

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 660**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**C07K 14/65** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12N 9/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2007 E 07801961 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2059261**

54 Título: **Método para la producción de conjugados de factor I de crecimiento similar a la insulina y polietilenglicol**

30 Prioridad:

**31.08.2006 EP 06018170**

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

**08.03.2013**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**FISCHER, STEPHAN;  
HESSE, FRIEDERIKE;  
KNOETGEN, HENDRIK;  
LANG, KURT;  
METZGER, FRIEDRICH;  
REGULA, JOERG, THOMAS;  
SCHANTZ, CHRISTIAN;  
SCHAUBMAR, ANDREAS y  
SCHOENFELD, HANS, JOACHIM**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 397 660 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

Método para la producción de conjugados de factor I de crecimiento similar a la insulina y polietilenglicol

5 La presente invención se refiere a métodos para la producción de conjugados de factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) con polietilenglicol (PEG), a composiciones farmacéuticas que contienen dichos conjugados y a métodos de utilización de dichos conjugados.

10 Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una forma crecientemente prevalente de neurodegeneración que explica aproximadamente 50% a 60% de los casos totales de demencia entre personas de más de 65 años. Se estima que actualmente afecta a 15 millones de personas en todo el mundo y debido al relativo incremento de personas de edad avanzada en la población, es probable que se incremente su prevalencia en las próximas 2 a 3 décadas. La EA es un trastorno progresivo con una duración media de aproximadamente 8,5 años desde la aparición de los síntomas clínicos hasta la muerte. La muerte de neuronas piramidales y la pérdida de sinapsis neuronales en regiones cerebrales asociadas a funciones mentales superiores resulta en los síntomas típicos de alteraciones gruesas y progresivas de la función cognitiva (Francis P.T. *et al.*, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 66:137-147, 1999). La EA es la forma más común de demencia tanto senil como presenil y se reconoce clínicamente como demencia inexorablemente progresiva que se presenta con pérdida creciente de la memoria, de la función intelectual y alteraciones del habla (Merritt, A Textbook of Neurology, 6a edición, Lea & Febiger, Philadelphia, 1979, páginas 484 a 489). Neuropatológicamente las características principales de la EA son la presencia de dos lesiones típicas: las placas seniles de amiloide y los ovillos neurofibrilares (ONF). Mientras que las placas se depositan en el exterior de las neuronas, los ovillos se observan en el interior de las mismas en el cerebro post mortem. Uno de los componentes principales del núcleo de las placas amiloides es el péptido de pequeñas dimensiones beta-amiloide ( $\beta$ A) depositado patológicamente, el cual es cortado por secretasas a partir de la proteína precursora amiloide (PPA) (Selkoe D.J., *Physiol. Rev.* 81:741-766, 2001; Hardy J. y Selkoe D.J., *Science* 297:353-356, 2002; Bush A.I. y Tanzi R.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:7317-7319, 2002). El  $\beta$ A es un péptido autoagregante de 39 a 43 residuos (PM ~4 kDa) sintetizado como parte del péptido de mayor tamaño PPA (110 a 120 kDa). El PPA es una glucoproteína integral de membrana de tipo I con un dominio extracelular N-terminal de gran tamaño, un único dominio transmembranal y una cola citoplasmática corta. La región  $\beta$ A abarca partes de los dominios extracelular y transmembranal del PPA. La hipótesis más habitual sobre la participación del PPA en la muerte de las células neuronales en la EA es la hipótesis del amiloide. Esta hipótesis postula que los depósitos de placa amiloide o de  $\beta$ A soluble parcialmente agregado desencadenan una cascada neurotóxica, provocando de esta manera una neurodegeneración similar a la patología de la EA (Selkoe D.J., *Physiol. Rev.* 81:741-766, 2001; Hardy J. y Selkoe D.J., *Science* 297:353-356, 2002).

40 El factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) humano es una hormona circulante estructuralmente relacionada con la insulina. IGF-I ha sido considerado tradicionalmente como el principal mediador de las acciones de la hormona del crecimiento sobre los tejidos periféricos. IGF-I consiste de 70 aminoácidos y también se denomina somatomedina C y ha sido definido como SwissProt n° P01343. El uso, actividad y producción se mencionan en, por ejemplo, le Bouc Y. *et al.*, *FEBS Lett.* 196:108-112, 1986; de Pagter-Holthuizen P. *et al.*, *FEBS Lett.* 195:179-184, 1986; Sandberg Nordqvist A.C. *et al.*, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 12:275-277, 1992; Steenbergh P.H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175:507-514, 1991; Tanner J.M. *et al.*, *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 84:681-696, 1977; Uthne K. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39:548-554, 1974; patentes EP n° 0 123 228 y n° 0 128 733, US n° 5.861.373, US n° 5.714.460, EP n° 0 597 033, WO 02/32449 y WO n° 93/02695.

50 La regulación de la función del IGF-I es bastante compleja. En circulación, sólo el 0,2% de IGF-I existe en forma libre, mientras que la mayor parte se encuentra unida a proteínas de unión a IGF (IGFBP), que presentan afinidades muy elevadas para los IGF y que modulan la función del IGF-I. El factor puede ser liberado localmente mediante mecanismos que liberan IGF-I, tales como la proteólisis de las IGFBP por proteasas.

55 El IGF-I desempeña un papel paracrino en el cerebro en desarrollo y maduro (Werther G.A. *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 4:773-778, 1990). Los estudios *in vitro* indican que IGF-I es un potente agente trófico no selectivo para varios tipos de neuronas en el SNC (Knusel B. *et al.*, *J. Neurosci.* 10:558-570, 1990; Svrzic D. y Schubert D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:54-60, 1990), incluyendo las neuronas dopaminérgicas (Knusel B. *et al.*, *J. Neurosci.* 10:558-570, 1990) y los oligodendrocitos (McMorris F.A. y Dubois-Dalcq M., *J. Neurosci. Res.* 21:199-209, 1988; McMorris F.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:822-826, 1986; Mozell R.L. y McMorris F.A., *J. Neurosci. Res.* 30:382-390, 1991). La patente US n° 5.093.317 menciona que la supervivencia de las células neuronales colinérgicas resulta incrementada por la administración de IGF-I. Es conocido además que IGF-I estimula la regeneración de los nervios periféricos (Kanje M. *et al.*, *Brain Res.* 486:396-398, 1989) y que incrementa la actividad de la ornitina descarboxilasa (patente US n° 5.093.317). Las patentes US n° 5.861.373 y WO n° 93/02695 mencionan un método para tratar lesiones o enfermedades del sistema nervioso central que afectan predominantemente a las células

gliales y/o a las células neuronales no colinérgicas mediante el incremento de la concentración o concentraciones activas de IGF-I y/o análogos del mismo en el sistema nervioso central del paciente. La patente WO nº 02/32449 se refiere a métodos para reducir o prevenir el daño isquémico en el sistema nervioso central de un mamífero mediante la administración en la cavidad nasal del mamífero de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de IGF-I o de un derivado biológicamente activo del mismo. El IGF-I o variante del mismo resulta absorbido en la cavidad nasal y transportado al sistema nervioso central del mamífero en una cantidad efectiva para reducir o prevenir el daño isquémico asociado a un suceso isquémico. La patente EP nº 0 874 641 reivindica la utilización de un IGF-I o un IGF-II para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o prevención del daño neuronal en el sistema nervioso central, debido a demencia relacionada con el SIDA, EA, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Huntington, encefalopatía hepática, síndromes ganglionares corticales-basales, demencia progresiva, demencia familiar con paraparesia espástica, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, esclerosis cerebral de Schilder o encefalomielitis hemorrágica necrotizante, en las que el medicamento se encuentra en una forma destinada a la administración parenteral de una cantidad efectiva de dicho IGF fuera de la barrera hematocefálica o de la barrera hematomedular.

La reducción de los niveles cerebrales y séricos de IGF-I libre se ha relacionado con la patogénesis de las formas esporádicas y hereditarias de EA. Además, IGF-I protege a las neuronas frente a la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  (Niikura T. *et al.*, J. Neurosci. 21:1902-1910, 2001; Dore S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4772-4777, 1997; Dore S. *et al.*, Ann. NY Acad. Sci. 890:356-364, 1999). Recientemente se ha demostrado que el IGF-I administrado periféricamente es capaz de reducir los niveles cerebrales de  $\beta$ A en ratas y ratones (Carro E. *et al.*, Nat. Med. 8:1390-1397, 2002). Además, el estudio ha demostrado que en un modelo de ratón transgénico de la EA, el tratamiento prolongado de IGF-I reduce significativamente la carga de placas amiloides en el cerebro. Estos datos proporcionan fuerte soporte a la idea de que el IGF-I es capaz de reducir los niveles cerebrales de  $\beta$ A y la demencia cerebral asociada a las placas mediante la eliminación del  $\beta$ A en el cerebro.

La modificación covalente de proteínas con polietilenglicol (PEG) ha demostrado ser un método útil para extender las vidas medias circulantes de las proteínas en el cuerpo (Hershfield MS. *et al.*, N. Engl. J. Med. 316:589-596, 1987; Meyers F.J. *et al.*, Clin. Pharmacol. Ther. 49:307-313, 1991; Delgado C. *et al.*, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9:249-304, 1992; Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10:91-114, 1993; documento EP nº A 0 400 472; Monfardini C. *et al.*, Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Satake-Ishikawa R. *et al.*, Cell Struct. Funct. 17:157-160, 1992; Katre N.V. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1487-1491, 1987; Tsutsumi Y. *et al.*, Jpn. J. Cancer Res. 85:9-12, 1994; Inoue H. *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 124:529-536, 1994; Chamow S.M. *et al.*, Bioconjugate Chem. 5:133-140, 1994).

