

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 462**

51 Int. Cl.:
A61K 35/20 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 31/7052 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02732207 .2**
96 Fecha de presentación: **17.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1399108**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2004**

54 Título: **Preparación de una composición terapéutica**

30 Prioridad:
17.01.2001 US 764017

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2012

73 Titular/es:
OHR Pharmaceutical, Inc.
1245 East Brickyard Road, Suite 590
Salt Lake City, UT 84106, US

72 Inventor/es:
FRIEDLAND, Bernard;
HIRSCHMAN, Shalom Z. y
TARAPOREWALA, Irach B.

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 379 462 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación de una composición terapéutica

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un nuevo polipéptido útil como un modulador inmunitario para tratar diversas infecciones víricas y enfermedades del sistema inmunitario.

2. Descripción de la técnica relacionada

10 El concepto de un agente antivírico compuesto de peptonas, péptidos, proteínas y ácido nucleico se originó en 1934. Después de algunos años de experimentación, tal agente antivírico se modificó usando seroalbúmina bovina en combinación con peptona, un ácido ribonucleico para producir un agente biótico antivírico que es no tóxico, está libre de propiedades anafilactogénicas, y es miscible con fluidos tisulares y sueros sanguíneos. El agente usado se describe como un "compuesto de lipopéptido-ácido nucleico"¹, y se registró con la marca RETICULOSE® por Chemico Laboratories, Inc. Physician Desk Reference, p. 651, 1960. RETICULOSE® se ha dado a conocer como un agente antivírico para tratar una variedad de infecciones víricas humanas, tales como gripe, herpes, hepatitis A y B. Después se supuso que RETICULOSE® actúa como un agente antivírico al menos incrementando la leucogénesis, la síntesis de anticuerpos, y potenciando la fagocitosis. Finalmente, RETICULOSE® se vendió en los Estados Unidos de América en 1964.

El método para obtener RETICULOSE® se ha mantenido como un secreto industrial por el fabricante hasta la expedición de la patente U.S. 5.849.196, que describe el método para obtener RETICULOSE®.

20 Como se describe en la patente U.S. 5.849.196, los materiales de partida para obtener RETICULOSE® consisten, en peso, en 40-50% de caseína, 1-10% de albúmina sanguínea, 15-40% de peptona de carne de vacuno, 10-25% de ARN y 5-25% de hidróxido sódico. Estos materiales de partida se suspendieron en agua, que produce una relación de proteínas (caseína, peptona y albúmina sanguínea) a agua igual a alrededor de 4,3 a alrededor de 100 en peso. Después de un tratamiento con autoclave de la mezcla de los materiales de partida, la disolución resultante se filtra y el pH se ajusta a aproximadamente 8,5 y después a 7,8, después de lo cual la disolución neutralizada se filtra nuevamente. El pH se ajusta adicionalmente hasta aproximadamente 7,5 después de que se diluye la disolución. Tal procedimiento produce una mezcla de péptidos y ácidos nucleicos que tienen pesos moleculares en un intervalo de aproximadamente 1 a 25 kDa.

30 Como enseña la patente U.S. 5.849.196, los componentes de alrededor de 15 kDa de la composición convencional de RETICULOSE® son más eficaces tratando enfermedades víricas tales como VIH, el virus de la gripe, el virus del herpes simple, etc., mientras que los componentes en un intervalo de aproximadamente 1 a 15 kDa funcionan como inhibidores de la fagocitosis.

35 Sin embargo, los métodos convencionales sufren varias desventajas: 1) el método no asegura que cada preparación produzca los componentes acabados con la misma relación, y de ese modo el producto no es reproducible; 2) el método convencional produce un amplio intervalo de componentes acabados, lo que hace extremadamente difícil, si es posible, el control de calidad de la preparación, debido a que es necesario determinar demasiados parámetros; 3) la presencia de los componentes de mayor peso molecular, tales como el componente de 25 kDa, esencialmente péptidos, aumenta el riesgo de hipersensibilidad o de reacción inmunitaria, y hace al producto menos estable. Por lo tanto, es deseable tener un producto desprovisto de las deficiencias de RETICULOSE® convencional, a la vez que mantenga sus propiedades terapéuticas. También es deseable identificar y aislar ingredientes o componentes activos de tal producto de forma que el modo de acción del Producto R se puede estudiar posteriormente y se pueden desarrollar nuevos agentes terapéuticos.

SUMARIO DE LA INVENCION

45 En consecuencia, un objeto de la presente invención se refiere a un nuevo péptido identificado y aislado de la composición Producto R que se describe en la solicitud de patente U.S. Serie Número 09/344.095.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un nuevo péptido que muestra efecto terapéutico.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a los usos terapéuticos del nuevo compuesto peptídico para tratar enfermedades tales como infecciones víricas o trastornos del sistema inmunitario.

50 Otros objetos y características de la presente invención serán manifiestos a partir de la siguiente descripción detallada considerada en conjunto con los dibujos que se acompañan. Sin embargo, se ha de entender que los dibujos se diseñan simplemente con fines ilustrativos y no como una definición de los límites de la invención, para la cual se ha de hacer referencia a las reivindicaciones anejas. Se debería entender además que los dibujos no están dibujados necesariamente a escala, y que, excepto que se indique de otro modo, están destinados simplemente a ilustrar conceptualmente las estructuras y procedimientos descritos aquí.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En los dibujos:

La Figura 1 muestra un perfil de absorción ultravioleta representativo del Producto R;

5 la Figura 2 muestra un cromatograma representativo del Producto R obtenido a partir de un análisis de HPLC de fase inversa;

la Figura 3 muestra un perfil de fraccionamiento de BioGel P-2 del Producto R;

la Figura 4 muestra los componentes de la fracción I del perfil de fraccionamiento de BioGel P-2 resueltos en una electroforesis de 16% de SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);

10 la Figura 5 muestra la masa relativa (Mr) de los dos componentes peptídicos principales del Producto R resueltos en 16% de SDS-PAGE;

la Figura 6 es un 16% de SDS-PAGE, que muestra los efectos de una variedad de enzimas catabólicas sobre el Producto R;

la Figura 7 es un histograma citométrico de flujo, que muestra el efecto del Producto R sobre la fagocitosis de Dextrano-FITC;

15 la Figura 8 es un histograma citométrico de flujo, que muestra el efecto del Producto R sobre la fagocitosis de Dextrano-BoDipyFL;

la Figura 9 es un espectro de RMN de protón del Péptido A;

la Figura 10 es un espectro de HSQC de carbono/hidrógeno del Péptido A;

la Figura 11 es un espectro de RMN de protón del Péptido B;

20 la Figura 12 es un espectro de RMN de fósforo 31 del Péptido B;

la Figura 13 es un espectro de HSQC de carbono/hidrógeno del Péptido B;

la Figura 14 es un espectro de RMN de C-13 del Péptido B;

la Figura 15 muestra la estructura del Péptido B;

la Figura 16 muestra la naturaleza del enlace entre serina 18 y el dinucleótido en el Péptido B;

25 la Figura 17 muestra la estructura general de un péptido enlazado con un dinucleótido;

la Figura 18 es un dato espectral de masas para el Péptido B;

la Figura 19 muestra el efecto de la concentración del componente peptídico del Producto R sobre la secreción de IL-8 y MCP-1 por células U937; y

30 la Figura 20 muestra el efecto de los péptidos A y B, aislados del Producto R, sobre la secreción de IL-8 y MCP-1 por células U937.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN ACTUALMENTE PREFERIDA

Preparación del Producto R

Generalmente, el Producto R se prepara de acuerdo con la siguiente manera.

35 En primer lugar, los materiales de partida caseína, peptona de ternera, ARN, BSA, e hidróxido sódico, se suspenden en proporciones de, en peso, 35-50% (caseína), 15-40% (peptona de carne de vacuno), 10-25% (ARN), 1-10% (BSA) y 5-25% (hidróxido de sodio) en un volumen apropiado de agua destilada. Todos los materiales de partida están generalmente disponibles, o de otro modo se pueden preparar fácilmente por una persona de pericia normal en la técnica. Aunque cualquier ARN es adecuado para el fin pretendido de la presente invención, se prefiere ARN vegetal, y el más preferido es ARN de levadura. La relación de proteínas totales frente al volumen de agua destilada es generalmente alrededor de 1,5-2,5 a alrededor de 100 en peso, preferiblemente alrededor de 2,2 a alrededor de 40 100 en peso. Esto significa que cada 1,5-2,5 gramos de las proteínas totales están suspendidos en alrededor de 100 mililitros de agua destilada.

Todos los materiales de partida están generalmente disponibles en el comercio, o se pueden preparar fácilmente por una persona de pericia normal en la técnica.

5 La suspensión como se prepara anteriormente se somete entonces a autoclave a una presión de aproximadamente 5-15 lbs., preferiblemente 8-10 lbs., a una temperatura elevada en un intervalo de, por ejemplo, alrededor de 150-300°F, preferiblemente alrededor de 200-230°F, durante un período de aproximadamente 2-10 horas, preferiblemente más de 3 horas. Como es conocido por una persona de pericia normal en la técnica, en tales condiciones el ARN se puede hidrolizar completamente en nucleótidos. Después de someter a autoclave, la disolución se enfría hasta la temperatura ambiente, y después se deja que permanezca a una temperatura de 3 a 8°C durante al menos 12 horas para precipitar elementos insolubles. Como alternativa, la disolución enfriada se puede centrifugar a una temperatura por debajo de 8°C, para eliminar los precipitados.

10 La disolución resultante se filtra entonces a través de filtros de 2 micrómetros y 0,45 micrómetros en un gas inerte, tal como nitrógeno o argón, a una presión de alrededor de 1-6 psi. De manera similar, la disolución se filtra nuevamente a través de un filtro de retención pirógeno, preferiblemente 0,2 micrómetros.

Después de la filtración anterior, la disolución se puede enfriar a 3 a 8°C nuevamente durante al menos alrededor de 12 horas, y se puede filtrar nuevamente de la misma manera como se describe anteriormente.

15 El filtrado resultante se ensaya entonces para determinar el contenido de nitrógeno total usando métodos conocidos por una persona de pericia normal en la técnica, tal como el método de Kjeldahl, J.G.C.D. Kjeldahl, Z. Anal. Chem., Vol. 22, p. 366 (1883), y sus mejoras. Basándose en el ensayo, el filtrado se diluye entonces con agua destilada enfriada hasta un volumen apropiado, que tiene un contenido total de nitrógeno preferido que oscila de 165 a 210 mg/ml.

20 El pH de la disolución diluida se ajusta entonces con HCl hasta un pH fisiológicamente aceptable, preferiblemente hasta alrededor de 7,3 a 7,6, después de lo cual la disolución diluida se filtra nuevamente a través de un filtro de 0,2 micrómetros en un gas inerte como se describe anteriormente.

25 El Producto R así producido contiene esencialmente nucleótidos, nucleósidos y bases de ácidos nucleicos libres de bajos pesos moleculares procedentes de una hidrólisis completa de ARN, y pequeños péptidos procedentes de la hidrólisis parcial de las proteínas. Es posible que la hidrólisis básica de las proteínas también produzca aminoácidos libres.

Se entiende que el uso de la técnica de filtración es esencialmente para eliminar bacterias u otras partículas que tienen un tamaño similar a o un tamaño mayor que las bacterias. De este modo, para el fin pretendido, es adecuado cualquier filtro, independientemente de su fabricante o del material del que esté hecho. Todos los filtros usados en el presente procedimiento están ampliamente disponibles para una persona de pericia normal en la técnica.

30 El filtrado final se introduce entonces y se encierra en viales apropiados, tales como viales de vidrio de 2 ml o 10 ml bajo un gas inerte. Los viales llenos se someten a autoclave para la esterilización final, después de lo cual están listos para uso.

35 En uso, el Producto R se administra parenteral o tópicamente a un paciente que lo necesite como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. 5.807.839, 5.807.840 y 5.902.786, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Sin embargo, los usos del Producto R no están limitados a los descritos en las patentes anteriores.

40 Un análisis de la composición de Producto R revela que el Producto R contiene dos componentes principales, que son mostrados como dos bandas que tienen pesos moleculares de 5,2 kDa y 4,3 kDa en una electroforesis en SDS-gel de poli(acrilamida), a saber, el péptido A y el péptido B, respectivamente. El péptido A es un nuevo péptido único, y el péptido B comprende un péptido único unido covalentemente a un oligonucleótido. Estos dos componentes están en una cantidad relativamente igual en peso.

45 El análisis funcional de estos dos componentes demostró que ambos eran capaces de inducir la producción de interleucina 8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica 1 de monocitos (MCP-1) en células U937, mientras que el péptido B contribuye más a la actividad que el péptido A. La actividad combinada de estos dos componentes es comparable con el Producto R, indicando que estos dos componentes de péptido-nucleótido son probablemente los ingredientes clave responsables de todas las actividades biológicas del Producto R.

Caracterización del Producto R

50 El espectro de absorción ultravioleta: La Figura 1 es un espectro de absorción ultravioleta representativo del Producto R medido en una microcubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de recorrido (100 µl de capacidad) usando un espectrofotómetro UV-VIS modelo UV-1201 de Shimadzu. El Producto R se diluyó 100 veces con agua destilada. El espectro se registra entre 220-320 nm, y muestra una absorción máxima a 260 nm y un valle a 235 nm. La relación de la absorbancia (A) a 260 nm con respecto a la absorbancia a 280 nm es 1,998 (± 10%), y A a 260 nm con respecto a A a 230 nm es 1,359 (± 10%).

55 El perfil de HPLC: La Figura 2 es un cromatograma representativo del Producto R obtenido de un análisis de HPLC de fase inversa usando un sistema de HPLC Hewlett Packard 1100 HPLC (Hewlett Packard Co.) que incluye una

bomba binaria (Modelo G1312A), un detector de conjunto de diodos (Modelo G1315A), un termostato de columna (Modelo G1316A), un muestreador termostatzado (Modelo G1329A), un termostato para muestra y un desgasificador de vacío (Modelo G1322A); y una columna YMC-pack ODSAQ S-5 μ M de acero inoxidable (YMC, Inc. 3223 Burnt Mill Dr., Wilmington, NC 28403) que tiene un tamaño de 250 x 10 mm ID y un tamaño de poros de 120 Å. La fase móvil que consiste en ácido acético 0,1 M:trietilamina se prepara según lo siguiente: se disuelven 6,0 ml de ácido acético glacial en 1000 ml de agua de grado HPLC. La disolución agitada de ácido acético se valora con trietilamina hasta pH 4,8. La disolución se deja equilibrar toda la noche a temperatura ambiente, y después se filtra a través de un filtro de 52 mm de diámetro y 0,45 μ m de tamaño de poros. El pH de la disolución se reajusta hasta pH 4,8 si es necesario con la adición de trietilamina antes del uso. La fase móvil se desgasifica mediante el desgasificador de vacío añadido al sistema de flujo de HPLC. Se inyectan 8 μ l de muestra de Producto R, por medio de un automuestreador, en la columna que tiene un ajuste de temperatura a 30°C para cada inyección. La muestra se eluye entonces isocráticamente de la columna con una fase móvil de ácido acético 0,1 M:trietilamina (pH 4,8) a un caudal de 1 ml por minuto a una presión de bomba de 92-102 bares. Los cromatogramas (absorbancias de UV a 260 nm) se llevan a cabo a 160 minutos por muestra, y los datos se recogen mediante el detector de conjunto de diodos y se analizan entonces usando el software de Hewlett-Packard HPLC ChemStation. Se generan representaciones gráficas, y se lleva a cabo un análisis estadístico usando el programa SigmaPlot. La HPLC de fase inversa en tales condiciones da como resultado 13 picos característicos de HPLC: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L y M, cada una de las cuales tiene un perfil de absorción de UV característico (datos no mostrados).

El perfil de filtración en gel de BioGel P-2: La Figura 3 muestra un perfil de fraccionamiento del Producto R en una columna BioGel P-2 (Bio-Rad Laboratories Inc.) que tiene un tamaño de 2,6 cm x 55 cm de tamaño empaquetado. Después de cargar el Producto R en la columna, la columna se eluyó con 0,1X PBS, preferiblemente PBS de DULBECCO, libre de ion calcio (Ca^{++}) e ion magnesio (Mg^{++}), a un caudal de 0,5 mililitros por minuto. 1X PBS contiene 1,47 mM de KH_2PO_4 , 2,67 mM de KCl, 138 mM de NaCl y 8,1 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El eluyente pasa a través de un monitor "Uvcord SII", que está unido a un registrador de diagrama REC 101 y está ajustado con un filtro de 254 nm, y se recoge a 12 minutos por fracción en un colector de fracciones "Frac 200". La cromatografía de filtración en gel en tales condiciones da como resultado 9 fracciones: I, Ia, II, IIa, IIb, III, IIIa, IV e IVa. Cada pico individual se compara con nucleótidos, nucleósidos y bases de ácidos nucleicos libres conocidos, eluidos al mismo volumen o a volúmenes muy próximos de las fracciones respectivas como se muestra en la TABLA I. En la columna de Observaciones se muestran compuestos conocidos que tienen valores comparables.

