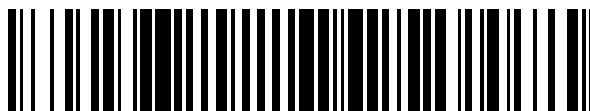


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 774**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)  
**A61K 38/44** (2006.01)  
**A61K 47/24** (2006.01)  
**A61P 7/02** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2005 E 05790438 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1803808**

54 Título: **Composición de superóxido dismutasa lecitinizada y un procedimiento para su producción**

30 Prioridad:

**12.10.2004 JP 2004297519**

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

**08.05.2013**

73 Titular/es:

**LTT BIO-PHARMA CO., LTD. (100.0%)  
26TH FLOOR, ATAGO GREEN HILLS MORI  
TOWER, 2-5-1  
ATAGO MINATO-KU TOKYO 105-6201, JP**

72 Inventor/es:

**NOMOTO, HIDEO;  
NAKAYAMA, TOSHIAKI;  
MURAHASHI, MAKI y  
MORIZAWA, YOSHITOMI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 402 774 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

Composición de superóxido dismutasa lecitinizada y un procedimiento para su producción.

La presente invención se refiere a una composición de superóxido dismutasa lecitinizada y a un procedimiento para su producción.

5 Las superóxido dismutasas (en lo sucesivo denominadas simplemente SOD) son enzimas presentes en una amplia variedad de organismos, tales como animales, plantas y microorganismos. Las SOD catalizan la dismutación de la especie de oxígeno reactiva libre denominada radical anión superóxido. Se espera utilizar las SOD como un fármaco anti-reumático, como un agente terapéutico para enfermedades autoinmunitarias e infarto de miocardio, durante el trasplante de órganos, para la eliminación de radicales generados *in vivo* mediante el uso de agentes antitrombóticos después de un infarto cerebral y para los diversos tipos de inflamación (documento que no es patente 1).

10 Se han propuesto varios derivados de SOD. Por ejemplo, se propone como fármaco (documento de patente 1) una superóxido dismutasa lecitinizada (denominada de aquí en adelante PC-SOD) con una capacidad de acumulación muy mejorada en las lesiones diana y una estabilidad *in vivo* muy mejorada obtenida tratando con lecitina una SOD específica.

Documento de patente 1: Patente japonesa N° 3070980.

Documento que no es patente 1: "*Kasseisan-so-no Rinsho-heno Tembo (Clinical Review of Active Oxygen)*", editado por Naoyuki Taniguchi, publicado por Iyaku Journal Co., Ltd., Tokyo, pp. 61-111 (1994).

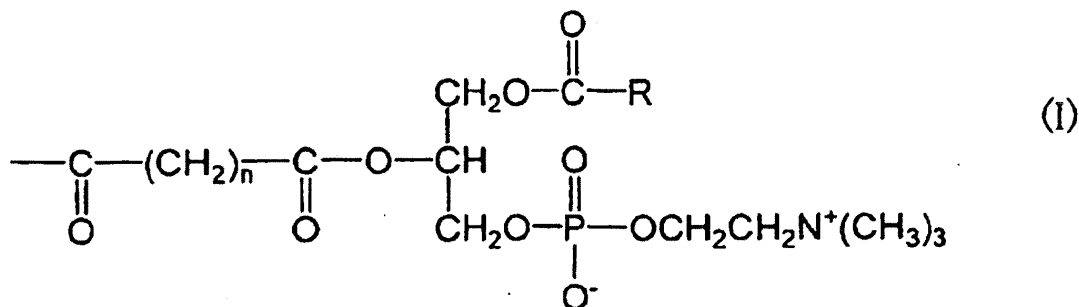
20 Además, la Patente de EE.UU. 5.762.929 describe un agente anti-enfermedad de las motoneuronas, que comprende superóxido dismutasa conjugada con lecitina por reticulación química.

Sin embargo, el uso médico práctico de la PC-SOD presenta algunos problemas. Por ejemplo, la PC-SOD obtenida convencionalmente haciendo reaccionar una SOD específica con un derivado de lecitina tiene el problema de actividad enzimática inestable que puede provocar trastornos cuando se fórmula en preparaciones o después de dicha formulación. Además, por el procedimiento convencional no se obtiene con rendimientos suficientemente altos.

25 El objeto de la presente invención es proporcionar una composición de PC-SOD con buena estabilidad que sea útil como fármaco.

30 Como resultado de su amplia investigación, los autores de la presente invención encontraron que una composición de PC-SOD que contiene, como componente principal, una PC-SOD (A) obtenida sustituyendo de 1 a 4 grupos amino en una SOD específica con restos de lecitina (de aquí en adelante denominada PC-SOD (A)) resuelve los problemas antes mencionados. Además, estudiaron las condiciones para la producción de la composición de PC-SOD y encontraron que la composición de PC-SOD se puede obtener con altos rendimientos haciendo reaccionar un derivado de lecitina con una SOD específica en una relación específica y aislando el producto de reacción por un proceso específico.