Otras ventajas de la PEGilación son un incremento de la solubilidad y una reducción de la inmunogenicidad de las proteínas (Katre N.V., J. Immunol. 144:209-213, 1990). Un método habitual para la PEGilación de las proteínas es la utilización de polietilenglicol activado con reactivos aminorreactivos tales como la N-hidroxisuccinimida (NHS). Con dichos reactivos se une polietilenglicol a las proteínas en los grupos amino primarios libres, tales como el grupo  $\alpha$ -amino N-terminal y los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina. Sin embargo, una limitación importante de dicho enfoque es que las proteínas típicamente contienen una cantidad considerable de residuos de lisina y por lo tanto los grupos de polietilenglicol se unen a la proteína de una manera no específica en todos los grupos  $\epsilon$ -amino libres, resultando en una mezcla heteróloga de productos de proteínas PEGiladas aleatorias. Por lo tanto, muchas proteínas NHS-PEGiladas no resultan adecuadas para el uso comercial debido a su baja actividad específica. La inactivación resulta de la modificación covalente de uno o más residuos de lisina o del residuo amino N-terminal requeridos para la actividad biológica, o de la unión covalente de los residuos de polietilenglicol en proximidad o en el sitio activo de la proteína. Por ejemplo, se ha encontrado que la modificación de la hormona del crecimiento humana utilizando reactivos de NHS-PEGilación reduce la actividad biológica de la proteína en más de 10 veces (Clark R. *et al.*, J. Biol. Chem. 271:21969-21977, 1996). La hormona del crecimiento humana contiene 9 lisinas además del aminoácido N-terminal. Algunas de estas lisinas se encuentran situadas en regiones de la proteína que es conocido que resultan críticas para la unión de receptores (Cunningham B.C. *et al.*, Science 254:821-825, 1991). Además, la modificación de la eritropoyetina mediante la utilización de reactivos de polietilenglicol aminorreactivos resulta también en una pérdida prácticamente completa de la actividad biológica (Wojchowski D.M. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 910:224-232, 1987). La modificación covalente del interferón- $\alpha$ 2 con reactivos de PEGilación aminorreactivos resulta en una pérdida de bioactividad de entre 40% y 75% (patente US nº 5.382.657). Una modificación similar del G-CSF resulta en una pérdida de actividad superior al 60% (Tanaka H. *et al.*, Cancer Res. 51:3710-3714, 1991) y en el caso de la interleuquina-2, superior al 90% (Goodson R.J.) y Katre N.V., BioTechnology 8:343-346, 1990).

Las patentes WO nº 94/12219 y nº 95/32003 reivindican conjugados de polietilenglicol que comprenden PEG e IGF o un IGF con mutación de una cisteína, encontrándose dicho PEG unido a dicha cisteína en una cisteína libre en la región N-terminal de la cisteína. La patente WO nº 2004/60300 describe IGF-I PEGilado N-terminalmente.

La patente WO nº 91/0287 da a conocer un método para la producción de IGF-I, en el que una proteína de fusión

que comprende IGF-I unido N-terminalmente al extremo C-terminal de un propéptido se corta con una diaminopeptidasa.

5 El sitio de reconocimiento de la IgA proteasa se describe como Yaa-Pro!.Xaa-Pro. Yaa se refiere a Pro (o raramente a Pro en combinación con Ala, Gly o Thr: Pro-Ala, Pro-Gly o Pro-Thr. Xaa se refiere a Thr, Ser o Ala (Pohlner J. *et al.*, Bio/Technology 10:799-804, 1992; Pohlner J. *et al.*, Nature 325:458-462, 1987, y la patente US nº 5.427.927). Los sitios de corte naturales han sido identificados por Wood S.G. y Burton J., Infect. Immun. 59:1818-1822, 1991. Los sustratos peptídicos sintéticos para la inmunoglobulina A1 proteasa de *Neisseria gonorrhoeae* (tipo 2) son los sitios autoproteolíticos Lys-Pro-Ala-Pro!.Ser-Pro, Val-Ala-Pro-Pro!.Ser-Pro, Pro-Arg-Pro-Pro!.Ala-Pro, Pro-Arg-Pro-Pro!.Ser-Pro, Pro-Arg-Pro-Pro!.Thr-Pro y los sitios de corte de IgA1 Pro-Pro-Thr-Pro!.Ser-Pro y Ser-Thr-Pro-Pro!.Thr-Pro.

15 La patente WO nº 2006/066891 da a conocer conjugados que consisten de un factor-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y uno o dos grupos polietilenglicol, caracterizados porque dicha variante de IGF-I presenta una alteración de aminoácido en como máximo tres posiciones aminoácidas de entre las posiciones 27, 37, 65 y 68 de la secuencia de aminoácidos del IGF-I de tipo salvaje, de manera que uno o dos de dichos aminoácidos son lisinas y el aminoácido 27 es un aminoácido polar, aunque no lisina, conjugado mediante el grupo o grupos amino primarios de dicha lisina o lisinas y dicho grupo o grupos polietilenglicol presentan un peso molecular global de entre 20 y 100 kDa. Dichos conjugados resultan útiles para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. La patente WO nº 2006/074390 se refiere a polipéptidos de fusión de IGF-I.

#### Descripción resumida de la invención

25 La invención comprende un método para la producción de un IGF-I PEGilado en las lisinas o una variante de IGF-I PEGilado en las lisinas, comprendiendo dicha variante uno o dos aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de lisina 27, 65 y/o 68 sustituida independientemente por otro aminoácido polar, caracterizado por:

- 30 a) el cultivo de una célula huésped procariótica que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I o variante de IGF-I unido N-terminalmente al extremo C-terminal de un propéptido, en el que Gly-Pro son los dos primeros aminoácidos de IGF-I,
- 35 b) en el que dicho propéptido termina C-terminalmente con aminoácidos-Y-Pro, en donde Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro,
- c) la recuperación y PEGilación de dicha proteína de fusión,
- d) el corte de dicha proteína de fusión PEGilada con IgA proteasa, en el que dicha IgA proteasa presenta la secuencia SEC ID nº 26, y
- e) la recuperación de dicho IGF-I o variante de IGF-I PEGilado.

40 En una realización, dicho método se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas porta los aminoácidos R27, R65, K68 (RRK) y dicha variante se encuentra monoPEGilada en el residuo de lisina 68 o la variante de IGF-I PEGilada en la lisina porta los aminoácidos R27, K65, R68 (RKR) y dicha variante se encuentra monoPEGilada en el residuo de lisina 65.

45 En otra realización, dicho método se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas porta los aminoácidos R27, K65, K68 (RKK) y dicha variante se encuentra monoPEGilada o diPEGilada en los residuos de lisina 65 y 68.

50 En otra realización, dicho método se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas es una mezcla de una variante que porta los aminoácidos R27, R65, K68 (RRK), una variante que porta los aminoácidos R27, K65, R68 (RKR) o una variante que porta los aminoácidos R27, K65, K68 (RKK) y dicha variante se encuentra monoPEGilada o diPEGilada en el residuo o residuos de lisina 65 y 68.

55 Una realización adicional de la invención es una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I o variante de IGF-I unido N-terminalmente al extremo C-terminal de un propéptido, en el que Gly-Pro son los primeros dos aminoácidos de IGF-I, caracterizado porque dicho propéptido finaliza C-terminalmente con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro. Gracias a la secuencia -Y-Pro, el propéptido puede separarse mediante tratamiento con una IgA proteasa de dicho IGF-I o variante de IGF-I.

60 Preferentemente, la proteína de fusión según la invención se caracteriza por la fórmula Met-X<sub>1</sub>-His<sub>n</sub>-X<sub>2</sub>-Y-Pro-[IGF-I o variante de IG-FI], en la que:

- IGF-I se refiere al IGF-I humano y variante de IGF-I se refiere a IGF-I en el que uno o dos aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de la lisina 27, 65 y/o 68 han sido sustituidos

independientemente por otro aminoácido polar,

- Met se refiere a metionina,
- X<sub>1</sub> es un enlace, serina o asparagina,
- His es histidina,
- n es un número entre 0 y 10, preferentemente entre 0 y 6,
- X<sub>2</sub> es un péptido conector, seleccionado de entre el grupo de péptidos SEC ID n° 6-10,
- Pro es prolina, y
- Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

5  
10 Preferentemente, la proteína de fusión según la invención se selecciona de entre el grupo que consiste de las proteínas de fusión SEC ID n° 2-5 y SEC ID n° 22-25.

Preferentemente el propéptido se muestra mediante la fórmula Met-X<sub>1</sub>-His<sub>n</sub>-X<sub>2</sub>-Y-Pro, en la que:

- 15
- Met se refiere a metionina,
  - X<sub>1</sub> es un enlace, serina o asparagina,
  - His es histidina,
  - n es un número entre 0 y 10, preferentemente entre 0 y 6,
  - X<sub>2</sub> es un péptido conector, seleccionado de entre el grupo que consiste de los péptidos SEC ID n° 6-10,
  - Pro es prolina, y
  - Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.
- 20

25 El propéptido se encuentra unido C-terminalmente al extremo N-terminal (glicina) de IGF-I o de una variante de IGF-I. Preferentemente el propéptido no incluye un residuo de lisina. El propéptido preferentemente presenta una longitud de hasta 30 aminoácidos. Preferentemente X<sub>1</sub> es un enlace. Preferentemente n es 0 ó 6. Preferentemente X<sub>2</sub> es el péptido SEC ID n° 7. Preferentemente Y es Pro-Arg-Pro.

30 Las variantes de IGF-I y las variantes en la proteína de fusión preferentes son: RKK, RKR y RRK. (las variantes de IGF-I se denominan de la manera siguiente: K65 se refiere a que el aminoácido 65 es lisina, R27 se refiere a que el aminoácido 27 es arginina, etc. Una variante de IGF-I que porta los aminoácidos R27, K65 y K68 se denomina RKK, y los aminoácidos restantes de dicha variante RKK son iguales a los del IGF-I de tipo salvaje de SEC ID n° 1. De esta manera, RKK es una variante del IGF-I de tipo salvaje que se encuentra mutada en la posición 27 mediante el intercambio de K por R. RKR es una variante del IGF-I de tipo salvaje que se encuentra mutada en las posiciones 27 y 68 mediante el intercambio de K por R. RRK es una variante del IGF-I de tipo salvaje que se encuentra mutada en las posiciones 27 y 65 mediante el intercambio de K por R. El IGF-I de tipo salvaje, en el que no se ha modificado ningún aminoácido, se denomina KKK.

35

40 El IGF-I PEGilado en la lisina preferentemente se encuentra PEGilado aleatoriamente en los residuos de lisina 27, 65 y 68, preferentemente mono-PEGilado o diPEGilado (uno o dos PEG por cada molécula de IGF-I). La variante de IGF-I PEGilada en lisinas preferentemente se encuentra monoPEGilada o diPEGilada en los residuos de lisina 65 y 68, preferentemente monoPEGilado en K65 ó K68. El grupo o grupos polietilenglicol se encuentran conjugados con dicho IGF-I o variante de IGF-I mediante uno o más grupos de amino primario de la lisina o lisinas.