TABLA I

Pico	Valor experimental				Observaciones
	λ_{max}	λ_{min}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	
Pico I	~275 nm	~255 nm	0,976	0,300	Mayoritariamente péptidos y conjugados peptídicos
Pico Ia	~260 nm	~240 nm	1,636	0,943	Nucleoproteína y/peptide ácido nucleico
Pico Is	~270 nm	~245 nm	1,258	0,939	El componente principal es CMP
Pico II α	~260 nm	~230 nm	2,893	3,12	Los componentes principales son AMP, UMP
Pico III β	~250 nm	~225 nm	1,509	1,988	El componente principal es GMP
Pico IIa	~250 nm	~230 nm	1,257	1,176	Componentes mixtos
Pico IIb	~270 nm	~250 nm	1,142	0,941	El componente principal es Citidina
Pico III	~260 nm	~230 nm	2,695	3,664	El componente principal es Uridina
Pico IIIa	~260 nm	~225 nm	5,15	4,24	Los componentes principales son Uracilo, Adenosina
Pico IV	~260 nm	~225 nm	5,406	3,892	El componente principal es Adenina
Pico IVa	~245 nm	~225 nm	1,016	1,285	El componente principal es Guanina

Las fracciones se concentran entonces y se analizan mediante SDS-PAGE (véase lo siguiente) en un gel al 16%. La tinción del gel con plata demuestra que sólo la fracción I muestra esencialmente dos bandas principales teñibles con plata que tienen pesos moleculares aparentes de 4,3 kDa, 5,2 kDa y una banda minoritaria de 7,6 kDa, como se muestra en la Figura 4.

La masa relativa (M_r): La Figura 5 muestra la masa relativa (medida del peso molecular) de los dos componentes peptídicos principales del Producto R resuelto en electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida al 16% (SDS-PAGE) y teñido mediante tinción con plata usando el kit de tinción "SilverXpress" de NOVEX, siguiendo el protocolo sugerido

5 por el fabricante. El Producto R se resuelve en dos bandas principales teñibles con plata que tienen un peso molecular aparente de alrededor de 4,3 y alrededor de 5,2 kDa. También es visible un componente minoritario teñible con plata que tiene un peso molecular de alrededor de 7,6 kDa en gel de SDS-PAGE sobrecargado, y puede haber cantidades en trazas de otros péptidos teñibles con plata que tienen pesos moleculares que oscilan desde alrededor de 5 kDa hasta alrededor de 14 kDa. El azul de Coomassie, un tinte universal para proteínas, tiñe muy mal a la banda de 4,3 kDa. Las tres bandas, 4,3 kDa, 5,2 kDa y 7,6 kDa, constituyen más de alrededor del 90% de los péptidos. De este modo, el Producto R consiste esencialmente en moléculas que tienen pesos moleculares por debajo de 8 kDa.

10 La TABLA II muestra la composición de aminoácidos de los componentes de 5,2 kDa y 4,3 kDa. El análisis de aminoácidos de la banda de 5,2 kDa (muestra A) y de la banda de 4,3 kDa (muestra B) se llevó a cabo en un analizador PE Bio-system 420 con hidrólisis automática usando química estándar de isotiocianito de fenilo (PTIC).

TABLA II

Aminoácido	Muestra A	Muestra B
	Res/mol	Res/mol
As(x)	1,01	2,03
Gl(x)	4,98	1,97
Ser	0,00	2,02
His	0,00	0,00
Gly	0,99	3,99
Thr	0,00	0,00
Ala	2,01	0,99
Arg	1,03	1,03
Tyr	2,04	2,05
Val	4,01	3,02
Met	1,02	0,00
Trp	0,00	0,00
Phe	1,05	1,02
Ile	1,03	1,98
Leu	3,98	0,00
Lys	2,01	0,00
Pro	5,97	0,97

15 Las propiedades bioquímicas de los péptidos: Se analizaron algunas propiedades bioquímicas de los componentes peptídicos teñibles con plata del Producto R usando diversas enzimas catabólicas, como se describe a continuación:

20 El tratamiento con proteinasa K (ICN Biochemicals): La proteinasa K es una proteasa de amplio espectro no específica que escinde enlaces peptídicos en el C-terminal de aminoácidos alifáticos, aromáticos e hidrófobos. Puede escindir todos los péptidos séricos completamente a 50 µg/ml en una hora. Se incubó una muestra de Producto R en un tampón de reacción que tiene 10 mM de Tris-HCl, pH 7,6; 0,5% de SDS; 1 mM de CaCl₂; 100 µg/ml de proteinasa K a 40°C durante 30 minutos, y después se sometió a SDS-PAGE en un gel al 16% como se describe anteriormente. En tal condición, la tinción con plata del Producto R no muestra cambio significativo. Sin embargo, cuando la cantidad de proteinasa K se incrementa hasta 800 µg/ml y el tiempo de incubación se prolonga hasta una hora, la banda de 5,2 kDa desaparece, pero no hay cambio obvio en la banda de 4,3 kDa.

25 El tratamiento con tripsina (Boehringer Mannheim, USA): La tripsina es una serina proteasa, que escinde específicamente enlaces peptídicos de lisina y arginina en el C-terminal a pH 7,5-9,0. Se incubó una muestra

de Producto R en un tampón de reacción que tiene 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 0,1% de SDS y 250 µg/ml de tripsina de grado de secuenciación a 25°C durante 19 horas, y después se somete a SDS-PAGE en un gel al 16%. Aunque las proteínas séricas se romperán en péptidos más pequeños que 4,3 kDa en tales condiciones de reacción, ninguno de los componentes del Producto R teñidos con plata se ven afectados por la tripsina.

5 El tratamiento con quimiotripsina (Boehringer Mannheim, USA): La quimiotripsina es una serina proteasa que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos de tirosina, fenilalanina y triptófano en los C-terminales. También escinde enlaces peptídicos de leucina, metionina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico en los C-terminales a velocidades relativamente menores. Se incubó una muestra de Producto R en un tampón de
10 reacción que contiene 100 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM de CaCl₂ y 250 µg/ml de quimiotripsina de grado de secuenciación a 25°C durante 19 horas, y después se somete a SDS-PAGE en un gel al 16%. El tratamiento con quimiotripsina reduce significativamente la intensidad de las bandas de 5,2 kDa y 7,6 kDa, pero no tiene efecto aparente sobre la banda de 4,3 kDa.

15 El tratamiento con pronasa (Boehringer Mannheim, USA): La pronasa es una proteasa no específica, actúa tanto en proteínas nativas como desnaturalizadas. Rompe virtualmente todas las proteínas en sus aminoácidos individuales. La preparación contiene diversos tipos de endopeptidasas tales como serina y metaloproteasas, exopeptidasas tales como carboxipeptidasas, proteasa neutra y fosfatasa alcalinas y neutras. Se incubó una muestra de Producto R en un tampón de reacción que contiene 100 mM de Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM de CaCl₂; 0,1% de SDS y 2 mg/ml de pronasa procedente de *S. griseus* a 40°C durante 75
20 minutos, y después se somete a SDS-PAGE en un gel al 16%. Todos los componentes teñidos con plata desaparecieron después de tal tratamiento de pronasa.

25 El tratamiento con N-glucosidasa F (Boehringer Mannheim, USA): La N-glucosidasa F escinde todos los tipos de N-glucanos unidos a asparagina, con la condición de que el grupo amino y el grupo carboxilo estén presentes en un enlace peptídico y el oligosacárido tenga la longitud mínima de la unidad central de quitobiosa. Se incubó una muestra de Producto R en un tampón de reacción que contiene 0,4X de PBS de Dulbecco (en el que 1X PBS contiene 1,47 mM de KH₂PO₄, 2,67 mM de KCl, 138 mM de NaCl y 8,1 mM de Na₂PO₄ 7H₂O), 0,1% de SDS, 0,5% de NP40 y 50 unidades/ml de N-glucosidasa F recombinante a 37°C durante 4 horas, y se somete a SDS-PAGE en un gel al 16%. El tratamiento con N-glucosidasa F no altera la intensidad de ninguna de las bandas del Producto R en el gel de SDS al 16%. La resistencia a N-glucosidasa F indica la falta de N-glucano unido a asparagina, que se observa habitualmente en glucoproteínas.

30 El tratamiento con ribonucleasa A (ICN Biochemicals, USA): La ribonucleasa A es una endorribonucleasa específica de pirimidina que actúa sobre ARN monocatenario. Se incubó una muestra de Producto R en un tampón de reacción que contiene 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 3 mM de MgCl₂, y 1 mg/ml de ribonucleasa A pancreática bovina a 37°C durante alrededor de 1 hora, y se somete a SDS-PAGE en un gel al 16%. La
35 ribonucleasa A no altera la intensidad de ninguna de las bandas del Producto R resueltas por el gel de SDS-PAGE al 16%. La resistencia a ribonucleasa A excluye la posibilidad de la presencia de un fragmento de ARN unido al péptido.

40 El tratamiento con fosfatasa alcalina (Life Technologies, USA): La fosfatasa alcalina de timo de ternera (CIAP) es una fosfomonoesterasa que hidroliza los grupos 5'-fosfato de ADN, ARN y nucleótidos. Se incubó una muestra de Producto R en un tampón de reacción proporcionado por el fabricante de la enzima y 200 unidades/ml de CIAP a 37°C durante alrededor de una hora, y se somete a SDS-PAGE en un gel al 16%. CIAP no altera la intensidad de ninguna de las bandas del Producto R resueltas por SDS-PAGE.

En la siguiente TABLA III se proporciona un resumen de los tratamientos descritos anteriormente mediante enzimas catabólicas, y los resultados del tratamiento se muestran en la Figura 5, en la que “-” representa ninguna alteración sustancial de las bandas teñibles, y “+” representa una alteración sustancial de las bandas teñibles.

45 TABLA III

Sensibilidad enzimática de los componentes peptídicos del Producto R (SDS-PAGE)			
	4,3 kDa	5,2 kDa	7,6 kDa
Proteinasa K (100 µg/ml)	-	+/-	?*
800 µg/ml)	-	+	?*
Tripsina (250 µg/ml)	-	-	-
Quimiotripsina (250 µg/ml)	-	+	+
Pronasa (2 mg/ml)	+	+	+

N-glucosidasa F (50 unidades/ml)	-	-	-
Ribonucleasa A (1 mg/ml)	-	-	-
Fosfatasa alcalina (200 unidades/ml)	-	-	-

* Esta banda no está claramente identificada debido a la presencia de los fragmentos enzimáticos en esa región.

La complejidad de estos patrones de digestión enzimática sugiere que los componentes peptídicos del Producto R se pueden conjugar con otras moléculas tales como mononucleótidos y/o hidratos de carbono, o se pueden reticular intra/intermolecularmente.

5 Electroforesis en gel de ARN: Ni la electroforesis en gel de agarosa ni en gel de poliacrilamida para ácidos nucleicos genera bandas teñibles con bromuro de etidio, indicando que no hay fragmentos de ARN en el Producto R.

El efecto del Producto R sobre la fagocitosis

10 Las Figuras 7 y 8 son histogramas citométricos de flujo que representan la fluorescencia asociada a las células, que muestran el efecto del Producto R sobre la fagocitosis de Dextrano-FITC o Dextrano-BoDipyFL después de 24 horas y 8 días del tratamiento del Producto R, respectivamente. Los efectos del Producto R sobre la fagocitosis se ensayan usando una estirpe celular monocítica humana, U937. Las células U937 se cultivan en un medio que tiene 5% de Producto R, o 5% de PBS como control, durante 24 horas antes del ensayo de Dextrano-FITC, u 8 días antes del ensayo de Dextrano-BoDipyFL. Para medir la fagocitosis, las células se alimentan continuamente con un marcador fagocítico, tal como Dextrano-FITC marcado fluorescentemente, durante 5, 15, 30 y 45 minutos como se indica en la Figura 5, o Dextrano-BoDipyFL durante 5, 15, 25 y 40 minutos como se indica en la Figura 6, a 37°C. La cantidad de fluorescencia asociada a las células tras la captación fagocítica se monitoriza usando análisis de citometría de flujo esencialmente según el método descrito por Sallusto, F. et al. (1995), J. Exp. Med., 182:389-400, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. En estos ensayos, los valores del fondo se han restado de aquellos de las muestras experimentales, y las células muertas se han excluido de los datos usando exclusión con yoduro de propidio.

25 Cada una de las Figuras 7 y 8 muestra una superposición del log de la fluorescencia frente al número de células para el control de PBS (púrpura) el tratamiento de Producto R (verde) y el Dextrano de fondo que se une a las células (negro). Las curvas púrpuras (control de PBS) están solapadas sustancialmente con las curvas verdes (Producto R) en cada punto de tiempo, indicando que el Producto R no inhibe la fagocitosis de células monocíticas humanas.

30 Otras funciones biológicas del Producto R: En las patentes U.S. n^{os} 5.807.840, 5.807.839 y 5.902.786, y en las solicitudes de patentes U.S. Series n^{os} 08/838.077, 08/838.069, 08/835.793, 08/835.794, 08/833.950, 08/837.992, 08/837.988, 08/838.070, 08/834.190, 08/835.791, 08/838.134, 08/839.651, 08/835.796, 08/964.250, 08/964.427, 08/923.516, 08/923.343, 08/922.888, 09/189.172, 09/007.565, 09/316.624, 09/316.374, 09/257.739 y en la publicación de Hirschman et al., J. Investig. Med. 1996; 44:347-351, se han descrito algunas de otras funciones biológicas conocidas del Producto R. Estas patentes, solicitudes de patentes y publicación se incorporan aquí como referencias en sus totalidades.

Conclusiones

35 De este modo, se determina que la composición del Producto R preparado según los presentes métodos descritos comprende nucleótidos y péptidos que tienen pesos moleculares no mayores que 14 kDa, principalmente no mayores que 8 kDa. Los componentes peptídicos del Producto R están distribuidos de manera no uniforme, y están localizados típicamente en dos bandas principales teñibles con plata, que tienen pesos moleculares de 4,3 kDa, 5,2 kDa, y una banda minoritaria de 7,6 kDa.

40 El espectro de absorción de UV del Producto R muestra típicamente una absorción máxima a 260 nm y un valle a 235 nm, y las relaciones características de la absorbancia a 260 nm con respecto a la absorbancia a 280 nm es 1,998, y a 260 nm con respecto a 230 nm es 1,359.

El perfil de HPLC del Producto R comprende fracciones de A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L y M, como se muestra en la Figura 2.

45 El perfil de filtración en gel de BioGel P-2 del Producto R comprende las fracciones de I, Ia, II, IIa, IIb, III, IIIa, IV e IVa, como se muestra en la Figura 3.

Comparación entre la composición convencional de Reticulose® y Producto R

La composición de Producto R según se obtiene de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se

compara con la composición convencional de RETICULOSE® con respecto a sus pesos moleculares (MW) y absorbancias (A) de ultravioleta (UV) a longitudes de onda de 230 nm, 260 nm y 280 nm, como se muestra en la TABLA IV. Aunque se ha dado a conocer que los componentes que tienen pesos moleculares por debajo de 15 kDa de RETICULOSE® inhiben la fagocitosis, la presente solicitud demuestra que el Producto R no inhibe la fagocitosis.

5

TABLA IV

	MW	UV		I/PH*
		A _{260/280}	A _{260/230}	
Producto R	< 14 KDa	1,998	1,359	No
RETICULOSE®	1 - 25 KDa	2,839	1,198	Sí

* Inhibición de fagocitosis por moléculas que tienen un peso molecular por debajo de 15 kDa.

De este modo, el Producto R difiere sustancialmente de RETICULOSE® en su composición y funciones biológicas.

La TABLA V es una comparación entre las cantidades relativas de los materiales de partida usados para las preparaciones de la presente composición terapéutica Producto R y la composición convencional RETICULOSE®.

10

TABLA V

MATERIALES DE PARTIDA PARA LA REACCIÓN INICIAL EN DIEZ LITROS	RETICULOSE®	Producto R
caseína gramos	250 gramos	140
peptona de carne de vacuno en gramos	150 gramos	68,4
seroalbúmina en gramos	15 gramos	13
ARN en gramos	80 gramos	88
NaOH en gramos	75 gramos	66

Se usan alrededor de 221 gramos de proteínas en la reacción inicial para la preparación de Producto R, mientras que se usan alrededor de 415 gramos para la preparación de RETICULOSE®. De este modo, la concentración proteica inicial para la preparación de RETICULOSE® es dos veces aquella para la preparación del Producto R.

15

Para estudiar adicionalmente las estructuras y actividades de la composición del Producto R, se aislaron y purificaron los dos componentes peptídicos principales, a saber, el péptido de 5,2 kDa (en lo sucesivo "péptido A") y el péptido de 4,3 kDa (en lo sucesivo "péptido B"). Se desarrolló un método para resolver la mezcla del Producto R y purificar cada uno de los dos péptidos. Esto implicó la filtración en gel, seguido de una liofilización, filtración centrífuga y diálisis. Esto produjo muestras de péptido A y Péptido B adecuadas para procedimientos de secuenciación y estudios estructurales mediante RMN y espectroscopía de masas. El péptido A y el péptido B están presentes en la composición del Producto R en una cantidad aproximadamente igual, y la cantidad total de estos dos péptidos es alrededor de 4,8-5,3 mg/ml, determinada mediante un ensayo de proteínas de Lowry.

20

Purificación de péptidos del Producto R

25

El Producto R (6 ml) se liofilizó, y la torta de liofilización se disolvió en un volumen total de 1,5 ml de agua Nanopure para obtener una concentración 4X. Una columna de BioGel P-b (16 x 51 cm) se equilibró con 0,05X de disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (PBS). El Producto R concentrado se aplicó a la columna. La columna se eluyó con 0,05X PBS, y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones se ensayaron para determinar la presencia de Péptido A y Péptido B mediante la técnica de electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguido de la tinción del gel con plata.

30

Las fracciones que contienen el Péptido A se reunieron, y después se liofilizaron. Las fracciones que contienen el Péptido B no estaban completamente libres de Péptido A. Las fracciones que contienen >80% de Péptido B se reunieron y liofilizaron. El procedimiento anterior se repitió varias veces hasta que se obtuvieron cantidades suficientes de péptidos individuales para estudios estructurales.