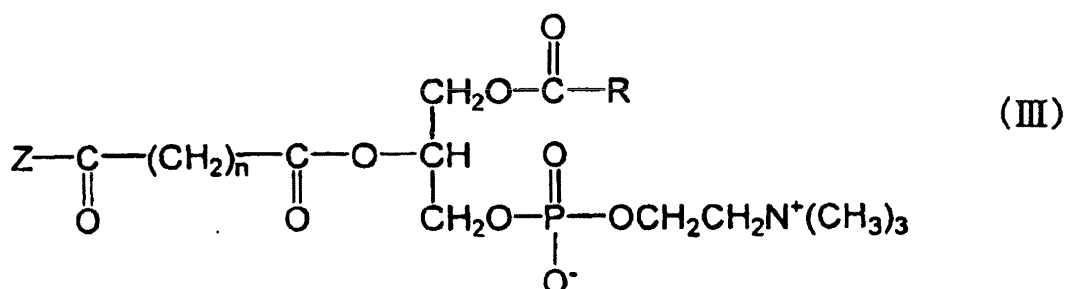
35 Concretamente, la presente invención proporciona una composición de PC-SOD que contiene una PC-SOD obtenida sustituyendo al menos un grupo amino en superóxido dismutasa humana coordinada con cobre y/o zinc que tiene un grupo hidroxietiltilio en lugar del grupo mercapto en la cisteína de la posición 111, con al menos un resto de lecitina representado por la siguiente fórmula (I):



40 (en donde R es un grupo alquilo de C<sub>8-30</sub> y n es un número entero de 2 a 10), que está disuelto en alcohol isopropílico, en donde el resto de lecitina se hace reaccionar con 0,05 a 0,4 veces los moles de dicha superóxido dismutasa, en donde la PC-SOD comprende, como componente principal, una PC-SOD (A) que tiene un número m de grupos amino sustituidos con restos de lecitina (en donde m es un número entero de 1 a 4 y como valor medio de

1,5 a 2,4) y la PC-SOD (A) consiste en 25 a 40% en moles de una superóxido dismutasa lecitinizada (a1) en donde m = 1, de 35 a 50% en moles de una superóxido dismutasa lecitinizada (a2) en donde m = 2, de 10 a 20% en moles de una superóxido dismutasa lecitinizada (a3) en donde m = 3 y de 5 a 15% en moles de una superóxido dismutasa lecitinizada (a4) en donde m = 4.

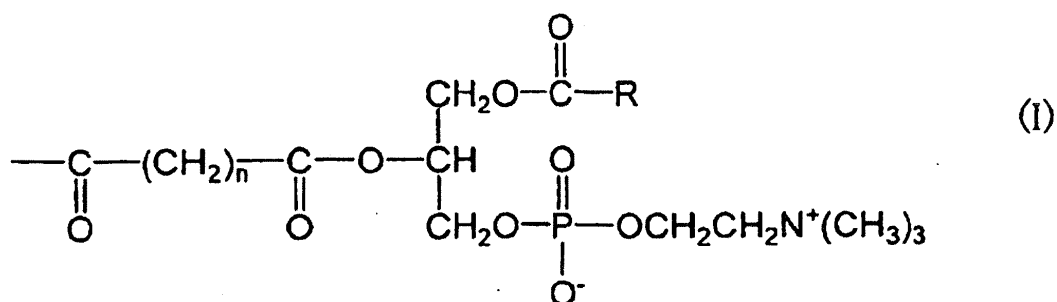
- 5 La presente invención proporciona también un procedimiento para producir la composición de superóxido dismutasa lecitinizada definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una etapa de lecitinación haciendo reaccionar un derivado de lecitina representado por la siguiente fórmula (III):



- 10 (en donde R es un grupo alquilo de C<sub>8-30</sub>, Z es un grupo hidroxilo o un grupo formador de éster activo que elimina un grupo carbonilo y n es un número entero de 2 a 10) que está disuelto en alcohol isopropílico, con 0,5 a 0,4 veces los moles de superóxido dismutasa humana coordinada con cobre y/o zinc que tiene un grupo hidroxietiltilio en lugar del grupo mercapto en la cisteína de la posición 111, para obtener una PC-SOD en bruto, y una etapa de purificación en la que se purifica la PC-SOD en bruto por cromatografía en columna de intercambio iónico.

- 15 La composición de PC-SOD de la presente invención tiene una actividad enzimática estable y una alta estabilidad *in vivo* y es fácil de formular en una preparación. Por consiguiente, es útil como fármaco. Por el procedimiento de la presente invención se obtiene la composición de PC-SOD con altos rendimientos.