45 El método según la invención comprende la preparación de un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en las lisinas, presentando dicho grupo o grupos polietilenglicol un peso molecular global de por lo menos 20 kDa por cada IGF-I o variante de IGF-I, más preferentemente entre aproximadamente 20 y 100 kDa, y especialmente preferentemente entre 20 y 80 kDa, haciendo reaccionar la proteína de fusión de IGF-I según la invención con polietilenglicol activado bajo condiciones en las que dicho polietilenglicol se encuentra unido químicamente a dicho intermediario de IGF-I mediante uno o más grupos amino primarios de lisinas de IGF-I o de una variante de IGF-I. Preferentemente, el IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en lisinas se encuentra monoPEGilado. La variante preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de RKK, RKR y RRK respecto a las posiciones de aminoácidos 27, 65 y 68, respectivamente. PEG preferentemente presenta un peso molecular global medio de entre 30 y 45 kDa, especialmente de 30 ó 40 kDa.

50

55 Descripción detallada de la invención

Inesperadamente se ha encontrado que la IgA proteasa, preferentemente la IgA proteasa de *Neisseria gonorrhoeae*, es capaz de cortar la secuencia de aminoácidos Y-Pro!.Gly-Pro. Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro. Preferentemente útil como sitio de corte es Pro-Pro!.Gly-Pro (SEC ID n° 15) o Pro-ArgPro-Pro!.Gly-Pro (SEC ID n° 11) (!. : posición del corte). El sitio de corte de la IgA proteasa para el procedimiento según la presente invención presenta la secuencia de consenso

60

de aminoácidos Y-Pro!.Gly-Pro, en la que Gly-Pro son los primeros dos aminoácidos de IGF-I. Y preferentemente representa una secuencia de aminoácidos que finaliza con el aminoácido o aminoácidos Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro. Dichas secuencias de aminoácidos Y, especialmente Pro-Arg-Pro pueden prolongarse mediante un grupo adicional Ala o Pro-Ala, tal como en, por ejemplo, Ala-Pro-Arg-Pro (SEC ID n° 12) o Pro-Ala-Pro-Arg-Pro (SEC ID n° 13). Resultan particularmente preferentes las secuencias de aminoácidos de corte Pro-Arg-Pro!.Gly-Pro (SEC ID n° 14), Pro-Pro!.Gly-Pro (SEC ID n° 15), Pro-Arg-Pro-Pro!. Gly-Pro (SEC ID n° 16), Ala-Pro-Arg-Pro-Pro!.Gly-Pro (SEC ID n° 17) o Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro!.Gly-Pro (SEC ID n° 18).

Según la presente invención la expresión "IgA proteasa" incluye las proteasas que cortan específicamente IgA y que describen, por ejemplo, Kornfeld S.J. y Plaut A.G., Rev. Infekt. Dis. 3:521-534, 1981, tal como, por ejemplo, la IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2). Las IgA proteasas recombinantes, tales como la descritas en el documento DE n° A 36 22 221; Koomey J.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7881-7885, 1982; Bricker J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2681-2685, 1983; Pohlner J., Nature 325:458-462, 1987; y Halter R. *et al.*, EMBO J. 3:1595-1601, 1984, resultan igualmente adecuadas. Preferentemente dicha IgA proteasa es la IgA proteasa de *Neisseria gonorrhoea*, preferentemente de tipo 2. Preferentemente, dicha IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2) presenta la secuencia SEC ID n° 26.

El gen codificante de la proteína de fusión preferentemente se sitúa bajo el control de señales de expresión adecuadas (preferentemente inducibles) de manera que las proteínas de fusión pueden producirse según las necesidades. Pueden utilizarse células procarióticas o eucarióticas (vegetales así como animales) adecuadas como células huésped para la producción de fusiones de proteínas; sin embargo, también resultan posibles los sistemas sin células.

Una realización preferente del procedimiento según la presente invención se caracteriza porque una célula huésped se transforma con un ADN recombinante o con un vector recombinante, en el que el ADN o el vector contiene por lo menos una copia de un gen que codifica una proteína de fusión según la invención y la célula transformada se cultiva en un medio adecuado, se hace que el gen codificante de la proteína de fusión se exprese en la célula transformada, la proteína de fusión se PEGila y seguidamente se corta con la IgA proteasa y se aísla el IGF-I o variante de IGF-I PEGilado.

La expresión de la proteína de fusión según la invención puede mejorarse, por ejemplo, al nivel del ADN mediante fusión con fragmentos de gen  $\beta$ -galactosidasa sin lisina, es decir, Y contiene una parte de una proteína  $\beta$ -galactosidasa sin lisina. El experto conoce medios alternativos para incrementar la expresión de la proteína de fusión. La purificación y la separación del producto de expresión puede facilitarse mediante fusión con otros polipéptidos, en particular con polipéptidos o proteínas altamente cargadas (por ejemplo poli(Lis, Arg)) o que pueden unirse a sustancias particulares con elevada afinidad (por ejemplo estreptavidina) (ver, por ejemplo, las solicitudes de patente EP n° A 0 089 626 y EP n° A 0 306 610). Son péptidos conectores especialmente preferentes los péptidos SEC ID n° 6 a 10, preferentemente precedidos N-terminalmente por SHHHHHH (SEC ID n° 18, NHHHHHH (SEC ID n° 20) o HHHHHH (SEC ID n° 21).

La presente invención proporciona además un ácido nucleico (recombinante) que codifica una proteína de fusión según la presente invención y en el que se incorpora un sitio de corte de IgA proteasa en la región de unión entre el propéptido y el IGF-I o variante de IGF-I.

Puede obtenerse un ADN recombinante según la presente invención de una manera conocida por el experto en el campo de la biología molecular. Para ello, un vector que contiene una secuencia de ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de IGF-I o variante de IGF-I habitualmente se corta con una o más endonucleasas de restricción en la región del extremo 5' de dicho gen y se liga nuevamente con oligonucleótidos que contienen la secuencia deseada.

Además, la invención proporciona además un vector recombinante que contiene por lo menos una copia de un ADN recombinante según la presente invención. Los vectores que resultan adecuados como base para la expresión de proteínas en los organismos procarióticos son conocidos por el experto. Este vector preferentemente es uno que permite un nivel elevado de expresión del ADN recombinante según la presente invención. El ADN recombinante en el vector preferentemente se encuentra bajo el control de una señal de expresión inducible (por ejemplo un promotor  $\lambda$ , tac, lac o trp).

El vector según la presente invención puede encontrarse presente extracromosómicamente (por ejemplo como plásmido), así como integrado en el genoma del organismo huésped (por ejemplo el bacteriófago  $\lambda$ ). El vector según la presente invención preferentemente es un plásmido. Los vectores que resultan adecuados en cada caso para la expresión génica en un organismo huésped particular son conocidos por el experto en el campo de la biología molecular. Puede ser un vector eucariótico, aunque preferentemente es un vector procariótico. Los ejemplos de vectores adecuados para la expresión del ADN según la presente invención en los procariotas son, por ejemplo,

vectores pUC y pUR disponibles comercialmente.

La invención proporciona además una célula, preferentemente una célula procariótica, particularmente una célula de *E. coli* preferentemente, que se transforma con el ADN recombinante según la presente invención y/o con un vector recombinante según la presente invención.

En el caso de que la proteína de fusión se exprese en procariotas, se forman agregados poco solubles (cuerpos refráctiles, cuerpos de inclusión) que son inactivos. Por lo tanto, la proteína de fusión debe transformarse en su forma activa. Utilizando los procedimientos que resultan familiares para el experto en la materia (ver, por ejemplo, las solicitudes de patente EP nº A 0 219 874, nº A 0 114 506 y WO nº 84/03711), en primer se lleva a cabo una solubilización mediante la adición de agentes desnaturalizantes seguida de la renaturalización y, si se desea, etapas de purificación adicionales. El tratamiento de la proteína de fusión con IgA proteasa tiene lugar tras la PEGilación de la proteína de fusión.

Las condiciones necesarias para el tratamiento del IGF-I o variante de IGF-I PEGilado que debe ser cortado con las IgA proteasas no son críticas. Sin embargo, en dicho procedimiento, resulta preferente que la proporción en peso de IGF-I o variante de IGF-I PEGilado a IgA proteasa es de entre 1:1 y 500:1, preferentemente de 100:1. La reacción preferentemente tiene lugar en una solución acuosa tamponada de pH entre 6,5 y 8,5. La concentración de tampón preferentemente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 50 y 500 mmoles/l si se desea, con la adición de entre 0 y 100 mmoles/l de cloruro sódico. El corte preferentemente se lleva a cabo a temperatura ambiente durante por lo menos 60 minutos y hasta 5 días, preferentemente durante 24 a 72 horas.

Tras la solubilización, renaturalización, PEGilación y corte con IgA proteasa, el producto de corte PEGilado obtenido de esta manera preferentemente se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y/o fraccionamiento según tamaño. El IGF-I o variante de IGF-I PEGilado producido de esta manera se encuentra libre de metionina en la posición -1 y preferentemente se encuentra libre de otras proteínas, tales como IGF-I o variante de IGF-I no pegilado, y preferentemente libre de propéptido PEGilado N-terminal, en 5% (p/p) o menos.

La expresión "IGF-I o variante de IGF-I PEGilado" o "PEGilación aminorreactiva" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a que un IGF-I o variante de IGF-I se encuentra covalentemente unido a grupos polietilenglicol mediante acoplamiento aminorreactivo. El grupo o grupos PEG se encuentran unidos a los sitios de la molécula de IGF-I o variante de IGF-I que son los grupos de  $\epsilon$ -amino primario de las cadenas laterales de lisina. Resulta posible además que la PEGilación se produzca además en el grupo  $\alpha$ -amino N-terminal del propéptido. Debido al método de síntesis y proteína de fusión utilizados, el IGF-I o variante de IGF-I PEGilado pueden consistir de una mezcla en la que los sitios de PEGilación pueden ser diferentes en diferentes moléculas o pueden ser sustancialmente homogéneos con respecto a la cantidad de cadenas laterales de polietilenglicol en cada molécula y/o con respecto al sitio de PEGilación en la molécula. Preferentemente el IGF-I o variantes de IGF-I se encuentran monoPEGiladas y/o diPEGiladas.

