

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 576**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2007 PCT/KR2007/002825**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2007 WO07145457**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2007 E 07746877 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2026842**

54 Título: **PEG-TRAIL modificado en N-terminal, procedimiento de preparación y usos del mismo**

30 Prioridad:

12.06.2006 KR 20060052702

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

28.04.2017

73 Titular/es:

**THERALY PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
7751 Coriander Place
Elkridge, Maryland 21075, US**

72 Inventor/es:

**LEE, KANG CHOON;
CHAE, SU YOUNG;
YOUN, YU SEOK;
KIM, WON BAE y
LEE, SUNG KWON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 610 576 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

PEG-TRAIL modificado en N-terminal, procedimiento de preparación y usos del mismo

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a un conjugado polietilenglicol (PEG)-TRAIL modificado en N-terminal y un procedimiento de preparación y uso del mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal en el que PEG se une al extremo N de TRAIL, un procedimiento de preparación del conjugado, y un agente para prevenir y tratar enfermedades proliferativas o enfermedades autoinmunes que comprende el conjugado como un ingrediente eficaz.

[Técnica antecedentes]

10 El ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de la necrosis tumoral (TNF) (TRAIL) es un elemento típico de la familia de TNF, y es una proteína de membrana que participa en la apoptosis. TRAIL es una proteína que consiste en 281 aminoácidos en la que un dominio extracelular que comprende los aminoácidos de arginina en la posición 114 a glicina en la posición 281 afecta a la apoptosis. Tres moléculas de TRAIL forman un trímero estructuralmente modificado. El trímero de TRAIL se ensambla con receptores que participan en la muerte celular para inducir la apoptosis.

15 Una diferencia principal entre TRAIL y otros miembros de la superfamilia de TNF, tal como TNF y CD95L, es su capacidad para no inducir la muerte celular en tejidos normales. Se han intentado una diversidad de aplicaciones médicas o farmacéuticas en TNF y CD95L, ya que estas proteínas inducen la muerte celular. Dado que las proteínas de TNF y CD95L afectan a las células normales y también inducen la muerte de las células cancerosas y las células inmunitarias sobreactivadas, tienen una aplicabilidad limitada. Por el contrario, TRAIL induce la apoptosis en una amplia gama de células cancerosas y células inmunitarias sobreactivadas poco efecto sobre las células normales. Esto se debe a la expresión diferencial de los receptores de TRAIL entre los tipos celulares. Se han identificado cinco receptores de TRAIL. Entre ellos, DR4(TRAIL-R1) y DR5(TRAIL-R2) son receptores relacionados con la muerte de células representativos. Cuando TRAIL se une a DR4 o DR5, se activa un dominio de muerte intracelular del receptor se activa y, por lo tanto, transduce señales de apoptosis a través de diversas rutas de transducción de señales, lo que conduce a la muerte celular apoptótica. TRAIL también puede unirse a DcR1, DcR2 y osteoprotegerina (OPG), que no inducen la apoptosis. No se ha observado una diferencia marcada en los niveles de expresión de los receptores inductores de la muerte celular DR4 y DR5 entre las células normales y tumorales. Por el contrario, los otros tres receptores que no inducen la apoptosis se expresan a altos niveles en las células normales, pero se expresan a bajos niveles o no se expresan en absoluto en las células tumorales. Por lo tanto, en las células normales, TRAIL se une en su mayor parte a DcR1, DcR2 y OPG, que no contienen un dominio de muerte y, por lo tanto, no inducen la muerte celular. Por el contrario, en las células cancerosas y las células inmunitarias sobreactivadas, la apoptosis se induce por la unión de TRAIL a DR4 y DR5, que contienen un dominio de muerte. Dicha inducción de la apoptosis selectiva de TRAIL parece ser una característica particularmente atractiva en aplicaciones médicas o farmacéuticas.