- 20 La composición de PC-SOD de la presente invención contiene una PC-SOD que tiene una estructura de superóxido dismutasa humana coordinada con cobre y/o zinc (denominada de aquí en adelante SOD humana) que tiene un grupo hidroxietiltilio en lugar del grupo mercapto en la cisteína de la posición 111, y tiene al menos un grupo amino sustituido con un resto de lecitina representado por la siguiente fórmula (I).



La SOD utilizada para producir la PC-SOD se puede obtener por cualquier método sin restricciones particulares y puede ser de origen humano u otro origen. Especialmente, la SOD humana puede ser de cualquier origen siempre que tenga la misma estructura que la SOD de origen humano.

- 25 En la presente invención, la PC-SOD consiste en una PC-SOD (A) que se describirá más adelante y una PC-SOD (B) (denominada de aquí en adelante PC-SOD (B)) obtenida sustituyendo al menos 5 grupos amino en la SOD humana con restos de lecitina (I). El total de las PC-SOD significa la suma de la PC-SOD (A) y la PC-SOD (B).

- 30 En el resto de lecitina representado por la fórmula (I) (denominado de aquí en adelante el resto de lecitina (I)), R es un grupo alquilo de C<sub>8-30</sub>, preferiblemente un grupo alquilo de C<sub>14-22</sub>. R puede ser lineal o ramificado, preferiblemente lineal. R es preferiblemente un grupo alquilo lineal de 13, 15 o 17 átomos de carbono, particularmente un grupo alquilo lineal de C<sub>15</sub>.

n es un número entero de 2 a 10, preferiblemente de 2 a 6, particularmente con preferencia 3.

En la presente invención, la PC-SOD en la composición de PC-SOD se refiere genéricamente a compuestos

obtenidos sustituyendo al menos un grupo amino en la SOD humana con un resto de lecitina. Debido a que la SOD humana tiene 12 grupos amino, la PC-SOD tiene de 1 a 12 restos de lecitina (I).

"Sustituido con un resto de lecitina (I)" significa que cualquier átomo de hidrógeno de un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) está sustituido por un resto de lecitina.

- 5 La composición de PC-SOD de la presente invención contiene, como componente principal, una PC-SOD (A), en donde el número (m) de restos de lecitina (I) es un número entero de 1 a 4, y el valor medio de m es de 1,5 a 2,4. m es el número de restos de lecitina en los grupos amino en la PC-SOD (A). "Que contiene, como componente principal, la PC-SOD (A)" significa que entre las PC-SOD en la composición de PC-SOD, la PC-SOD (A) constituye la mayor proporción. La relación entre la PC-SOD (A) y el total de las PC-SOD es preferiblemente al menos 75% en masa, particularmente del 85 al 100% en masa.

Además, en la presente invención, la PC-SOD (A) contiene cuatro tipos de PC-SOD, en donde m es 1, 2, 3 y 4, en relaciones específicas, respectivamente. Especialmente, la PC-SOD (A) consiste en 25 a 40% en moles de una PC-SOD (a1) en donde m = 1, de 35 a 50% en moles de una PC-SOD (a2) en donde m = 2, de 10 a 20% en moles de una PC-SOD (a3) en donde m = 3 y de 5 a 15% en moles de una PC-SOD (a4) en donde m = 4.

- 15 El valor medio de m es de 1,5 a 2,4. El valor medio de m se calcula sobre una base molar a partir de las relaciones molares entre las PC-SOD (a1), (a2), (a3) y (a4) y la cantidad total.

- 20 Cuando el número de restos de lecitina unidos a la PC-SOD es grande, la PC-SOD es muy hidrófoba y por consiguiente adherente a las células y fácilmente absorbida por los tejidos adiposos. Por otro lado, cuando el número de restos de lecitina unidos a la PC-SOD es pequeño, la PC-SOD es hidrófila y fácilmente aplicable a preparaciones acuosas, tales como inyecciones, y tiene otras ventajas como una elevada actividad enzimática y ser reconocida menos probablemente como un antígeno *in vivo*.

- 25 Cuando la PC-SOD se formula en una preparación, es necesario que estén bien equilibradas la dinámica, la estabilidad y la facilidad de formulación *in vivo*. Debido a estos factores, los autores de la presente invención encontraron que el número medio óptimo de restos de lecitina (I) unidos a la PC-SOD es de 1,5 a 2,4. También encontraron que debido a la estabilidad de la composición de PC-SOD de la presente invención, no es suficiente que la PC-SOD tenga de 1,5 a 2,4 restos de lecitina por término medio y que la presencia tanto de una PC-SOD que tenga un número moderado de restos de lecitina (I) como de una PC-SOD que tenga menos restos de lecitina (I) mejoró la estabilidad como fármaco y fue eficaz para la producción de un fármaco y una preparación.

La composición de PC-SOD de la presente invención puede contener, además de la PC-SOD (A), una PC-SOD (B).