La PEGilación aminorreactiva tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un método para unir aleatoriamente cadenas de polietilenglicol a uno o más grupos amino primarios de lisina de IGF-I o variante de IGF-I mediante la utilización de polietilenglicol reactivo (activado), preferentemente mediante la utilización de ésteres de N-hidroxisuccinimidilo de, preferentemente, metoxipolietilenglicol. La reacción de acoplamiento de polietilenglicol a grupos de  $\epsilon$ -amino primario reactivos de residuos de lisina y opcionalmente el grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido N-terminal de la proteína de fusión. Dicha conjugación de grupo amino de PEG a las proteínas es bien conocida de la técnica. Por ejemplo, la revisión de dichos métodos se proporciona en Veronese F.M., *Biomaterials* 22:405-417, 2001. Según Veronese, la conjugación de PEG a grupos amino primarios de las proteínas puede llevarse a cabo mediante la utilización de PEG activados que llevan a cabo la alquilación de dichos grupos amino primarios. Para dicha reacción, los PEG activados alquilantes, por ejemplo puede utilizarse aldehído de PEG, tresil-cloruro de PEG o epóxido de PEG. Son reactivos útiles adicionales los PEG acilantes tales como los hidroxisuccinimidil-ésteres de los PEG carboxilados o los PEG en los que el grupo hidroxilo terminal se encuentra activado por cloroformatos o carbonilimidazol. Son reactivos PEG útiles adicionales los PEG con brazos de aminoácidos. Dichos reactivos pueden contener los denominados PEG ramificados, en los que por lo menos dos moléculas de PEG idénticas o diferentes se encuentran unidas entre sí mediante un espaciador peptídico (preferentemente lisina) y se encuentran unidos a, por ejemplo, IGF-I o variante de IGF-I a modo de carboxilato activado del espaciador lisina.

La expresión "PEG o polietilenglicol" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polímero soluble en agua que se encuentra disponible comercialmente o que puede prepararse mediante polimerización por apertura de anillo del etilenglicol según métodos bien conocidos de la técnica (Kodera Y *et al.*, *Progress in Polymer Science* 23:1233-1271, 1998; Francis G.E. *et al.*, *Int. J. Hematol.* 68:1-18, 1998). El término "PEG" se utiliza ampliamente para comprender cualquier molécula de polietilenglicol en la que el número de unidades de etilenglicol es de por lo menos 460, preferentemente de entre 460 y 2.300, y especialmente preferentemente de entre 460 y 1.840 (230

unidades PEG corresponde a un peso molecular de aproximadamente 10 kDa). El número superior de unidades de PEG únicamente se encuentra limitado por la solubilidad del IGF-I o variante de IGF-I con lisina PEGilada. Habitualmente no se utilizan PEG de tamaño superior a los PEG que contienen 2.300 unidades. Preferentemente un PEG utilizado en la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxi (metoxiPEG, mPEG) y en el otro extremo se encuentra unido covalentemente a una fracción conectora mediante un oxígeno de enlace éter. El polímero PEG es lineal o ramificado. Preferentemente el polímero PEG es ramificado. Los PEG ramificados se describen en, por ejemplo, Veronese F.M. *et al.*, Journal of Bioactive and Compatible Polymers 12:196-207, 1997. Los reactivos PEG útiles se encuentran disponibles de, por ejemplo, Nektar Therapeutics (www.nektar.com). Los PEG ramificados pueden prepararse mediante, por ejemplo, la adición de óxido de polietileno a diversos polioles, incluyendo glicerol, pentaeritritol y sorbitol. Por ejemplo, puede prepararse un PEG ramificado de cuatro brazos a partir de pentaeritritol y óxido de etileno. Los PEG ramificados habitualmente presentan 2 a 8 brazos y se describen en, por ejemplo, el documento EP nº A 0 473 084 y en la patente US nº 5.932.462. Resultan especialmente preferentes los PEG con dos cadenas laterales PEG unidas mediante el grupo amino primario de una lisina (abreviado PEG2) (Monfardini C. *et al.*, Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995).

Puede utilizarse cualquier masa molecular para un PEG según se desee en términos prácticos, por ejemplo de entre aproximadamente 20 kDaltons (Da) y 100 kDa (n es de 460 a 2.300). El número de unidades repetidas, "n", en el PEG es aproximado para la masa molecular descrita en Daltons. Por ejemplo, en el caso de que se unan dos moléculas de PEG a un conector, en donde cada molécula de PEG presenta la misma masa molecular, de 10 kDa (cada n es aproximadamente 230), la masa molecular total de PEG en el conector es de aproximadamente 20 kDa. Las masas moleculares del PEG unido al conector también pueden ser diferentes, por ejemplo de dos moléculas en un conector; una molécula de PEG puede ser de 5 kDa y la otra molécula de PEG puede ser de 15 kDa. La expresión "masa molecular" se refiere en todos los casos a masa molecular media.

En los ejemplos proporcionados posteriormente se describen algunos reactivos preferentes para la producción de IGF o variantes de IGF-I aminorreactivos. Se entiende que pueden realizarse modificaciones, por ejemplo basándose en los métodos descritos por Veronese F.M., Biomaterials 22:405-417, 2001, en los procedimientos, con la condición de que el procedimiento resulte en IGF-I o variantes de IGF-I PEGilados en las lisinas según la invención.

La invención proporciona métodos para la producción de formas PEGiladas de IGF-I o variante de IGF-I con propiedades mejoradas. Dicho IGF-I o variantes de IGF-I PEGilados en las lisinas contienen PEG lineal o ramificado unido aleatoriamente a los mismos, de manera que el peso molecular global de todos los grupos PEG en el IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en las lisinas sea preferentemente de entre aproximadamente 20 y 80 kDa. Resulta evidente para el experto en la materia que resultan posibles pequeñas desviaciones respecto a este intervalo de pesos moleculares con la condición de que el IGF-I o variante de IGF-I PEGilado no muestre actividad de reducción de los niveles de péptido  $\beta$ A en el cerebro. Además, el PEG con pesos moleculares no superiores a 80 kDa resulta en una mayor biodisponibilidad. Sin embargo, se espera que dicha actividad se reduzca a medida que se incrementa el peso molecular debido a la menor activación de los receptores de IGF-I y transporte a través de la barrera hematocefálica. Por lo tanto, el intervalo de 20 a 100 kDa para el peso molecular del PEG debe considerarse el intervalo optimizado para un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en las lisinas que resulte útil para un tratamiento eficiente de un paciente que sufre de EA.

Preferentemente se produce una variante de IGF-I monoPEGilada, seleccionada de entre el grupo que consiste de RKK, RKR y RRR, en la que el grupo PEG ramificado presenta un peso molecular de entre 30 y 45, preferentemente de entre 40 y 45 kDa (aproximadamente 920 unidades de PEG). Por ejemplo, considerando un peso molecular medio de 44 kDa para el PEG y un peso molecular de 7,6 kDa para el IGF-I, el peso molecular medio calculado para dicho monoPEG-IGF-I es de aproximadamente 51,6 kDa. Resulta especialmente preferente la utilización de un éster de PEG ramificado activado con N-hidroxisuccinimidilo (mPEG2-NHS) de un peso molecular de 40 kDa (Monfardini C. *et al.*, Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese F.M. *et al.*, J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997, patente US nº 5.932.462). También se produce preferentemente un IGF-I monoPEGilado, en el que el PEG presenta un peso molecular medio de 30 ó 40 kDa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "peso molecular" se refiere al peso molecular medio del PEG.

Las formas PEGiladas siguientes de IGF-I o de variantes de IGF-I son productos preferentes y se encuentran disponibles mediante los métodos según la invención:

- variante de IGF-I monoPEGilado en K68, preferentemente la variante RRR o RKK, más preferentemente la variante RRR, en el que el grupo PEG presenta un peso molecular de 20 a 80 kDa (460 a 1.840 unidades PEG),
- variante de IGF-I monoPEGilada en K65, preferentemente la variante RKR o RKK, más preferentemente la variante RKR, en el que el grupo PEG presenta un peso molecular de 20 a 80 kDa (460 a 1.840 unidades

- PEG),
- variante de IGF-I diPEGilada, preferentemente la variante RKK, en la que los grupos PEG presentan un peso molecular de aproximadamente 10 a 50 kDa (230 a 1.150 unidades PEG) cada uno, y mezclas de las mismas,
  - 5 - variante de IGF-I monoPEGilada en K68, preferentemente la variante RRK o RKK, más preferentemente la variante RRK, en el que el grupo PEG2 presenta un peso molecular de 40 kDa,
  - variante de IGF-I monoPEGilada en K65, preferentemente la variante RRK o RKK, más preferentemente la variante RKR, que comprende un grupo PEG2 de un peso molecular de 40 kDa,
  - 10 - IGF-I monoPEGilado, en el que el grupo PEG presenta un peso molecular de 20 a 80 kDa (460 a 1.840 unidades de PEG),
  - IGF-I diPEGilado, en el que los grupos PEG presentan un peso molecular de aproximadamente 10 a 50 kDa (230 a 1.150 unidades PEG) cada uno,
  - IGF-I monoPEGilado, que comprende un grupo PEG2 de un peso molecular de 40 kDa.

15 IGF-I o variantes de IGF-I PEGilados son sustancialmente homogéneos. La preparación puede contener cantidades reducidas de proteínas no reaccionadas (es decir, sin grupos de PEG). Según se determina mediante mapeado de péptidos, la pureza de la variante es de por lo menos 90% (p/p). La purificación adicional de dichas preparaciones, incluyendo la separación de IGF-I o variantes de IGF-I monoPEGiladas y/o diPEGiladas puede llevarse a cabo mediante los métodos de purificación habituales, preferentemente mediante cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrofóbica y/o cromatografía de intercambio iónico, especialmente mediante cromatografía de intercambio catiónico.

20 El término "monoPEGilado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que el IGF-I o variante de IGF-I se encuentra PEGilado en únicamente una lisina por cada molécula de IGF-I o variante de IGF-I.

