

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 131**

51 Int. Cl.:

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 14/53 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.1998 E 06025664 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1762574**

54 Título: **Modificación química de proteínas para mejorar la biocompatibilidad y la bioactividad**

30 Prioridad:

15.08.1997 US 911224

21.07.1998 US 119800

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

06.08.2013

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**GEGG, COLIN JR. y
KINSTLER, OLAF B.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 417 131 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

Modificación química de proteínas para mejorar la biocompatibilidad y la bioactividad

Área de la invención

5 La presente invención hace referencia, en líneas generales, a la modificación química de proteínas biológicamente activas o análogos de las mismas (el término "proteína" tal como se utiliza en la presente patente es sinónimo de "polipéptido" o "péptido", a menos que se indique lo contrario). De manera más específica, la presente invención describe métodos novedosos para modificaciones químicas de un sitio específico de varias proteínas, y las composiciones resultantes.

Antecedentes de la invención

10 Debido a recientes avances en las tecnologías de ingeniería celular y genética, las proteínas que se conoce que muestran varias acciones farmacológicas *in vivo*, se pueden producir en grandes cantidades para sus aplicaciones farmacéuticas. Tales proteínas incluyen la eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferones (alfa, beta, gamma, consenso), proteína de unión al factor de necrosis tumoral (TNFbp), antagonista de los receptores de la interleucina-1 (IL-1ra), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor del crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de las células madre (SCF), factor de diferenciación del crecimiento de megacariocitos (MGDF), osteoprotegerina (OPG), factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF) y proteína de la obesidad (proteína OB). La proteína OB puede ser denominada también como leptina en la presente patente.

20 El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una glicoproteína que induce la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas de los neutrófilos, y estimula la actividad de los neutrófilos maduros. El G-CSF recombinante humano (rhG-CSF, por sus siglas en inglés), expresado en *E. coli*, contiene 175 aminoácidos, tiene un peso molecular de 18.978 Da, y es biológicamente activo. Actualmente, el Filgrastim, un G-CSF recombinante, se encuentra disponible para su uso terapéutico.

25 La estructura del G-CSF bajo diversas condiciones se ha estudiado ampliamente, Lu et al., J. Biol. Chem. Vol. 267, 8770-8777 (1992), y la estructura tridimensional del rhG-CSF ha sido determinada recientemente mediante cristalografía de rayos X. El G-CSF es un miembro de una clase de factores de crecimiento que comparten un motivo estructural común de un haz de cuatro hélices α , con dos conexiones de cruce; Hill et al., P.N.A.S. USA, Vol. 90, 5167-5171 (1993). Esta familia incluye el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos o GM-CSF (por sus siglas en inglés), la hormona del crecimiento, interleucina-2, interleucina-4, e interferón B. La extensión de la estructura secundaria es sensible al pH del disolvente, donde la proteína adquiere un grado aún mayor del contenido helicoidal alfa en un pH ácido; Lu et al., Arch. Biochem. Biophys., 286, 81-92 (1989).

30 La leptina es activa *in vivo* tanto en ratones mutantes *ob/ob* (ratones obesos debido a un defecto en la producción del producto génico OB), como además en ratones normales de tipo salvaje. La actividad biológica se manifiesta, entre otras cosas, en la pérdida de peso. Véase *en general*, Barinaga, "Obese" Protein Slims Mice, Science 269: 475-476 (1995) y Friedman, "The Alphabet of Weight Control," Nature 385: 119-120 (1997). Se conoce, por ejemplo, que en los ratones mutantes *ob/ob*, la administración de leptina da como resultado una disminución en los niveles de insulina en suero, y en los niveles de glucosa en suero. También se conoce que la administración de leptina da como resultado una disminución en la grasa corporal. Esta característica se observó tanto en ratones mutantes *ob/ob*, como además en ratones normales no obesos. Pelleymounter et al., Science 269: 540-543 (1995); Halaas et al., Science 269: 543-546 (1995). Ver también, Campfield et al., Science 269: 546-549 (1995) (La administración periférica y central de dosis de microgramos de leptina redujo la ingesta de alimentos y el peso corporal de ratones *ob/ob* y ratones con obesidad inducida por la dieta, pero no en los ratones obesos *db/db*.)

45 Los experimentos preliminares de pérdida de peso inducida por leptina en modelos animales, predicen la necesidad de una formulación de leptina de alta concentración con una administración crónica para tratar de manera eficaz la obesidad en humanos. Las dosis en un rango de miligramos de proteína por kilogramo de peso corporal, tal como ,5 o 1,0 mg/kg/día o inferior, resultan deseables para la inyección de cantidades terapéuticamente efectivas en mamíferos de gran tamaño, tales como por ejemplo humanos. Un aumento en la concentración de proteínas es, por tanto, necesario para evitar la inyección de grandes volúmenes, lo cual puede resultar incómodo o posiblemente doloroso para el paciente.

50 Desafortunadamente, para la preparación de una composición farmacéutica para la inyección en humanos, se ha observado que la secuencia de aminoácidos de la leptina es insoluble en pH fisiológico en concentraciones relativamente elevadas, tales como por encima de aproximadamente 2 mg de proteína activa/por mililitro de líquido. La pobre solubilidad de la leptina bajo condiciones fisiológicas parece contribuir a la formación de precipitados de leptina en el sitio de inyección, de manera dependiente de la concentración, cuando se administran dosis elevadas

en una formulación con pH bajo. Asociada a los precipitados de leptina observados, se encuentra, en el sitio de inyección, una respuesta inflamatoria que incluye un infiltrado celular mixto caracterizado por la presencia de eosinófilos, macrófagos y células gigantes.

5 Hasta la fecha, no se informado sobre preparaciones estables de proteína OB humana en concentraciones de al menos, aproximadamente, 2 mg/ml en pH fisiológico, y además, ni tampoco sobre concentraciones estables de proteína OB humana activa de al menos, aproximadamente, 50 mg/ml o superior. El desarrollo de las formas de leptina que permitirían dosis elevadas sin los problemas mencionados anteriormente, sería de un gran beneficio. Es, por lo tanto, un objeto de la presente invención proporcionar formas mejoradas de leptina mediante la modificación química específica de un sitio de la proteína.

10 Existen varios métodos de modificación química de proteínas de utilidad terapéutica sobre los que se ha informado. Uno de tales métodos, la succinilación, implica la conjugación de una o más fracciones de succinilo con una proteína biológicamente activa. Las aproximaciones a la succinilación clásicas emplean, tradicionalmente, condiciones de reacción alcalinas con un gran exceso de anhídrido succínico. Los conjugados resultantes de succinilo-proteína se modifican de manera habitual en múltiples sitios, a menudo muestran estructuras terciarias y cuaternarias modificadas, y ocasionalmente se encuentran inactivas. Las propiedades de varias proteínas succiniladas se describen en Holcenberg et al., J. Biol. Chem, 250:4165-4170 (1975), y en WO 88/01511 (y referencias citadas en la misma), publicado el 10 de marzo, 1988. Es importante destacar que ninguna de las citadas referencias describe métodos en donde la proteína biológicamente activa se encuentre monosuccinilada exclusivamente en el N-terminal de la proteína, y en donde la composición resultante muestre una solubilidad mejorada y una toxicidad del sitio de inyección mejorada.

15 El ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido etilendiaminotetraacético (de ahora en adelante denominado como EDTA²), se han utilizado habitualmente para introducir sitios de quelación de metales en proteínas con el propósito de radiomarcado. De manera similar a la succinilación, la modificación con DTPA y/o EDTA² ocurre habitualmente en múltiples sitios por toda la molécula y cambia la carga y el punto isoeléctrico de la proteína modificada. Hasta la fecha, no se ha informado sobre monómeros y dímeros de proteína-EDTA² y/o -DTPA que muestren una solubilidad mejorada y una toxicidad en el sitio de inyección mejorada.

Resumen de la invención

20 La presente invención hace referencia a una preparación que comprende una proteína mono-succinilada en donde las únicas proteínas modificadas son aquellas que tienen un grupo succinilo y al menos un 90% de la preparación se encuentra químicamente modificada, en donde dicha proteína mono-succinilada se encuentra modificada exclusivamente en el N-terminal; en donde la proteína es leptina, o G-CSF, o su análogo G-CSF (C17A). De manera inesperada, la modificación química de un sitio de la leptina, demostró tener ventajas de bioavilidad y biocompatibilidad que no se han visto en otras especies de leptina. Es importante destacar que los métodos descritos en la presente invención se pueden aplicar en general a otras proteínas (o análogos de las mismas), además de a la leptina. Por tanto, tal como se describe a continuación en mayor detalle, la presente invención presenta una cantidad de aspectos en relación a la modificación química de proteínas (o análogos de las mismas), además de a las modificaciones específicas de proteínas específicas.

25 La invención además proporciona un método para la elaboración de una preparación que comprende una proteína monosuccinilada, en donde las únicas proteínas modificadas químicamente son aquellas que presentan un grupo succinilo y al menos un 90% de la preparación se encuentra químicamente modificada, que comprende las etapas de: (a) hacer reaccionar una proteína con un exceso molar de 3- 7 veces de anhídrido succínico para formar una mezcla de reacción; (b) agitar dicha mezcla de reacción 2-16 horas a 4 °C; (c) dializar dicha mezcla de reacción contra 20mM Tris -HCl, a un pH 7,2; y (d) aislar dicha proteína monosuccinilada de dicha mezcla de reacción, en donde dicha proteína monosuccinilada se encuentra modificada exclusivamente en el N-terminal. En el caso en que la proteína es leptina o un análogo de la misma, es importante destacar que el método descrito da como resultado una elevada producción de proteína monosuccinilada que se encuentra modificada exclusivamente en el N-terminal, proporcionando de ese modo ventajas de procesamiento en comparación con otras especies. Y, a pesar de la modesta modificación del N-terminal, la succinil-leptina mono-sustituida mostró de manera inesperada: 1) una mejora sustancial en la solubilidad; 2) la conservación de la estructura secundaria, actividad de unión al receptor *in vitro* y bioeficacia *in vivo*; y 3) mejora de las reacciones graves del sitio de inyección observadas con la administración de altas concentraciones de leptina no modificada.