Los conjuntos combinados de Péptido A liofilizado se disolvieron en agua Nanopure, se concentraron y se

purificaron adicionalmente mediante centrifugación a través de un montaje de filtro Centriplus 3 (MWCO-3 kDa) (Millipore Corporation, USA). El contenido proteico del concentrado se evaluó usando el kit de ensayo de proteína BioRad DC. Se volvió a examinar la pureza del Péptido A mediante SDS-PAGE, y la muestra se liofilizó y la torta de liofilización se almacenó refrigerada a 4°C hasta su uso para estudios estructurales.

5 Los conjuntos combinados de Péptido B liofilizado se disolvieron en un pequeño volumen de agua Nanopure, se dializaron frente a 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4 en un Spectra/Por Dispo Dialyzer (MWCO-1kDa), obtenido de Spectrum Microgen, USA. El contenido proteico y la pureza del Péptido B en el dializado se evaluó mediante uso del kit de ensayo de proteína de BioRad DC y mediante SDS-PAGE, como se menciona para el Péptido A. El dializado se liofilizó, y la torta de liofilización del Péptido B se almacenó refrigerada a 4°C hasta uso para estudios estructurales.

El Péptido A se analizó mediante espectroscopía de RMN, secuenciación N-terminal mediante el método de Edman, y mediante espectroscopía de masas.

15 La muestra de Péptido A estuvo disponible como una torta liofilizada tras la diálisis como se describe en la purificación de la Sección de Péptidos. Para los estudios de RMN, la muestra se disolvió en óxido de deuterio. Para estudios espectrales de masas, el material se disolvió en un tampón de PBS.

Análisis de RMN del Péptido A

Una muestra de 5,2 mg de Péptido A (ensayado mediante un ensayo de proteína total de Lowry) se disolvió en 0,5 ml de D₂O en un tubo de RMN de 5 mm. El tubo se mezcló con vórtice durante 30 segundos. El espectro se llevó a cabo en un instrumento Bruker de 300 MHz.

20 La RMN protónica del Péptido A en D₂O fue un espectro complejo típico de un polipéptido. En el espectro se observan tanto los restos alifáticos como aromáticos (Figura 9).

25 Un espectro de RMN de carbono ¹³C no se pudo obtener satisfactoriamente en la muestra debido a la baja concentración de la muestra. Sin embargo, se pudo obtener un espectro de 2D-HSQC (coherencia cuántica simple heteronuclear), que proporciona desplazamientos químicos de átomos de carbono para todos los átomos de carbono en la muestra salvo los átomos de carbono terciarios (aquellos que carecen de un átomo de hidrógeno unido, tal como grupos carbonilo) (Figura 10). Esto se llevó a cabo en un instrumento Bruker de 500 MHz con adquisición de datos toda la noche durante 12 horas. El experimento de HSQC bidimensional permite la correlación de un desplazamiento químico protónico con los desplazamientos químicos correspondientes de los átomos de carbono a los que están unidos los protones. Este experimento dio como resultado la elucidación del contenido de aminoácidos del Péptido A (véase la TABLA VI – correlaciones espectrales de HSQC – Péptido A). El espectro bidimensional de HSQC indicó la presencia de aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina, el iminoácido prolina, ácido aspártico, ácido glutámico, metionina, arginina, alanina, valina, glicina, isoleucina, leucina, lisina y glutamina como componentes del Péptido A. No se pudieron detectar triptófano, cisteína, serina, asparagina, histidina o hidroxiprolina.

35 Las asignaciones para los desplazamientos químicos de resonancia se realizaron en base a los datos de las siguientes fuentes: K. Wuthrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, John Wiley, 1986 y J.N.S. Evans, Biomolecular NMR Spectroscopy, Oxford University Press, 1995).

También se llevó a cabo un espectro de ³¹P en la muestra de Péptido A; un experimento nocturno de 12 horas no produjo señales de resonancia de fósforo. Por lo tanto, el Péptido A no es un péptido fosforilado.

40 TABLA VI – CORRELACIONES DEL ESPECTRO DE HSQC – PÉPTIDO A

PICOS CRUZADOS (ppm)

PROTÓN	CARBONO	ASIGNACIÓN
7,28	128,8	Cl Tyr
7,22	128,4	Cl Tyr
7,18	127,8	C2,6 Tyr
7,05	130,2	C4 Phe
6,75	115,7	C3,5 Tyr
4,60	55,2	-H Asp
4,52	54,1	-C Met

ES 2 379 462 T3

4,32	56,1	-C Glu
4,24	50,4	-C Ma
4,22	54,4	-C Arg
4,18	60,8	-C Val
3,87	43,0	-C Gly
3,55	48,3	-C Pro
2,24	30,3	β -C Pro
2,18	31,8	β -C Met
2,13	33,5	β -C Gln
1,74	36,7	β -C Ile
1,72	29,4	β -C Arg
1,48	40,0	β -C Leu
1,24	16,2	C Ile
0,88	18,5	-C Val
0,84	23,2, 21,6	-C Leu
0,80	10,9	-C Ile

Secuenciación peptídica N-terminal del Péptido A

Se llevó a cabo la secuenciación peptídica N-terminal del Péptido A mediante el análisis degradativo de Edman. La secuencia obtenida fue

5 KVLVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLG
o

**HZN-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-
Gln-Arg-Asp-MetPro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-GIn-Glu-
Pro-Val-Leu-Gly-OH**

10 Un examen de la base de datos de secuencias proteicas BLAST (disponible en línea de NCBI/NIH) para la comparación de secuencias proporcionó un emparejamiento exacto con esta secuencia, que corresponde a los restos de aminoácidos 178-208 en beta-caseína bovina, un péptido de 216 aminoácidos de longitud (A.F. Stewart, J. Bonsing, C.W. Beattie, F. Shah, I.M. Willis y A.G. Mackinlay, complete nucleotide sequences of bovine alpha-s2 and beta-casein cDNAs: Comparisons with related sequence in other species Mol. Biol. Evol. 4, 231-241 1987). Esta secuencia parece ser la secuencia correcta para el Péptido A, puesto que el Producto R deriva de caseína bovina.
15 Además, la composición de aminoácidos de esta secuencia coincide con los aminoácidos identificados como constituyentes del Péptido A en los estudios de RMN y en el análisis de aminoácidos.

La estructura peptídica tuvo seis restos de prolina separados y cuatro restos de glutamina básicos. Puesto que los restos de prolina en la cadena peptídica pueden inducir flexiones en una cadena peptídica, es probable que el Péptido A tenga una estructura muy plegada, lo que da cuenta de su elevada estabilidad química y su carácter refractario frente a proteasas y peptidasas.

20 Estudios espectrales de masas en el Péptido A

Se obtuvo un número de espectros de masas en muestras de Péptido A, procedentes de Borealis Laboratories y de Commonwealth Biotechnologies. Para adquirir los espectros de masas, se usaron métodos tanto de electropulverización como MALDITOE (ionización/desorción láser asistida por matriz – tiempo de vuelo).

La espectroscopía de masas de MALDI-TOF tuvo varias características que la hacen eficaz como un complemento a

5 las técnicas de secuenciación (K.R. Williams, S.M. Samandar, K.L. Stone, M. Saylor y J. Rush, MALDI-MS as a complement to internal protein sequencing., en: The Protein Protocols Handbook, J.M. Walker, ed., 1996, Humana Press, Totowa, NJ, p. 541-555). MALDI-MS tiene una elevada sensibilidad, y a menudo resuelve fragmentos que representan la escisión de enlaces peptídicos consecutivos en una estructura peptídica, permitiendo la
 10 secuenciación y/o confirmación de secuencias detectadas por el protocolo de secuenciación N-terminal de Edman. MALDI-MS da típicamente exactitudes de masas de +0,25% en los iones másicos, lo que es satisfactorio para realizar asignaciones.

La tabla a continuación (TABLA VII) muestra fragmentos másicos obtenidos en el Péptido A que son consistentes con la estructura peptídica de 31 aminoácidos descrita anteriormente. Los fragmentos másicos observados también confirman que los restos de aminoácidos previamente ambiguos asignados a las posiciones 11, 15 y 20 del análisis de secuencia N-terminal de Edman son P, R y Q, respectivamente.

TABLA VII - DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE MASAS MALDI PARA EL PÉPTIDO A

Fragmento	ión Másico Esperado	ión Másico Observado
/MPIQAF/	688,87	690,3
/VPQKAVPY/	884,07	884,5 884,2
/DMPIQAFL-NH3	900,09	900,9
/AFLLYQEP-28	935,11	935,9
KVLPVPQKAV/	962,06	961,90
/PQKAVPYPQ-NH3	993,15	992,8
/PQKAVPYPQ/	1010,19	1009,3
/PIQAFLLYQ	1075,30	1075,70 1075,40
/LPVPQKAVPY/	1094,35	1095,70
/YPQRDMPIQ-NH3	1113,28	1112,1 1113,0
/PQKAVPYPQR-NH3	1149,34	1150,0
/PQKAVPYPQR/	1166,37	1166,80
/VPQKAVPYPQR-28	1237,50	1236,5
/PQKAVPYPQRD/	1281,46	1280,9
/MPIQAFLLYQE-28	1307,60	1308,20 1307,1
/VPQKAVPVYPQRD/	1380,60	1381,02 1380,05
/P1QAFLLYQEPV/	1400,67	1399,60
/DMP1QAFLLYQE-28	1422,69	1423,1
/KAVPYPQRDMPIQ-28	1497,81	1499,9
/MPIQAFLLYQEPV/	1503,42	1503,85 1503,42
/KAVPYPQRDMPIQ/	1525,82	1526,31

ES 2 379 462 T3

Fragmento	Íón Másico Esperado	Íón Másico Observado
/VPYPQRDMPIQAF-NH ₃	1527,79	1527,46
/MPIQAFLLTQEPV/	1531,86	1532,05
/PYPQRDMPIQAF-NH ₃	1541,82	1541,84
/VPYPQRDMPIQAF/	1544,82	1544,63
KVLPVPQKAVPYPQ/	1546,90	1545,32
/DMPIQAFLLYQEP/	1547,82	1549,47
/VPYPQRDMPIQAF/	1558,85	1560,28
/LPVPQKAVPYPQR/	1574,92	1575,22
/QRDMPIQAFLLY-NH ₃	1588,88	1589,0
/LPVPQKAVPYPQRD/	1590,87	1590,26
/QRDMPIQAFLLYQ/	1605,91	1606,05
/AVPYPQRDMPIQAF/	1615,90	1614,94
/DMPIQAFLLYQEPV-NH ₃	1629,92	1630,35
/PYPQRDMPIQAFLL-28	1644,00	1643,31
/PYPQRDMPIQAFLL/	1672,01	1673,13
/PYPQKAVPYPQRDMP/	1678,02	1678,15
/PQRDMPIQAFLLYQ-NH ₃	1685,99	1686,95
/QKAVPYPQRDMPIQA-28	1697,02	1698,67
/PVPQKAVPYPQRDMP/	1706,03	1706,7
/QKAVPYPQRDMPIQA/	1725,03	1725,6
/AVPYPQRDMPIQAF/	1729,06	1730,07
/QRDMPIQAFLLYQE/	1735,02	1735,57
VPYPQRDMPIQAFLL-NH ₃	1754,11	1755,83
/DMPIQAFLLYQEPVL/	1760,11	1762,11
/VPYQRDMPIQAFLL/	1771,14	1770,88
/LPVPQKAVPYPQRDMP/	1790,17	1789,61
/KVLPVPQKVPYPQRDM-NH ₃	1801,15	1799,50
/KVLPVPQKAVPYPQRD/	1818,16	1772,92 (-CO ₂ , -H)
/YPQRDMPIQAFLLYQ/	1866,20	1864,68
/QKAVPYPQRDMPIQAF/	1872,21	1874,98
/LPVPQKAVPYPQRDMP-28	1890,31	1890,61
/RDMPQAFLLYQEPVL-NH ₃	1899,27	1897,0
/PQRDMPIQAFLLYQEP/	1929,26	1929,92
/VPYPQRDMPIQAFLLY/	1934,32	1936,39
/QKAVPYPQRDMPIQAF/	1957,36	1955,81

Fragmento	Ión Másico Esperado	Ión Másico Observado
/PYPQRDMPIQAFLLYQ/	1963,32	1962,80
KVLPVPQKAVPYPQRDMPI/	2159,64	2207,32 (+2Na,+2H)
/AVPYPQRDMPIQAFLLYQE/	2262,69	2263,52
/PVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQ-28	2664,40	2664,36
/KAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVL/	2700,23	2724,23(+Na)
KVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVL/	3462,18	3462,67
KVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLG	3536,24	3536,84
		3583,48 (+2Na)

Por lo tanto, los datos espectrales de masas para el Péptido A son consistentes con la secuencia de 31 aminoácidos derivada de beta-caseína como se muestra anteriormente.

5 De este modo, el péptido A, un constituyente del Producto R, es un péptido de 31 aminoácidos de longitud derivado de beta-caseína bovina, con un peso molecular de 3536,24 Da. Es un péptido de cadena lineal que carece de reticulaciones cisteína-cisteína. La estructura es notable por seis restos de prolina separados a lo largo de la molécula y cuatro restos de glutamina básicos. Puesto que los restos de prolina pueden inducir flexiones en las cadenas peptídicas, es probable que la estructura sea un péptido muy plegado.

Estudios estructurales del Péptido B

10 El Péptido B se analizó mediante espectroscopía de RMN, secuenciación N-terminal mediante el método de Edman, secuenciación C-terminal, y mediante espectroscopía de masas.

15 La muestra de Péptido B purificada estuvo disponible como una torta liofilizada tras la diálisis, como se describe en la Sección 4.2. Para los estudios de RMN, la muestra se disolvió en óxido de deuterio. Para los estudios espectrales de masas, el material se disolvió en agua Nanopure o en 0,1 X de tampón PBS. El Péptido B también dio una reacción positiva para glucopéptido/nucleopéptido mediante tratamiento con peryodato y el marcaje con DIG-hapteno (Boehringer Mannheim). El Péptido B unido a DIG-hapteno se hizo reaccionar con anti-DIG-peroxidasa, y después se trató con TETON (4-trietilentrioxi-1-naftanol para producir un precipitado azul, indicando un resto de azúcar unido a la porción peptídica en un complejo glucopeptídico/nucleopeptídico.

Análisis espectral de RMN del Péptido B

20 El espectro de RMN de protón para Péptido B (Figura 11) muestra señales características de un compuesto peptídico, pero tiene picos atípicos adicionales en la región aromática del espectro, no típicos en aminoácidos aromáticos, y en la región entre la región de 5,7-6,05 ppm, que se asemejan a los de los protones aromáticos y restos de azúcar de ribosa en un dirribonucleótido de diadenosina. En la TABLA VIII se muestran las asignaciones para las señales de resonancia protónica. Los picos no peptídicos adicionales en el espectro aparecieron en una relación molar 1:1 con el péptido, indicando un complejo molar 1:1 entre un péptido y un dinucleótido de adenosinaadenosina.

30 El espectro de fósforo (Figura 12) muestra tres señales, un pico dividido a 3,96 ppm, indicativo de dos átomos de fósforo de fosfodiéster desplazados en cierto grado campo abajo de los esperados de un enlace de fosfodiéster internucleosídico típico, y otro a 2,46 ppm, característico de un enlace de fosfodiéster internucleotídico. Esto sugiere un enlace de fosfodiéster 3' a 5' tradicional entre unidades de ribosa en una unidad de ribodinucleótido, junto con otros dos enlaces de fosfodiéster que no son enlaces internucleotídicos típicos. Por lo tanto, es probable que exista un enlace covalente de fosfodiéster entre un grupo hidroxílico en un resto de serina o tirosina y un grupo hidroxílico en el resto de ribosa del dinucleótido.

35 Por lo tanto, el Péptido B consiste en una unidad peptídica enlazada a un ribodinucleótido diadenosínico, puesto que muestra señales de RMN que corresponden a aminoácidos y unidades de adenina. Los aminoácidos identificados a partir del espectro de HSQC (Figura 13, TABLA X) son 4 restos de glicina, 3 restos de valina, 3 restos de ácido aspártico, 2 restos de isoleucina, 2 restos de serina, 2 restos de tirosina, y uno de cada uno de alanina, arginina, fenilalanina, prolina y ácido glutámico. Estos datos, tomados en conjunto, indican un péptido de 21 aminoácidos de longitud, asociado con una unión de dirribonucleótido adenínico, posiblemente a través de un enlace de tipo fosfodiéster.

40 El espectro de RMN de C-13 del Péptido B (Figura 14, TABLA IX) muestra de forma similar picos atípicos de

cualesquiera aminoácidos, tanto en la región aromática (118-160 ppm) que corresponden a adenina como en la región de 70-90 ppm, en la que los átomos de carbono del anillo de ribosa producen señales, que se pueden atribuir a dos subunidades de adenosina.