25 Los "PEG activados o reactivos PEG activados" son bien conocidos en el estado de la técnica. Preferentemente se utilizan PEG electrofílicamente activados, tales como los succinimidil-ésteres de ácido alcoxibutírico de polietilenglicol ("alcoxi inferior-PEG-SBA") o succinimidil-ésteres de ácido alcoxipropiónico de polietilenglicol ("alcoxi inferior-PEG-SPA") o PEG activados por N-hidroxisuccinimida. Puede utilizarse cualquier método convencional de reacción de un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción del PEG activado con IGF-I, el succinimidil-éster ejemplificado es un grupo saliente que causa la formación de amida. La utilización de succinimidil-ésteres para producir conjugados con proteínas se da a conocer en la patente US nº 5.672.662.

35 Las condiciones de reacción utilizadas presentan una influencia sobre la cantidad relativa de los IGF-I o variantes de IGF-I diferentemente PEGilados. Mediante la manipulación de las condiciones de reacción (por ejemplo la proporción de reactivos, el pH, la temperatura, la concentración de proteínas, el tiempo de reacción, etc.), pueden modificarse las cantidades relativas de las diferentes especies PEGiladas. Preferentemente la reacción se lleva a cabo en una solución acuosa tamponada a un pH de entre 8 y 10, que opcionalmente contiene hasta 30% (v/v) de etanol. La proporción molar de proteína: PEG preferentemente es de entre 1:1 y 1:6, preferentemente de entre 1:2 y 40 1:5. La temperatura de reacción y el tiempo de reacción pueden modificarse según los conocimientos del experto en la materia, en la que la temperatura elevada y el tiempo de reacción prolongado resulta en una PEGilación incrementada. En el caso de que se produzcan proteínas monoPEGiladas, resulta preferente trabajar entre 4°C y 22°C y durante un máximo de 30 minutos, o durante un máximo de 60 minutos. Al combinar el reactivo de PEGilación con IGF-I o variante de IGF-I en un tampón de reacción que consiste preferentemente de borato sódico 45 50 mM y etanol al 25% a un pH de entre aproximadamente 9,0 y 9,5, una proporción de proteína:PEG de entre aproximadamente 1: 3 y 1:4 y una temperatura de reacción de 4°C, se produce una mezcla de especies monoPEGiladas, diPEGiladas y cantidades traza de especies triPEGiladas, dependiendo de la presencia de residuos de Lys en la proteína.

50 Puede prepararse IGF-I o variantes de IGF-I PEGilados en las lisinas según la invención mediante la reacción covalente de un grupo amino primario de lisina de un IGF-I o variante de IGF-I con un reactivo bifuncional para formar un intermediario con un enlace amida y la reacción covalente del intermediario que contiene un enlace amida con un derivado polietilenglicol activado para formar un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en las lisinas. En el procedimiento anteriormente indicado, el reactivo bifuncional preferentemente es N-succinimidil-S-acetilpropionato o N-succinimidil-S-acetilacetato y el derivado polietilenglicol activado preferentemente se selecciona de entre el 55 grupo que consiste de yodo-acetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinilsulfona y metoxi-PEG-maleimida.

60 Los derivados de PEG activado son conocidos de la técnica y se describen en, por ejemplo, Morpurgo M. *et al.*, J. Bioconjugate Chem. 7:363-368, 1996, para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada resultan adecuadas para la preparación de los compuestos de fórmula I. Son ejemplos de reactivos PEG reactivos, yodo-acetil-metoxi-PEG y metoxi-PEG-vinilsulfona. La utilización de dichas sustancias yodo-activadas es conocida de la técnica y ha sido descrita por, por ejemplo, Hermanson G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, páginas 147-148, 1996.

Un "aminoácido polar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S) y treonina (T). La lisina también es un aminoácido polar, aunque se excluye, ya que la lisina es sustituida según la invención. Preferentemente se utiliza arginina como aminoácido polar.

#### 5 Formulaciones farmacéuticas

10 El IGF-I o variante de IGF-I PEGilado producido según la invención proporciona una estabilidad mejorada en circulación, permitiendo un acceso sostenido a receptores de IGF-I en todo el cuerpo utilizando intervalos de aplicación cortos.

15 Los compuestos de la presente invención pueden formularse según métodos para la preparación de composiciones farmacéuticas, siendo los métodos conocidos por el experto en la materia. Para la producción de dichas composiciones, se combina un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado según la invención en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente mediante diálisis o diafiltración frente a una solución acuosa que contiene los ingredientes deseados de las composiciones farmacéuticas. Dichos portadores aceptables se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, 1990, Mack Publishing Company, editada por Oslo *et al.* (por ejemplo en las páginas 1435 a 1712). Las composiciones típicas contienen una cantidad efectiva de la sustancia según la invención, por ejemplo de entre aproximadamente 0,1 y 100 mg/ml, conjuntamente con una cantidad adecuada de un portador. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral. El IGF-I o variante de IGF-I PEGilado según la invención se administra preferentemente por vía intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, o mediante aplicación intranasal.

25 Las formulaciones farmacéuticas según la invención pueden prepararse según métodos conocidos de la técnica. Habitualmente, las soluciones de IGF-I o variante de IGF-I PEGilado se dializan o se diafiltran frente al tampón destinado a la utilización en la composición farmacéutica y la concentración final deseada de proteína se ajusta mediante concentración o dilución.

30 Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Los nombres de los aminoácidos se abrevian utilizando el código de una letra (por ejemplo R) o el código de tres letras (por ejemplo Arg).

#### Listado de secuencias

SEC ID nº 1	secuencia de aminoácidos del IGF-I humano (aminoácidos 49 a 118 de SwissProt P01343).
SEC ID nº 2	secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAG_R K27R K65R K68
SEC ID nº 3	secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAEE_F1 K27R K65R K68
SEC ID nº 4	secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F1 K27R K65R K68
SEC ID nº 5	secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F2 K27R K65R K68
SEC ID nº 6-10	conector
SEC ID nº 11-18	secuencias de corte
SEC ID nº 19-21	otros
SEC ID nº 22	secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAG_R K27R K65 K68R
SEC ID nº 23	secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAEE_F1 K27R K65 K68R
SEC ID nº 24	secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F1 K27R K65 K68R
SEC ID nº 25	secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F2 K27R K65 K68R
SEC ID nº 26	secuencia de aminoácidos de una IgA1 proteasa de <i>Neisseria gonorrhoea</i> (tipo 2)

#### Descripción de las figuras

40 Fig 1: Análisis peptídico de la proteína de fusión monoPEGilada. Análisis de SDS-PAGE de proteína de fusión plegada antes y después de la PEGilación. Carril 1, mezcla de proteína estándar (aprotinina pulmonar bovina, 6,0 kDa; lisozima de clara de huevo de pollo, 14,4 kDa; inhibidor de tripsina de soja, 21,5 kDa; anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos, 31,0 kDa; lactato deshidrogenasa de músculo porcino, 36,5 kDa; deshidrogenasa glutámica de hígado bovino, 55,4 kDa; albúmina de suero bovino, 66,3 kDa; fosforilasa b de músculo de conejo, 97,4 kDa;  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, 97,4 kDa; miosina muscular de conejo, 200 kDa); carril 2, pro-IGF-I antes de la pegilación; carril 3, pro-IGF-I después de la pegilación.

45 Fig. 2: Análisis peptídico de variante de IGF-I monoPEGilada. Análisis de SDS-PAGE de proteína de fusión pegilada antes y después del corte de IgA. Carril 1, mezcla de proteína estándar (igual que en la figura 1); carril 2, mezcla de reacción antes del corte con IgA proteasa; carril 3, mezcla de reacción después del corte

con IgA proteasa.

Fig. 3: SDS-PAGE. Análisis de SDS-PAGE de proteína de fusión plegada antes y después de la PEGilación. Carril 1, mezcla de proteína estándar (igual que en la figura 1); carril 2, mezcla de reacción antes del corte con IgA proteasa; carril 3, eluido de CIE; carriles 4 a 19, fracciones eluidas únicas del CIE.

5 Fig. 4: Reducción de beta-A cerebral in vivo con PEG-RRK en ratones B6.152H. Se trataron ratones B6.152H doblemente transgénicos de 9 a 10 meses de edad con vehículo (NaCl) o con PEG-RRK (5 mg/kg s.c., dos veces por semana) durante 14 días. Se prepararon extractos cerebrales solubles y se evaluaron los niveles de APP, beta-A y actina tal como se ha descrito. Se calcularon las proporciones APP/actina, beta-A/actina y beta-A/APP y se expresaron como % del control. A, APP/actina; B, beta-A/actina; C, beta-A/APP. Los  
10 gráficos en la parte superior muestran puntos individuales de datos animales; los gráficos inferiores muestran la representación de barras (medias  $\pm$  SEM), incluyendo las diferencias estadísticas (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  frente a control no tratado,  $n=10$ ).

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1

Se produjeron los mutantes siguientes (que comprendían IGF-I -variante RRK) con los propéptidos de (fórmula I):

Mutante	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	n	Y
Px3036_IAG K27R K65R K68	no	KAKRFKKH	6	PRPP
Px3036_IAG_R K27R K65R K68	no	RARRFRRH	6	PRPP
Px3036_IAEE_F1 K27R K65R K68	S	NTEHNREH	6	PRPP
Px3036_IAFX_F1 K27R K65R K68	N	IEGRH	6	PRPP
Px3036_IAFX_F2 K27R K65R K68	N	TEFENIEH	6	PRPP

20

Preparación de variante de IGF-I (variante RRK) monopegilada en K68

El vector de expresión y la cepa de *E. coli* utilizados se describen en la patente EP nº 0 972 838. A partir de un clon de *E. coli* que expresaba la proteína de fusión px3036\_IAG\_R K27R K65R K68, px3036\_IAEE\_F1 K27R K65R K68, px3036\_IAFX\_F1 K27R K65R K68 ó px3036\_IAFX\_F2 K27R K65R K68, cultivado en una placa de agar selectivo, se transfirió un asa de inoculación a medio selectivo (100 ml) y se cultivó durante 13 horas a 37°C hasta una densidad óptica (578 nm) de 2 a 4. Este cultivo se almacenó sobre hielo durante las siguientes 6 horas previamente a la inoculación automática del cultivo principal, que se llevó a cabo a 37°C. La expresión del mutante de IGF-I se inició a una densidad óptica (578 nm) de 50 con la adición de IPTG 1,0 mM. La fermentación global se prolonga durante hasta 16 horas. La cantidad de proteína se determinó densitométricamente mediante comparación de la intensidad volumétrica de la banda de proteína del producto con la banda de un estándar de IGF en un gel de SDS-PAGE. El caldo de cultivo se recolectó mediante centrifugación.