30 En el caso en que la proteína sea G-CSF o un análogo de la misma, es importante destacar que el succinil-G-CSF y el análogo de succinil-G-CSF mono-sustituido, demostraron de manera inesperada una mejora sustancial en la solubilidad, estabilidad física a 4 °C y 37 °C, y conservación de la bioactividad *in vitro*.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un cromatograma de la separación por cromatografía de intercambio iónico de la leptina succinilada. Se representa gráficamente la absorbancia a 280 nm frente al volumen de elución en mL. El pico de leptina monosuccinilada está marcado con (*).

5 La Figura 2 es un análisis de electroforesis por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida IEF-PAGE (por sus siglas en inglés) en pH 3-7, que representa la leptina no modificada (carril 2), leptina succinilada (carril 3), dímero de leptina modificada con DTPA (carril 4) y dímero de leptina modificada con EDTA² (carril 5). Los carriles 1 y 6 son marcadores de puntos isoelectrónicos.

10 La Figura 3 es un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE (por sus siglas en inglés) al 4-20%, que representa la leptina no modificada (carril 2), leptina succinilada (carril 3), dímero de leptina modificada con DTPA (carril 4) y dímero de leptina modificada con EDTA² (carril 5). Los carriles 1 y 6 son marcadores del peso molecular.

La Figura 4 es un cromatograma de cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC (por sus siglas en inglés) de fase reversa, de digestiones con Lys-C que muestran desfases en el tiempo de retención que son el resultado de las modificaciones químicas del péptido N-terminal (M1-K6) mediante anhídrido succínico.

15 La Figura 5 representa el espectro de dicroísmo circular CD (por sus siglas en inglés) en el UV lejano de la leptina nativa no modificada y la leptina monosuccinilada. Ambas muestras se encuentran en una solución tampón de fosfatos a razón de 0,25 mg/mL a temperatura ambiente.

20 La Figura 6 es un gráfico que representa la unión al receptor *in vitro* de la leptina no modificada (-♦-), la leptina succinilada (-■-), el dímero de leptina-DTPA (-▲-) o el dímero de leptina-EDTA² (-●-), mediante el desplazamiento de la leptina humana radiomarcada del receptor de la leptina humana inmovilizado. Se representa gráficamente la concentración del ligando (ng/mL) frente al % del ligando enlazado.

25 La Figura 7 es un gráfico que representa la pérdida de peso en ratones que habían sido tratados bien con leptina no modificada (-♦-), leptina succinilada (-■-), dímero de leptina-DTPA (-▲-) o monómero de leptina-DTPA (-x-). Se dan dosis diarias de 10 mg/kg a los ratones, administradas a razón de 2 mg/mL en PBS. Se representa de manera gráfica el tiempo (días) frente al % de pérdida de peso.

La Figura 8 es un gráfico que representa la bioactividad *in vitro* del G-CSF no modificado (-♦-) y del G-CSF-succinilado (-■-). Se representa gráficamente los conteos por minuto de fondo o CPM-BGND, frente al logaritmo (ng/pocillo).

30 La Figura 9 es un gráfico que representa los resultados de la prueba de estabilidad física del G-CSF no modificado a 4 °C (-♦-), G-CSF-succinilado a 4 °C (-■-), G-CSF no modificado a 37 °C (-▲-), y G-CSF-succinilado a 37 °C (-●-). Se representa gráficamente la concentración de proteínas (mg/mL) frente al tiempo (horas).

La Figura 10 es un gráfico que representa la bioactividad *in vitro* del G-CSF no modificado (-♦-), el G-CSF (C17A) no modificado (-■-) y el G-CSF-succinilado (C17A) (-▲-). Se representa gráficamente los CPM-BGND frente al logaritmo (ng/pocillo).

35 Las Figuras 2, 3, 6 y 7 contienen información referente a las proteínas modificadas con modificadores alternativos EDTA² y DTPA. Las proteínas modificadas con estos modificadores alternativos no forman parte de la presente invención, pero se incluyen con fines informativos.

Descripción detallada

40 Las preparaciones de la presente invención pueden ser descritas como "sustancialmente homogéneas". La expresión "sustancialmente homogéneas", tal como se utiliza en la presente invención, significa que las únicas proteínas químicamente modificadas observadas son aquellas que presentan un grupo succinilo "modificador".

45 La preparación puede contener proteína sin reaccionar (es decir, que carece de grupo succinilo modificador). Como queda establecido mediante mapeo peptídico y la secuenciación N-terminal, la presente invención proporciona preparaciones que son proteínas modificadas al menos en un 90%, y como máximo proteínas no modificadas en un 10%. De manera preferente, el material modificado químicamente es al menos un 95% de la preparación (al igual que en el ejemplo de trabajo a continuación), y de manera más preferente, el material químicamente modificado es un 99% de la preparación o más. El material modificado químicamente presenta actividad biológica. Las presentes preparaciones de leptina monosuccinilada "sustancialmente homogéneas" proporcionadas en la presente invención, son aquellas que son lo suficientemente homogéneas para mostrar las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, facilidad en la aplicación clínica en la predictibilidad de la farmacocinética de lote a lote.

Tal como se utiliza en la presente invención, los agentes biológicamente activos hacen referencia a proteínas recombinantes o naturales, ya sean humanas o animales, útiles para su aplicación profiláctica, terapéutica o diagnóstica. El agente biológicamente activo puede ser natural, sintético, semi-sintético, o derivados de los mismos. Además, los agentes biológicamente activos de la presente invención pueden ser perceptibles. Se contempla una amplia gama de agentes biológicamente activos. Estos incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citocinas, factores hematopoyéticos, factores de crecimiento, factores antiobesidad, factores adriáticos, factores antiinflamatorios, y enzimas (ver también la Patente estadounidense nº 4.695.463 para ejemplos adicionales de agentes biológicamente activos útiles). Un experto en el arte podrá adaptar fácilmente un agente biológicamente activo deseado a las composiciones de la presente invención.

Tales proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, interferones (ver, las Patentes estadounidenses nº 5.372.808, 5.541.293, 4.897.471, y 4.695.623), interleucinas (ver, la Patente estadounidense nº 5.075.222), eritropoyetinas (ver, las Patentes estadounidenses nº 4.703.008, 5.441.868, 5.618.698, 5.547.933, y 5.621.080), factores estimulantes de colonia de granulocitos (ver, las Patentes estadounidenses nº 4.810.643, 4.999.291, 5.581.476, 5.582.823, y la publicación PCT nº 94/17185,), factor de las células madre (Publicaciones PCT nº 91/05795, 92/17505 y 95/17206,), y leptina (proteína OB) (ver la publicación PCT nº 96/40912, 96/05309, 97/00128, 97/01010 y 97/06816). La publicación PCT nº WO 96/05309, publicada el 22 de Febrero, 1996, titulada "Moduladores del peso corporal, ácidos nucleicos y proteínas correspondientes, y usos diagnósticos y terapéuticos de los mismos", explica al completo la proteína OB y los métodos y composiciones relacionados, y se incorpora en la presente patente a modo de referencia. Una secuencia de aminoácidos para la proteína OB humana se expone en la patente WO 96/05309, Seq. ID Nos. 4 y 6 (en las páginas 172 y 174 de dicha publicación), y el primer residuo de aminoácido de la proteína madura se encuentra en la posición 22 y es un residuo de valina. La proteína madura es de 146 residuos (o 145 si la glutamina en la posición 49 se encuentra ausente, Seq. ID No. 4).

En general, el G-CSF útil en la práctica de la presente invención, puede ser una forma aislada a partir de organismos mamíferos o, de manera alternativa, un producto de procedimientos sintéticos químicos o de la expresión del hospedador eucariota o procariota de secuencias de ADN exógeno, obtenido mediante clonación genómica o de ADNc o mediante síntesis de ADN. Hospedadores procariotas adecuados incluyen varias bacterias (por ejemplo, E. coli); hospedadores eucariotas adecuados incluyen levadura (por ejemplo, S.cerevisiae) y células de mamíferos (por ejemplo, células de ovario de hámster chino, células de mono). Dependiendo del hospedador empleado, el producto de expresión de G-CSF puede estar glicosilado con carbohidratos de mamíferos u otros carbohidratos eucariotas, o puede estar no glicosilado. El producto de expresión puede también incluir un residuo de aminoácido inicial de metionina (en la posición -1). La presente invención contempla el uso de cualquiera y de todas esas formas de G-CSF, aunque resulta preferente el G-CSF recombinante, en especial el derivado de la E. coli, entre otras cosas, por su mayor viabilidad comercial.