5 Se consideró además que un dinucleótido de diadenosina podría estar enlazado como un complejo iónico al resto peptídico y no estar unido covalentemente. Para determinar si este fue el caso, se llevó a cabo un experimento para disociar una posible unidad dinucleotídica unida mediante enlazamiento iónico al péptido. Una muestra de Péptido B se llevó hasta una fuerza iónica 2M de NaCl mediante adición de NaCl 5M. Esta disolución de fuerza iónica elevada debería disociar un complejo iónico. La disolución se incubó a 4°C durante 1 hora, y después se dializó frente a 500 ml de una disolución de NaCl 1M en 10 mM de Tris-HCl, pH 7,9, en una bolsa Float-a-Lyzer (corte de MW – 1kDa) 10 durante 2 horas. El dializado se volvió a dializar entonces a 40°C durante 2 horas frente a 500 ml de una disolución de NaCl 0,5 M en 10 mM de Tris-HCl, pH 7,9. Una diálisis final a 4°C durante 16 horas toda la noche frente a 2,5 l de 10 mM de Tris-HCl, pH 7,9, proporcionó una disolución de Péptido B que se aplicó a una columna de soporte de DEAE de Macrorep, previamente equilibrada con 10 mM de Tris-HCl. La disolución del eluato se liofilizó. Este producto se analizó entonces nuevamente mediante RMN de protón y de fósforo, y dio espectros idénticos a los del Péptido B sin tratar. Esto sugiere una unión covalente en lugar de un complejo iónico entre el péptido y los restos oligonucleotídicos conectados a través de un enlace fosfodiéster mediante un grupo hidroxilo en un resto de aminoácido. 15

Análisis de secuencia N-terminal del Péptido B

20 Se llevó a cabo la secuenciación peptídica N-terminal del Péptido B mediante análisis degradativo de Edman. La muestra se disolvió en 1 ml de agua Nanopure, y de la muestra disuelta se aplicaron 50 µl a cartuchos de secuenciación. Se llevó a cabo una secuencia de 30 ciclos, lo que dio como resultado una identificación de una secuencia de 21 aminoácidos de longitud:

GEIPDAGGR1VDYYVGFSD (X) (X)

25 Los aminoácidos en los extremos C-terminales, 20 y 21, no se pudieron determinar de forma no ambigua en la secuencia. Esta secuencia se buscó en la base de datos de NCBI/BLAST, pero no dio como resultado ningún éxito para alguna secuencia coincidente. De este modo, parece que el Péptido B es un compuesto previamente no descrito.

TABLA VIII – ASIGNACIONES DE PICOS DE RMN DE PROTÓN PARA EL PÉPTIDO B (EN DISOLUCIÓN DE H₂O)

Desplazamiento Químico	Asignación de Picos
0,897	δ-CH ₃ Ile (2 restos de Ile)
0,909	
0,933	
0,947	γ-CH ₃ Val, γ-CH ₃ Ile (3 restos de Val, 2 restos de Ile)
0,949	
0,946	
0,964	
1,409	β-H Ala
1,476	
1,490	γ-CH ₂ Ile (2 restos de Ile)
1,676	γ-CH ₂ Arg
1,866	β-H Asp (3 restos de Asp)
1,885	
1,920	
2,011	β-H Pro
2,071	β-H Glu

ES 2 379 462 T3

Desplazamiento Químico	Asignación de Picos
2,164	β -H Val (3 restos de Val)
2,178	
2,191	
2,284	β -H Pro
2,299	γ -CH ₂ Glu
2,961	β -H Tyr
3,151	β -H Phe
3,696	δ -H Pro
3,706	Ribosa 5' CH ₂ OH
3,878	β -H Ser (2 restos de Ser)
3,885	
3,901	α -H Gly (4 restos de Gly)
3,912	
3,923	
3,93 1	
4,158	α -H Val (3 restos de Val)
4,178	
4,166	α -H Glu
4,323	
4,359	α -H Arg
4,425	α -H Pro
5,863	Ribosa 5'
5,886	Ribosa 3'
5,894	
5,938	Ribosa 2'
5,948	
6,006	Ribosa 1'
6,021	
6,794	3,5-H Tyr
7,088	
7,144	2,6-H, Tyr
7,266	2,6-H, Phe
7,282	3,5-H, Phe
7,305	4-H, Phe
7,740	H-2 del anillo de adenina

ES 2 379 462 T3

Desplazamiento Químico	Asignación de Picos
7,756	
7,791	H8 del anillo de adenina
7,806	

TABLA IX – ASIGNACIONES DE PICOS DE RMN DE C13 PARA EL PÉPTIDO B (EN D₂O)

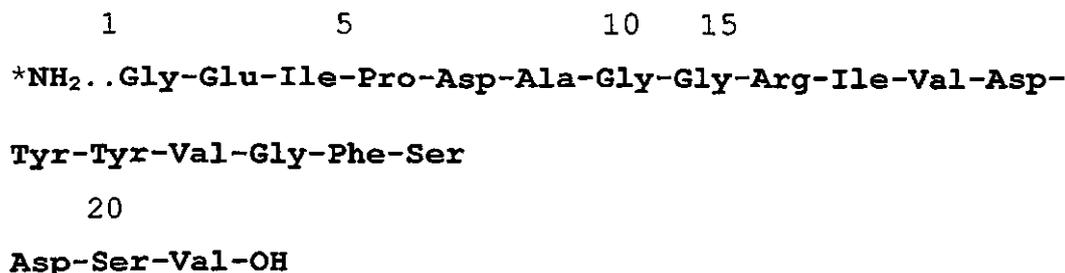
Desplazamiento Químico (ppm)	Asignación de Picos
17,7	Ala (β -C)
18,5	Val (γ -C)
23,2	Pro (γ -C)
25,7	Arg (γ -C)
28,7	Arg (β -C)
28,8	Glu (β -C)
30,6	Pro (β -C)
38,4	Tyr (β -C) / Phe (β -C)
39,8	Asp (β -C)
40,8	Asp (β -C)
41,7	Arg (δ -C)
43,5	Gly (α -C)
43,9	Gly (α -C)
48,2	Pro (trans, δ -C)
51,2	Ala (α -C)
53,1	Asp (α -C)
53,4	
57,4	Phe (α -C), Tyr (α -C)
57,6	
60,0	Ile (α -C)
60,8	Val (α -C)
62,0	Ribosa 5' CH ₂ OH
62,3	Ser (β -C)
62,4	
72,0	Adenosina (C2' de ribosa)
74,2	Adenosina (C3' de ribosa)
83,7	Adenosina (C4' de ribosa)
84,2	

ES 2 379 462 T3

90,4	Adenosina (C1' de ribosa)
95,2	
116,2	Tyr (C3, C5)
128,4	Tyr (C1), Phe (C-4)
128,6	
131,2	Tyr (C2, C6)
141,8	Adenina (C8 del anillo de adenosina)
142,4	
158,1	Adenina (C4/C2 del anillo de adenosina)
172-177	Grupos C=O de aminoácidos
182,8	Glu (δ -C)

TABLA X – CORRELACIONES DEL ESPECTRO DE HSQC – PÉPTIDO B

PICOS CRUZADOS		
Desplazamiento químico (ppm)		
Protón	Carbono	Asignación
7,79	158,1	Adenosina C/H 2
7,80	159,4	
7,74	141,8	Adenosina C/H 8
7,76	142,4	
7,30	128,4	Phe C4
7,28	128,6	Phe 2, 6
6,79	116,2	Tyr 3, 5
6,01	95,2	Adenosina 1'
5,95	90,4	Adenosina 1'
4,81	72,0	Adenosina 2'
4,60	74,2	Adenosina 3'
4,38	53,3	α -C Leu
4,28	70,1	Adenosina 2'
4,20	83,7	Adenosina 4'
4,16	84,2	Adenosina 4'
4,17	60,8	α -C/H Val
3,91	43,5	α -C/H Gly
3,89	62,3	β -C/H Ser
3,70	62,0	Adenosina 5'-CH ₂ OH
2,96	39,4	α -C/H Tyr



5 Este segmento peptídico de 21 aminoácidos daría cuenta de un peso molecular de 2216,4. En los espectros de masas se observaron fragmentos consistentes con esta estructura (véase la TABLA XI). Toda la estructura del Péptido B mostró un MW de 2955 en los estudios espectroscópicos de masas, indicando una estructura de MW de 740 unida covalentemente al péptido.

10 Los estudios de RMN indicaron dos unidades de adenina enlazadas entre sí a través de un enlace de fosfodiéster 3' a 5', como en la estructura de ARN. Se excluye un enlace de 2' a 5' debido a que se observan para ambas unidades de adenina señales de carbono e hidrógeno de 2'-ribosa consistentes con grupos hidroxilo de 2' libres. Un dinucleótido de diadenosina enlazado a través de un enlace de fosfodiéster 3'-5' da cuenta de un fragmento de MW595. Esto deja un peso molecular de 144 a justificar, que corresponde a dos enlaces de fosfodiéster no internucleotídicos adicionales.

15 La unidad de dinucleótido de diadenosina podría estar unida al grupo hidroxilo de la serina peptídica en su grupo hidroxilo libre de 3' o de 5' a través del enlace de difosfoéster. Se indica un enlace de 3', debido a que se observa un grupo hidroxilo de 5' libre (pico cruzado a 3,7 y 62,0 ppm en el espectro de HSQC) para una de las unidades de ribosa de adenina.

La presencia de un grupo hidroxilo de 5' libre en la estructura del dinucleótido de adenosina se indicó además por la resistencia del Péptido B a la hidrólisis por fosfatasa alcalina de timo de ternera. Esta enzima hidroliza fácilmente los grupos fosfato de 5' en ADN, ARN y nucleótidos.

20 La estructura en la Figura 15 es consistente con los datos adquiridos para el Péptido B en los estudios estructurales, que se resume como sigue:

a. La estructura es un péptido lineal de 21 aminoácidos de longitud, enlazado covalentemente en el grupo hidroxilo de un resto de serina en la posición 18 a una unidad de dinucleótido de diadenosina a través de un enlace de difosfodiéster en la posición 3'.

25 b. Los datos espectrales de masas son consistentes con la estructura asignada y con los datos de secuenciación N-terminal y C-terminal. Se observan fragmentos másicos consistentes con pérdida del aducto dinucleótido no peptídico, así como fragmentos iónicos secuenciales que confirman la secuencia de aminoácidos asignada en el resto de péptido lineal.

30 c. Los tres enlaces de fosfodiéster observados en el espectro de RMN de ³¹P se pueden explicar mediante esta estructura, que incluye un enlace de fosfodiéster 3'-5' internucleotídico convencional, y dos señales que resultan de un enlace de difosfodiéster entre un grupo hidroxilo de serina en el péptido y un grupo hidroxilo de 3' en el resto dinucleótido.

La Figura 16 muestra la naturaleza del enlace en la serina 18 vía un enlace de difosfodiéster a la unidad de dinucleótido de diadenina.

35 Sin embargo, la presente invención no está limitada a la estructura de nucleótido-péptido descrita anteriormente. Se cree que el enlace de difosfodiéster entre el péptido y el oligonucleótido en la estructura de nucleótido-péptido descrita anteriormente es crucial para las actividades del Producto R. De este modo, la presente invención engloba todas las otras variaciones de la estructura anterior que se pueden o se deberían de haber percibido por una persona de pericia normal en la técnica basándose en la estructura anterior sin separarse de la presente invención.

40 La Figura 17 muestra una estructura general del nucleótido-péptido descrito anteriormente, en el que B1 y B2 son purinas o pirimidinas tales como citosina, guanina, adenina, timina, uracilo, 5-metilcitosina o 5-fluorouracilo, R1 y R2 son hidrógeno o un grupo hidroxilo, X es un resto de aminoácido hidroxilado tal como restos de serina, treonina, o tirosina, e Y es las porciones restantes del péptido unido al dinucleótido (restos peptídicos), con exclusión del resto de aminoácido hidroxilado. La longitud del péptido puede variar, pero generalmente contiene no más de 50

45 aminoácidos. Al menos se requiere un resto de aminoácido hidroxilado en tal péptido, pero la localización de tal resto puede ser cualquiera a lo largo del péptido, incluyendo el N-terminal y C-terminal del péptido. Otros restos de aminoácidos en el péptido se pueden escoger de cualesquiera aminoácidos conocidos, y el dinucleótido puede ser ribodinucleótido o desoxirribonucleótido.

Estudios espectrales de masas en el Péptido B

Los espectros de masas se obtuvieron en muestras del Péptido B de Commonwealth Biotechnologies, Inc., de Borealis Laboratories, y de la Universidad del Estado de Louisiana. Para estos análisis, se usaron las técnicas tanto de MALDI-TOF como de electropulverización. La tabla a continuación (TABLA XI) muestra los iones de fragmentos espectrales de masas observados, y las asignaciones estructurales.

5

TABLA XI – DATOS ESPECTRALES DE MASAS PARA EL PÉPTIDO B

Fragmento	Ión Másico Esperado	Ión Másico Observado
/IVDYY/	654,74	655,7
/DAGGRIV/	669,76	671,8
/YYVGFSDS-28	689,79	688,8
/IPDAGGRIV/	880,04	879,82
/YYVGFSDS-H ₂ O	901,95	901,97
/PDAGGRIVDY/	1045,14	1044,18
		1044,87
/GGRIVDYYVG-28	1053,21	1053,1
GEIPDAGGIV/	1066,20	1066,32
/EIPDAGGRIVD-28	1096,23	1096,63
/VDYYVGFSDS-H ₂ O	1116,18	1118,34
/EIPDAGGRIVD/	1124,24	1123,74
		1123,90
/AGGRIVDYYVG/	1151,58	1150,0
/RIVDYYVGFSDS/	1201,37	1202,85
		1202,82
/GGRIVDYYVGF/	1228,40	1228,61
/IVDYYVGFSDS-H ₂ O	1229,34	1229,45
/GGRIVDYYVGF-28	1230,41	1230,44
/EIPDAGGRIVD/	1124,24	1123,74
GEIPDAGGRIVD/	1181,30	1181,03
/GGRIVDYYVGF/	1228,46	1229,12
		1228,61
/GGRIVDYYVGF-28	1200,39	1198,11
/IPDAGGRIVDYY-28	1293,87	1293,87
/IPDAGGRIVDYY-NH ₃	1304,45	1302,00
/PDAGGRIVDYYV/	1307,45	1308,42
GEIPDAGGRIVDY/	1344,46	1342,09
		1342,04
		142,7

ES 2 379 462 T3

Fragmento	Ión Másico Esperado	Ión Másico Observado
/PDAGGRIVDYYVG-NH ₃	1347,47	1346,77
/PDAGGRIVDYYG/	1364,51	1364,02 1365,0
/ACGRIVDYYVGFS/	1386,56	1386,02
/IPDAGGRIVDYYV-28	1392,60	1391,12
/GRIVDDYYVGFSDS	1460,59	1459,63 1461,56
IGRIVDDYYVGFSDS-H ₂ O	1441,68	1440,06 1440,41
/IPDAGGRIVDYYVG/	1477,67	1475,01
/DAGGRIVDYYVGFSDS-H ₂ O	1483,63	1482,43 1482,45
GEIPDAGGRIVDYY/	1507,63	1545,32(+K)
/EIPDAGGRIVDYYV-NH ₃	1532,70	1533,93
/PDAGGRIVDYYVGF/	1511,68	1510,41
/PDAGGRIVDYYVGFSDS-2NH ₃	1564,72	1565,6 1566,16
/AGGRIVDYYVGFSDS-H ₂ O	1570,71	1569,89
/AGGRIVDYYVGFSDS	1588,72	1588,58 1587,01 1589,0
/GEIPDAGGRIVDYYV-NH ₃	1589,76	1591,53
GEIPDAGGRIVDYYV/	1606,76	1608,01
/GEIPDAGGRIVDYYV-28	1635,80	1635,82
GEIPDAGGRIVDYYVGF/	1663,81	1664,61
/DAGGRIVDYYVGFSDS-28	1675,80	1675,95 1674,56
/EIPDAGGRIVDYYVGF/	1753,96	1751,00
GEIPDAGGRIVDYYVGF-NH ₃ -28	1765,97	1765,6
/PDAGGRIVDYYVGFSDS-28	1772,92	1772,92
/AGGRIVDYYVGFSDSV-NH ₃	1688,84	1688,69
GEIPDAGGRIVDYYVGF/	1810,91	1890,61 (+2K)
GEIPDAGGRIVDYYVGFSDS/	1898,06	1898,61
/EIPDAGGRIVDYYVGFSDS/	1956,13	1957,64
GEIPDAGGRIVDYYVGFSDS/	2100,28	2100,17

Fragmento	ión Másico Esperado	ión Másico Observado
GEIPDAGGRIVDYYVGFSDSV/	2199,35	2199,68
		2200,17
		236,71(+K)
		2245,93/2246,10 (+2Na)
GEIPDAGGRIVDYYVGFSDSV-NH ₃	2182,35	2183,12
		2183,68
GEIPDAGGRIVDYYVGFSDSV.OH (M+)	2216,29	2217,11
		2217,18
		2244,12 (+K)
		2259,48 (+2Na)
		2252,27 (+2H ₂ O)
		2262,24 (+2Na)
M-Adenina, -H ₂ O	2802,73	2803,09
M-V (C-terminal)	2857,86	2859,53
M-(NH-V) (C-terminal)	2842,85	2842,14
M-Adenina	2819,74	2821,70
M-2H ₂ O	2918,81	2918,69
		2940,33 (+Na)
M	2954,82	2956,19
		2994,99 (+K)
		3000,63 (+2Na)

Los datos espectrales de masas apoyan la estructura asignada del Péptido B, y también proporcionan una confirmación independiente de la asignación de un resto de glicina en la posición 16 y restos de serina en las posiciones 18 y 20 en la estructura peptídica mediante los fragmentos que aparecen a masas de 1664,61, 1898,61 y 2199,68, respectivamente.

En la Figura 18 se muestran los espectros de masas representativos obtenidos en el Péptido B.

Por lo tanto, el Péptido B consiste en un péptido de cadena lineal de 21 aminoácidos de longitud enlazado covalentemente mediante el grupo hidroxilo de un resto de serina en la posición 18 a través de un grupo difosfodiéster al extremo 3' de un resto de adenilil (3'-5') adenosina. Esto hace al Péptido B un conjugado de péptido-ácido nucleico.