Con el fin de obtener el material purificado de cuerpos de inclusión (CI), la biomasa recolectada de la fermentación estándar se trató siguiendo el procedimiento siguiente: se resuspendió la biomasa con tampón TrisMgSO<sub>4</sub> a pH 7 y se suplementó con 0,3 g/100 g de biomasa seca. Se incubaron lisozima y 5 U/lxg de biomasa seca de benzonasa durante 20 minutos y se homogeneizaron. Se añadieron 30 U/lxg de biomasa seca de benzonasa y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Se añadieron 0,5 litros de tampón Brij/litro y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se resuspendió el pellet en 300 ml de tampón Tris-EDTA/100 g de biomasa seca (peso húmedo de CI purificado), se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó. Se solubilizó 1 g de CI/litro a temperatura ambiente en guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, DTT 0,1 M, pH 8,5, durante la noche. La solución turbia se dializó a 4°C frente a guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, pH 8,0. Tras la diálisis se eliminaron los componentes insolubles mediante centrifugación. Se llevó a cabo el plegamiento mediante dilución 50 veces de la solución de pro-IGF-I en arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, GSH 1 mM, GSSG 1 mM, pH 8,5 a temperatura ambiente. Tras dos horas, la solución se suplementó con cloruro sódico 2 M, se filtró y se aplicó a un caudal de 10 ml/minuto a una columna HIC (butilsefarosa 4 Fast Flow, GE, Amersham Biosciences), equilibrada a temperatura ambiente con tampón que contenía NaCl 2 M, arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, pH 8,5. La columna se lavó con tampón de equilibrado hasta alcanzar la línea base y después se eluyó con diez volúmenes de columna de un gradiente lineal que partía de tampón de equilibrado y finalizaba con tampón que contenía TrisHCl 0,1 M, etilenglicol al 5%, pH 8,5. Las fracciones eluidas se analizaron mediante cromatografía de alto rendimiento de fase inversa (rpHPLC). Se agruparon las fracciones que contenían proteína con puentes SS correctamente formados. Lo agrupado se dializó a 4°C frente a borato sódico 50 mM, pH 9,0. Se

50

solubilizó el éster N-hidroxisuccinimida (NHS) de PEG ramificado de 40 kDa activado por NHS de mPEG PM 20.000 (mPEG2NHS, patente US nº 5.932.462, Nektar Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en HCl 2 mM helado y se añadió inmediatamente a la solución de proteína dializada (proporción molar de reactivo PEG/proteína de 2:1). Tras 1 h e incubación de 2 h sobre hielo, se añadió la misma cantidad de solución ácida de mPEG2-NHS a la mezcla de reacción de proteína/PEG. Tras una tercera adición de la misma cantidad de solución ácida de mPEG2-NHS (exceso molar global de 6 veces de reactivo PEG), la reacción se incubó sobre hielo durante una hora adicional. La reacción se detuvo mediante la adición de cloruro amónico sólido e incubación durante 45 minutos adicionales y después se ajustó a pH 8,0 (ver la figura 1). La mezcla de reacción de proteína/PEG se suplementó con IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2) (proporción p/p de 1: 50) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente (ver la figura 2). La mezcla de reacción se diluyó 1:2 con ácido acético 50 mM, pH 4,5, y después se aplicó a una columna IEC catiónica (con MacroCap SP; GE, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), que había sido equilibrada con ácido acético 50 mM. Se lavó la columna hasta alcanzar la línea base y después se eluyó con 20 volúmenes de columna de un gradiente lineal desde ácido acético 50 mM hasta finalizar con ácido acético 50 mM suplementado con cloruro sódico 1 M. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían una única banda con un peso molecular relativo estimado de aproximadamente 60 kDa se agruparon como IGF-I monoPEGilado en K68 (ver la figura 3). Se verificó la identidad de IGF-I monoPEGilado en K68 mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC) con detección de dispersión de luz estática, análisis de EM de los digeridos con tripsina, análisis de EM de los digeridos de Asp-N y CIE analítica catiónica. No pudo encontrarse ninguna otra isovariante de pegilación aparte de IGF-I monoPEGilado en K68.

### Ejemplo 2

Se produjeron los mutantes siguientes (que comprendían IGF-I -variante RKR) con los propéptidos de (fórmula I):

Mutante	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	n	Y
Px3036_IAG K27R K65 K68R	no	KAKRFKKH	6	PRPP
Px3036_IAG_R K27R K65 K68R	no	RARRFRRH	6	PRPP
Px3036_IAEE_F1 K27R K65 K68R	S	NTEHNREH	6	PRPP
Px3036_IAFX_F1 K27R K65 K68R	N	IEGRH	6	PRPP
Px3036_IAFX_F2 K27R K65 K68R	N	TEFENIEH	6	PRPP

Preparación de variante de IGF-I (variante RKR) monopegilada en K65

El vector de expresión y la cepa de *E. coli* utilizados se describen en la patente EP nº 0 972 838. A partir de un clon de *E. coli* que expresaba la proteína de fusión px3036\_IAG\_R K27R K65 K68R, px3036\_IAEE\_F1 K27R K65 K68R, px3036\_IAFX\_F1 K27R K65 K68R o px3036\_IAFX\_F2 K27R K65 K68R, cultivado en una placa de agar selectivo, se transfirió un asa de inoculación a medio selectivo (100 ml) y se cultivó durante 13 horas a 37°C hasta una densidad óptica (578 nm) de 2 a 4. Este cultivo se almacenó sobre hielo durante las siguientes 6 horas previamente a la inoculación automática del cultivo principal, que se llevó a cabo a 37°C. La expresión del mutante de IGF-I se inició a una densidad óptica (578 nm) de 50 con la adición de IPTG 1,0 mM. La fermentación global se prolonga durante hasta 16 horas. La cantidad de proteína se determina densitométricamente mediante comparación de la intensidad volumétrica de la banda de proteína del producto con la banda de un estándar de IGF en un gel de SDS-PAGE. El caldo de cultivo se recolecta mediante centrifugación.

Con el fin de obtener el material purificado de cuerpos de inclusión (CI), la biomasa recolectada de la fermentación estándar se trató siguiendo el procedimiento siguiente: se resuspendió biomasa con tampón TrisMgSO<sub>4</sub>, pH 7, y se suplementó con 0,3 g/100 g de biomasa seca de lisozima y 5 U/l g de biomasa seca de benzonasa y se homogeneizó. Se añadieron 30 U/l de biomasa seca de benzonasa y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Se añadieron 0,5 litros de tampón Brij/litro y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se resuspendió el pellet en 300 ml de tampón Tris-EDTA/100 g de biomasa seca (peso húmedo de CI purificado), se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó. Se solubilizó 1 g de CI/litro a temperatura ambiente en guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, DTT 0,1 M, pH 8,5, durante la noche. La solución turbia se dializó a 4°C frente a guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, pH 8,0. Tras la diálisis se eliminaron los componentes insolubles mediante centrifugación. Se llevó a cabo el plegamiento mediante dilución 50 veces de la solución de pro-IGF-I en arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, GSH 1 mM, GSSH 1 mM, pH 8,5 a temperatura ambiente. Tras 2 a 48 horas, preferentemente tras 2 a 24 horas, la solución se suplementó con cloruro sódico 2 M, se filtró y se aplicó a un caudal de 10 ml/minuto a una columna HIC (butilsefarosa 4 Fast Flow, GE, Amersham Biosciences), equilibrada a temperatura ambiente con tampón que contenía NaCl 2 M, arginina 0,8 M,

TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, pH 8,5. La columna se lavó con tampón de equilibrado hasta alcanzar la línea base y después se eluyó con diez volúmenes de columna de un gradiente lineal que partía de tampón de equilibrado y finalizada en tampón que contenía TrisHCl 0,1 M, etilenglicol al 5%, pH 8,5. Las fracciones eluidas se analizaron mediante cromatografía de alto rendimiento de fase inversa (rpHPLC). Se agruparon las fracciones que contenían proteína con puentes SS correctamente formados. Lo agrupado se dializó a 4°C frente a borato sódico 50 mM, pH 9,0. Se solubilizó el éster N-hidroxisuccinimida (NHS) de PEG ramificado de 40 kDa activado por NHS de mPEG PM 20.000 (mPEG2NHS, patente US nº 5.932.462, Nektar Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en HCl 2 mM helado y se añadió inmediatamente a la solución de proteína dializada (proporción molar de reactivo PEG/proteína de 2:1). Tras 1 h e incubación de 2 h sobre hielo, se añadió la misma cantidad de solución ácida de mPEG2-NHS a la mezcla de reacción de proteína/PEG. Tras una tercera adición de la misma cantidad de solución ácida de mPEG2-NHS (exceso molar global de 6 veces de reactivo PEG), la reacción se incubó sobre hielo durante una hora adicional. La reacción se detuvo mediante la adición de cloruro amónico sólido e incubación durante 45 minutos adicionales y después se ajustó a pH 8,0 (ver la figura 1). La mezcla de reacción de proteína/PEG se suplementó con IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2) (proporción p/p 1:50) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente (ver la figura 2). La mezcla de reacción se diluyó 1:2 con ácido acético 50 mM, pH 4,5, y después se aplicó a una columna IEC catiónica (con MacroCap SP; GE, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), que había sido equilibrada con ácido acético 50 mM. Se lavó la columna hasta alcanzar la línea base y después se eluyó con 20 volúmenes de columna de un gradiente lineal desde ácido acético 50 mM hasta finalizar con ácido acético 50 mM suplementado con cloruro sódico 1 M. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían una única banda con un tamaño molecular relativo estimado de aproximadamente 60 kDa se agruparon como IGF-I monoPEGilado en K65. Se verificó la identidad de IGF-I monoPEGilado en K65 mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (CET) con detección de la dispersión lumínica estática, análisis de EM de las digestiones con tripsina, análisis de EM de las digestiones con Asp-N y CII analítica catiónica.