- 30 El número (r) de restos de lecitina (I) en la PC-SOD (B) es de 5 a 12.

Debido a que los grupos amino interiores en la conformación de la PC-SOD son resistentes a la sustitución, en general, r es preferiblemente de 5 a 8.

- 35 Cuando la composición de PC-SOD contiene la PC-SOD (B), la cantidad de la PC-SOD (B) es preferiblemente como máximo 25% en masa, particularmente como máximo 15% en masa, basada en el total de PC-SOD en la composición de PC-SOD. Si supera el 25% en masa, los efectos de la presente invención se pueden anular por las razones antes mencionadas.

- 40 En la presente invención, la PC-SOD que es un compuesto obtenido sustituyendo al menos un grupo amino en SOD humana con un resto de lecitina (I) puede tener al menos un grupo amino sustituido con un resto distinto del resto de lecitina (I), tal como un grupo obtenido por descomposición parcial de un resto de lecitina (I) o un producto de descomposición del derivado de lecitina usado para síntesis de la PC-SOD como sustituyente en un grupo amino.

Ejemplos específicos de dicho grupo distinto del resto de lecitina (I) incluyen los siguientes grupos, en los que n es el mismo que el definido para el resto de lecitina (I).





de lecitina se difunda totalmente en el sistema de reacción en un tiempo corto, generalmente de 20 a 100 mL/min, preferiblemente de 40 a 80 mL/min.

La velocidad de reacción debe ser tal que el derivado de lecitina se difunda totalmente en el sistema de reacción en un tiempo corto, generalmente de 50 a 500 rpm, preferiblemente de 100 a 300 rpm.

- 5 El límite superior de la temperatura de reacción es preferiblemente +20°C, debido a que la mayor parte del derivado de lecitina se introduce en una molécula de SOD a medida que aumenta la temperatura. El límite inferior de la temperatura de reacción debe ser tal que a dicha temperatura no se congelen las soluciones de reacción. La temperatura de reacción es preferiblemente de 0 a +10°C.

El tiempo de reacción es preferiblemente de 0,5 a 72 horas, particularmente de 2 a 24 horas.

- 10 La presión de reacción es preferiblemente de 0,05 MPa a 0,2 MPa, particularmente alrededor de la presión atmosférica.

Con el fin de producir la composición de PC-SOD de la presente invención de calidad más estable con altos rendimientos, se prefiere ajustar también condiciones estrictas en cuanto a la concentración de SOD humana en la solución de SOD y el modo de adición del derivado de lecitina.

- 15 Específicamente, se prefiere añadir una solución de derivado de lecitina, obtenida diluyendo un derivado de lecitina, con 20 a 100 veces de alcohol isopropílico, a una solución de SOD obtenida diluyendo SOD humana con 100 a 2000 veces un disolvente orgánico.

- 20 El disolvente utilizado para disolver la SOD puede ser agua o una mezcla disolvente de agua y un disolvente orgánico, preferiblemente una mezcla disolvente de agua y un disolvente orgánico. Dicha mezcla disolvente permite la formación de un sistema de reacción homogéneo por adición de la solución de derivado de lecitina y evita la formación de precipitados. Se prefiere impartir al disolvente una capacidad de tamponamiento disolviendo en él ácido bórico o similar.

- 25 El agua es preferiblemente agua purificada, agua tratada por intercambio iónico, agua destilada o agua para inyección (denominadas de aquí en adelante ampliamente "agua"). El disolvente orgánico puede ser alcohol isopropílico, N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, N,N-dimetilacetamida, sulfolano, dimetilsulfóxido, acetona, 1,4-dioxano, metanol o similares y es preferiblemente alcohol isopropílico.

El disolvente para diluir el derivado de lecitina es alcohol isopropílico.

- 30 La solución de reacción así obtenida (la PC-SOD en bruto) contiene no sólo la PC-SOD (A), sino también la PC-SOD (B), la SOD humana sin reaccionar, el derivado de lecitina sin reaccionar y otros componentes. Como otros componentes, se puede(n) mencionar el(los) residuo(s) de los reactivos usados para la síntesis del derivado de lecitina.

A continuación, la PC-SOD en bruto obtenida en la etapa de lecitinación se purifica en la etapa de purificación por cromatografía en columna de intercambio iónico. La etapa de purificación proporciona la composición de PC-SOD de la presente invención con altos rendimientos.

- 35 La etapa de purificación se realiza cargando la PC-SOD en bruto en una columna rellena de una resina de intercambio iónico dejando que sea adsorbida por la resina y eluyendo la composición de PC-SOD deseada con un disolvente que contenga un tampón que a su vez contenga una sal inorgánica.

Como resina de intercambio iónico, se puede utilizar una resina de intercambio aniónico o una resina de intercambio catiónico.