Se ha informado de que ciertos análogos de G-CSF son biológicamente funcionales, y estos pueden también ser modificados químicamente. Se presentan análogos de G-CSF en la Patente estadounidense nº 4.810.643. Ejemplos de otros análogos de G-CSF, sobre los que se ha informado que presentan actividad biológica, son aquellos expuestos en AU-A-76380/91, EP 0 459 630, EP 0 272 703, EP 0 473 268 y EP 0 335 423, aunque no se realiza ninguna descripción en referencia a la actividad de cada análogo revelado según se publica. Ver también AU-A-10948/92, PCT US94/00913 y EP 0 243 153. En general, los G-CSF y análogos de los mismos útiles en la presente invención, pueden determinarse practicando los procedimientos de modificación química tal como se proporcionan en la presente invención, y sometiendo a ensayo el producto resultante para la característica biológica deseada, tal como por ejemplo los ensayos de actividad biológica proporcionados en la presente patente. Por supuesto, si se desea, cuando se tratan mamíferos no humanos, pueden utilizarse G-CSF recombinantes no humanos, tales como recombinante murino, bovino, canino, etc. Ver el documento PCT WO 9105798 y PCT WO 8910932, por ejemplo.

Adicionalmente, los agentes biológicamente activos pueden también incluir, pero no estar limitados a, insulina, gastrina, prolactina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), gonadotropina coriónica humana (HCG), motilina, interferones (alfa, beta, gamma), interleucinas (IL-1 a IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF), proteína de unión al factor de necrosis tumoral (TNF-bp), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor neurotrófico 3 (NT3), factores del crecimiento de fibroblastos (FGF), factor del crecimiento neurotrófico (NGF), factores del crecimiento óseo tales como la osteopogénesis (OPG), factores del crecimiento similares a la insulina (IGF), factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor del crecimiento derivado de macacariocitos (MGDF), factor del crecimiento de queratinocitos (KGF), trombopoyetina, factor del crecimiento derivado de plaquetas (PGDF), factores del crecimiento estimulantes de colonias (CSF), proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa (SOD), activador tisular del plasminógeno (TPA), uroquinasa, estreptoquinasa y caliceína. El término proteínas, tal como se utiliza en la presente patente, incluye péptidos, polipéptidos, moléculas consenso, y análogos, derivados y combinaciones de los mismos.

En general, abarcadas por la presente invención se encuentran composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades efectivas de proteína modificada químicamente, o productos derivados, junto con diluyentes

5 farmacéuticamente aceptables, conservantes, solubilizadores, emulsificadores, adyuvantes y/o soportes que se necesitan para su administración. (Ver PCT 97/01331). La formulación óptica para un agente biológicamente activo será determinada por un experto en el arte, dependiendo de la vía de administración y la dosis deseada. Composiciones farmacéuticas a modo de ejemplo se revelan en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., 18th Ed., Easton, PA, pgs. 1435-1712 (1990)). Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas mediante preparaciones por vía oral y no oral (*por ejemplo*, mediante preparaciones por vía intramuscular, subcutánea, transdérmica, visceral, IV (intravenosa), IP (intraperitoneal), intraarticular, aplicación en el oído, ICV (intracerebroventricular), IP (intraperitoneal), intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, inyectable, pulmonar, nasal, rectal, y transmucosa uterina).

10 Los usos terapéuticos de las composiciones de la presente invención, dependen del agente biológicamente activo utilizado. Un experto en el arte podrá adaptar fácilmente un agente biológicamente activo a la presente invención para los usos terapéuticos a los que se destina. Los usos terapéuticos para tales agentes se exponen en mayor detalle en las siguientes publicaciones, incorporadas en el presente documento a modo de referencia incluyendo los dibujos. Los usos terapéuticos incluyen usos para proteínas como interferones (ver las Patentes estadounidenses nº 5.372.808, 5.541.293 incluyendo los dibujos), interleucinas (ver la Patente estadounidense nº 5.075.222), eritropoyetinas (ver las patentes estadounidenses nº 4.703.008, 5.441.868, 5.618.698, 5.547.933, y 5.621.080), factores estimulantes de colonias de granulocitos (ver las Patentes estadounidenses nº 4.999.291, 5.581.476, 5.582.823, 4.810.643 y la publicación PCT nº. 94/17185), factor de las células madre (las publicaciones PCT nº 91/05795, 92/17505 y 95/17206), y la proteína OB (ver publicaciones PCT nº 96/40912, 96/05309, 97/00128, 97/01010 y 97/06816). Además, las presentes composiciones pueden también ser utilizadas para la elaboración de uno o más medicamentos para el tratamiento o la mejora de las condiciones que el agente biológicamente activo está destinado a tratar.

25 El principal modo de realización del método para elaborar las preparaciones de proteína monosuccinilada, en donde la únicas proteínas modificadas químicamente son aquellas que presentan un grupo succinilo, comprende: (a) hacer reaccionar una proteína con un exceso molar de 3- 7 veces de anhídrido succínico; (b) agitar la mezcla de reacción 2-16 horas a 4 °C; (c) dializar dicha mezcla contra 20mM Tris -HCl, a un pH 7,2; y (d) aislar dicha proteína monosuccinilada de dicha mezcla de reacción, en donde dicha proteína monosuccinilada se encuentra modificada exclusivamente en el N-terminal. De manera opcional, el método puede comprender, justo después de la etapa (b), las etapas de: añadir hidroxilamina sólida a dicha mezcla, mientras se mantiene el pH por encima de 6,5 hasta que dicha hidroxilamina se disuelva por completo, seguido de elevar el pH a 8,5 utilizando 5N NaOH, seguido de agitar dicha mezcla 1 -2 horas más a 4 °C. El proceso en general se muestra de manera esquemática en el Ejemplo 1.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar más completamente la invención. El Ejemplo 1 describe la preparación de la leptina monosuccinilada.

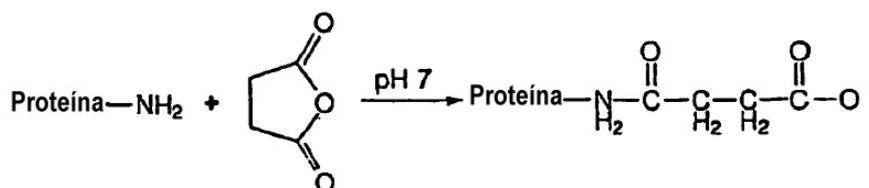
35 El Ejemplo 2 describe la caracterización fisicoquímica de la especie de leptina modificada preparada en el Ejemplo 1. El Ejemplo 3 describe los estudios de unión al receptor realizados sobre la especie de leptina modificada preparada en el Ejemplo 1. El Ejemplo 4 describe la prueba de solubilidad realizada sobre la especie de leptina modificada preparada en el Ejemplo 1. El Ejemplo 5 describe los estudios de bioactividad *in vivo* realizados sobre la especie de leptina modificada preparada en el Ejemplo 1. El Ejemplo 6 describe el ensayo del sitio de inyección realizado sobre la especie de leptina modificada preparada en el Ejemplo 1. El Ejemplo 7 describe la preparación del análogo del G-CSF monosuccinilado y del G-CSF monosuccinilado (C17A) y a continuación describe los resultados del ensayo de bioactividad *in vitro*, de la prueba de ensayo de solubilidad, y del ensayo de estabilidad física para las preparaciones.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la preparación de leptina monosuccinilada.

Leptina monosuccinilada

45 El método de succinilación de proteínas de la presente invención puede representarse en general como sigue a continuación:



La proteína metionil-leptina humana recombinante (rhu-met-leptina) (preparada tal como se describe en el apartado Materiales y Métodos, *más abajo*) a 2-3 mg/mL en 20mM de NaHPO₄, pH 7.0, se hizo reaccionar con un exceso molar de 3-7 veces de anhídrido succínico sólido (Sigma Chemical, St. Louis, MO) siendo preferente un exceso molar de 5 veces, y la reacción se agitó 2-16 horas a 4 °C. La hidroxilamina sólida (Sigma Chemical, St. Louis, MO) se añade entonces a la reacción, mientras se mantiene el pH por encima de 6,5. Después de que la hidroxilamina se haya disuelto por completo el pH se eleva a 8,5 utilizando 5N de NaOH, y se deja agitar la reacción 1-2 horas más a 4 °C (la etapa de la hidroxilamina puede omitirse con una pequeña disminución en la producción). Finalmente, la reacción se dializa contra 20mM Tris-HCl, pH 7.2.

La rhu-met-leptina se aísla mediante cromatografía de intercambio aniónico con una columna en Q-sefarosa de alto rendimiento (Pharmacia, Piscataway, NJ) en 20mM Tris, pH 7.2, con un gradiente de 0 – 0,5M de NaCl (ver la Figura 1). El producto se reconoce en el eluyente mediante un desplazamiento isoeléctrico de -0,7 unidades en el pI (punto isoeléctrico) observadas con electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE por isoelectroenfoque (IEF), utilizando una poliacrilamida al 5%, pH 3-7 (Novex, Inc., San Diego CA) (Figura 2). La recuperación final de la rhu-met-leptina es habitualmente del 45-47%.

15 Ejemplo 2

Este ejemplo describe la caracterización fisoquímica de los conjugados de leptina preparados en el Ejemplo 1. La modificación de la succinil-leptina se evaluó mediante una combinación de mapeo peptídico de las digestiones con Lys-C en HPLC de fase reversa, espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación de péptidos.

Las digestiones con Lys-C de la leptina no modificada y las diferentes leptinas modificadas, se realizaron mediante reacción de 100 µg de proteína con 4 µg de endoproteinasa Lys-C (Boehringer Mannheim), en 50mM de Tris-HCl, pH 8,5 (200 µl) durante cuatro horas a temperatura ambiente. Los mapas peptídicos de las diferentes muestras se generaron mediante HPLC de fase reversa en una columna de 4,6 x 250 mm, 5 µ C4 (VydaK, Hesperia, CA), equilibrada en 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) con elución sobre un gradiente de 0-90% de acetonitrilo (ver Figura 4). Como queda evidenciado por los gráficos representados en la Figura 4, únicamente el péptido N-terminal (M1-K6) muestra cualquier cambio en el tiempo de retención como resultado de la modificación química. Este resultado indica que la lisina en la posición 6 se encuentra no modificada y es accesible a la digestión con Lys-C, y sugiere que la modificación química ocurre en la α-amino del N-terminal. La modificación del N-terminal es además apoyada por los esfuerzos en la secuenciación N-terminal, los cuales indican que el N-terminal se encuentra bloqueado (datos no mostrados).