### 25 Ejemplo 3

Reducción *in vivo* de beta-A soluble cerebral por IGF-I variante RRK monoPEGilado en K68

30 Para la evaluación de la potencia de IGF-I variante RRK monoPEGilado en K68 (40 kD, PEG2) (PEG-RRK) sobre la reducción de los niveles de beta-A soluble, se trataron repetidamente mediante una inyección s.c. dos veces por semana de 5 mg/kg de PEG-RRK, ratones B6.152H de 9-10 meses de edad (ratones doblemente transgénicos que expresaban las mutaciones humanas APP y PS2) con una carga elevada de placas amiloides. Se detectaron los niveles corticales de APP, beta-A y actina tras 14 días. La proporción APP/actina no resultó modificada significativamente por PEG-RRK (fig.4A), sugiriendo que PEG-RRK no presentaba ningún efecto sobre la expresión transgénica durante los 14 días. En contraste, las proporciones beta-A/actina (fig. 4B) y beta-A/APP (fig. 4C) fueron significativamente reducidos por PEG-RRK. Lo anterior indica un efecto positivo de PEG-RRK sobre la eliminación de beta-A independiente de su producción por el transgén.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Método para la producción de conjugados de factor-1 de crecimiento similar a la insulina y polietilenglicol

<130> 23907 WO

<150> EP06018170

10 <151> 2006-08-31

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.2

15

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> misc\_feature

<223> secuencia de aminoácidos de IGF-I humano (aminoácidos 49 a 118 de SwissProt P01343).

25 <400> 1

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly  
20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys  
35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu  
50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala  
65 70

<210> 2

<211> 89

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036\_IAG\_R K27R K65R K68

35

<400> 2

ES 2 397 660 T3

Met His His His His His His Arg Ala Arg Arg Phe Arg Arg His Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala  
 20 25 30  
 Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr  
 35 40 45  
 Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp  
 50 55 60  
 Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys  
 65 70 75 80  
 Ala Pro Leu Arg Pro Ala Lys Ser Ala  
 85

<210> 3  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036\_IAEE\_F1 K27R K65R K68

10 <400> 3

Met Ser His His His His His His Asn His Asn Arg Glu His Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu  
 20 25 30  
 Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly  
 35 40 45  
 Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu  
 50 55 60  
 Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala  
 65 70 75 80  
 Pro Leu Arg Pro Ala Lys Ser Ala  
 85

<210> 4  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036\_IAEX\_F1 K27R K65R K68

20

ES 2 397 660 T3

<400> 4

```

Met Asn His His His His His His Ile Glu Gly Arg His Pro Arg Pro
1           5           10           15

Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln
20           25           30

Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly Tyr
35           40           45

Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys
50           55           60

Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro
65           70           75           80

Leu Arg Pro Ala Lys Ser Ala
85
    
```

5 <210> 5  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036\_IAFX\_F1 K27R K65R K68

<400> 5

```

Met Asn His His His His His His Thr Glu Phe Glu Asn Ile Glu His
1           5           10           15

Pro Arg Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp
20           25           30

Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro
35           40           45

Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val
50           55           60

Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr
65           70           75           80

Cys Ala Pro Leu Arg Pro Ala Lys Ser Ala
85           90
    
```

15 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> conector

ES 2 397 660 T3

<400> 6

**Lys Ala Lys Arg Phe Lys Lys His**  
**1 5**

<210> 7

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector

10

<400> 7

**Arg Ala Arg Arg Phe Arg Arg His**  
**1 5**

<210> 8

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector

20

<400> 8

**Asn Thr Glu His Asn Arg Glu His**  
**1 5**

<210> 9

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> conector

30

<400> 9

**Ile Glu Gly Arg His**  
**1 5**

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> conector

40

<400> 10

**Thr Glu Phe Glu Asn Ile Glu His**  
**1 5**

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220> <223> secuencia de corte

50

<400> 11

**Pro Arg Pro Pro Gly Pro**  
**1 5**

5 <210> 17  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <223> secuencia de corte<400> 12

**Ala Pro Arg Pro**  
**1**

15 <210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> secuencia de corte  
<400> 13

**Pro Ala Pro Arg Pro**  
**1 5**

25 <210> 14  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> secuencia de corte  
<400> 14

35 <210> 15  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> secuencia de corte  
<400> 15

**Pro Pro Gly Pro**  
**1**

50 <210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 397 660 T3

<220>  
<223> secuencia de corte

5 <400> 16

**Pro Arg Pro Pro Gly Pro**  
**1 5**

<210> 17  
<211> 7  
10 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia de corte

15 <400> 17

**Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro**  
**1 5**

20 <210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> secuencia de corte

<400> 18

**Pro Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro**  
**1 5**

30 <210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> otro

40 <400> 19

**Ser His His His His His His**  
**1 5**

<210> 20  
45 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
50 <223> otro

<400> 20

**Asn His His His His His His**  
**1 5**

55

5 <210> 21  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> otro

10 <400> 21

**His His His His His His**  
**1 5**

15 <210> 22  
 <211> 89  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036\_IAG\_R K27R K65 K68R

<400> 22

**Met His His His His His His Arg Ala Arg Arg Phe Arg Arg His Pro**  
**1 5 10 15**

**Arg Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala**  
**20 25 30**

**Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr**  
**35 40 45**

**Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp**  
**50 55 60**

**Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys**  
**65 70 75 80**

**Ala Pro Leu Lys Pro Ala Arg Ser Ala**  
**85**

25 <210> 23  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036\_IAEE\_F1 K27R K65 K68R

<400> 23

ES 2 397 660 T3

Met Ser His His His His His His Asn His Asn Arg Glu His Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu  
 20 25 30  
 Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly  
 35 40 45  
 Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu  
 50 55 60  
 Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala  
 65 70 75 80  
 Pro Leu Lys Pro Ala Arg Ser Ala  
 85

5 <210> 24  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036\_IAFX\_F1 K27R K65 K68R  
 <400> 24

Met Asn His His His His His His Ile Glu Gly Arg His Pro Arg Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln  
 20 25 30  
 Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly Tyr  
 35 40 45  
 Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys  
 50 55 60  
 Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Pro Ala Arg Ser Ala  
 85

15 <210> 25  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 397 660 T3

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036\_IAFX\_F2 K27R K65 K68R

<400> 25

5

```
Met Asn His His His His His Thr Glu Phe Glu Asn Ile Glu His
 1                5                10                15

Pro Arg Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp
          20                25                30

Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro
          35                40                45

Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val
 50                55                60

Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr
65                70                75                80

          Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Arg Ser Ala
                    85                90
```

<210> 26

<211> 960

10

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15

<223> secuencia de aminoácidos de una IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2)

<400> 26

ES 2 397 660 T3

Met Ala Leu Val Arg Asp Asp Val Asp Tyr Gln Ile Phe Arg Asp Phe  
 1 5 10 15

Ala Glu Asn Lys Gly Lys Phe Phe Val Gly Ala Thr Asp Leu Ser Val  
 20 25 30

Lys Asn Lys Arg Gly Gln Asn Ile Gly Asn Ala Leu Ser Asn Val Pro  
 35 40 45

Met Ile Asp Phe Ser Val Ala Asp Val Asn Lys Arg Ile Ala Thr Val  
 50 55 60

Val Asp Pro Gln Tyr Ala Val Ser Val Lys His Ala Lys Ala Glu Val  
 65 70 75 80

His Thr Phe Tyr Tyr Gly Gln Tyr Asn Gly His Asn Asp Val Ala Asp  
 85 90 95

Lys Glu Asn Glu Tyr Arg Val Val Glu Gln Asn Asn Tyr Glu Pro His  
 100 105 110

Lys Ala Trp Gly Ala Ser Asn Leu Gly Arg Leu Glu Asp Tyr Asn Met  
 115 120 125

Ala Arg Phe Asn Lys Phe Val Thr Glu Val Ala Pro Ile Ala Pro Thr  
 130 135 140

ES 2 397 660 T3

Asp Ala Gly Gly Gly Leu Asp Thr Tyr Lys Asp Lys Asn Arg Phe Ser  
 145 150 155 160

Ser Phe Val Arg Ile Gly Ala Gly Arg Gln Leu Val Tyr Glu Lys Gly  
 165 170 175

Val Tyr His Gln Glu Gly Asn Glu Lys Gly Tyr Asp Leu Arg Asp Leu  
 180 185 190

Ser Gln Ala Tyr Arg Tyr Ala Ile Ala Gly Thr Pro Tyr Lys Asp Ile  
 195 200 205

Asn Ile Asp Gln Thr Met Asn Thr Glu Gly Leu Ile Gly Phe Gly Asn  
 210 215 220

His Asn Lys Gln Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Lys Gln Ala Leu Ser Gln  
 225 230 235 240

Asp Ala Leu Thr Asn Tyr Gly Val Leu Gly Asp Ser Gly Ser Pro Leu  
 245 250 255

Phe Ala Phe Asp Lys Gln Lys Asn Gln Trp Val Phe Leu Gly Thr Tyr  
 260 265 270

Asp Tyr Trp Ala Gly Tyr Gly Lys Lys Ser Trp Gln Glu Trp Asn Ile  
 275 280 285

Tyr Lys Lys Glu Phe Ala Asp Lys Ile Lys Gln His Asp Asn Ala Gly  
 290 295 300

Thr Val Lys Gly Asn Gly Glu His His Trp Lys Thr Thr Gly Thr Asn  
 305 310 315 320

Ser His Ile Gly Ser Thr Ala Val Arg Leu Ala Asn Asn Glu Gly Asp  
 325 330 335

Ala Asn Asn Gly Gln Asn Val Thr Phe Glu Asp Asn Gly Thr Leu Val  
 340 345 350

Leu Asn Gln Asn Ile Asn Gln Gly Ala Gly Gly Leu Phe Phe Lys Gly  
 355 360 365

ES 2 397 660 T3

Asp Tyr Thr Val Lys Gly Ala Asn Asn Asp Ile Thr Trp Leu Gly Ala  
 370 375 380

Gly Ile Asp Val Ala Asp Gly Lys Lys Val Val Trp Gln Val Lys Asn  
 385 390 395 400

Pro Asn Gly Asp Arg Leu Ala Lys Ile Gly Lys Gly Thr Leu Glu Ile  
 405 410 415

Asn Gly Thr Gly Val Asn Gln Gly Gln Leu Lys Val Gly Asp Gly Thr  
 420 425 430

Val Ile Leu Asn Gln Lys Ala Asp Ala Asp Lys Lys Val Gln Ala Phe  
 435 440 445

Ser Gln Val Gly Ile Val Ser Gly Arg Gly Thr Leu Val Leu Asn Ser  
 450 455 460

Ser Asn Gln Ile Asn Pro Asp Asn Leu Tyr Phe Gly Phe Arg Gly Gly  
 465 470 475 480

