

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 590**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 08800773 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **16.06.2010 EP 2196477**

54 Título: **Endostatina humana recombinante modificada y su aplicación**

30 Prioridad:

05.09.2007 CN 200710131562

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2013

73 Titular/es:

**JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL R&D
CO., LTD. (50.0%)
699-18, XUANWU AVENUE XUANWU DISTRICT
NANJING JIANGS 210042, CN y
SHANDONG XIANSHEG MAIDEJIN BIOLOGICAL
PHARMACEUTICAL CO. LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YAO, WENBING;
TIAN, HONG;
XU, XIANGYANG;
LI, HAIRUI;
TONG, YUE y
GAO, XIANGDONG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 394 590 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

Endostatina humana recombinante modificada y su aplicación.

Fundamento de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al campo de la biofarmacia y en particular a una endostatina humana recombinante modificada y su aplicación.

Técnica relacionada

10 Desde el punto de vista de la "dependencia del crecimiento tumoral de la neoangiogénesis" propuesto por el Profesor Folkman en 1971, es posible controlar el crecimiento tumoral bloqueando la neoangiogénesis, para conseguir el objeto de inhibir la invasión tumoral, la recidiva y la metástasis, creando así un nuevo campo en la terapia de tumores.

15 En 1997, O'Reilly, et al., en la Universidad de Harvard encontraron que el medio de cultivo de células endoteliales de hemangioendotelioma de ratón tenía un efecto inhibitor sobre los endotelios, y por purificación, dicha especie activa exhibía inhibición del crecimiento, dependiente de la dosis, de los endotelios, específicamente en cierto intervalo de concentraciones (100 ng/ml-600 ng/ml). La secuenciación de los aminoácidos terminales del extremo N indicó que, dicha especie es un fragmento terminal del extremo C del colágeno XVIII, con un peso molecular de aproximadamente 20 kD, y dicha proteína se denomina endostatina (ES).

20 Los estudios muestran que la endostatina puede controlar eficazmente el crecimiento, la infiltración y la metástasis de diversos tumores sólidos, tales como el carcinoma de pulmón no microcítico, el cáncer de colon, el glioma cerebral, el fibroma, el mesotelioma y linfomas malignos. Actualmente, la endostatina se obtiene por un método de ingeniería genética. Debido al coste demasiado alto de la expresión de endostatina por hongos, hay una tendencia hacia la utilización de E. coli como sistema de expresión, pero la proteína expresada tiene el problema de una baja renaturalización y similares. Con este objeto se inician los intentos de modificar la estructura de la endostatina natural. Luo Yongzhang, et al., añadieron 9 aminoácidos al extremo N de la endostatina natural y como resultado, se potenció la estabilidad de la ES, y se prolongó su semivida, se mejoró su bioactividad, y la renaturalización de la proteína es mayor que la del método general de producción. Este medicamento ha sido comercializado, con el nombre comercial Endostar. La endostatina humana producida recombinantemente consiste en 192 aminoácidos, y su secuencia de aminoácidos es:

30 **(M)GGSHHHHHHSRDFQPVHLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRADR
AAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSFQKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNGRRLTESYCETWRTEAP
SATGQASSLLGGRLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK**, en la cual, cuando es expresada por E. coli, Met en el extremo N puede estar suprimido en algunos casos (SEQ ID NO.1 o SEQ ID NO.2).

35 Los experimentos clínicos en fase III indican que la endostatina modificada puede tener cierto efecto sinérgico cuando se usa en combinación con un fármaco genérico quimioterapéutico y ser capaz de prolongar la progresión de tumores en pacientes.

40 Experimentos clínicos confirman que la endostatina tiene pocos efectos adversos y es adecuada en combinación con radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, como proteína de pequeño tamaño molecular, la endostatina tiene propiedades inestables y estudios indican que la endostatina se degrada probablemente en condiciones anóxicas (después que la endostatina se incubaba junto con endotelios en un ambiente de hipoxia durante 48 horas, el contenido disminuirá en aproximadamente 20%). El ambiente en el interior del tumor es un ambiente de hipoxia, siendo por tanto particularmente favorable para ejercer su actividad. Por otra parte, actualmente la dosis clínica de Endostar es tan alta como 7,5 mg/m² y se administra por goteo intravenoso durante 3-4 horas al día. Los experimentos muestran que cuando se administra por inyección intraperitoneal, la endostatina se elimina en 2 horas. Estos datos indican que, después de ser introducida en el organismo, la endostatina puede ser hidrolizada por las enzimas proteolíticas, particularmente en el sitio del tumor en el que el fármaco desempeña el papel farmacodinámico. Por tanto es un problema que hay que resolver urgentemente cómo proteger la molécula de proteína contra la enzimólisis y reducir su eliminación, reduciendo de este modo la dosificación.