- 40 El tampón en el disolvente de elución puede ser cualquier tampón sin restricciones particulares siempre que contenga una sal inorgánica y tenga capacidad de tamponamiento. Sin embargo, en el caso de un tampón de fosfato, debido a que la PC-SOD puede ser insoluble en él, es necesario comprobar antes de su uso si disuelve la PC-SOD. El pH del tampón es preferiblemente de 6 a 9 debido a la estabilidad de la PC-SOD durante la purificación.

- 45 La sal inorgánica puede ser cloruro de sodio, sulfato de amonio o similares. Se puede utilizar sola o en proporciones predeterminadas en una mezcla.

El disolvente de elución contiene preferiblemente un disolvente orgánico para disolver más fácilmente la PC-SOD.

El disolvente orgánico puede ser alcohol isopropílico, N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, N,N-dimetilacetamida, sulfolano, dimetilsulfóxido, acetona, 1,4-dioxano, metanol o similares. Entre ellos, se prefiere el metanol debido a que disuelve bien la PC-SOD y permite una purificación eficaz.

- 50 La cantidad de disolvente orgánico en el disolvente debe ser preferiblemente tal que la PC-SOD sea soluble y el disolvente orgánico no retarde la adsorción de la PC-SOD sobre la resina de intercambio iónico. La proporción del



disolvente orgánico es preferiblemente del 10 al 80% en volumen, más preferiblemente del 20 al 70% en volumen, particularmente del 40 al 60% en volumen, basada en el volumen total del disolvente.

La PC-SOD deseada se eluye cambiando la concentración de la sal inorgánica del tampón en el disolvente.

5 Hablando específicamente, se prefiere cargar la PC-SOD en bruto en la columna, eluir a continuación las sustancias no adsorbidas con el disolvente (A) siguiente y eluir la composición de PC-SOD con el disolvente (B) siguiente.

Disolvente (A): un disolvente que consiste en 20 a 90% en volumen de un tampón (a1), que tiene un pH de 6 a 9 y una concentración de sal inorgánica de 5 a 100 mM, y de 10 a 80% en volumen de metanol.

Disolvente (B): un disolvente que consiste en 20 a 90% en volumen de un tampón (b1), que tiene un pH de 6 a 9 y una concentración de sal inorgánica de 150 a 400 mM, y de 10 a 80% en volumen of metanol.

10 Se prefiere separar la sal inorgánica y el disolvente orgánico por ultrafiltración de las fracciones que contienen la composición de PC-SOD obtenida como se ha mencionado antes. Después de ultrafiltración, se obtiene una solución acuosa de la composición de PC-SOD que contiene la composición de PC-SOD y agua. Aunque la composición de PC-SOD se puede aislar por deshidratación de la solución acuosa, se obtiene preferiblemente como una solución acuosa debido a que la composición de PC-SOD se utiliza generalmente en forma de solución acuosa cuando se formula en una preparación. La concentración de PC-SOD en la solución acuosa es preferiblemente de 0,1 a 300 mg/mL, particularmente de 1 a 50 mg/mL.

La composición de PC-SOD de la presente invención es útil como fármaco y se formula en una preparación por adición de diversos aditivos o por disolución.

20 Su forma farmacéutica puede ser una inyección (tal como una solución, una suspensión, una emulsión o una formulación sólida para disolución antes de su uso), un comprimido, una cápsula, un granulado, un polvo, un líquido, una formulación liposómica, un gel, un polvo tópico, una pulverización, un inhalante en polvo o un supositorio.

Se puede administrar por inyección (intramuscular, subcutánea, intradérmica o intravenosa), por vía oral o por inhalación. Su dosis se determina en cada caso, dependiendo del método de preparación del fármaco, la forma farmacéutica, el tipo de enfermedad, la vía de administración, la pauta terapéutica, la finalidad y el peso del paciente y puede ser, por ejemplo, de 0,5 a 200 mg al día para un adulto.

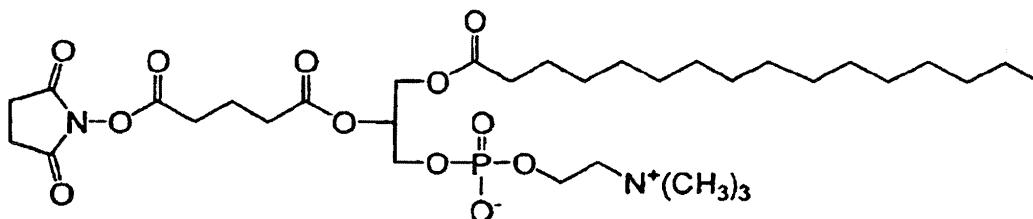
#### EJEMPLOS

A continuación, la presente invención se describirá con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención de ningún modo se restringe a los Ejemplos específicos.