Arg Leu Asp Ala Asn Gly Asn Asp Leu Thr Phe Glu His Ile Arg Asn  
 485 490 495

Val Asp Glu Gly Ala Arg Ile Val Asn His Asn Thr Asp His Ala Ser  
 500 505 510

Thr Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Leu Ile Thr Asn Pro Asn Ser Leu  
 515 520 525

Ser Val His Ser Ile Gln Asn Asp Tyr Asp Glu Asp Asp Tyr Ser Tyr  
 530 535 540

Tyr Tyr Arg Pro Arg Arg Pro Ile Pro Gln Gly Lys Asp Leu Tyr Tyr  
 545 550 555 560

Lys Asn Tyr Arg Tyr Tyr Ala Leu Lys Ser Gly Gly Arg Leu Asn Ala  
 565 570 575

Pro Met Pro Glu Asn Gly Val Ala Glu Asn Asn Asp Trp Ile Phe Met  
 580 585 590

ES 2 397 660 T3

Gly Tyr Thr Gln Glu Glu Ala Arg Lys Asn Ala Met Asn His Lys Asn  
 595 600 605

Asn Arg Arg Ile Gly Asp Phe Gly Gly Phe Phe Asp Glu Glu Asn Gly  
 610 615 620

Lys Gly His Asn Gly Ala Leu Asn Leu Asn Phe Asn Gly Lys Ser Ala  
 625 630 635 640

Gln Asn Arg Phe Leu Leu Thr Gly Gly Ala Asn Leu Asn Gly Lys Ile  
 645 650 655

Ser Val Thr Gln Gly Asn Val Leu Leu Ser Gly Arg Pro Thr Pro His  
 660 665 670

Ala Arg Asp Phe Val Asn Lys Ser Ser Ala Arg Lys Asp Ala His Phe  
 675 680 685

Ser Lys Asn Asn Glu Val Val Phe Glu Asp Asp Trp Ile Asn Arg Thr  
 690 695 700

Phe Lys Ala Ala Glu Ile Ala Val Asn Gln Ser Ala Ser Phe Ser Ser  
 705 710 715 720

Gly Arg Asn Val Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ile Thr Ala Thr Asp Asn  
 725 730 735

Ala Lys Val Asn Leu Gly Tyr Lys Asn Gly Asp Glu Val Cys Val Arg  
 740 745 750

Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Val Thr Cys Asn Thr Gly Asn Leu Ser Asp  
 755 760 765

Lys Ala Leu Asn Ser Phe Asp Ala Thr Arg Ile Asn Gly Asn Val Asn  
 770 775 780

Leu Asn Gln Asn Ala Ala Leu Val Leu Gly Lys Ala Ala Leu Trp Gly  
 785 790 795 800

Lys Ile Gln Gly Gln Gly Asn Ser Arg Val Ser Leu Asn Gln His Ser

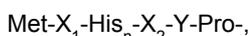
				805						810						815
Lys	Trp	His	Leu	Thr	Gly	Asp	Ser	Gln	Val	His	Asn	Leu	Ser	Leu	Ala	
			820					825					830			
Asp	Ser	His	Ile	His	Leu	Asn	Asn	Ala	Ser	Asp	Ala	Gln	Ser	Ala	Asn	
		835					840					845				
Lys	Tyr	His	Thr	Ile	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ser	Gly	Asn	Gly	His	Phe	
	850					855					860					
His	Tyr	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Gly	Asp	Lys	Val	Leu	Val	
865					870					875					880	
Lys	Glu	Ser	Ala	Ser	Gly	His	Tyr	Gln	Leu	His	Val	Gln	Asn	Lys	Thr	
				885					890					895		
Gly	Glu	Pro	Asn	Gln	Glu	Gly	Leu	Asp	Leu	Phe	Asp	Ala	Ser	Ser	Val	
			900					905					910			
Gln	Asp	Arg	Ser	Arg	Leu	Phe	Val	Ser	Leu	Ala	Asn	His	Tyr	Val	Asp	
		915					920					925				
Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Tyr	Thr	Ile	Lys	Thr	Glu	Asn	Gly	Ile	Thr	Arg	
	930					935					940					
Leu	Tyr	Asn	Pro	Tyr	Ala	Gly	Asn	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Pro	Ala	Pro	
945					950					955					960	

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la producción de un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en las lisinas, comprendiendo dicha variante uno o dos aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de lisina 27, 65 y/o 68 sustituidos independientemente por otro aminoácido polar, caracterizado porque:

- a) se cultiva una célula huésped procariótica que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I o variante de IGF-I unido N-terminalmente al extremo C-terminal de un propéptido, en el que Gly-Pro son los dos primeros aminoácidos de IGF-I,
- b) en el que dicho propéptido termina C-terminalmente con aminoácidos -Y-Pro, en donde Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro,
- c) se recupera y PEGila dicha proteína de fusión,
- d) se corta dicha proteína de fusión PEGilada con IgA proteasa, en el que dicha IgA proteasa presenta la secuencia SEC ID nº 26, y
- e) se recupera dicho IGF-I o variante de IGF-I PEGilado.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el propéptido está representado por la fórmula:



en la que:

- Met es metionina,
- X<sub>1</sub> es un enlace, serina o asparagina,
- His es histidina,
- n es un número entre 0 y 10,
- X<sub>2</sub> es un péptido conector, seleccionado de entre el grupo que consiste de los péptidos SEC ID nº 6-10,
- Pro es prolina, y
- Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el propéptido no comprende un residuo de lisina.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho aminoácido o aminoácidos polares son, independientemente, arginina, glutamina o asparagina.

5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas se encuentra monoPEGilada o diPEGilada en los residuos de lisina 65 y 68.

6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas porta los aminoácidos R27, R65, K68 (RRK) y dicha variante se encuentra monoPEGilada en el residuo de lisina 68 o la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas porta los aminoácidos R27, K65, R68 (RKR) y dicha variante se encuentra monoPEGilada en el residuo de lisina 65.

7. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas porta los aminoácidos R27, K65, K68 (RKK) y dicha variante se encuentra monoPEGilada o diPEGilada en los residuos de lisina 65 y 68.

8. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas es una mezcla de una variante que porta los aminoácidos R27, R65, K68 (RRK), una variante que porta los aminoácidos R27, K65, R68 (RKR) o una variante que porta los aminoácidos R27, K65, K68 (RKK) y dicha variante se encuentra monoPEGilada o diPEGilada en el residuo o residuos de lisina 65 y 68.

9. Método según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la variante de IGF-I PEGilada en las lisinas se encuentra monoPEGilada o diPEGilada.

10. Método según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque dicho PEG presenta un peso molecular global de entre 20 y 100 kDa.

11. Método según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el grupo o grupos polietilenglicol son grupos polietilenglicol ramificados.

12. Proteína de fusión que comprende un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en las lisinas, comprendiendo dicha

variante uno o dos aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de las lisinas 27, 65 y/o 68 sustituidas independientemente por otro aminoácido polar, unido N-terminalmente con el extremo C-terminal de un propéptido, en el que Gly-Pro son los primeros dos aminoácidos de IGF-I, caracterizado porque dicho propéptido finaliza C-terminalmente con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

5 13. Proteína de fusión según la reivindicación 12, caracterizada porque dicho propéptido presenta una longitud de hasta 30 aminoácidos.

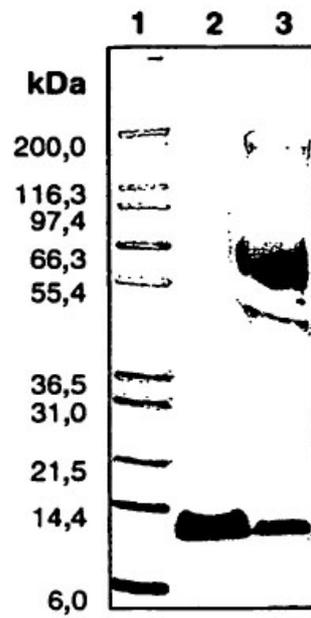
10 14. Proteína de fusión según la reivindicación 12 ó 13, caracterizada por la fórmula:



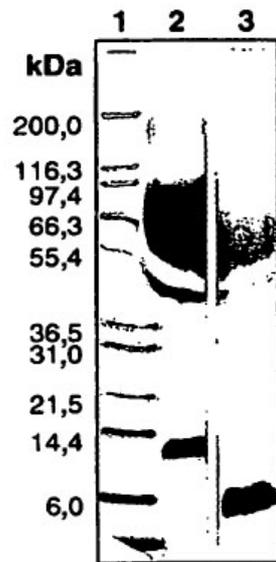
en la que:

- 15
- IGF-I se refiere a IGF-I humano y variante de IGF-I se refiere a IGF-I en el que uno o dos aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de las lisinas 27, 65 y/o 68 han sido sustituidas independientemente por otro aminoácido polar,
  - Met es metionina,
  - 20 • X<sub>1</sub> es un enlace, serina o asparagina,
  - His es histidina,
  - n es un número entre 0 y 10,
  - X<sub>2</sub> es un péptido conector, seleccionado de entre el grupo que consiste de los péptidos SEC ID nº 6-10,
  - Pro es prolina, y
  - 25 • Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

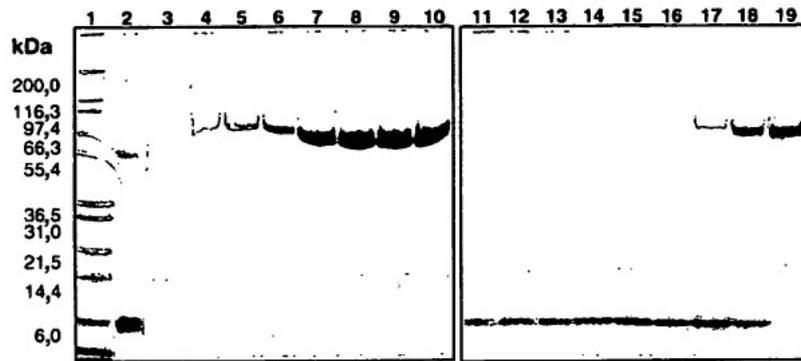


Fig. 4