45 El polietilenglicol (PEG) es un polímero seguro, no activo y no tóxico. Por unión covalente a la proteína para modificación química, la pegilación es capaz de superar eficazmente las desventajas de los fármacos de naturaleza proteica en la aplicación clínica, por ejemplo prolonga la semivida en plasma, aumenta la biodisponibilidad, reduce la inmunogenicidad de la proteína, mejora el efecto curativo de los fármacos y su inocuidad y así sucesivamente, al mismo tiempo que mantiene la actividad biológica de la proteína natural. Hasta ahora, los fármacos polipeptídicos con la proteína modificados con PEG que han sido comercializados satisfactoriamente incluyen adenosina-desaminasa (Adagen[®]), asparaginasa (OncasPar[®]), interferón α -2b (PEG-intron[®]), interferón α -2a (Pegasys[®]) etc., y también están actualmente en estudios clínicos más de 20 fármacos tales como, uricasa, hirudina, interleuquina-2 y interleuquina-6.

5 Durante la pegilación de la proteína, las moléculas de PEG activadas se acoplan a los grupos amino libres, principalmente de Lys, de la molécula de proteína. Debido a que no hay solamente un grupo amino libre en la cadena proteínica, en los productos de reacción hay varios tipos de productos modificados, tales como, productos monomoleculares, bimoleculares e incluso trimoleculares. Además, los productos modificados también incluyen muchos tipos de isómeros. Comparados con los productos modificados monomoleculares, la pérdida de actividad de los productos modificados multimoleculares es mayor, conduciendo por tanto no solo al desperdicio de los sustratos de reacción, sino también a la reducción de la actividad global de los productos de reacción. El problema de los productos modificados multimoleculares puede ser resuelto controlando las condiciones de reacción y adoptando medios de purificación, para obtener productos modificados monomoleculares. Sin embargo, aún así persiste el problema de isómeros en la modificación monomolecular. Además, puede haber gran diferencia en la bioactividad de los isómeros, y la mezcla de los isómeros por lo general es difícil de purificar. Por tanto, es deseable conseguir una modificación dirigida al sitio controlando las condiciones de reacción, para favorecer la purificación y los estudios de las propiedades de los productos. Además, la modificación dirigida al sitio es más favorable para mantener la actividad de la proteína. Un método inventado por Kinstler es aprovechar el valor menor del pKa de un grupo α -amino en el extremo N que el del grupo amino de la lisina. Se obtiene el Pegfilgrastim[®] modificando el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) con PEG-acetaldehído.

10 Y. Ling et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 361 (2007), 79-84, describen que la endostatina humana recombinante Endostar ejerce un efecto antiangiogénico mediante el bloqueo de la fosforilación de tirosina inducida por VEGF en KDR/Flk-1 de células endoteliales.

20 O. Kinstler et al., Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002), 477-485, describen un estudio sobre conjugados de mono-N-terminal poli(etilenglicol)-proteína.

Yongjun Nie et al., Bioconjugate Chem. 2006, 17, 995-999, describen un estudio sobre la preparación y estabilidad de Endostatina humana recombinante monopegilada en el extremo N.

25 El documento de patente EP 1 985 302 A1 se refiere a un conjugado formado por un agente modificante y una endostatina, en donde dicho agente modificante es capaz de aumentar la vida in vivo de dicha endostatina.

El documento de patente CN 1 891 717 A se refiere a un método de modificación química para Endostatina rh recombinante humana usando mPEG-propionaldehído para combinarse con el grupo amino libre de un aminoácido B-terminal de Endostatina rh.

30 El documento de patente CN 101 002 946 A describe una medicina antineoplásica para tratar un tumor o preparar una medicina compuesta antineoplásica.