Las determinaciones de masa para la succinil-leptina se realizaron en un espectrómetro Kompact Maldi IV (Kratos, Ramsey, NJ), utilizando una muestra de 12 pmol en una matriz de ácido sinapínico. Cada conjugado indica una única modificación química por molécula.

Tabla 1

Conjugado	Masa esperada (Da)	Masa del conector (Da)	Masa medida (Da)
Leptina no modificada	16.157	0	16.156
Succinil-leptina	16.258	101	16.254

Además del análisis anterior, se evaluaron los efectos sobre la estructura secundaria de la succinil-leptina utilizando espectroscopia de dicroísmo circular. Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la leptina no modificada y succinilada en una solución tampón de fosfatos se recogieron utilizando una célula de 0,05 cm en un espectrómetro de dicroísmo circular Jasco J-710 ((Jasco, Tokyo, Japan). Los espectros se representan en la Figura 5 y demuestran que la estructura secundaria de la leptina succinilada se conserva.

En resumen, los datos del Ejemplo 2 confirman la modificación de la succinil-leptina, además de la conservación de la estructura secundaria con succinil-leptina.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe los estudios de unión al receptor realizados sobre los conjugados de leptina preparados en el Ejemplo 1. Los conjugados de leptina preparados en el Ejemplo 1 fueron sometidos a prueba utilizando un ensayo *in vitro* de unión al receptor, el cual mide la afinidad relativa de los conjugados de leptina en base a su habilidad para desplazar la leptina humana radiomarcada de un receptor de leptina humana expresada en membranas celulares inmovilizadas. Como queda evidenciado por los datos de la Figura 6, la isoforma modificada químicamente, succinil-

leptina, mostró afinidades relativas para el receptor de leptina humana iguales que la leptina no modificada, sobre el rango completo de la unión a ligando (~1-100 ng/mL), con un ED₅₀ de aproximadamente 10 ng/mL.

Los datos del Ejemplo 3 muestran, por tanto, que la succinil-leptina mono-sustituida demuestra la conservación de la actividad de unión al receptor *in vitro* en comparación con la leptina no modificada.

5 Ejemplo 4

Este ejemplo describe la prueba de solubilidad realizada sobre los conjugados de leptina preparados en el Ejemplo 1. Los conjugados de leptina se dializaron en PBS, a continuación se concentraron con concentradores CentriPrep, 10kDa de peso molecular de corte (Amicon) hasta el punto en que se observaron precipitados. La muestra se clarificó mediante centrifugación y se determinó la proteína conjugada en el sobrenadante. Las muestras se mantuvieron, a continuación, a temperatura ambiente (≈22 °C) durante 48 horas, y se centrifugaron en puntos de tiempo regulares, y se re-determinó la concentración de proteína conjugada en el sobrenadante. La solubilidad de la proteína conjugada en PBS se define, de este modo, como la concentración de proteínas en estado estable a temperatura ambiente observada en el sobrenadante después de la centrifugación (ver la Tabla 2).

Tabla 2

Muestra	Solubilidad máxima en PBS (mg/ml)
Leptina no modificada	3,2
Succinil-leptina	8,4

Los datos de la Tabla 2 muestran que la succinil-leptina mono-sustituida ha mejorado sustancialmente la solubilidad en comparación con la leptina no modificada.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe los estudios de bioactividad *in vivo* realizados sobre los conjugados de leptina preparados en el Ejemplo 1. Los conjugados de leptina descritos se probaron en modelos animales de ratón y de perro para determinar la bioeficacia en relación a la leptina no modificada. Se inyectó a los ratones diariamente durante 5-7 días con succinil-leptina mono-sustituida en dosis de 1, 10 y 50 mg/kg de peso corporal. La bioeficacia se midió como un porcentaje de pérdida de peso desde el día 0, normalizado sólo con respecto al control del vehículo y en comparación con la pérdida de peso observada con la proteína no modificada. Todas las muestras para las dosis de 1 a 10 mg/kg se formularon en PBS a 0,2 y 2,0 mg/ml respectivamente. Se formularon dosis más elevadas en PBS a 20-50 mg/ml para las formas modificadas químicamente, sin embargo los límites de solubilidad de la leptina no modificada necesitaron su formulación a altas concentraciones en un tampón de acetato de pH 4. Además, se inyectó a los perros con dosis diarias de 0,05, 0,15 y 0,5 mg/kg de succinil-leptina a 5 mg/ml durante 28 días, mientras se monitorizaba la pérdida de peso seguido de un periodo de recuperación.

La bioactividad, tal como se juzga por la pérdida de peso inducida por fármacos en modelos animales, para la succinil-leptina, fue equivalente a la de la leptina no modificada tanto en perros como en ratones (Figura 7).

Los datos de la Figura 7 muestran que la succinil-leptina mono-sustituida demuestra la conservación de la bioeficacia *in vitro* en comparación con la leptina no modificada.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe la evaluación del sitio de inyección realizada sobre los conjugados de leptina preparados en el Ejemplo 1. Se examinaron de manera histoquímica secciones de tejido de los sitios de inyección de tres ratones provenientes de cada grupo de dosificación. Las patologías del sitio de inyección que se identificaron y se valoraron fueron la necrosis, patología supurativa (infiltrado celular mixto compuesto de eosinófilos y neutrófilos), células mononucleares (macrófagos), precipitados de leptina (caracterizados bien como precipitados finos o como grandes depósitos/agregados) y células gigantes. Cada reacción fue valorada utilizando el siguiente sistema de clasificación:

0,5 – 1 cambio mínimo

1,5 – 2 cambio suave

2,5 – 3 cambio moderado

3,5 – 4 cambio marcado

4,5 – 5 cambio grande

La suma media de los valores para cada animal se utilizó para definir un valor de biocompatibilidad total utilizando la siguiente clave de valoración:

- 5 0 - 2 Normal
- 3 - 5 Mínimo
- 6 - 10 Suave
- 11 - 20 Moderado
- 21 - 30 Marcado
- 10 >30 Grave

Aunque las elevadas concentraciones de succinil-leptina resultaron ligeramente solubles en PBS a pH 7,0, para los propósitos del ensayo del sitio de inyección, las muestras de succinil-leptina a 20 mg/ml permanecieron solubles en PBS a un pH 7,2 y a 50 mg/ml en PBS a pH 7,5. La tabla 3 muestra la evaluación del sitio de inyección comparando la leptina no modificada a 50 mg/mL administrada en un tampón de acetato con pH 4,0, frente a la succinil-leptina mono-sustituida a 50 mg/mL en PBS con pH 7,5, después de 7 días.

Tabla 3

Tratamiento	Dosis mg/kg	Volumen mL	Necr.	Supur.	Finos Mono.	Grandes Precip	Depósitos Gigantes	Células
Tampón de Acetato	0	20	0	0,5	1	0	0	1
	0	20	0	0	0,5	0	0	0
	0	20	0	0,5	1	0	0	0
Leptina no modificada	50	20	0	3	2	1	4	1
	50	20	0	2,5	2	1	4	2,5
	50	20	0	1,5	2	0	1,5	1
Tampón PBS	0	20	0	0,5	0,5	0	0	0
	0	20	0	0,5	0,5	0	0	0
	0	20	0	0	0	0	0	0
Succinil-leptina	50	20	0	1	1,5	0	0	0
	50	20	0	2	1	0	0,5	0,5
	50	20	0	1,5	0,5	0	0	0

Tal como se ha representado en la Tabla 3, la succinil-leptina mono-sustituida, en dosis de concentración elevada, mostró una mejora en cada categoría de la patología en el sitio de inyección en relación con la leptina no modificada, con la mejora más espectacular observada con la casi completa eliminación de los precipitados de leptina y las células gigantes en los sitios de inyección.

La Tabla 4 muestra la evaluación del sitio de inyección comparando la leptina no modificada administrada a 43 mg/mL en un tampón de acetato con un pH 4,0, frente a la succinil-leptina mono-sustituida a 43 mg/mL en un tampón de acetato con pH 4,0, después de 7 días.

Tabla 4

Tratamiento	Dosis mg/kg	Volumen mL	Necr.	Supur.	Mono.	Biocomp. Precip	Valor	Reacción
Tampón de Acetato	0	20	0	1	1	0	2	normal
	0	20	0	0	0	0	2	normal
	0	20	0	0	0,5	0	2	normal
Leptina no modificada	43	20	2	4	3	3,5	27	marcada
	43	20	1	3	3	2,5	27	marcada
	43	20	1,5	3,5	2,5	3	27	marcada
Succinil-leptina	43	20	0,5	2	1,5	0,5	10	suave
	43	20	0,5	1,5	1,5	0	10	suave
	43	20	0	1	1	0	10	suave

Los datos de la Tabla 4 muestran que, de manera sorprendente, también se observó que las concentraciones elevadas de succinil-leptina mono-sustituida podrían ser administradas en un tampón de acetato con pH 4, y aún mostrar las mejoras espectaculares en las reacciones en el sitio de inyección observadas cuando se administró succinil-leptina non-sustituida en PBS.

En resumen, los datos del Ejemplo 6 muestran que la succinil-leptina mono-sustituida no precipita en el sitio de inyección cuando se dosifica en concentraciones elevadas, y lo más importante, muestra una mejora sustancial en las reacciones adversas en el sitio de inyección observadas con la leptina no modificada.