En suma, el Producto R se resolvió en sus compuestos constituyentes, que entonces se identificaron mediante una serie de análisis químicos estructurales. El procedimiento implicó la elución en gel metódica, el análisis de HPLC, la electroforesis en SDS-gel, estudios enzimáticos, análisis espectrales de ultravioleta, análisis espectrales de RMN y análisis espectroscópicos de masas.

En base a estos estudios, se concluyó que los constituyentes orgánicos del Producto R son trece compuestos nucleósidos/nucleótidos derivados de la hidrólisis controlada de ARN, y dos péptidos.

El péptido más largo, denominado Péptido A, con un MW de 3536, es un fragmento de 31 aminoácidos derivado de beta-caseína bovina. Tiene seis restos de prolina espaciados, que probablemente dan como resultado un fuerte plegamiento del péptido, que da cuenta de su estabilidad química y su estabilidad a la hidrólisis enzimática. También tiene cuatro restos de glutamina básicos en su estructura.

El péptido más corto, un conjugado de péptido-oligonucleótido denominado Péptido B, tiene una cadena de 21 aminoácidos de longitud unida en el resto de serina en la posición 18 a un dirribonucleótido de diadenina (3'-5') a través de un enlace de difosfodiéster en la posición 3'. Este conjugado nucleopeptídico tiene un resto peptídico de MW de 2215 unido a un aducto no peptídico de 740 MW, para dar un MW total de 2955. La estructura del péptido B hasta ahora no ha sido descrita en la bibliografía científica.

Además, el Producto R contiene cloruro sódico como ingrediente orgánico, que resulta de la neutralización del hidróxido sódico con ácido clorhídrico durante el procedimiento de fabricación.

Por lo tanto, hay dieciséis compuestos constituyentes identificados presentes en la formulación del Producto R – 3 nucleósidos, dos difosfatos de nucleósidos y ocho monofosfatos de nucleósidos, junto con dos péptidos (uno de ellos un conjugado de péptido-ácido nucleico) y cloruro de sodio.

Actividad biológica del péptido A y péptido B del Producto R

Se ha demostrado que las células U937, una estirpe celular promonocítica humana obtenida de un linfoma histiocítico, que se hacen crecer en condiciones particulares, responden al Producto R incrementando su producción de interleucina 8 (IL-8) y de proteína quimiotáctica 1 de monocitos (MCP-1). Se usan ensayos de ELISA cuantitativos comercialmente disponibles para detectar la secreción de IL-8 y MCP-1 por células U937 cultivadas en respuesta a la presencia de Producto R. Una respuesta positiva en estos ensayos se usa como un indicador de actividad biológica del Producto R. Este ensayo también se puede usar para demostrar la actividad biológica de los componentes peptídicos purificados del Producto R.

Precipitación con sulfato de amonio de los péptidos del Producto R: Muestras del Producto R se liofilizan y se redisuelven en 20% de volumen de muestra original en agua (concentrado 5X). A la disolución se añaden cristales de sulfato de amonio para alcanzar una saturación de 60% de sulfato de amonio (disolución de 390 mg/ml). El mezclado suave solubiliza los cristales. Después de 30 minutos a 1 h de incubación en hielo aparecen precipitados de proteína, y se centrifuga a 16.000 x g durante 30 minutos a 40°C. El pellet se disuelve en 5% de volumen de muestra original en agua. La disolución se desala mediante cromatografía de filtración en gel a través de una columna de BioGel P-2. La columna se eluye con 0,1X de disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Sólo las fracciones que contienen proteína se reúnen y se liofilizan.

Separación y aislamiento de dos péptidos principales del Producto R mediante cromatografía de filtración en gel: Una columna de BioGel P-10 (1,6 cm x 52 cm) se equilibró con una concentración 0,1X de PBS. Se aplicaron a la columna dos ml de Producto R concentrado 2X, columna la cual se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 25 ml/h. Se recogieron fracciones de cuatro ml. Todas las fracciones que contienen proteína se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las fracciones que contienen principalmente péptido A y péptido B se reúnen separadamente y se liofilizan. El conjunto de Péptido A contiene muy poca contaminación del otro péptido; sin embargo, el conjunto del péptido B está altamente enriquecido pero todavía contiene el péptido A como contaminante principal. Una estimación razonable de la pureza del péptido en los conjuntos es >90% para el péptido A y >75% para el péptido B.

Cultivo de células U937: La estirpe celular de linfoma histiocítico humano U937 se adquirió de la American Type Culture Collection. Las células se descongelaron y se mantuvieron en crecimiento logarítmico ($5-9 \times 10^5$ células/ml) en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, inactivado con calor a 56°C durante 30 min., 2 mM de L-glutamina y 1x de penicilina-estreptomina.

Tratamiento con Producto R o con péptidos aislados: Las células ($1,0 \times 10^5$ /ml) se cultivaron en medio de crecimiento que contiene Producto R, disolución de péptidos purificados aislados, disolución mixta de péptidos o PBS de Dulbecco, durante 2 días. Tras la centrifugación, los sobrenadantes del cultivo se analizaron usando kits de ELISA para quimiocina. La concentración final del Producto R en el medio de cultivo fue 10% (v/v). Los péptidos precipitados con sulfato de amonio se reconstituyeron en medio de cultivo para producir una disolución 10 mg/ml. Se prepararon dos diluciones de 2 veces, usando también como diluyente medio de cultivo. Estas disoluciones se usaron a una concentración final de 10% en el cultivo de células U937. Los péptidos liofilizados individuales se reconstituyeron en agua libre de endotoxina, para producir disoluciones 2 mg/ml (que es la concentración aproximada de cada péptido en el Producto R). Se preparó una mezcla equimolar de ambos péptidos a una concentración final de 4 mg/ml. Ambas se usaron a una concentración final de 10% en los medios de cultivo para los ensayos.

Medición de IL-8 y MCP-1 segregadas: Las concentraciones de IL-8 y MCP-1 en los sobrenadantes del cultivo se evaluaron mediante ELISA, usando kits de ELISA para IL-8 humana (Endogen. Inc.) y kits de ELISA para MCP-1 humana Quantikine (R&D Systems, Inc.), respectivamente, según las instrucciones del fabricante (con ligeras modificaciones para el ELISA para MCP-1). Cada sobrenadante de cultivo se ensaya por triplicado. Las absorbancias se miden en un espectrofotómetro de barrido PowerWave 200 Microplate Scanning Spectrophotometer. Para generar una curva patrón de ajuste logístico de cuatro parámetros, se utilizan diluciones de la proteína estándar suministrada por cada fabricante, y la concentración de quimiocina en cada sobrenadante se determina mediante extrapolación.

Resultados y conclusión: Los componentes peptídicos del Producto R se aislaron mediante precipitación con sulfato de amonio, liofilización y reconstitución en PBS. Se analizó su capacidad para aumentar la secreción de IL-8 y MCP-1 por células U937. Se llevaron a cabo dos ensayos diferentes con concentraciones decrecientes de la disolución peptídica, comenzando a 10 mg/ml. En la Figura 19 se muestra la media de los resultados para los dos ensayos. Tanto para la secreción de IL-8 como de MCP-1, la respuesta fue dependiente de la dosis. Para el ensayo de IL-8, 10% de una disolución 10 mg/ml de los péptidos fue capaz de provocar una respuesta similar a la del Producto R completo al 10% (mismo lote del cual se precipitaron los péptidos). Para MCP-1, 10% de una disolución 10 mg/ml no fue capaz de provocar una respuesta total en comparación con el Producto R completo.

Para analizar adicionalmente la capacidad de los componentes peptídicos del Producto R para aumentar la secreción de IL-8 y MCP-1 por células U937, se prepararon preparaciones enriquecidas en péptidos A y B mediante cromatografía de filtración en gel. Las disoluciones de los péptidos A y B (2 mg/ml) (la preparación B estaba más contaminada con el péptido A que viceversa) se ensayaron, tanto individualmente como mezcladas en cantidades equimolares (disolución 4 mg/ml), a una concentración final de 10% en los medios de cultivo. En la Figura 20 se muestran los resultados para dos ensayos independientes. La disolución del péptido B mantuvo la mayoría de la capacidad del Producto R para aumentar la secreción de IL-8 por células U937, mientras que la disolución del péptido A sólo provocó una respuesta menor. La disolución mixta de péptidos logró la misma actividad que el Producto R. Estos resultados indican la necesidad de que ambos péptidos estén presentes a fin de obtener una actividad completa del Producto R. En el caso de MCP-1, cada uno de péptido A, péptido B y la mezcla de ambos falló a la hora de provocar una respuesta igual a la del Producto R para el aumento de MCP-1, sugiriendo la necesidad de algún otro componente o componentes del Producto R para una total actividad del Producto R. La mezcla de los dos péptidos fue más activa que cada péptido individualmente, y el péptido B fue ligeramente más activo que el péptido A, sugiriendo, nuevamente, la necesidad de que ambos péptidos estén presentes para la actividad completa del Producto R. Se observa que en ambas ocasiones, el péptido B induce mayores niveles de secreción de IL-8 o MCP-1 que el péptido A. Puesto que el péptido B contiene un dinucleótido unido covalentemente al péptido, tal estructura puede ser la responsable del mayor nivel de las actividades biológicas del péptido B.

El siguiente ejemplo sólo sirve como una ilustración del procedimiento para obtener el Producto R, y no se debería de interpretar como una limitación de la presente invención.

Ejemplo

Suspéndanse alrededor de 35,0 g de caseína, alrededor de 17,1 g de peptona de carne de vacuno, alrededor de 22,0 g de ácido nucleico (ARN de levadura), alrededor de 3,25 g de seroalbúmina bovina, en alrededor de 2,5 litros de agua para inyección USP a alrededor de 3 a 7°C en un recipiente adecuado, y agítese suavemente hasta que todos los ingredientes se hayan humedecido apropiadamente. Añádanse con cuidado, mientras se agita, alrededor de 16,5 g de hidróxido sódico (ACS de grado reactivo), y continúese la agitación hasta que el hidróxido sódico se disuelva completamente. Sométanse a autoclave a alrededor de 9 libras de presión y 200-230°F durante un período de tiempo hasta que el ARN esté completamente digerido, por ejemplo alrededor de 4 horas. Al final del periodo, se detiene el autoclave, y el matraz de la reacción y los contenidos se dejan enfriar lentamente hasta la temperatura ambiente. Después, enfríese durante al menos seis horas a alrededor de 3-8°C. La disolución resultante se filtra a través de filtros de 2 micrómetros y 0,45 micrómetros usando un gas inerte tal como nitrógeno o argón a baja presión (1-6 psi). De manera similar, la disolución se filtra nuevamente a través de filtros de retención de pirógenos de 0,2 micrómetros. El filtrado resultante se muestrea y se ensaya para determinar el nitrógeno total. Entonces se lleva a cabo un cálculo para determinar la cantidad de agua enfriada para inyección a añadir al filtrado para producir un filtrado diluido con un contenido de nitrógeno entre alrededor de 165-210 mg/100 ml, y el volumen final es aproximadamente 5 litros. El pH se ajusta entonces con HCl concentrado (ACS de grado reactivo) o NaOH 1,0 N hasta un intervalo de alrededor de 7,3-7,6. La disolución diluida se filtra entonces nuevamente a través de filtros de 0,2 micrómetros con un gas inerte a baja presión. El filtrado final se introduce entonces y se encierra herméticamente en ampollas de vidrio de 2 ml mientras está en una atmósfera de gas inerte. Las ampollas se recogen y se someten a autoclave para la esterilización final a 240°F y 14-16 libras de presión durante alrededor de 30 minutos. Después del ciclo de esterilización, las ampollas con el Producto R se enfrían y se lavan.

Todas las cantidades se someten a una variación de más o menos 15% para pH, volumen, y ajustes analíticos.

Aunque es posible administrar el Producto R como parte de una formulación farmacéutica, es preferible presentarlo solo, aunque se puede administrar a alrededor del mismo tiempo que se administran independientemente uno o más fármacos diferentes. Si el Producto R se administra como parte de una formulación farmacéutica, las formulaciones de la presente invención comprenden al menos un ingrediente administrado, como se define anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación, y no deben ser perjudiciales para el receptor de los mismos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FRIEDLAND, BERNARD HIRSCHMAN, SHALOM Z. TARAPOREWALA, IRACH B.

<120> PREPARACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN TERAPÉUTICA

<130> 4493-2CIP2

5 <140> 09/764,017

<141> 17-01-2001

<150> 09/344,095

<151> 25-06-1999

<150> 08/735.236

10 <151> 22-10-1996

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 31

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1

Lys Val Leu Pro Val Pro Gln Lys Ala Val Pro Tyr Pro Gln Arg Asp
 1 5 10 15

Met Pro Ile Gln Ala Phe Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly
 20 25 30

20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2

Gly Glu Ile Pro Asp Ala Gly Gly Arg Ile Val Asp Tyr Tyr Val Gly
 1 5 10 15

Phe Ser Asp Ser Val
 20

<210> 3

ES 2 379 462 T3

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(21)

<223> Los restos no se pudieron determinar de manera no ambigua en la secuencia

10 <400> 3

```
Gly Glu Ile Pro Asp Ala Gly Gly Arg Ile Val Asp Tyr Tyr Val Gly
  1           5           10           15
Phe Ser Asp Xaa Xaa
           20
```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de SEC ID No: 1.

2. El péptido de la reivindicación 1, en el que dicho péptido se forma mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- 5
- a. formar una mezcla que incluye una combinación de proteínas que consiste en caseína, peptona de carne de vacuno y seroalbúmina bovina, un ARN vegetal y una base en agua, en el que la relación de dicha combinación de proteínas a dicho agua está en un intervalo de alrededor de 1,5/100 a alrededor de 2,5/100 en peso;
- 10
- b. procesar dicha mezcla a una temperatura elevada y a una presión elevada para formar una disolución y elementos insolubles;
- c. eliminar dichos elementos insolubles;
- d. diluir dicha disolución con agua; y
- e. después de llevar a cabo las etapas b, c y d, ajustar el pH de dicha disolución hasta un pH fisiológicamente aceptable.