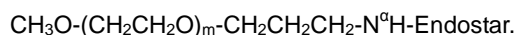
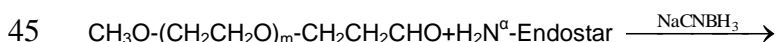
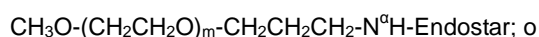
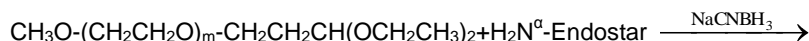
SUMARIO DE LA INVENCION

35 La presente invención se refiere a una endostatina humana recombinante modificada $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar, que potencia la estabilidad de Endostar *in vivo*, aumenta la concentración eficaz del fármaco en sangre, prolonga la semivida y reduce la dosificación del fármaco. El peso molecular medio ponderal de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ es 20 kD-40 kD, un peso molecular medio ponderal preferido de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ es 20 kD (expresado por $m=20$ kD), otro peso molecular medio ponderal preferido de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ es 40 kD (expresado por $m=40$ kD), con una dispersidad $\leq 1,2$ y una dispersidad preferida de 1,1.

40 La presente invención se refiere además a una aplicación de la endostatina humana recombinante modificada $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar en la preparación de fármacos antitumorales.

Los objetivos de la presente invención se consiguen por la siguiente medida.

1. Modificación química del extremo N de Endostar. Las fórmulas de las reacciones son como sigue:



(1) Fuente de Endostar: la endostatina vascular humana recombinante útil en la presente invención es de Jiangsu Sincere-Medgenn Bio-pharmaceutical Co., Ltd. Es la endostatina con la secuencia de aminoácidos adicional (Met)GlyGlyXaaHisHisHisHisHis en el extremo N expresada por E. coli, tiene un peso molecular de 21 kD, en la cual Xaa representa un aminoácido neutro o está ausente, y cuando es expresada por E. coli, Met en el extremo N puede estar suprimido en algunos casos.

(2) La endostatina vascular humana recombinante útil en la presente invención reacciona con derivados de monometil-polietilenglicol en presencia del agente reductor cianoborohidruro de sodio (concentración final de 10 mM-30 mM) a 0°C- 25°C durante 10 h-40 h, dando $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar.

La presente invención tiene los siguientes efectos beneficiosos.

5 La endostatina humana recombinante modificada ($\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar) de la presente invención tiene las siguientes ventajas:

(1) La concentración en sangre eficaz *in vivo* de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar es mayor en comparación con la de Endostar;

10 (2) La actividad para inhibir la proliferación de endoteliositos de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar ha aumentado significativamente en comparación con la de Endostar;

(3) La semivida *in vivo* de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar es mayor en comparación con la de Endostar;

(4) El área bajo la curva (AUC) de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar es mayor en comparación con la de Endostar.

15 Las ventajas muestran que, para el Endostar modificado, se ha potenciado la estabilidad *in vivo*, se ha aumentado la concentración del fármaco en sangre, se ha prolongado la semivida y se ha aumentado significativamente la actividad para inhibir la proliferación de endoteliositos, reduciendo por tanto la dosificación del fármaco, disminuyendo la frecuencia de administración, mitigando la aflicción física del paciente y aliviando su carga económica. La $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar es útil en la preparación de fármacos antitumorales.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada dada a continuación solamente para ilustración, y por tanto no es limitativa de la presente invención, y en donde:

25 La FIG. 1 muestra el acoplamiento de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ con Endostar, en la cual las pistas de electroforesis 1-4 corresponden respectivamente a: 1 las proteínas estándares con pesos moleculares 14400, 20100, 31000, 43000, 66200, 97400 respectivamente; 2 Endostar; 3 la mezcla de reacción; 4 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$.

La FIG. 2 es un diagrama cromatográfico de la purificación de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar.

30 La FIG. 3 muestra una identificación por SDS-PAGE de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar después de purificación, en la cual las pistas de electroforesis 1-4 corresponden respectivamente a: 1 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar después de purificación; 2 la mezcla de reacción; 3 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$; 4 las proteínas estándares con pesos moleculares de 14400, 20100, 31000, 43000, 66200, 97400 respectivamente.