#### [EJEMPLO 1] Preparación de la composición de PC-SOD

30 Se vertió agua destilada para inyección (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., nombre del producto: *Otsuka Distilled water*) (9000 mL) en un matraz de 20 L, y se añadieron sucesivamente ácido bórico (27,7 g), NaOH (3,6 g) y KCl (33,7 g). Luego, se añadió SOD en agua (100 g, concentración de SOD 113,6 mg/mL) y alcohol isopropílico (2000 mL) enfriado a 8°C en una cámara cromatográfica se añadió gota a gota a un caudal de 33 mL/min con agitación a 210 rpm para dar una solución de SOD.

35 Se disolvió un derivado de lecitina mostrado a continuación (15,7 g) preparado de acuerdo con la patente japonesa 3070980 en alcohol isopropílico (500 mL) y se filtró a través de un filtro hidrófobo para separar las sustancias insolubles. Se añadió alcohol isopropílico al filtrado hasta un volumen total de 8000 mL para dar una solución de derivado de lecitina. La temperatura de la solución fue 8°C. Luego, se añadió gota a gota la solución de derivado de lecitina (8000 mL) a la solución de SOD a un caudal de 66 mL/min y se agitó a 210 rpm durante 4 horas para dar una solución de reacción.



Toda la solución de reacción se cargó en una columna rellena con una resina de intercambio iónico (Cellulofine sf A-500) equilibrada preliminarmente con una mezcla líquida 1:1 (relación en volumen) de tampón de borato (50 mmol/L,



pH 8,5 ± 0,2) y metanol, y las sustancias no adsorbidas se eluyeron con la mezcla líquida para dar fracciones que contenían N-hidroxisuccinimida, 1H-tetrazol y dicitohexilcarbodiimida.

A continuación, la SOD no modificada se eluyó con una mezcla 1:1 de 50 mmol/L de tampón de borato (pH 8,5 ± 0,2, concentración de NaCl = 25 mmol/L) y metanol como disolvente de elución.

- 5 La elución subsiguiente con una mezcla 1:1 de 50 mmol/L de tampón de borato (pH 8,5 ± 0,2, concentración de NaCl = 200 mmol/L) y metanol como disolvente de elución dio una fracción que contenía la composición de PC-SOD.

10 La fracción que contenía la composición de PC-SOD se sometió a ultrafiltración a través de un ultrafiltro PLGC0005 (límite de peso molecular nominal 10.000, superficie de filtración 0,5 m<sup>2</sup>) fabricado por Millipore Corporation para desalación, reemplazamiento del metanol con agua destilada para inyección y ajuste de la concentración, hasta que la conductividad eléctrica del filtrado llegó a ser la misma que la del agua destilada para inyección. La concentración de PC-SOD se ajustó a aproximadamente 40 mg/mL para dar una solución acuosa de la composición de PC-SOD (Lote 001). Todos los métodos en tanto se realizaron en una cámara cromatográfica mantenida a 4°C con monitorización de la temperatura de la solución.

15 La composición de PC-SOD se fraccionó por HPLC preparativa a través de una columna de HPLC, *Phenyl 5PW-RP* (75 mm x 4,6 mm, Tosoh Corporation) usando una fase móvil con un gradiente de concentración desde una solución acuosa que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo al 20% hasta una solución acuosa que contenía ácido trifluoroacético al 0,075% y acetonitrilo al 90% que se hizo pasar a un caudal de 0,8 mL/min, y se recogieron las fracciones correspondientes a las PC-SOD respectivas. Como detector, se usó un detector de UV (longitud de onda 220 nm), y la temperatura de la columna fue la temperatura ambiente.

20 Las fracciones recogidas se analizaron por MALDI TOF-MS para determinar los pesos moleculares e identificar los fragmentos. Los números (m) de derivados de lecitina en 1 molécula de las PC-SOD, las relaciones (relaciones molares) de las PC-SOD con diferentes valores de m, el valor medio de m, y el valor medio de m en dímeros de PC-SOD se muestran más adelante en la Tabla 1.

25 La solución acuosa (Lote 001) contenía las PC-SOD que tenían de 1 a 4 moléculas de los derivados de lecitina, y el valor medio de m fue 2.

[EJEMPLOS 2 y 3]

30 Se siguieron los métodos del Ejemplo 1 para obtener soluciones acuosas de composición de PC-SOD (Lotes 002 y 003). Los números (m) de derivados de lecitina en 1 molécula de las PC-SOD, las relaciones (relaciones molares) de las PC-SOD con diferentes valores de m, el valor medio de m, y el valor medio de m en dímeros de PC-SOD para cada solución se muestran reunidos a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

	Ej. 1: Lote 001	Ej. 2: Lote 002	Ej. 3: Lote 003
m = 1	31 % en moles	31 % en moles	32 % en moles
m = 2	43 % en moles	43 % en moles	43 % en moles
m = 3	16 % en moles	16 % en moles	15 % en moles
m = 4	10 % en moles	10 % en moles	10 % en moles
Valor medio de m	2	2	2
Valor medio de m en dímeros	4	4	4

[Ejemplo 4] Ensayo de pureza por HPLC (Parte 1)

35 La solución acuosa obtenida en el Ejemplo 1 (Lote 001, 500 µL) se diluyó con agua destilada para inyección hasta una concentración de PC-SOD de 30 mg/mL y una porción (500 µL) de la solución diluida mezclada con agua destilada para inyección (2500 µL) para dar una muestra de ensayo. El análisis por HPLC de la muestra de ensayo reveló que la relación entre la PC-SOD (A) y el total de las PC-SOD fue 96,7% (en términos de superficie de los picos del cromatograma).