Figura 1

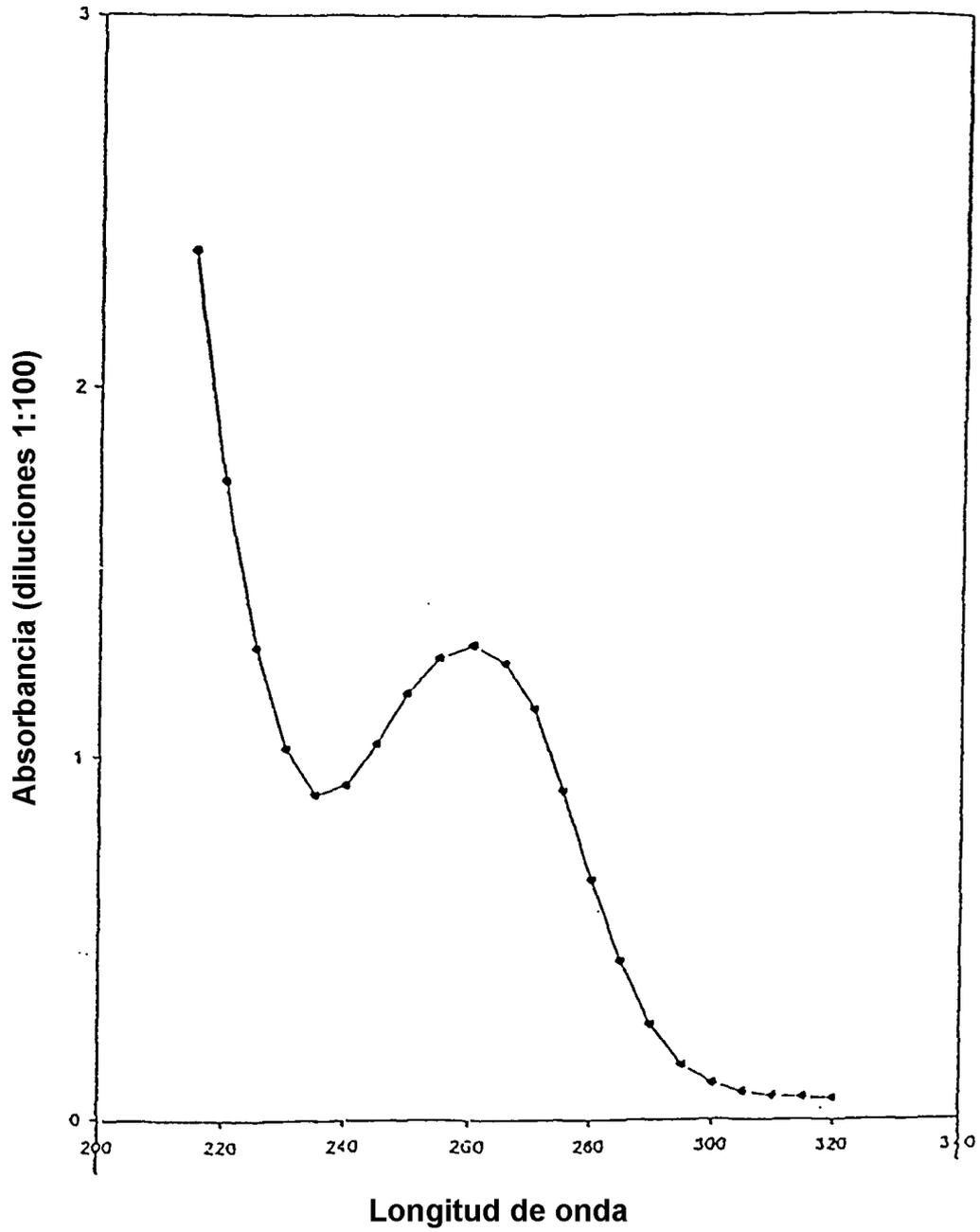


Figura 2

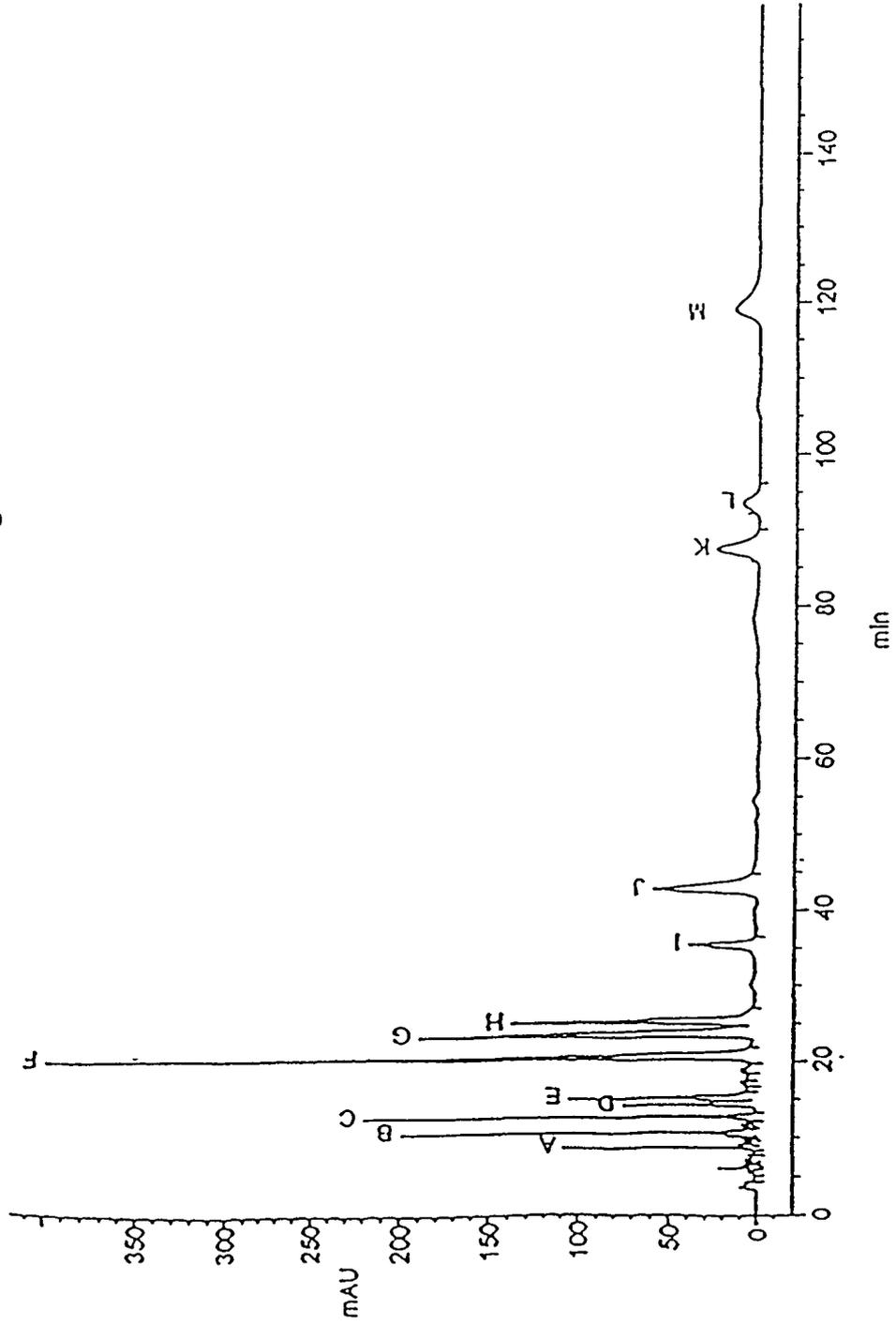


Figura 3

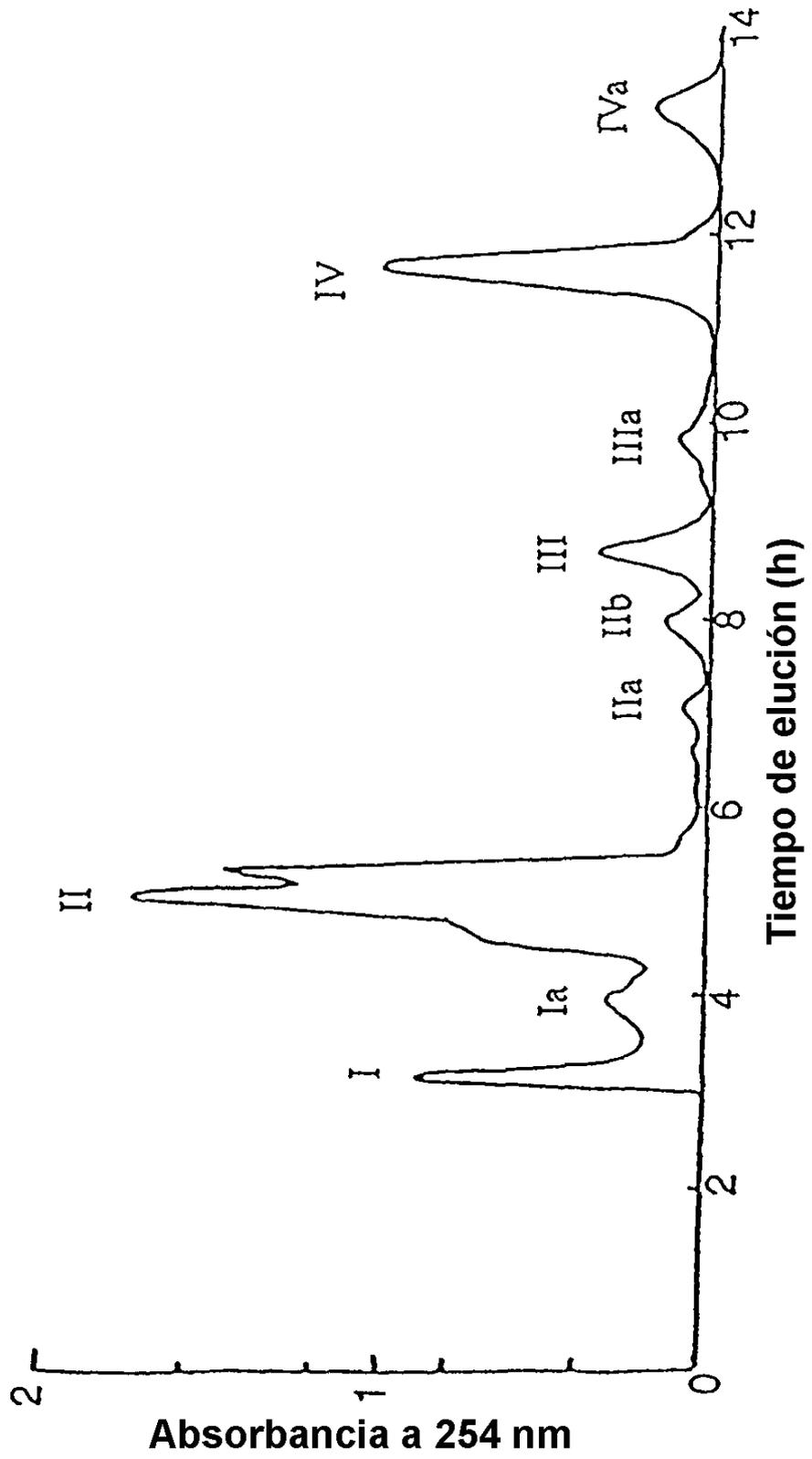


Figura 4

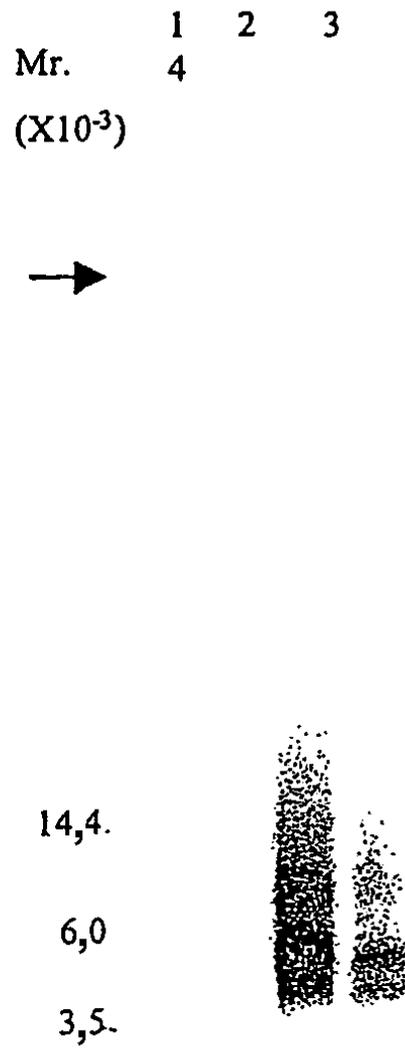
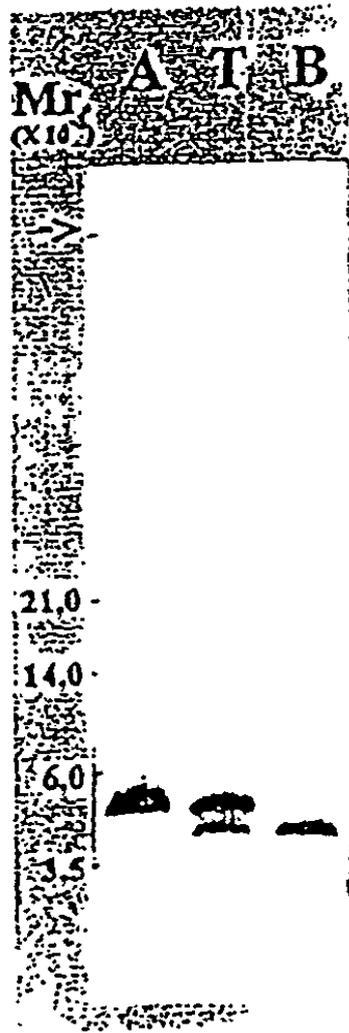


Figura 5



A - Fracción A

T - Producto R total

B - Fracción B

Figura 6

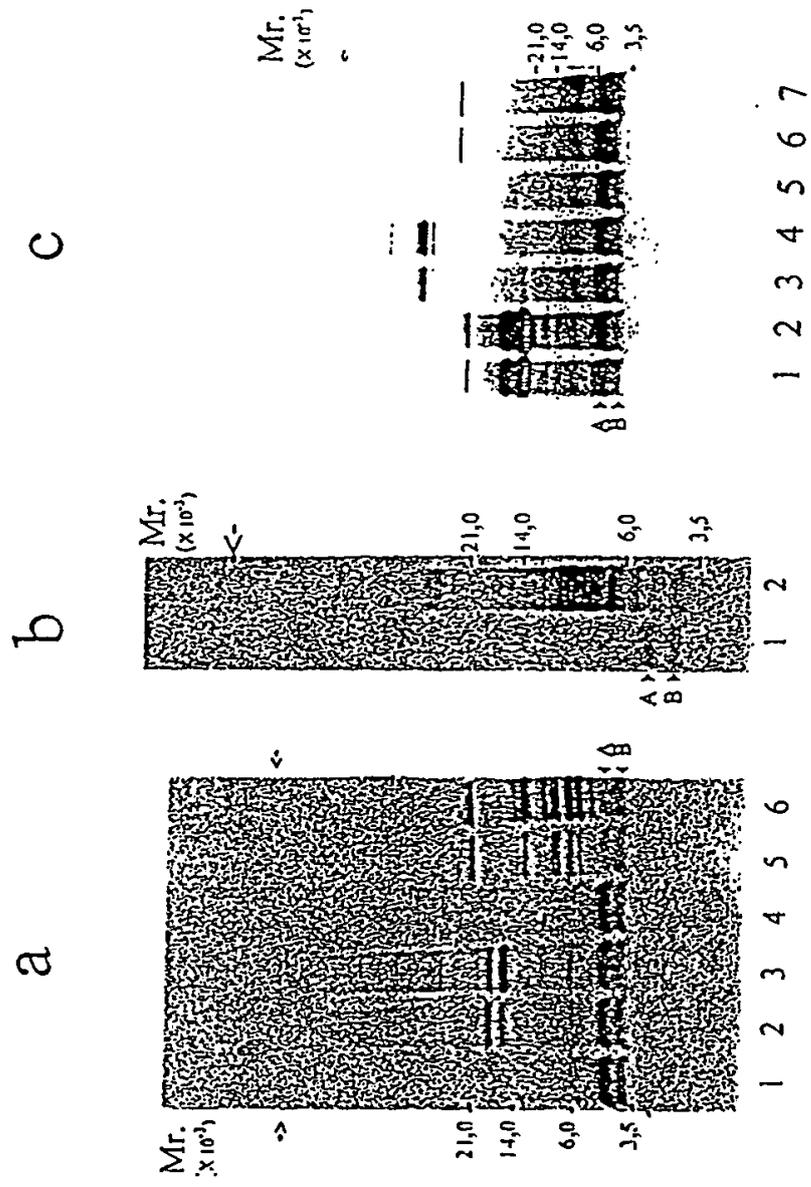


Figura 7

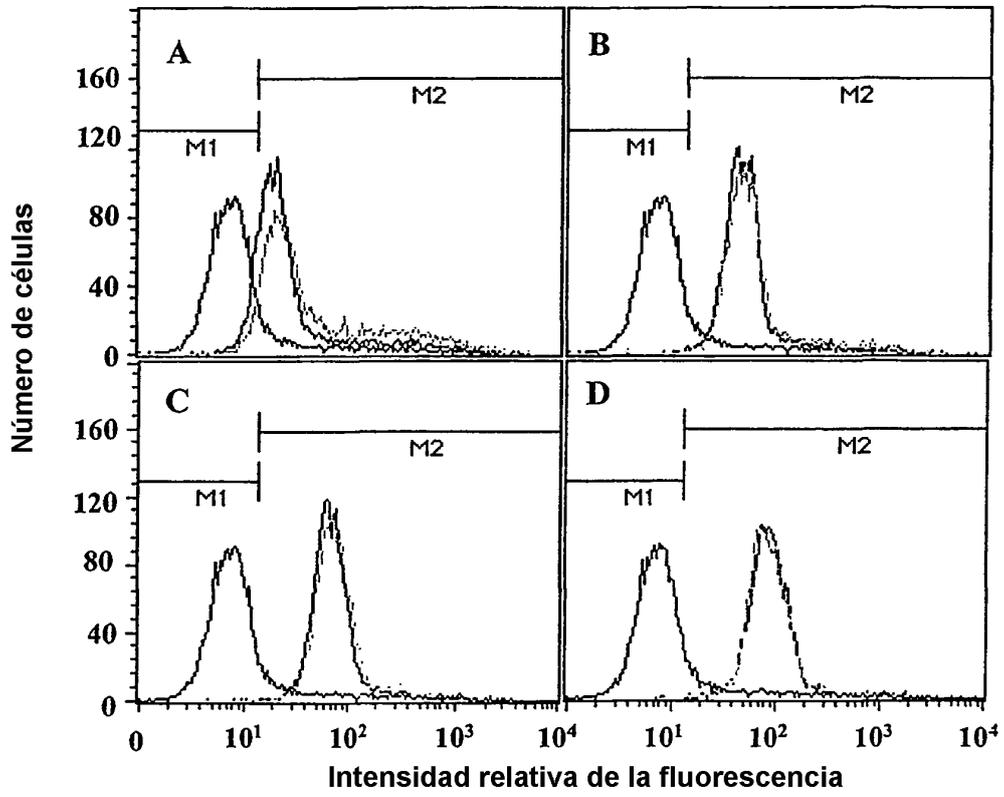
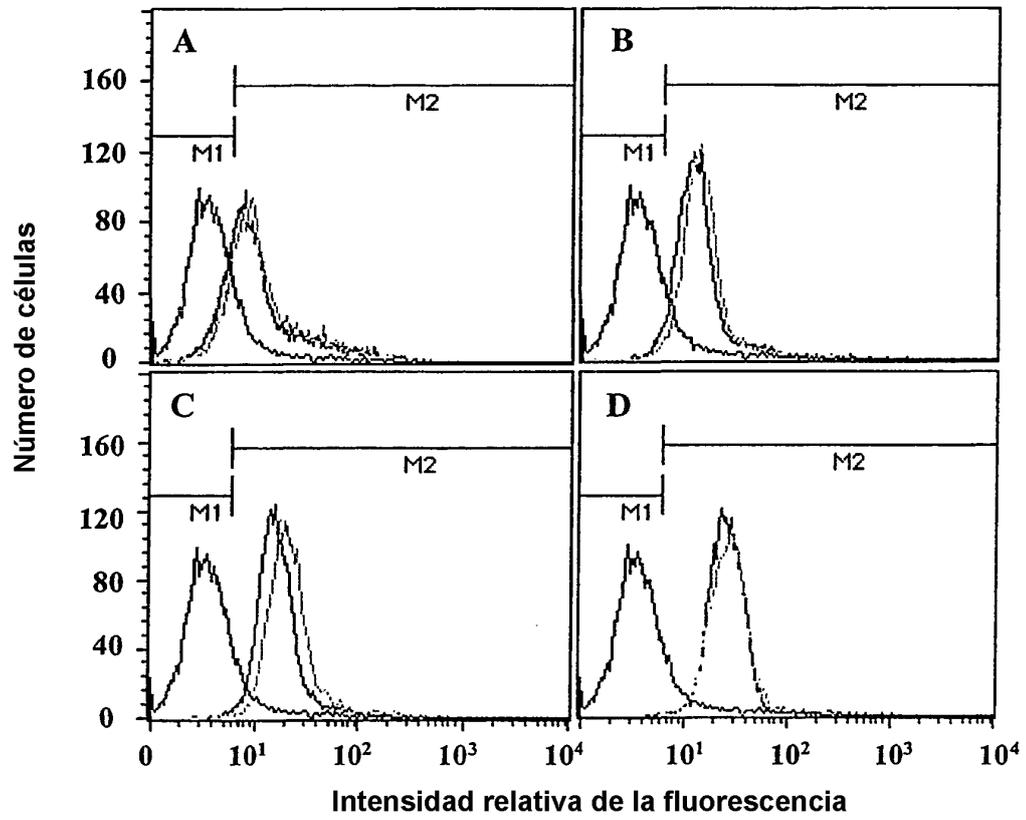