35 La FIG. 4 muestra el acoplamiento de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{40\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ con Endostar, en la cual las pistas de electroforesis 1-5 corresponden respectivamente a: 1-4 las mezclas de reacción; 5 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{40\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$.

La FIG. 5 es un diagrama cromatográfico de la purificación de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{40\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar.

40 La FIG. 6 muestra una identificación por SDS-PAGE de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{40\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar después de purificación, en la cual las pistas de electroforesis 1-3 respectivamente corresponden a: 1-2 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{40\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^q\text{H}$ -Endostar después de purificación; 3 las proteínas estándares con pesos moleculares de 14400, 20100, 31000, 43000, 66200, 97400 respectivamente.

La FIG. 7 es una curva de las relaciones de las concentraciones en sangre de Endostar antes y después de la modificación frente al tiempo.

La FIG. 8 muestra la actividad de Endostar antes y después de la modificación para inhibir la proliferación de endoteliositos.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En lo sucesivo la presente invención se describe con más detalle con referencia a las realizaciones que se indican a continuación, que no se pretende que limiten el alcance de la protección de la presente invención.

Realización 1. Preparación de un compuesto de acoplamiento de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ de un peso molecular medio ponderal de 20 kD con Endostar (abreviadamente PEG₂₀-ENDO):

(1) Acoplamiento de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ con Endostar

5 A 20 ml de solución madre de Endostar (pH 5,0-5,5, tampón HAc/NaAc, contenido de proteína de 5 mg/ml), se añadió el agente reductor cianoborohidruro de sodio NaCNBH_3 hasta una concentración final de 20 mM y 100 mg de monometoxi-poli(etilenglicol)-3,3-dietoxi-propano a una relación molar de monometoxi-poli(etilenglicol)-3,3-dietoxi-propano a Endostar de 1:1, y se agitó durante una noche a 4°C, para formar los productos de modificación PEG₂₀-ENDO, que se identificaron por SDS-PAGE. Los resultados de la identificación se muestran en la FIG. 1.

(2) Purificación de PEG₂₀-ENDO

10 Los productos de reacción se separaron y purificaron por cromatografía AKTA en columna de CM-Sepharose. Las muestras se inyectaron tras ser diluidas con tampón PB 20 mM, pH 7,0, equilibradas con tampón PB 20 mM, pH 7,0 hasta la línea base, luego eluidas escalonadamente con tampones PB 20 mM, pH 7,0 que contenían NaCl 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M respectivamente (FIG. 2) y recogidas en un colector de fracciones. Los productos modificados se identificaron por SDS-PAGE. (FIG. 3).

Realización 2. Preparación de un compuesto de acoplamiento de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{40\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ de un peso molecular medio ponderal de 40 kD con Endostar (abreviadamente PEG₄₀-ENDO):

15 (1) Acoplamiento de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{40\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ con Endostar

20 A 20 ml de solución madre de Endostar (pH 5.0-5.5, tampón HAc/NaAc, contenido de proteína de 5 mg/ml), se añadió el agente reductor cianoborohidruro de sodio NaCNBH_3 hasta una concentración final de 20 mM, y 400 mg de monometoxi-poli(etilenglicol)-3,3-dietoxi-propano a una relación molar de monometoxi-poli(etilenglicol)-3,3-dietoxi-propano a Endostar de 1:2, y se agitó durante una noche a 4°C, para formar los productos de modificación PEG₄₀-ENDO, que se identificaron por SDS-PAGE (FIG.4)

(2) Purificación de PEG₄₀-ENDO

25 Los productos de reacción se separaron y purificaron por cromatografía AKTA en columna de CM-Sepharose. Las muestras se inyectaron tras ser diluidas con tampón PB 20 mM, pH 7,0, equilibradas con tampón PB 20 mM, pH 7,0 hasta la línea base, luego eluidas escalonadamente con tampones PB 20 mM, pH 7,0 que contenían NaCl 0-0,5 M respectivamente (FIG. 5), y recogidas en un colector de fracciones. Los productos modificados se identificaron por SDS-PAGE. (FIG. 6).

Realización 3. Estudio farmacocinético de endostatina humana recombinante modificada con polietilenglicol.