20 Se ha observado la apoptosis mediada por TRAIL en diversos tipos de células cancerosas, incluyendo células de carcinoma de colon, glioma, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, tumores cerebrales y mieloma múltiple. Se ha demostrado que TRAIL tiene una actividad contra el cáncer muy elevada en los animales. La buena eficacia contra el cáncer de TRAIL se ha obtenido a través del uso de TRAIL en solitario, así como en combinación con otros agentes anticancerosos, tales como paclitaxel y doxorubicina, y radioterapia. Los ensayos clínicos se están realizando actualmente por Genentech y Amgen usando TRAIL, que tiene una buena eficacia contra el cáncer en los tumores sólidos. Además del cáncer, se han hecho diversos enfoques usando TRAIL en la artritis, una enfermedad autoinmune, para aliviar y tratar la artropatía mediante la inducción de la muerte de las células inmunitarias sobreactivadas. Además de la terapia de proteínas, se ha intentado la terapia génica a través de la administración del gen TRAIL. Por lo tanto, TRAIL puede ser útil en el tratamiento de diversos tipos de cáncer que se han mencionado anteriormente, así como en el tratamiento de trastornos autoinmunes mediados por linfocitos T, tales como encefalomiелitis autoinmune experimental, artritis reumatoide y diabetes de tipo I.

25 Sin embargo, TRAIL nativo tiene algunos problemas que deben superarse para la aplicación del mismo. El principal problema es la baja relación de la formación de trímeros de TRAIL nativo. Los monómeros de TRAIL no se unen a los receptores de TRAIL que se han mencionado anteriormente y, por lo tanto, no inducen la apoptosis. A este respecto, se han realizado muchos estudios con el objetivo de mejorar la estructura trimérica y la relación de la formación de trímeros de TRAIL. En TRAIL nativo, se ha conocido que el ión de cinc desempeña un papel crítico en la trimerización. Además, el análisis estructural de TRAIL se ha realizado usando un ordenador, y se han desarrollado mutantes de TRAIL en base a los resultados de los análisis. Para la formación de trímeros de TRAIL, el procedimiento más útil parece ser la introducción de una novedosa secuencia aminoacídica que favorezca el pliegue trimérico. Dichas secuencias incluyen un motivo de cremallera de leucina y un motivo de cremallera de isoleucina. Henning Walczak indicó la eficacia anticancerosa de un derivado de TRAIL trimérico en el que se añade un motivo de cremallera de leucina al extremo N de TRAIL nativo (H. Walczak, y col. Nature Medicine 1999, 5, 157-163). Dai-Wu Seol y col. indicaron un derivado de TRAIL que contenía un motivo de cremallera de isoleucina novedoso y que

tenía buena actividad apoptótica (MH Kim, y col. BBRC 2004, 321, 930-935).

Otro problema en las aplicaciones clínicas de TRAIL implica la citotoxicidad mostrada en las células normales de algunos tejidos. La mayor parte de las células normales son resistentes a la citotoxicidad, como resultado de la expresión de los diversos receptores de TRAIL que se han mencionado anteriormente, pero algunos hepatocitos y queratinocitos son sensibles a la citotoxicidad mediada por TRAIL (H. Yagita, y col. Cancer Sci. 2004, 95, 777-783; M. Jo y col. Nature Medicine 2000, 6, 564-567; S.J. Zheng, y col. J. Clin. Invest. 2004, 113, 58-64).

Además de la toxicidad hacia algunas células normales, TRAIL tiene una corta semivida *in vivo*, que debería resolverse para la aplicación clínica con éxito de TRAIL. TRAIL tiene diferentes semividas de acuerdo con las especies de animales usados en los ensayos. Por ejemplo, se ha indicado que TRAIL tiene una semivida de varios minutos en roedores y aproximadamente 30 minutos en los simios (H. Xiang, y col. Drug Metabolism and Disposition 2004, 32, 1230-1238). En particular, la mayor parte del TRAIL se excreta rápidamente a través de los riñones. Esta corta semivida se considera un inconveniente para la utilidad farmacéutica de TRAIL, dando como resultado la necesidad de TRAIL o derivados del mismo que tengan una extensa semivida. Otros problemas que deben resolverse incluyen la baja solubilidad y estabilidad en solución de TRAIL.