40 Para el análisis por HPLC, se hizo pasar una fase móvil con un gradiente de concentración desde una solución acuosa que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo al 20% hasta una solución acuosa que contenía ácido trifluoroacético al 0,075 % y acetonitrilo al 90% a un caudal de 0,8 mL/min a través de una columna YMC A-502 S-5 120A CN (150 mm x 4,6 mm, fabricada por YMC) con la columna a temperatura ambiente, y como detector se usó un detector de UV (longitud de onda 220 nm).

## [EJEMPLO 5] Ensayo de pureza por HPLC (Parte 2)

Se preparó una solución acuosa de PC-SOD (Lote 005) del mismo modo que el Ejemplo 1, y se analizó por HPLC del mismo modo que el Ejemplo 4. La relación entre PC-SOD (A) y el total de las PC-SOD fue 97,3% (en términos de superficie de los picos del cromatograma)

## 5 [EJEMPLO 6] Ensayo de pureza por electroforesis sobre dodecilsulfato de sodio-gel de poliacrilamida

La solución acuosa obtenida en el Ejemplo 1 (Lote 001, 500 µL) se diluyó con agua destilada para inyección hasta una concentración de PC-SOD de 30 mg/mL, y se mezcló una porción (100 µL) de la solución diluida con agua (2900 µL) para dar una solución de muestra.

Como control se usó una mezcla de la solución de muestra (100 µL) y agua (900 µL).

10 Se calentaron partes alícuotas de 20 µL de la solución de muestra y la solución de control con un tampón de muestra (8 µL) a 95°C durante 3 minutos. El tampón de muestra se preparó disolviendo glicerina (10 g), dodecilsulfato de sodio (2 g) y azul de bromofenol (100 mg) en tampón Tris-HCl (50 mmol/L) para obtener una solución que tenía un volumen total de 100 mL y añadiendo 2-mercaptoetanol (5 µL) a una parte alícuota de 95 µL de 100 mL de la solución.

15 Se sometieron a electroforesis 4 µL de la solución de muestra y la solución de control tratada anteriormente e inmediatamente después de la electroforesis, el gel se tiñó en una cámara de tinción. Después de la tinción, el gel se sumergió en una solución protectora preparada añadiendo agua a glicerina (20 mL) hasta un volumen total de 500 mL, y se secó.

20 De la comparación entre las bandas secundarias de la solución de muestra y la banda principal de la solución de control, se encontró que la proporción de la PC-SOD (A) en la composición de PC-SOD era al menos 90% (en términos de superficie de los picos del cromatograma).

## [EJEMPLO 7] Ensayo de actividad específica.

25 La actividad específica se midió por el método de citocromo C como ha sido descrito por Y. Oyanagi (*SOD and active oxygen regulators*, p. 95 (1989), J. M. McCord (*J. Biol. Chem.*, Vol. 224, p. 6049 (1969) y K. Asada (*Agr. Biol. Chem.*, Vol. 38, p. 471(1974)). Se usó como patrón SOD humana que tenía una actividad específica en el intervalo de 4500 a 5500.

30 A partir de las composiciones de PC-SOD de los Ejemplos previos, se prepararon muestras con diversas concentraciones, y se añadió una solución de xantina-oxidasa. Se midieron las absorbancias de UV (550 nm). Las actividades específicas de las muestras se determinaron a partir de una curva de calibrado obtenida a partir de medidas de concentración y absorbancia por el método de los mínimos cuadrados. La actividad específica de la composición de PC-SOD del Lote 001 fue 3400 (U/mg de SOD).

La actividad específica de la unidad, "U/mg de SOD", se refiere a la de las SOD totales (1 mg).

## [EJEMPLO 8] Ensayo de ácidos grasos

35 Se disolvió ácido palmítico (256 mg) en etanol para preparar 20 mL de una solución madre patrón de 50 mmol/L. La solución madre patrón se diluyó con etanol para dar muestras estándares de 0,1 mmol/L, 0,05 mmol/L y 0,01 mmol/L de ácido palmítico. Se definió con Factor ( $F^P$ ) el valor de la relación (el peso de ácido palmítico) / (el peso molecular del ácido palmítico = 256,43).