30 15 ratas SD machos se dividieron en 3 grupos al azar y se dosificaron con 45 mg/kg de peso. Al grupo A se le administró Endostar no modificado, al grupo B PEG₂₀-ENDO y al grupo C PEG₄₀-ENDO. Se tomaron muestras de sangre a los 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h de la administración del anticoagulante heparina y se centrifugaron inmediatamente a 6000 rpm durante 10 minutos, para obtener las muestras de plasma. El contenido de las muestras en el plasma se midió con el kit *Human Endostatin Protein Accucyte® EIA*. Se determinó que la concentración en sangre eficaz de la endostatina modificada aumentó en más de 20 veces (FIG. 7), y la semivida *in vivo* es 18 h para la PEG₂₀-ENDO y 97 h para la PEG₄₀-ENDO, mientras que es 8 h para Endostar. El AUC mejora al menos 10 veces para PEG₂₀-ENDO y al menos 100 veces para PEG₄₀-ENDO, en comparación con el de Endostar.

(AUC_{0-∞} de Endostar = 1065,46 µg/L*h; AUC_{0-∞} de PEG₂₀-ENDO = 1133103,46 µg/L*h; AUC_{0-∞} de PEG₄₀-ENDO = 19759375,66 µg/L*h)

Realización 4. Determinación de la bioactividad de Endostar modificado con polietilenglicol.

40 1. Se cultivaron endotelios de aorta de bovino en un medio RPMI-1640 que contenía suero fetal bovino al 10%, se colocaron en una incubadora a 37°C, con CO₂ al 5% y se seleccionaron para el experimento las células en fase de crecimiento logarítmico.

45 2. Las concentraciones de células (10000/ml) se ajustaron y dichas células se dividieron en 10 grupos para sembrar en una placa de 96 pocillos con 5 pocillos duplicados para cada grupo, se colocaron en una incubadora a 37°C, CO₂ al 5% durante 24 h, y se añadieron Endostar, PEG₂₀-ENDO y PEG₄₀-ENDO respectivamente a la concentración final de 100 µg/ml, 25 µg/ml, 6,25 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,39 µg/ml después de la adherencia celular. Para el grupo de control, se añadieron medio 1640 que contenía 2% de FCS y medio 1640 que contenía 2% de FCS+bFGF y los pocillos se sellaron con medio 1640 que contenía 2% de FCS en las últimas 4 semanas.

50 3. El valor de la densidad óptica (DO) de cada pocillo se midió por el método MTT. La tasa de inhibición se calculó de acuerdo con el valor de la DO y la fórmula de cálculo es Tasa de inhibición (TI) = (valor medio de la DO del grupo de control – valor medio de la DO del grupo experimental)/ valor medio de la DO del grupo de control.

4. La actividad de inhibición de la proliferación de endotelios de PEG₂₀-ENDO y PEG₄₀-ENDO aumenta significativamente, aunque aumenta más la actividad de PEG₂₀-ENDO (FIG. 8).

Listado de secuencias

<110> Jiangsu Simcere Pharmaceutical R&D Co., Ltd., China Pharmaceutical University, Shandong Xiansheng Maidejin Biological Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Una endostatina humana recombinante modificada y su aplicación

5 <160> 2

<210> 1

<211> 192

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Endostatina humana recombinante expresada por E. coli

<400> 1

Met	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Ser	His	Arg	Asp	Phe
1				5					10					15
Gln	Pro	Val	Leu	His	Leu	Val	Ala	Leu	Asn	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly
				20					25					30
Gly	Met	Arg	Gly	Ile	Arg	Gly	Ala	Asp	Phe	Gln	Cys	Phe	Gln	Gln
				35					40					45
Ala	Arg	Ala	Val	Gly	Leu	Ala	Gly	Thr	Phe	Arg	Ala	Phe	Leu	Ser
				50					55					60
Ser	Arg	Leu	Gln	Asp	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Arg	Arg	Ala	Asp	Arg
				65					70					75
Ala	Ala	Val	Pro	Ile	Val	Asn	Leu	Lys	Asp	Glu	Leu	Leu	Phe	Pro
				80					85					90
Ser	Trp	Glu	Ala	Leu	Phe	Ser	Gly	Ser	Glu	Gly	Pro	Leu	Lys	Pro
				95					100					105
Gly	Ala	Arg	Ile	Phe	Ser	Phe	Asp	Gly	Lys	Asp	Val	Leu	Arg	His
				110					115					120
Pro	Thr	Trp	Pro	Gln	Lys	Ser	Val	Trp	His	Gly	Ser	Asp	Pro	Asn
				125					130					135
Gly	Arg	Arg	Leu	Thr	Glu	Ser	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Arg	Thr	Glu
				140					145					150
Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Gly	Gln	Ala	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Arg
				155					160					165
Leu	Leu	Gly	Gln	Ser	Ala	Ala	Ser	Cys	His	His	Ala	Tyr	Ile	Val
				170					175					180
Leu	Cys	Ile	Glu	Asn	Ser	Phe	Met	Thr	Ala	Ser	Lys			
				185					190					