Figura 8



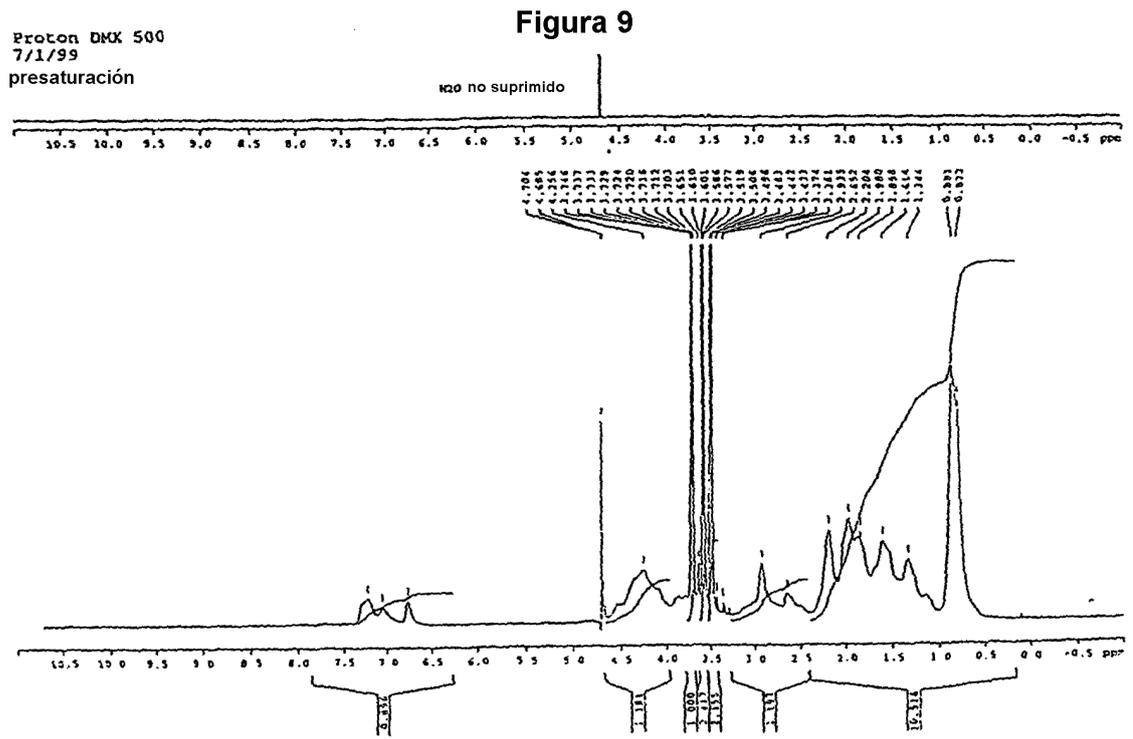


Figura 10

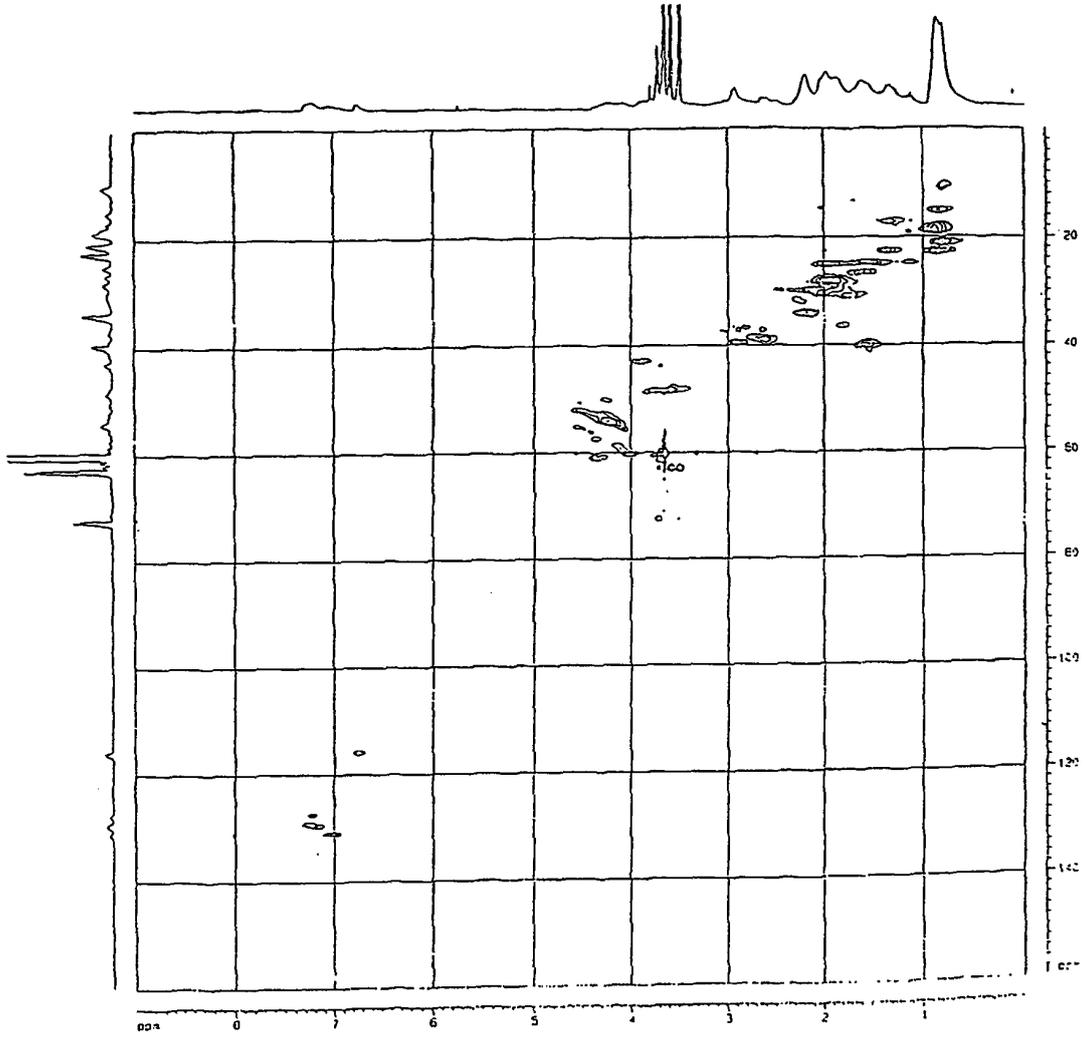


Figura 11

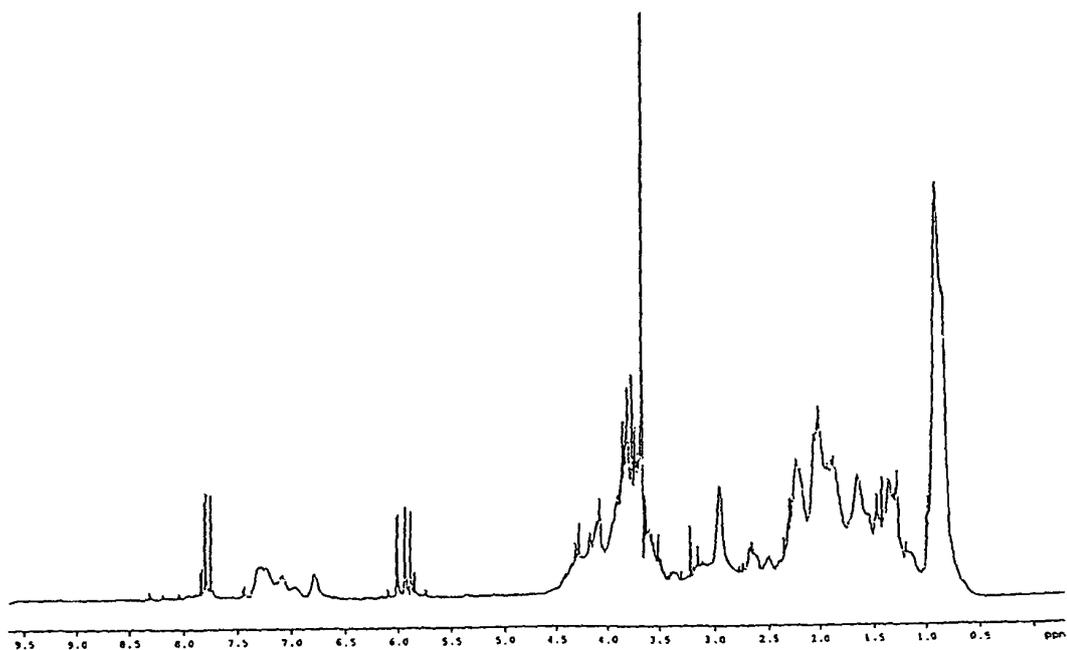


Figura 12

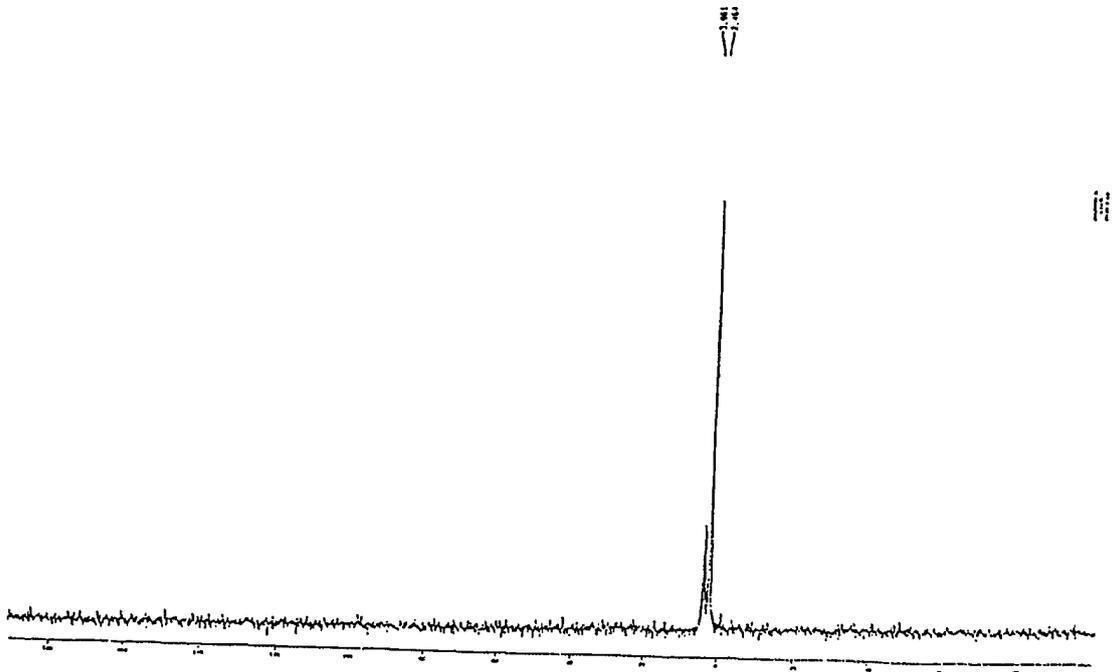


Figura 13

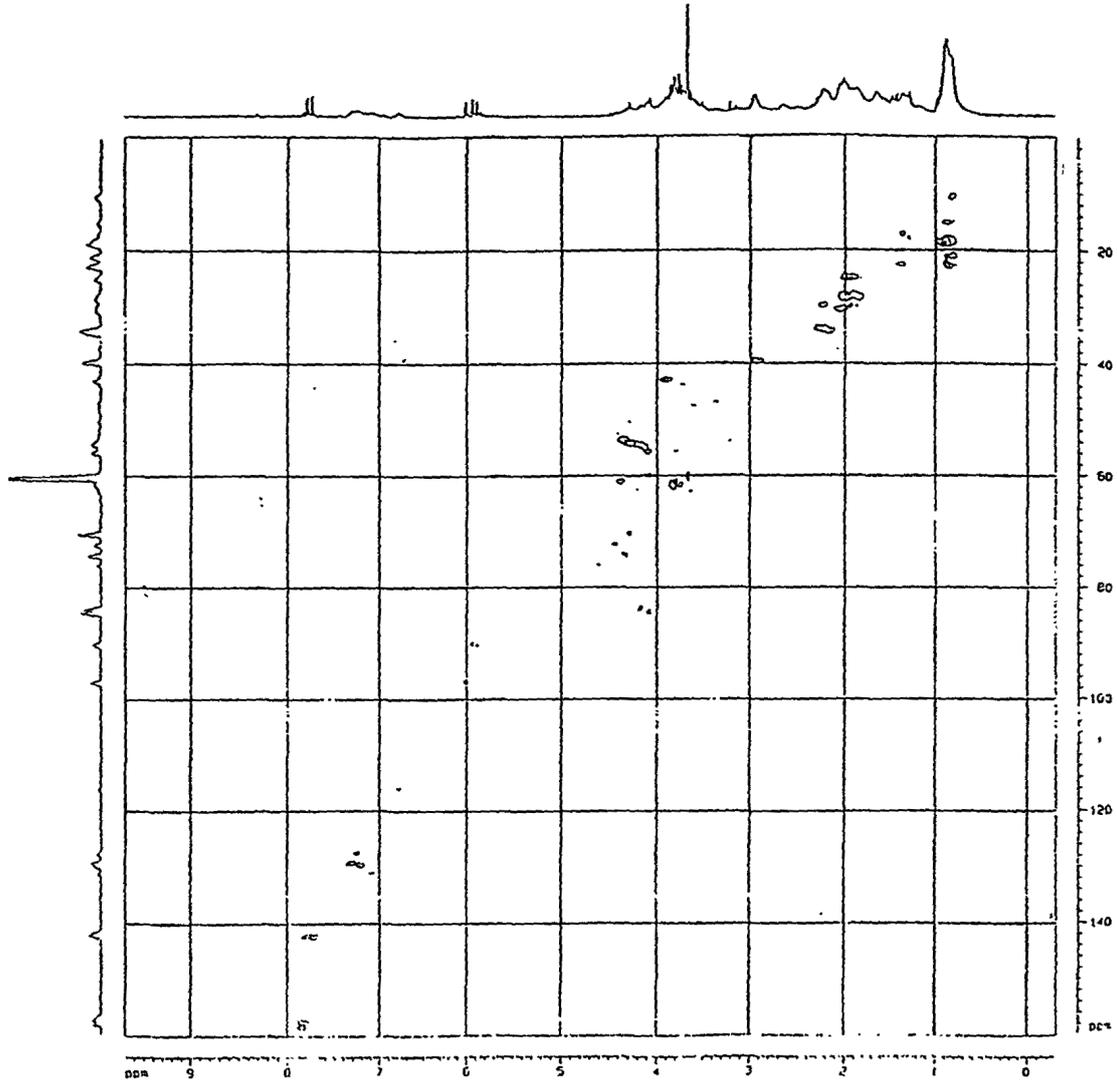


Figura 14

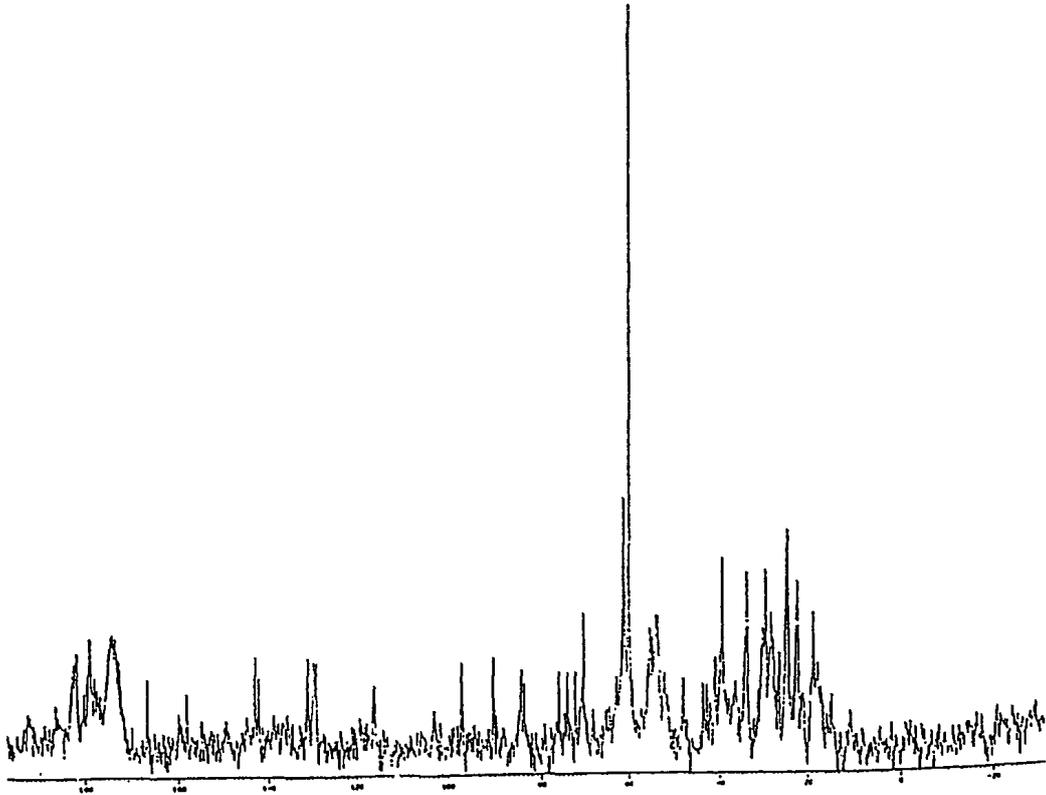


Figura 15

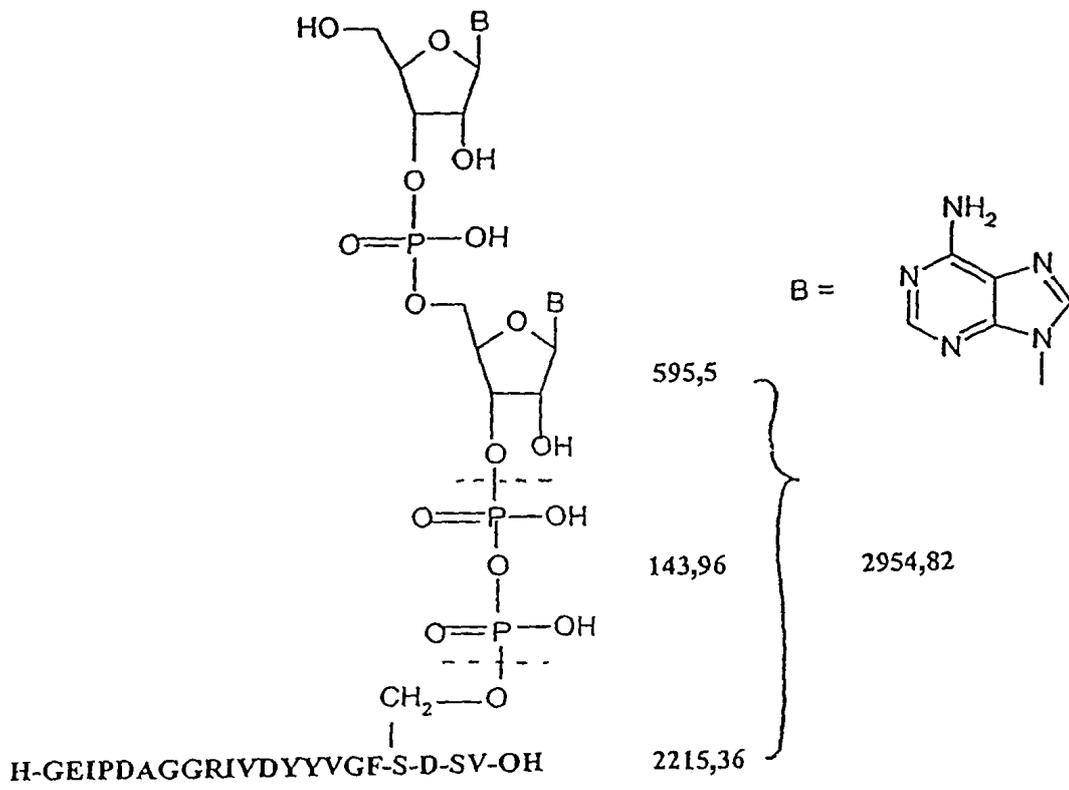


Figura 16

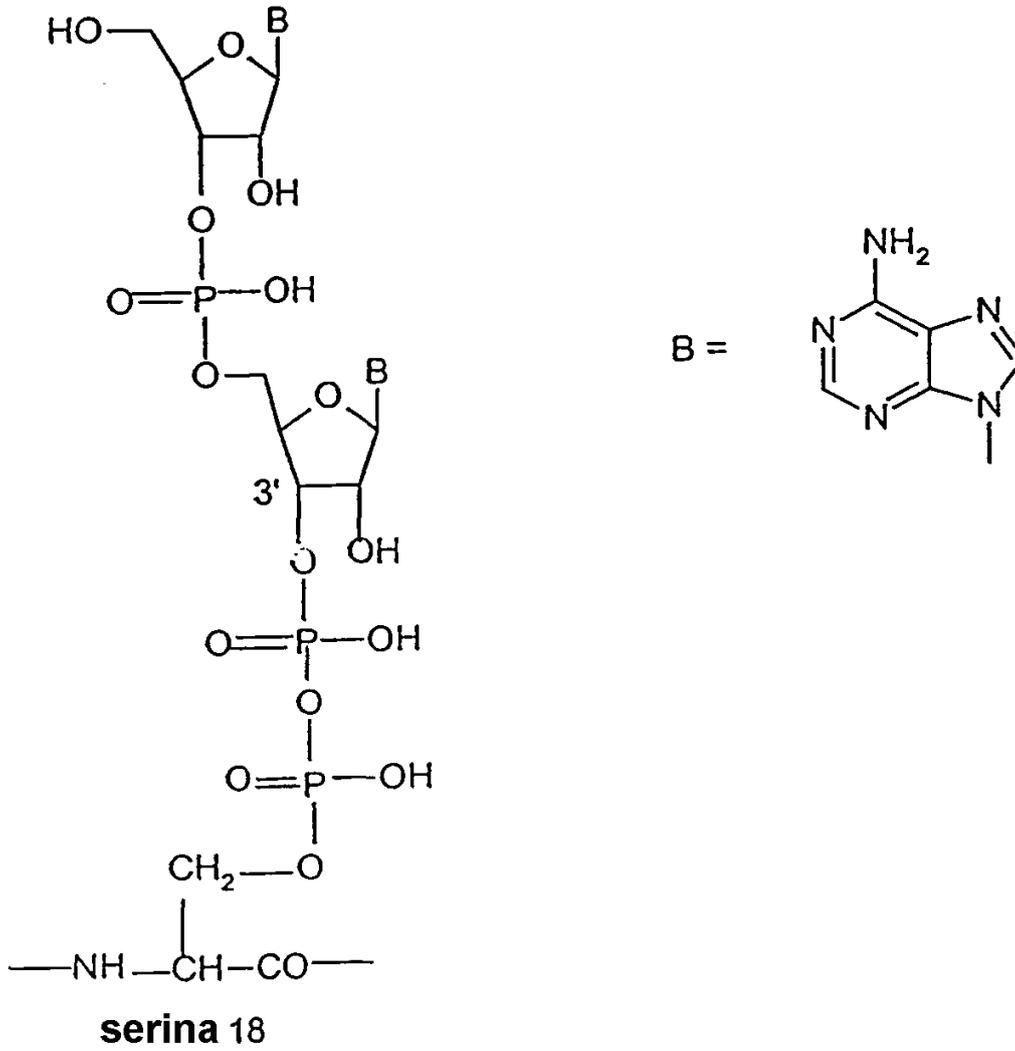
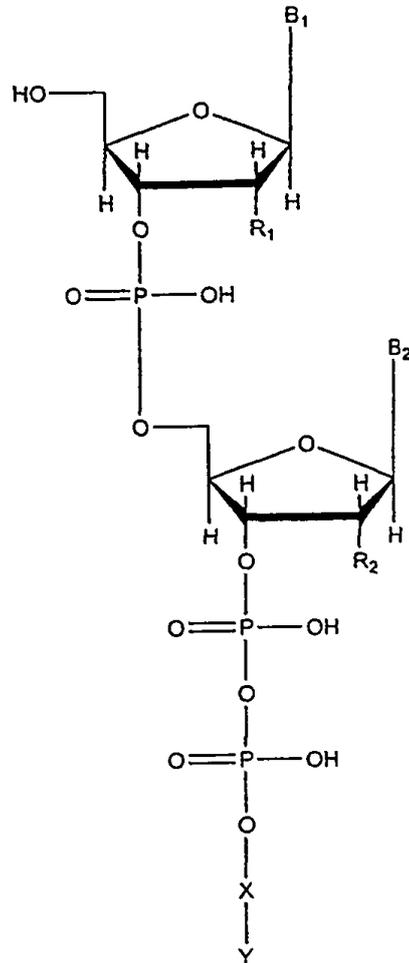


Figura 17



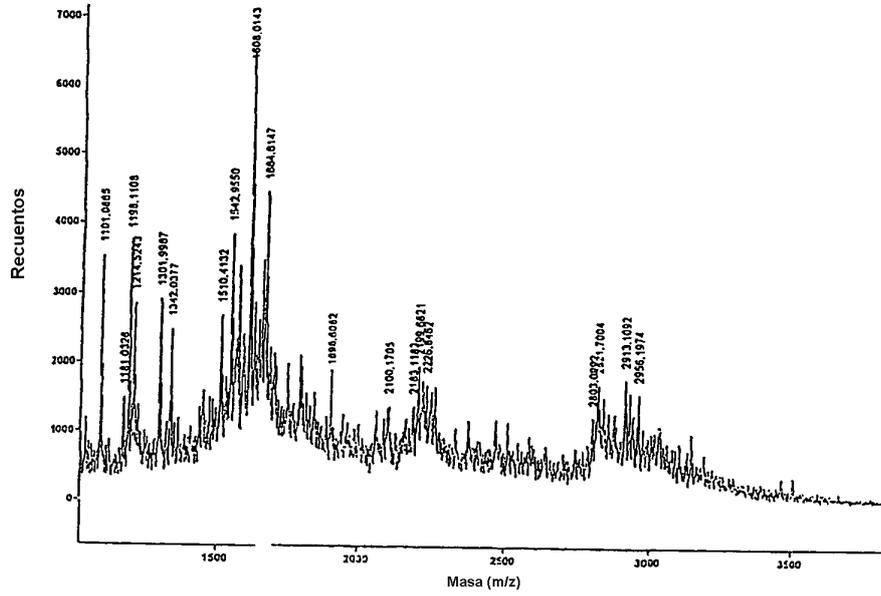
B₁, B₂ = Citosina, Guanina, Adenina, Timina, Uracilo, 5-metilcitosina, 5-fluorouracilo