10 Ejemplo 7

Este ejemplo describe la preparación del G-CSF monosuccinilado y del análogo de G-CSF monosuccinilado (C17A), y a continuación describe los resultados del ensayo de bioactividad *in vitro*, de la prueba de ensayo de solubilidad y del ensayo de estabilidad física para las preparaciones de G-CSF.

La proteína metionil-G-CSF humana recombinante (rhu-met-G-CSF) y su análogo G-CSF (C17A) (preparado tal como se describe en el apartado Materiales y Métodos, *más abajo*), a 2-3 mg/mL en 20mM de NaHPO₄, pH 7,0, se hizo reaccionar con un exceso molar de 3-7 veces de anhídrido succínico en (Sigma Chemical, St. Louis, MO), siendo preferente un exceso molar de 5 veces, y la reacción se agitó 2-16 horas a 4 °C. La hidroxilamina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) se añade entonces a la reacción, mientras se mantiene el pH por encima de 6,5. Después de que la hidroxilamina se haya disuelto por completo, el pH se eleva a 8,5 utilizando 5N de NaOH y la reacción se deja agitar 1- 2 horas más a 4 °C (la etapa de la hidroxilamina puede omitirse con una pequeña disminución en la producción). Finalmente, la reacción se dializa contra 20mM de Tris-HCl, pH 7,2.

La rhu-met-G-CSF monosuccinilada (y su análogo) se aísla mediante cromatografía de intercambio aniónico con una columna en Q-sefarosa de alto rendimiento (Pharmacia, Piscataway, NJ) en 20mM de Tris, pH 7,2, con un gradiente de 0-0,5M de NaCl. El producto se reconoce en el eluyente mediante un desplazamiento isoeléctrico de -0,7 unidades en el pI, observadas con electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE por isoelectroenfoque (IEF), utilizando una poliacrilamida al 5%, pH 3-7 (Novex, Inc., San Diego CA). La recuperación final de la rhu-met-G-CSF (y su análogo) es habitualmente del 45-47%.

Se sometieron a ensayo muestras de G-CSF no modificado y de rhu-met-G-CSF en un bioensayo *in vitro* en el que la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas de murino dependiente de G-CSF, se mide en función de la captación de timidina radiomarcada y la concentración de G-CSF. Se demuestra la completa conservación de la bioactividad (ver las Figuras 8 y 10).

La solubilidad de las isoformas succiniladas se comparó con la rhu-met-G-CSF no modificada y con el análogo de rhu-met-G-CSF. Las muestras de G-CSF se dializaron en PBS y luego se concentraron con concentradores CentriPrep, 10kDa de peso molecular de corte (Amicon) hasta el punto en que se observaron precipitados. La muestra se clarificó mediante centrifugación y se determinó la proteína conjugada en el sobrenadante. Las muestras se mantuvieron, a continuación, a 37 °C durante 22 horas, y se centrifugaron en puntos de tiempo regulares, y se re-determinó la concentración de proteína conjugada en el sobrenadante. La solubilidad de la proteína conjugada en

PBS se define, de este modo, como la concentración de proteínas en estado estable a temperatura ambiente observada en el sobrenadante después de la centrifugación (ver la Tabla 5).

Tabla 5

Muestra	Solubilidad máxima en PBS (mg/ml)
G-CSF no modificado	0,7
Succinil-G-CSF	8,2
G-CSF (C17A) no modificado	13,8
Succinil-G-CSF (C17A)	19,2

5 La estabilidad física del G-CSF y del G-CSF (C17A) no modificados y succinilados, se comparó mediante la concentración de las muestras a 5-6 mg/mL en PBS, y manteniendo la muestras a 4 °C y a 37 °C. La cantidad de proteína que permanece en la solución, se determinó midiendo la concentración de manera espectrofotométrica después de centrifugar las muestras. La estabilidad física (a 4 °C y a 37 °C) del G-CSF succinilado se mejora sustancialmente en relación con el G-CSF no modificado (ver la Figura 9).

10 Materiales y Métodos

1. Preparación de la proteína metionil-leptina humana

15 La presente metionil-leptina humana recombinante (rhu-met-leptina) puede prepararse de acuerdo a la publicación PCT mencionada anteriormente WO 96/05309, en las páginas 151-159. Para los presentes ejemplos de trabajo, se utilizó una rhu-met-leptina que presenta (en comparación con la secuencia de aminoácidos de la página 158) una lisina en la posición 35 en lugar de una arginina, y una isoleucina en la posición 74 en lugar de una isoleucina. Otras proteínas leptina humana recombinante pueden prepararse de acuerdo a los métodos conocidos, en general, en el arte de la expresión de proteínas que utilizan la tecnología de ADN recombinante.

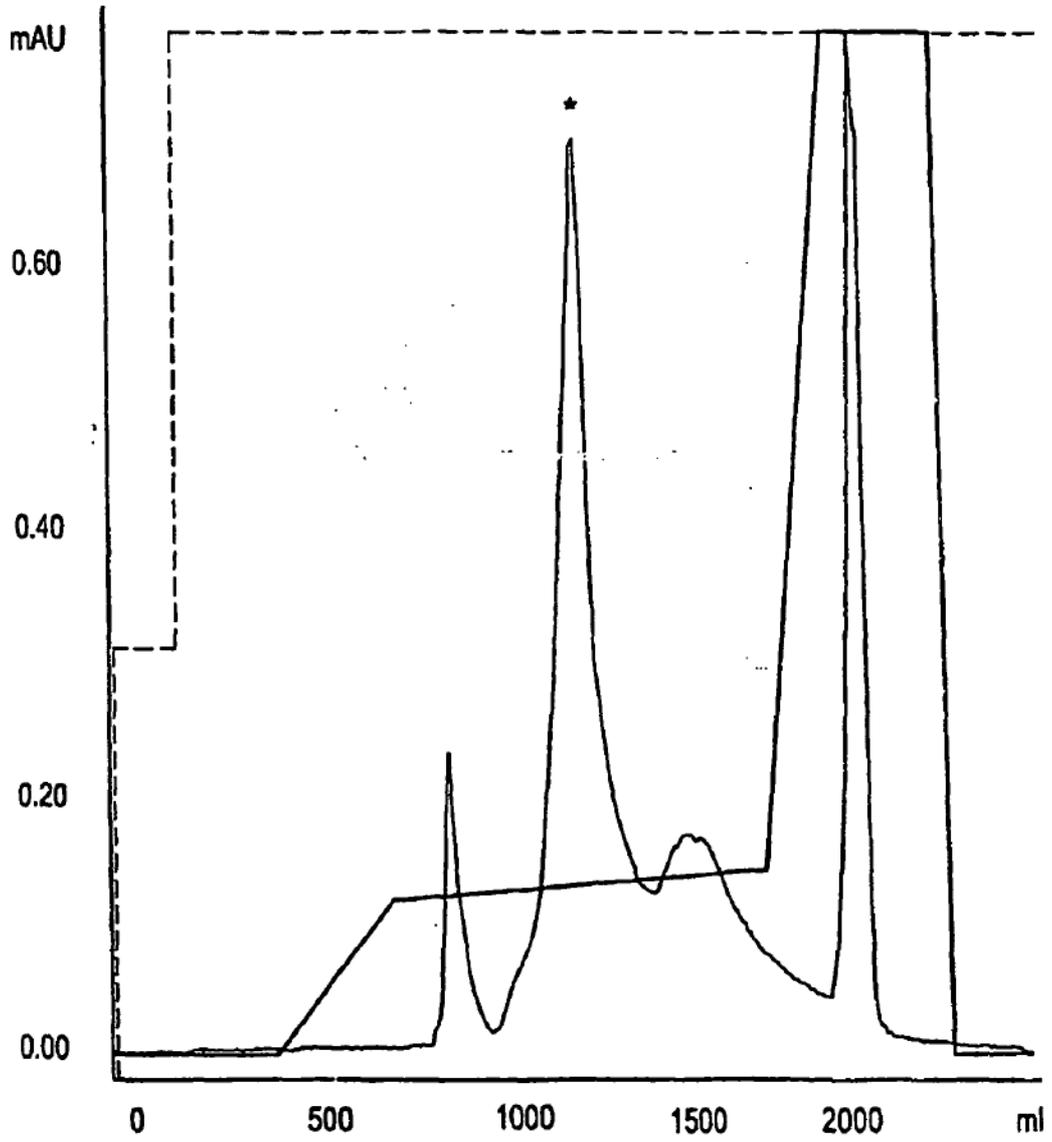
2. Preparación de la proteína metionil-G-CSF humana recombinante y su análogo G-CSF (C17A)