15

<210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Endostatina humana recombinante expresada por E. coli

<400> 2

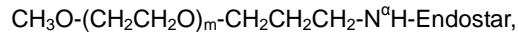
ES 2 394 590 T3

Gly Gly Ser His His His His His His Ser His Arg Asp Phe Gln
1 5 10 15
Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Ser Pro Leu Ser Gly Gly
20 25 30
Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln Gln Ala
35 40 45
Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser Ser
50 55 60
Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Ala
65 70 75
Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe Pro Ser
80 85 90
Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro Gly
95 100 105
Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg His Pro
110 115 120
Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly
125 130 135
Arg Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala
140 145 150
Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu
155 160 165
Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu

Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ala Ser Lys
170 175 180
185 190

REIVINDICACIONES

1. Una endostatina recombinante modificada que tiene una estructura de:

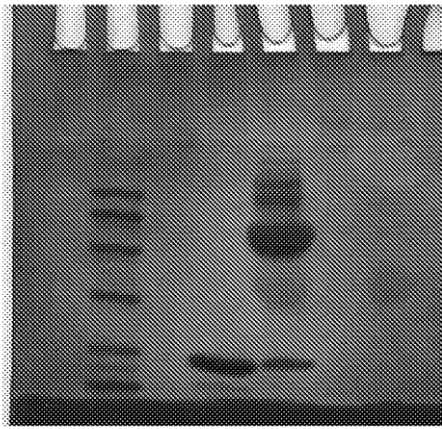


5 en donde el peso molecular medio ponderal de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ es 20 kD-40 kD; y la secuencia de aminoácidos de Endostar es la SEQ ID.NO.1 o la SEQ ID.NO.2.

2. La endostatina recombinante modificada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el peso molecular medio ponderal de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ es 20 kD.

3. La endostatina recombinante modificada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el peso molecular medio ponderal de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ es 40 kD.

10 4. Una aplicación de la endostatina recombinante modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la preparación de fármacos anti-tumorales.



1 2 3 4

FIG. 1

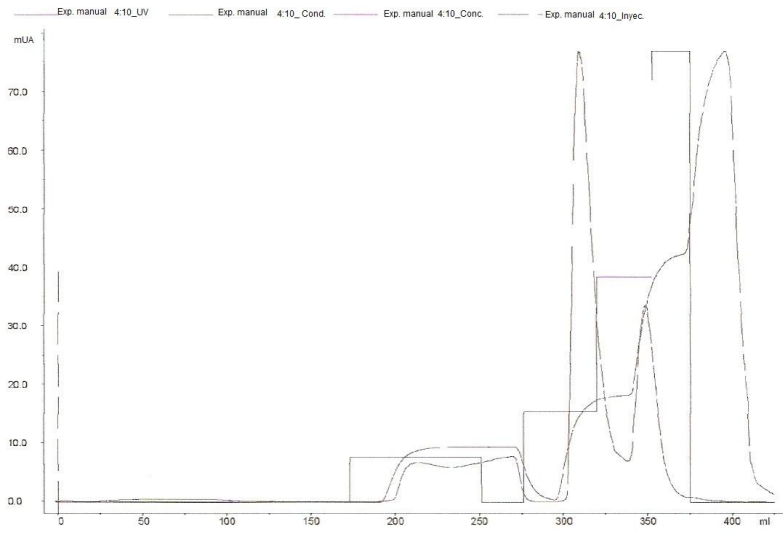
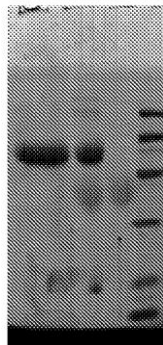