Mientras tanto, polietilenglicol (PEG) es un polímero que tiene una estructura de HO-(-CH₂CH₂O-)_n-H. Debido a su elevada hidrofiliidad, PEG permite un aumento en la solubilidad de las proteínas farmacológicas cuando se une a las mismas. Además, al unirse adecuadamente a una proteína, PEG aumenta el peso molecular de la proteína modificada al mismo tiempo que mantiene las funciones biológicas principales, tal como la actividad enzimática y la unión al receptor, reduciendo de esta manera la excreción urinaria, protegiendo la proteína de las células y los anticuerpos que reconocen los antígenos exógenos, y disminuyendo la degradación proteica por proteasas. El peso molecular de PEG, capaz de unirse a las proteínas, varía de aproximadamente 1.000 a 100.000. Se sabe que PEG con un peso molecular de más de 1.000 tiene muy poca toxicidad. PEG con un peso molecular entre 1.000 y 6.000 se distribuye ampliamente por todo el cuerpo y se metaboliza a través del riñón. En particular, PEG con un peso molecular de 40.000 se distribuye en la sangre y los órganos, incluyendo el hígado, y se metaboliza en el hígado.

En general, las proteínas médica y farmacéuticamente útiles administradas a través de rutas parenterales son desventajosas en cuanto a ser inmunógenas en el cuerpo, ser deficientemente solubles en agua y ser eliminadas de la circulación en un corto periodo de tiempo. Se han realizado muchos estudios para superar dichos problemas. La patente de Estados Unidos n.º 4.179.337 menciona que, al usarse como productos terapéuticos, las proteínas pegiladas y las enzimas tienen efectos que incluyen una inmunogenicidad reducida, una solubilidad aumentada y un tiempo de residencia *in vivo* ampliado, todos los cuales son ventajas de PEG. Después de esta patente, se ha hecho una diversidad de esfuerzos para superar las desventajas de las proteínas bioactivas a través de la pegilación. Un ejemplo es Veronese y col. pegylated ribonuclease and superoxide dismutase (Veronese y col., 1985). La Patente de Estados Unidos n.º 4.766.106 y 4.917.888 describe la conjugación de proteínas con un polímero que incluye PEG para aumentar la solubilidad en agua del mismo. Además, la Patente de Estados Unidos n.º 4.902.502 describe la conjugación de proteínas recombinantes con PEG u otros polímeros para reducir la inmunogenicidad y extender la semivida *in vivo* circulante.

Sin embargo, a pesar de las desventajas que se han mencionado anteriormente, existen algunos problemas con la pegilación de proteínas, como se indica a continuación. PEG se conjuga típicamente con una proteína diana a través de la unión covalente a uno o más residuos de lisina libre (Lys). En este momento, si PEG se une a una región directamente asociada a la actividad de proteínas entre las regiones superficiales de la proteína, la región unida a PEG pierde funciones biológicas, lo que conduce a un descenso de la actividad proteica. Además, dado que la unión de PEG a residuos de lisina se produce en su mayor parte de manera aleatoria, existen como una mezcla diversos tipos de conjugados de PEG-proteína, correspondientes a sitios de unión particulares. A partir de esta mezcla, un conjugado deseado es difícil de purificar y de aislar.

El documento WO 2004/001009 describe polipéptidos de variantes de ligando Apo-2/TRAIL, que pueden comprender opcionalmente sustituciones de cisteína, y la conjugación o unión de grupos de polioliol, tal como PEG, a los mismos.

TRAIL también alberga problemas similares a los causados por la pegilación que se ha descrito anteriormente. El TRAIL nativo tiene once residuos de lisina, algunos de los cuales participan en la interacción entre TRAIL y sus receptores análogos o están dentro de un sitio activo. Por lo tanto, la adición de moléculas de polietilenglicol a través de la reacción con residuos de lisina puede actuar como un factor inhibitorio muy importante contra la bioactividad de TRAIL. En el caso de la superfamilia de TNF, varios estudios han señalado que la unión entre los residuos de lisina y las moléculas de polietilenglicol inhibe la activación (Y. Yamamoto, y col. Nature Biotechnology 2003, 21, 546-552; H. Shibata y col. Clin. Cancer Res. 2004, 10, 8293-8300).