20 La presente metionil-leptina humana recombinante (rhu-met-G-CSF), puede prepararse de acuerdo a la publicación PCT mencionada anteriormente WO 94/17185. Para los presentes ejemplos de trabajo, un análogo de rhu-met-G-CSF, G-CSF (C17A), también se utilizó, el cual presenta una alanina en la posición 35 en lugar de una cisteína. Otras proteínas G-CSF humanas recombinantes pueden ser preparadas de acuerdo con los métodos conocidos en general en el arte de la expresión de proteínas que utilizan la tecnología de ADN recombinante.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación que comprende una proteína mono-succinilada en donde las únicas proteínas modificadas químicamente son aquellas que presentan un grupo succinilo y al menos un 90% de la preparación se encuentra modificada químicamente, en donde dicha proteína mono-succinilada se modifica exclusivamente en el N-terminal; en donde la proteína es leptina, G-CSF, o el análogo G-CSF (C17A).
2. La preparación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos el 95% de la preparación se encuentra modificada químicamente.
3. La preparación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos el 99% de la preparación se encuentra modificada químicamente.
- 10 4. La preparación de acuerdo a la reivindicación 1, en donde dicha proteína es leptina.
5. La preparación de acuerdo a la reivindicación 1, en donde dicha proteína es G-CSF, o el análogo G-CSF (C17A).
6. Un método para la realización de una preparación que comprende una proteína monosuccinilada, en donde las únicas proteínas modificadas químicamente son aquellas que presentan un grupo succinilo y al menos un 90% de la preparación se encuentra modificada químicamente, que comprende las etapas de:
- 15 (a) hacer reaccionar una proteína con anhídrido succínico en un exceso molar de 3-7 veces para formar una mezcla de reacción;
- (b) agitar dicha mezcla de reacción 2-16 horas a 4 °C;
- (c) dializar dicha mezcla de reacción contra 20mM de Tris-HCl, pH 7,2; y
- (d) aislar dicha proteína monosuccinilada de la mezcla de reacción,
- 20 en donde dicha proteína monosuccinilada se encuentra modificada exclusivamente en el N-terminal.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende tras la etapa (b), las etapas de:
- (1) elevar el pH de dicha mezcla de reacción a 8,5 utilizando 5N NaOH; y
- (2) agitar dicha mezcla de reacción 1-2 horas más a 4 °C.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende tras la etapa (b) las etapas de:
- 25 (1) añadir hidroxilamina sólida a dicha mezcla de reacción mientras se mantiene el pH por encima de 6,5, hasta que dicha hidroxilamina se disuelve por completo;
- (2) elevar el pH a 8,5 utilizando 5N NaOH;
- (3) agitar dicha mezcla 1-2 horas más a 4 °C;
- (4) elevar el pH de dicha mezcla de reacción a 8,5 utilizando 5N NaOH; y
- 30 (5) agitar dicha mezcla de reacción 1-2 horas más a 4 °C.
9. Una composición farmacéutica que comprende una proteína monosuccinilada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha proteína es leptina.
- 35 11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha proteína es G-CSF, o el análogo G-CSF (C17A).