FIG. 2



1 2 3 4
FIG. 3

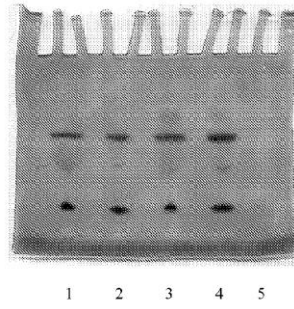


FIG. 4

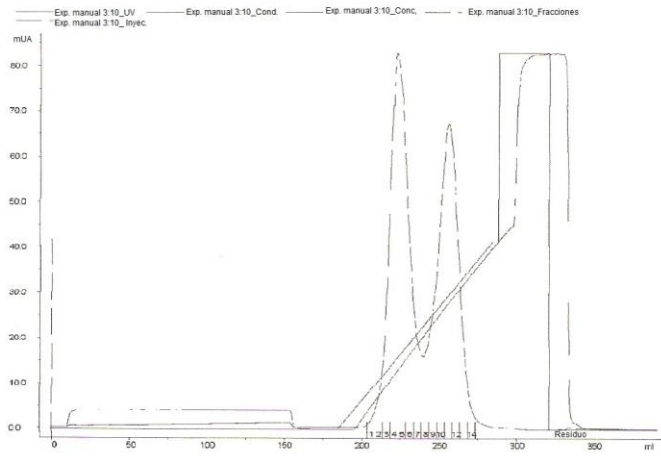


FIG. 5



1 2 3

FIG. 6

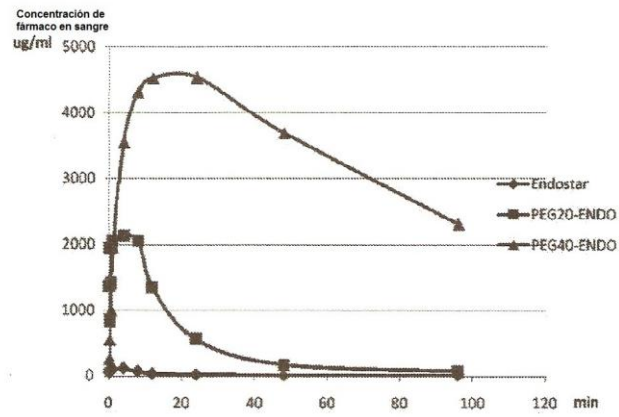


FIG. 7

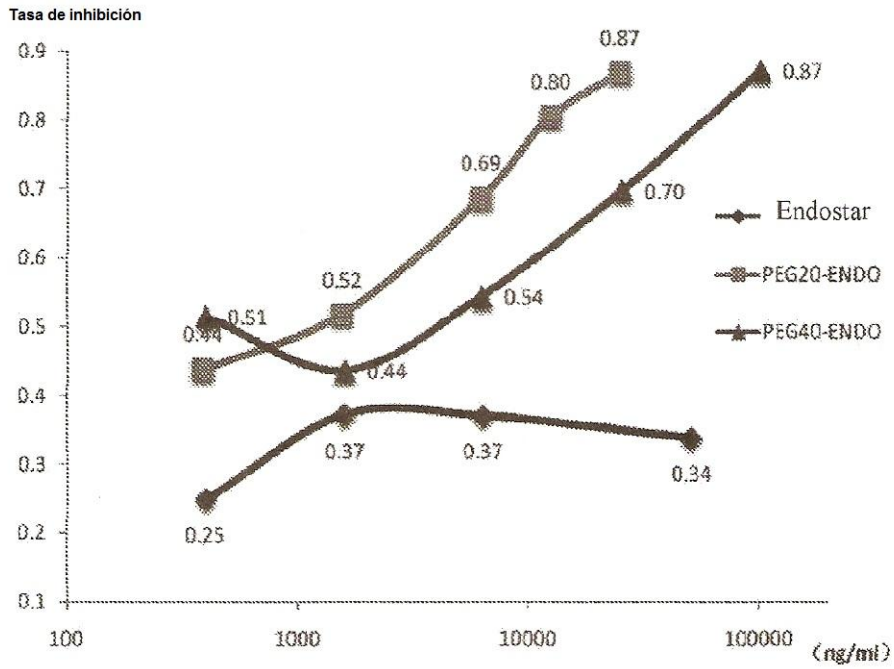


FIG. 8