A este respecto, los presentes inventores unieron selectivamente PEG o un derivado de PEG a un extremo N de TRAIL. Se descubrió que dicha pegilación reducía la captación del fármaco y la eliminación por los hepatocitos y el sistema reticuloendotelial hepático, conduciendo a un descenso de la hepatotoxicidad mediada por TRAIL, y aumentaba notablemente la solubilidad y la estabilidad de TRAIL. Además, se descubrió que la pegilación mejoraba las propiedades farmacocinéticas de un fármaco unido con un almacenamiento a largo plazo en diversas

formulaciones, reduciendo de esta manera las frecuencias de administración del fármaco y permitiendo una duración sostenida de los efectos del fármaco. De esta manera, los presentes inventores obtuvieron un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal y descubrieron un procedimiento de preparación del conjugado, conduciendo de esta manera a la presente invención.

5 **[Divulgación]**

[Problema técnico]

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de preparación del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar el uso del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal.

[Solución técnica]

15 Con el fin de realizar los objetos anteriores, la presente invención proporciona un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal que comprende: un TRAIL trimérico que comprende los motivos de cremallera de aminoácidos que favorecen la formación de trímeros en los N-terminales de los mismos; y un PEG, en el que el PEG está unido al N-terminal de un monómero del TRAIL trimérico, un procedimiento de preparación del mismo, y un agente preventivo o terapéutico para enfermedades proliferativas o enfermedades autoinmunes que comprende el mismo como un ingrediente eficaz.

20 **[Efectos ventajosos]**

Un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal preparado de acuerdo con la presente invención tiene una solubilidad y estabilidad muy elevadas en comparación con el TRAIL nativo. Además, el TRAIL pegilado ha aumentado notablemente la semivida *in vivo* conservando al mismo tiempo una actividad biológica similar a la del TRAIL nativo. Por lo tanto, el TRAIL pegilado puede ser muy útil como agente preventivo o terapéutico para enfermedades proliferativas o enfermedades autoinmunes.

25 **[Descripción de los dibujos]**

La figura 1 muestra esquemáticamente la estructura de hTRAIL recombinante (ILz-hTRAIL, monómero) para expresar hTRAIL trimérico;

30 la figura 2 es un cromatograma del hTRAIL recombinante purificado a través de cromatografía de afinidad de Ni (lavado 1 (w1): lavado con tampón fosfato que contiene imidazol 10 mM; lavado 2 (w2): lavado con tampón fosfato que contiene imidazol 50 mM);

la figura 3 muestra el resultado de SDS-PAGE del hTRAIL recombinante purificado (EJ: lisados de *E. coli*; UB: TRAIL no pegilado; lavado 1 (w1): lavado con tampón fosfato que contiene imidazol 10 mM; lavado 2 (w2): lavado con tampón fosfato que contiene imidazol 50 mM);

35 la figura 4 muestra el resultado de una cromatografía por exclusión de tamaño de productos de acuerdo con las relaciones de reacción de PEG con respecto a TRAIL;

la figura 5 muestra el resultado de una cromatografía por exclusión de tamaño de TRAIL (ILz-hTRAIL), una mezcla de reacción y un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal purificado (PEG5K-ILz-hTRAIL);

40 la figura 6 muestra el resultado de la electroforesis de una mezcla de reacción, un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal y TRAIL sin reaccionar;

la figura 7 muestra el resultado de un ensayo de citotoxicidad contra células HeLa de carcinoma cervical humano de acuerdo con el peso molecular de PEG;

la figura 8 es una fotografía microscópica que muestra la viabilidad celular de acuerdo con las concentraciones de fármaco en el ensayo de citotoxicidad contra las células HeLa;

45 la figura 9 muestra el resultado de un ensayo de citotoxicidad contra células HCT116 de carcinoma de colon humano de acuerdo con el peso molecular del PEG;

la figura 10 muestra la solubilidad en solución de TRAIL no pegilado y un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal;

50 la figura 11 muestra los perfiles farmacocinéticos de TRAIL no pegilado; y

la figura 12 muestra los perfiles farmacocinéticos de un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal.