Se disolvió ácido margárico (27 mg) en etanol para dar 200 mL de una solución patrón interna de 0,5 mmol/L.

40 La solución patrón interna (100 µL) se añadió a las muestras estándares de ácido palmítico (100 µL), la solución acuosa (100 µL) obtenida en el Ejemplo (Lote 001) y las soluciones acuosas (100 µL respectivamente) obtenidas del mismo modo que en el Ejemplo 1 (Lote 005 y Lote 008), respectivamente. Como muestra en blanco, se usó etanol (100 µL).

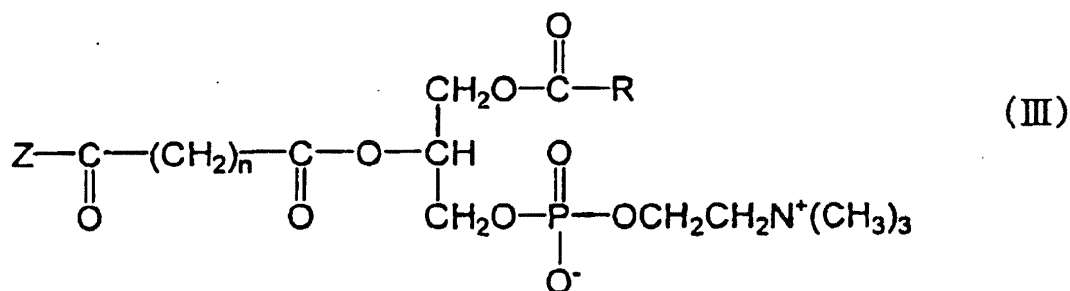
45 Cada muestra se agitó con Líquido A y Líquido B de un reactivo marcador de ácido graso de cadena larga y cadena corta (fabricado por YMC) compuesto de Líquido A, Líquido B y Líquido C en un baño termostático a 60°C durante 20 minutos. Después de la adición de Líquido C (200 µL), las muestras se agitaron en un baño termostático a 60°C durante 15 minutos para dar muestras para HPLC.

50 La HPLC se llevó a cabo haciendo pasar una fase móvil con un gradiente de concentración desde una solución acuosa que contenía ácido trifluoroacético al 0,01% y acetonitrilo al 20% hasta una solución acuosa que contenía ácido trifluoroacético al 0,01% y acetonitrilo al 20% a un caudal de 1 mL/min a través de una columna YMC A-512 S-5 120A CN (150 mm x 6,0 mm, fabricada por YMC) con la columna a la temperatura ambiente. Como detector se usó un detector de UV (longitud de onda de 230 nm).

Se determinaron los porcentajes de las superficies de los picos para el ácido palmítico a partir de los cromatogramas de HPLC resultantes y se compararon con los de la solución patrón interna para determinar las cantidades de ácido palmítico. La concentración de ácido palmítico para el total de las PC-SOD fue 0,074 mmol/mg en el Lote 001, 0,094 mmol/mg en el Lote 005, y 0,067 mmol/mg en el Lote 008.

- 5 La composición de PC-SOD de la presente invención es una excelente composición que tiene actividad enzimática estable y buena estabilidad *in vivo* y es fácil de formular en una preparación. Por lo tanto, es útil para diversos agentes terapéuticos, tales como un fármaco anti-reumático, y agentes terapéuticos para enfermedades autoinmunitarias.





- 5 [en donde R es un grupo alquilo de C<sub>8-30</sub>, Z es un grupo hidroxilo o un grupo formador de éster activo que elimina un grupo carbonilo, y n es un número entero de 2 a 10) que está disuelto en alcohol isopropílico con 0,05 a 0,4 veces los moles de superóxido dismutasa humana coordinada con cobre y/o zinc que tiene un grupo hidroxietiltilio en lugar del grupo mercapto en la cisteína de la posición 111 para obtener una superóxido dismutasa lecitinizada en bruto, y una etapa de purificación de la superóxido dismutasa lecitinizada en bruto por cromatografía en columna de intercambio iónico.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la etapa de purificación se lleva a cabo permitiendo que la superóxido dismutasa lecitinizada en bruto obtenida en la etapa de lecitinación sea adsorbida sobre una resina de intercambio iónico, eluyendo luego la superóxido dismutasa lecitinizada que no ha reaccionado con el siguiente disolvente (A) y eluyendo la composición de superóxido dismutasa lecitinizada como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con el siguiente disolvente (B)
- 10 disolvente (A): un disolvente que consiste en 20 a 90 % en volumen de un tampón (a1), que tiene un pH de 6 a 9 y una concentración de sal inorgánica de 5 a 100 mM, y de 10 a 80 % en volumen de metanol;
- 15 disolvente (B): un disolvente que consiste en 20 a 90 % en volumen de un tampón (b1), que tiene un pH de 6 a 9 y una concentración de sal inorgánica de 150 a 400 mM, y de 10 a 80 % en volumen de metanol.