FIG.1



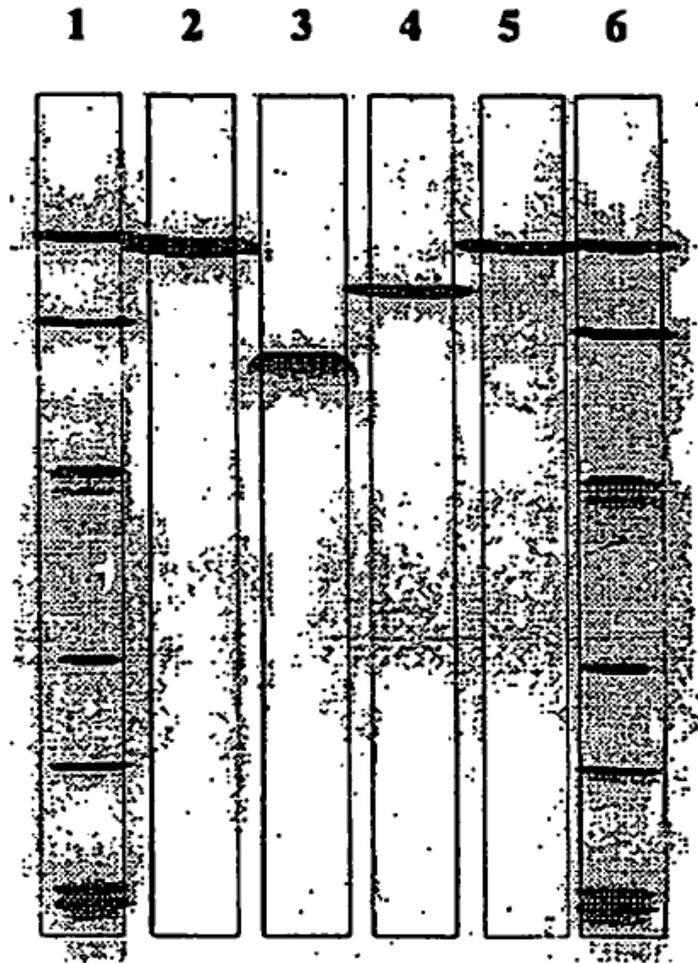


FIG.2

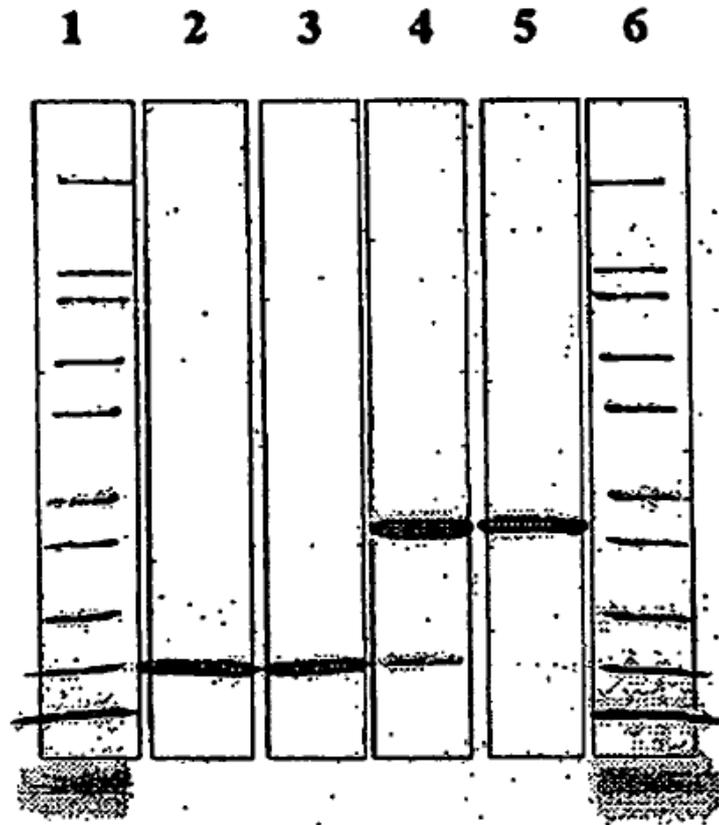


FIG.3

FIG.4

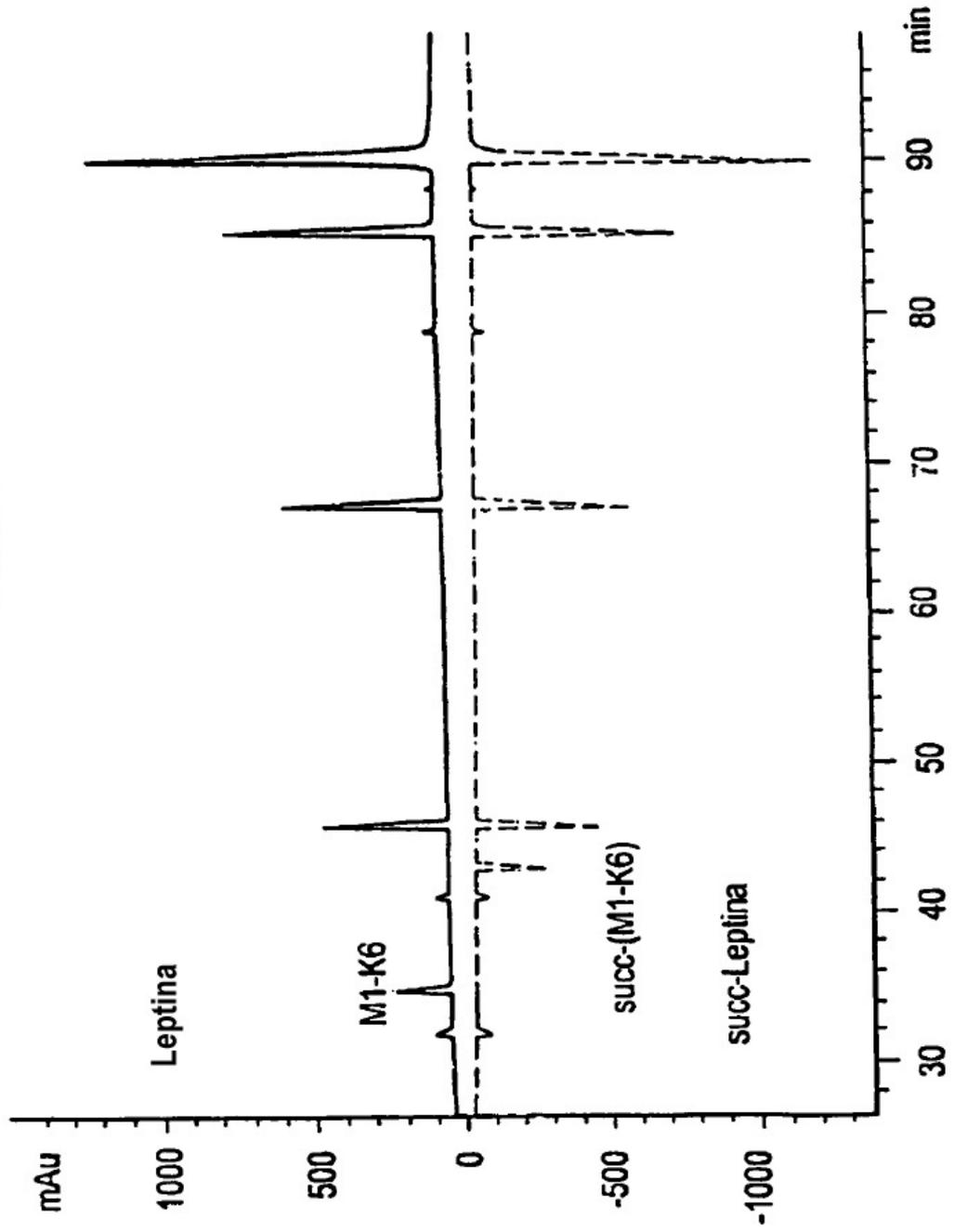
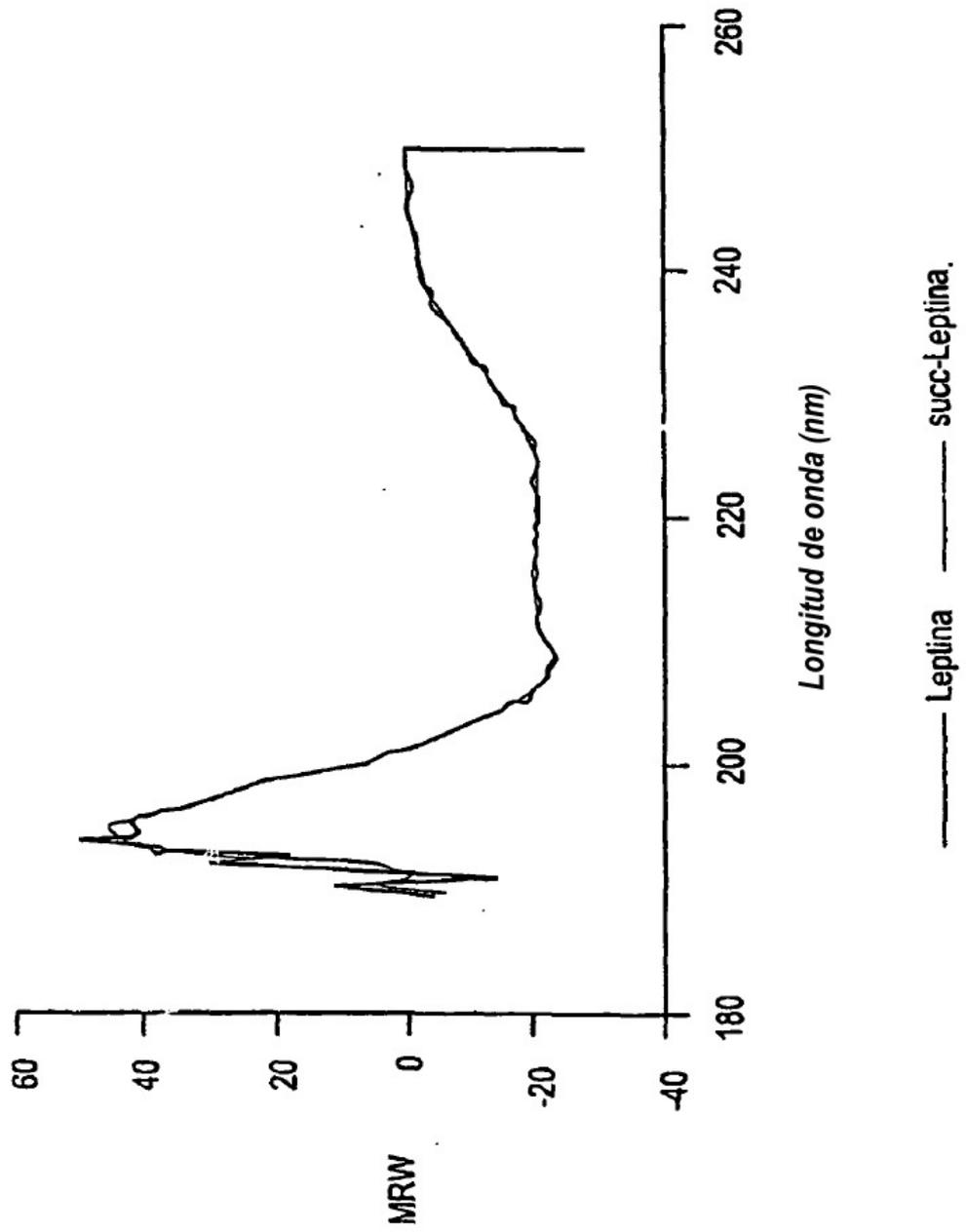