[Mejor modo]

En un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal como se define por la reivindicación 1.

TRAIL puede obtenerse en una forma nativa o genéticamente modificada (recombinante), y puede incluir un grupo terminal que facilita el aislamiento y la purificación del mismo.

5 TRAIL puede estar en la forma humana, que tiene una secuencia aminoacídica de 281 aminoácidos de longitud, o puede tener una secuencia aminoacídica de arginina-114 a glicina-281 de la forma humana de longitud completa (1-281).

TRAIL puede unirse a una cremallera de isoleucina en su extremo N.

PEG puede ser una forma lineal o ramificada. Preferiblemente, PEG incluye, pero sin limitación, propionato de metoxi PEG succinimidilo (mPEG-SPA), metoxi PEG N-hidroxisuccinimida (mPEG-NHS), metoxi PEG aldehído (mPEG-ALD), metoxi PEG maleimida (mPEG-MAL) y PEG de múltiples ramificaciones.

10 PEG puede tener un peso molecular entre 1.000 y 100.000, tal como entre 1.000 y 40.000, y preferiblemente entre 5.000 y 40.000.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal, como se define adicionalmente por la reivindicación 9.

15 El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal puede obtenerse haciendo reaccionar una amina N-terminal de un TRAIL trimérico que comprende los motivos de cremallera de aminoácidos en los N-terminales de los mismos con un grupo aldehído de PEG en presencia de un agente reductor.

PEG puede estar en una forma lineal o ramificada. Preferiblemente, PEG incluye propionato de metoxi PEG succinimidilo (mPEG-SPA), metoxi PEG N-hidroxisuccinimida (mPEG-NHS), metoxi PEG aldehído (mPEG-ALD), metoxi PEG maleimida (mPEG-MAL) y derivados de polietilenglicol de múltiples ramificaciones.

20 PEG puede tener un peso molecular entre 1.000 y 100.000, tal como entre 1.000 y 40.000, y preferiblemente entre 5.000 y 40.000.

En el presente procedimiento, PEG y TRAIL reaccionan en una relación molar (PEG/TRAIL) de 2 a 10, y preferiblemente de 5 a 7,5.

25 TRAIL puede obtenerse en una forma nativa o genéticamente modificada (recombinante). Preferiblemente, TRAIL puede incluir un grupo terminal que facilita el aislamiento y la purificación del mismo.

TRAIL puede estar en la forma humana, que tiene una secuencia aminoacídica de 281 aminoácidos de longitud, o puede tener una secuencia aminoacídica de arginina-114 a glicina-281 de la forma humana de longitud completa (1-281).

TRAIL puede unirse a una cremallera de isoleucina en su extremo N.

30 El agente reductor puede incluir NaCNBH_3 y NaBH_4 .

En un aspecto adicional, la presente invención se proporcionar para el uso del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer, o una enfermedad autoinmune.

35 El cáncer puede incluir preferiblemente carcinoma de colon, glioma, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, tumor cerebral y mieloma múltiple.

La enfermedad autoinmune incluye encefalomiелitis autoinmune experimental, artritis reumatoide y diabetes de tipo I.

El medicamento que comprende el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal como un ingrediente eficaz de acuerdo con la presente invención puede formularse en diversas formulaciones para su administración oral o parenteral tras la aplicación clínica, pero no se limita a lo mismo.