R₁, R₂ = H, OH

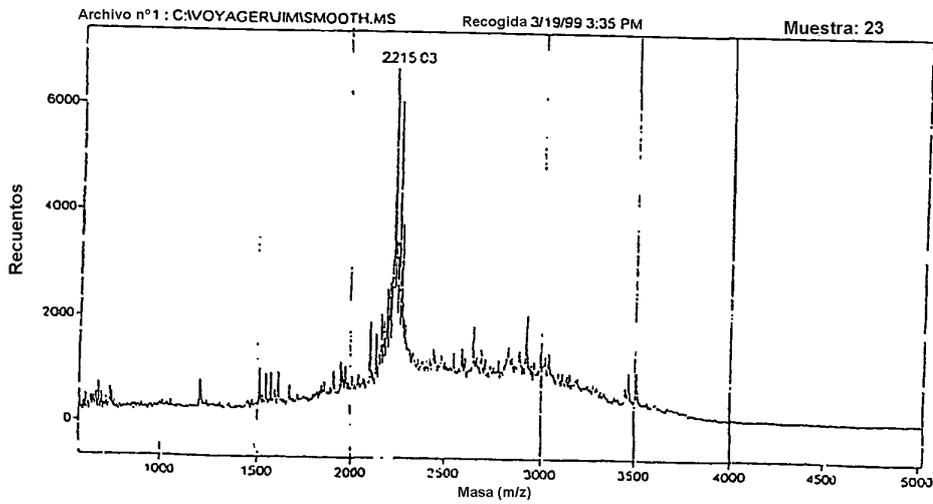
X = resto de aminoácido Ser, Thr, Tyr hidroxilado

Y = restos peptídicos

Figura 18



Muestra = T03556 (-4.3122)
MW =



21:21:56 02 JUN

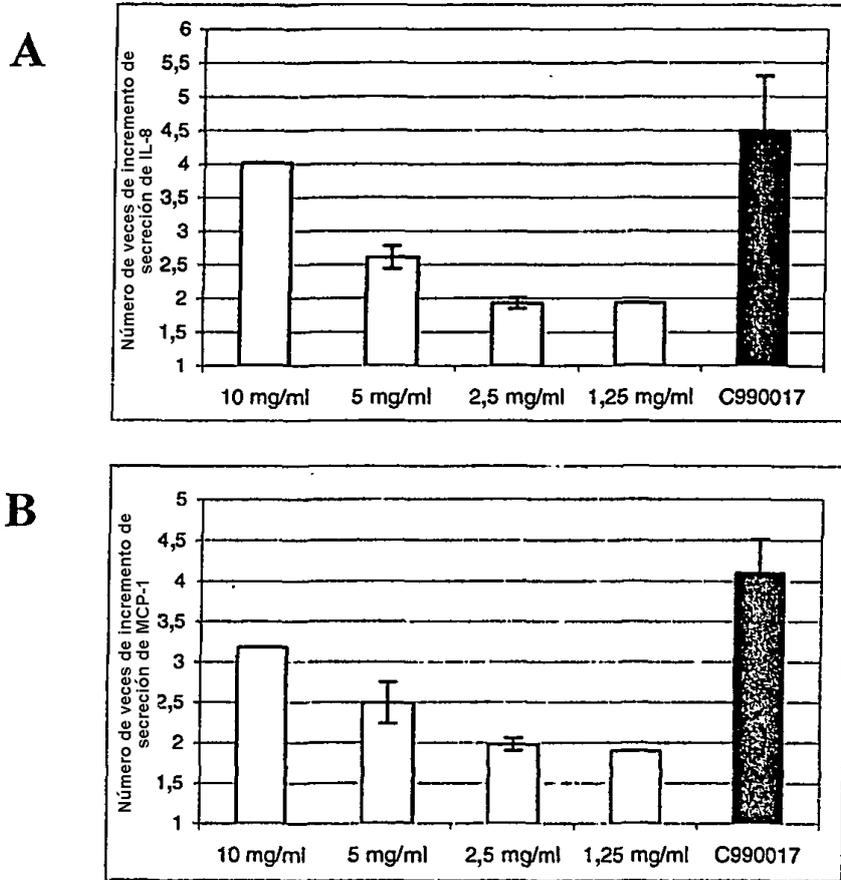


Figura 19: Efecto de la concentración del componente peptídico del Producto R sobre la secreción de IL-8 (A) y MCP-1 (B) por células U937.

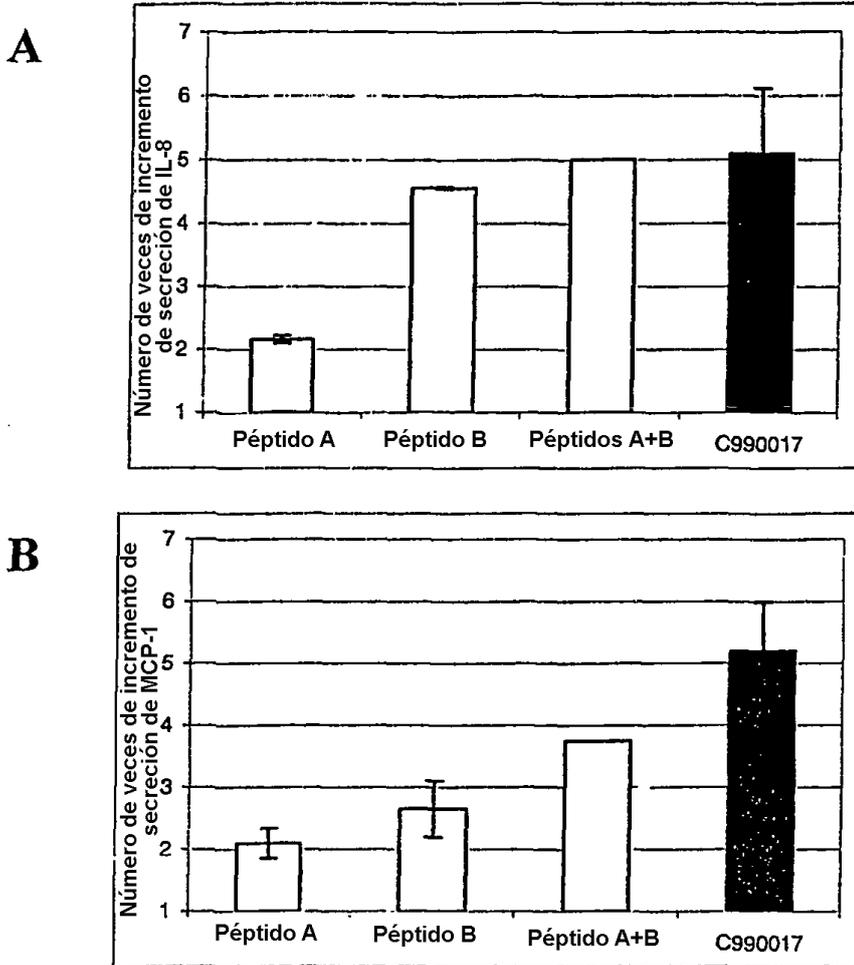


Figura 20. Efecto de péptidos aislados del Producto R sobre la secreción de IL-8(A) y MCP-1(B) por células U937.