FIG.5



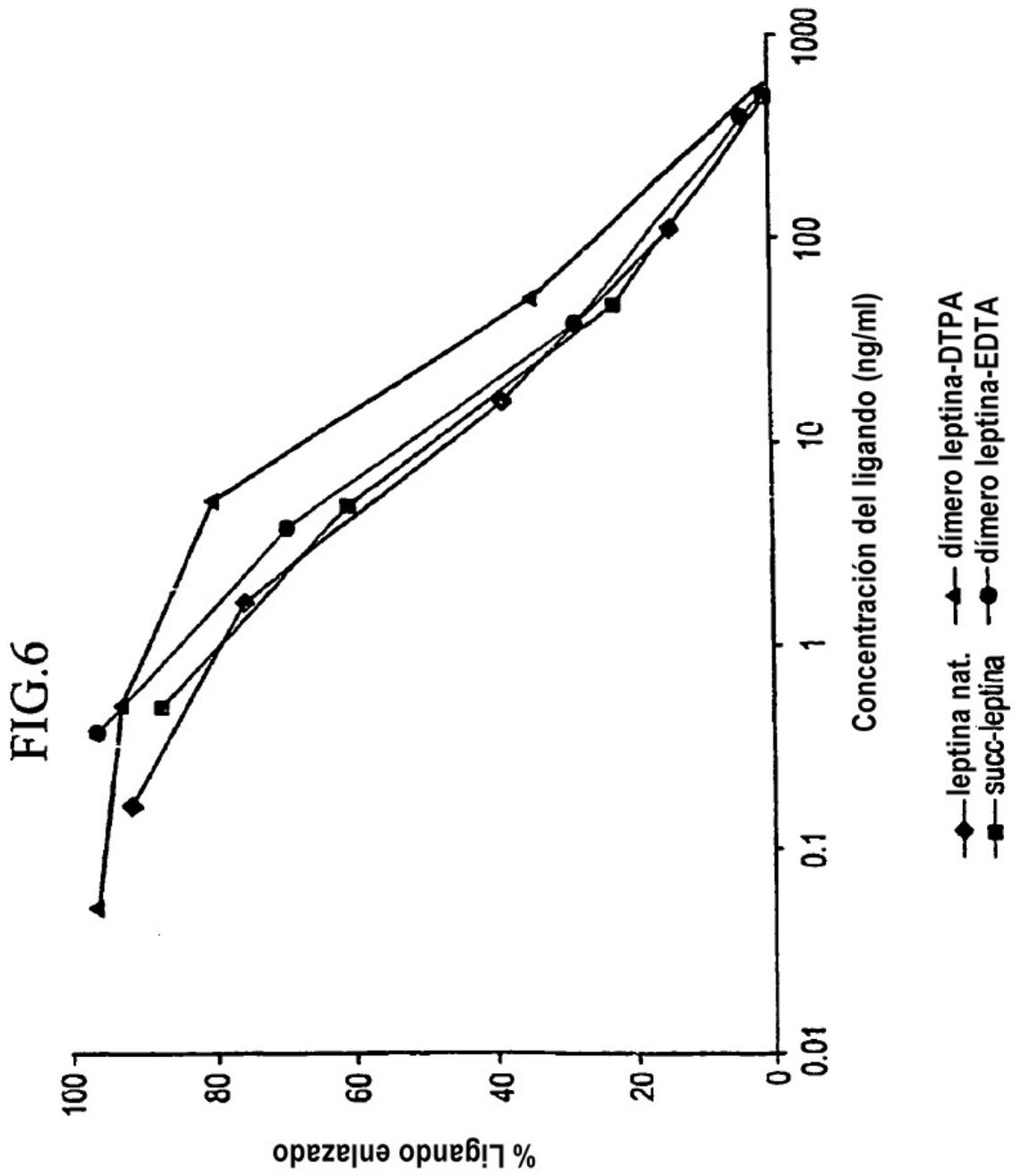


FIG.7

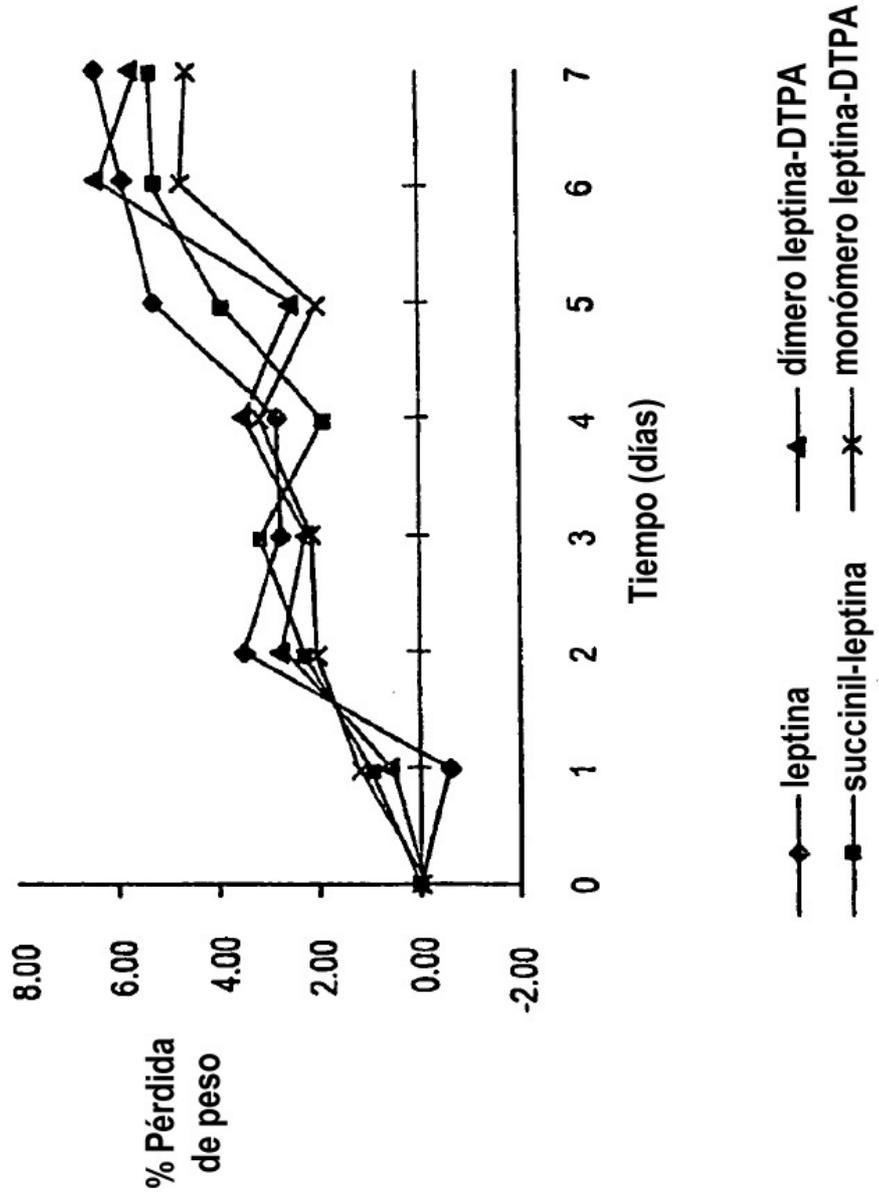


FIG.8

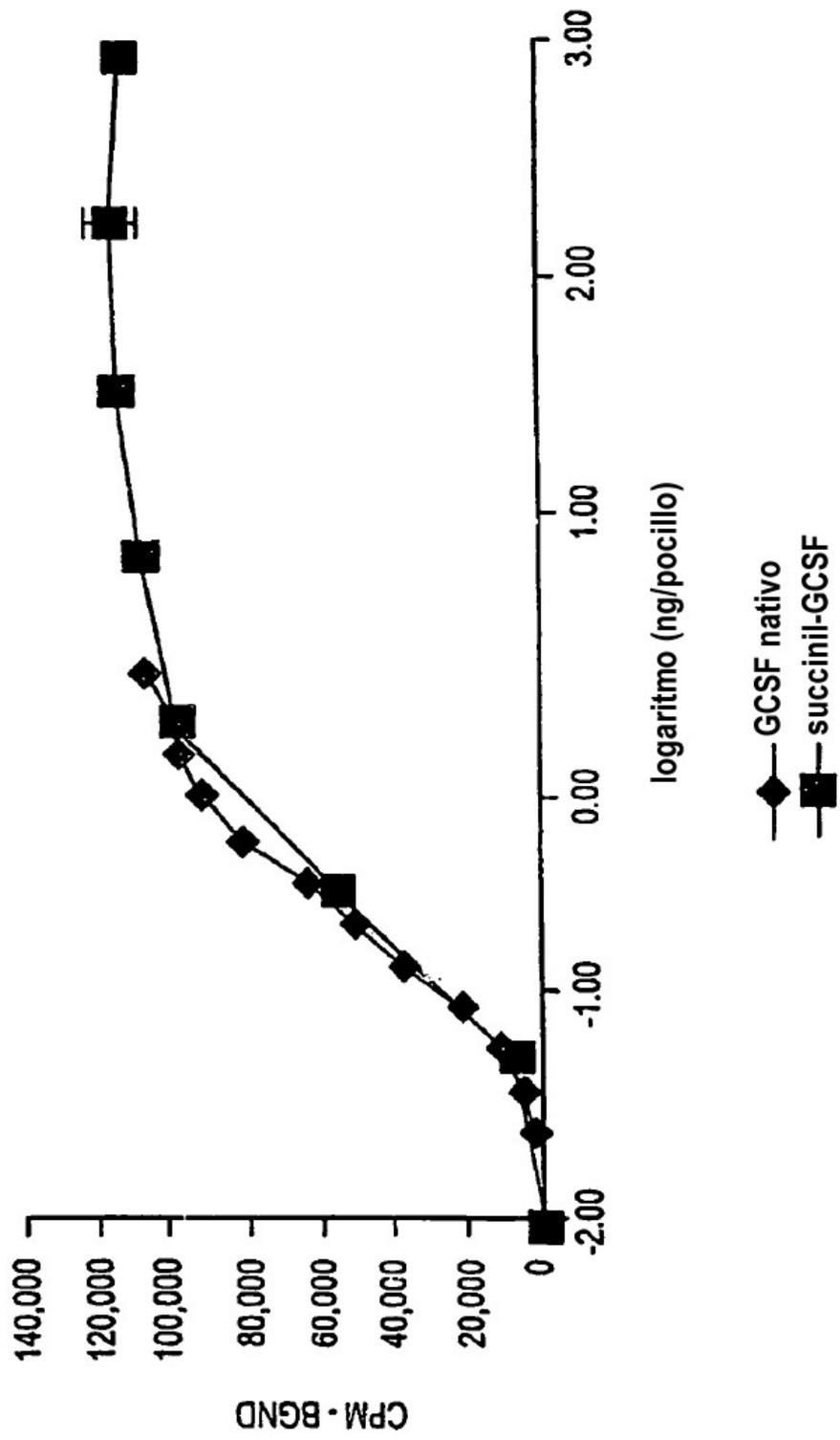


FIG.9

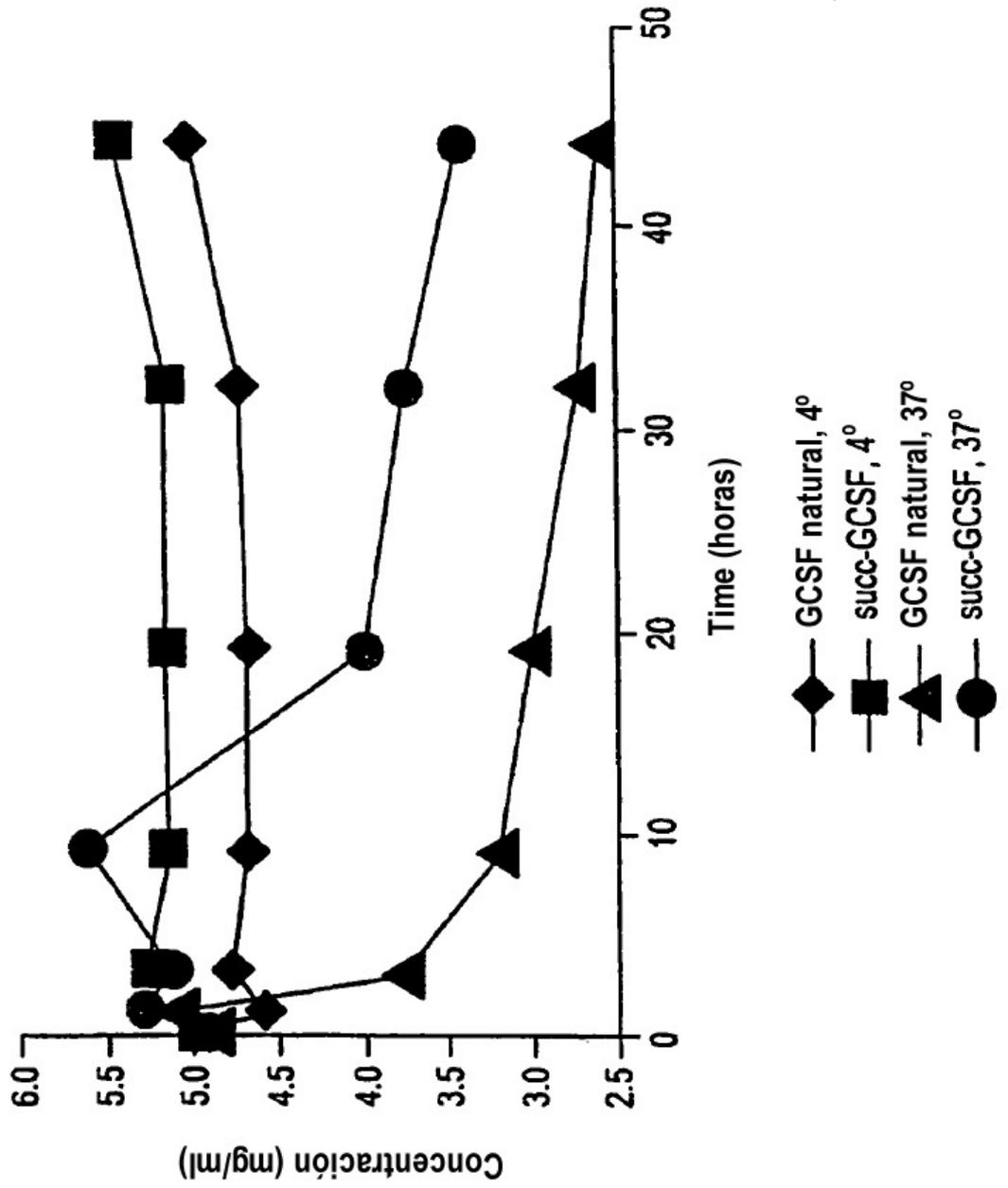


FIG.10