40 En la formulación, pueden usarse diluyentes o excipientes, y se ilustran por cargas, espesantes, aglutinantes, humectantes, disgregantes y tensioactivos. Los ejemplos de formulaciones sólidas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras, polvos, gránulos y cápsulas. Las formulaciones sólidas pueden incluir, además del conjugado de PEG-TRAIL, al menos un excipiente seleccionado de entre almidón, carbonato cálcico, sacarosa, lactosa, gelatina, etc. Además, las formulaciones sólidas pueden incluir, además de un único excipiente, un lubricante tal como estearato de magnesio o talco. Los ejemplos de formulaciones líquidas para administración oral incluyen suspensiones, soluciones internas, emulsiones y jarabes. Las formulaciones líquidas pueden incluir, además de los diluyentes individuales de uso común, tales como agua y parafina líquida, diversos excipientes, que se ilustran por humectantes, edulcorantes, aromatizantes y conservantes. Los ejemplos de preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas, soluciones no acuosas, suspensiones, emulsiones, preparaciones liofilizadas y supositorios. En la formulación en las soluciones y suspensiones no acuosas, pueden usarse propilenglicol, PEG, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres inyectables, tales como oleato de etilo.

50

Una formulación puede complementarse con calcio o vitamina D₃ con el fin de mejorar su eficacia como un agente terapéutico para enfermedades proliferativas o enfermedades autoinmunes.

La dosificación para un paciente específico puede variar según el peso del paciente, edad, sexo, estado de salud y la dieta, la duración de administración, vías de administración, tasas de excreción y la gravedad de la enfermedad.

5 Típicamente, es posible administrar una dosis eficaz una vez cada una o dos semanas. Además, la dosis se puede tomar en una dosis única o en varias dosis divididas dentro de una dosis eficaz diaria.

[Modo para la invención]

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos y ejemplos de ensayo, que se exponen para ilustrar la presente invención.

10 Ejemplo 1: Preparación del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal

1-1: Cultivo de *E. coli* transformado con el gen TRAIL y expresión de proteínas

La forma truncada de TRAIL humano (hTRAIL) usada en este ensayo contenía aminoácidos que incluían de arginina-114 a glicina-281 de la forma de longitud completa (1-281) de hTRAIL. El TRAIL recombinante se expresó y se produjo en BL21(DE3) de *E. coli*, y se usó un plásmido de expresión pET3a. Se añadió una cremallera de isoleucina (ILz) que favorecía el pliegue trimérico a un extremo N del hTRAIL recombinante. Después, el hTRAIL recombinante se etiquetó con seis residuos de histidina (6 x His) en su extremo N-terminal con el fin de facilitar el aislamiento y la purificación. La figura 1 muestra esquemáticamente la estructura del hTRAIL recombinante resultante (monómero) para expresar hTRAIL trimérico (etiquetado con His y unido a la cremallera de isoleucina).

El *E. coli* transformado se cultivó en medio LB estéril a 37 °C con agitación durante aproximadamente 12 h en presencia de ampicilina (50 mg/l) para el cultivo selectivo de un transformante. Después de la proliferación del *E. coli* transformado para el cultivo, se añadió isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) al medio de cultivo para inducir la expresión del genotipo de *E. coli*. Después de la incubadora de agitación y la reducción del cultivo de *E. coli* a 27 °C, se añadió 1 ml de solución 1 M de IPTG al medio de cultivo. Las células se cultivaron adicionalmente durante aproximadamente 7 h con agitación para inducir la expresión de proteínas. Las células cultivadas se cosecharon por centrifugación a 5.000 g durante 10 min.

1-2: Purificación del hTRAIL recombinante de *E. coli*

El hTRAIL recombinante se aisló de las células de *E. coli* transformadas cosechadas en el Ejemplo 1-1 usando una cromatografía de afinidad de Ni. En primer lugar, el sedimento celular obtenido por centrifugación se suspendió en tampón fosfato 20 mM (pH 7,5), y se sonicó para alterar la membrana celular, liberando así el TRAIL expresado en *E. coli*. Después de eliminar los sustratos celulares insolubles a través de centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se pasó lentamente a través de una columna prerrellenada con resina de Ni-NTA. El hTRAIL recombinante se unió selectivamente a la columna a través de la interacción entre los seis residuos de histidina etiquetados N-terminalmente y la quelación de los iones de níquel. La columna se lavó con tampón fosfato (pH 7,5) y tampón fosfato que contenía imidazol 10 mM y 50 mM para eliminar las impurezas, incluyendo proteínas distintas del hTRAIL recombinante. Después, el hTRAIL recombinante unido a la columna se eluyó con tampón fosfato que contenía imidazol 500 mM. Las fracciones de elución que contenían TRAIL se sometieron a ultrafiltración para eliminar las altas concentraciones de imidazol. El producto finalmente aislado purificado se puso en tampón acetato 50 mM a un pH de 5,0 con una alta pureza (98 % o más). Los resultados se dan en la figura 2.

La figura 3 muestra el resultado de SDS-PAGE (gel al 14 %) del hTRAIL recombinante aislado y purificado y las fracciones de elución obtenidas de la columna de Ni-NTA (EJ: lisados de *E. coli*; UB: TRAIL no pegilado; lavado 1 (w1): lavado con tampón fosfato que contiene imidazol 10 mM; lavado 2 (w2): lavado con tampón fosfato que contiene imidazol 50 mM). Como se muestra en la figura 2, el hTRAIL recombinante (ILz-hTRAIL) aislado en el Ejemplo 1-2 se observó que eluía a un tiempo de retención entre 135 y 145 min. El resultado electroforético representado en la figura 3 indicó que ILz-hTRAIL se aisló y se purificó con éxito usando la columna de Ni-NTA.

1-3: Síntesis y aislamiento de conjugados de PEG-TRAIL

El hTRAIL recombinante preparado en el Ejemplo 1-2 se diluyó a 200 µg/ml en tampón acetato 50 mM (pH 5,0), y se mezcló con metoxi polietilenglicol 5000 propionaldehído (PEG5k). Se añadió un agente reductor NaCNBH₃ a la mezcla a una concentración final de 20 mM, y la mezcla se dejó reaccionar a 4 °C durante aproximadamente 8 a 12 h. Se añadió PEG5k a TRAIL a relaciones molares de la reacción de PEG5k de 2,5, 5, 7,5 y 10 con el fin de preparar un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal. Por separado, se preparó otro conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal usando metoxi polietilenglicol 20000 propionaldehído como se ha descrito anteriormente. Las mezclas de reacción se sometieron a cromatografía de exclusión de tamaño, y los resultados se dan en la figura 4.

Como se muestra en la figura 4, la cantidad de TRAIL pegilado aumento con cantidades crecientes de PEG. Sin embargo, el PEG excesivo reaccionó con las aminas de cadena lateral de residuos de lisina internos, así como un

residuo de lisina N-terminal deseado, dando como resultado cantidades crecientes de subproductos. En este caso, un conjugado resultante tenía un peso molecular superior y se eluyó en un momento anterior tras la cromatografía de exclusión de tamaño (solución de elución: tampón fosfato que contenía NaCl 150 mM, pH 6,0). Estos resultados indican que es eficaz ajustar la relación de reacción de PEG con respecto a TRAIL dentro de un intervalo óptimo de manera que no sea muy alto o muy bajo.

Un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal, preparado usando PEG y TRAIL en una relación de reacción de 7, se aisló y se purificó a través de cromatografía de exclusión de tamaño. Los resultados se dan en la figura 5.

Como se muestra en la figura 5, el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal purificado se detectó en un volumen de elución relativamente más alto en comparación con el hTRAIL recombinante no pegilado producido en y aislado de *E. coli*. Además, el cromatograma indicó que el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal purificado era altamente puro y no contenía ningún TRAIL sin reaccionar.

La figura 6 muestra los resultados de la electroforesis de la mezcla de reacción de este ejemplo, el hTRAIL recombinante purificado y el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal purificado.

Como se muestra en la figura 6, al compararse con la banda de TRAIL monomérico, se descubrió que los monómeros de TRAIL existían en el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal purificado. Esto indica que el PEG se unió al extremo terminal de uno o dos monómeros de TRAIL trimérico. Además, en el gel de electroforesis, excepto para el TRAIL monomérico y los monómeros del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal, no se observó ninguna impureza, lo que indicaba que el TRAIL pegilado finalmente purificado tenía una alta pureza.

Ejemplo experimental 1: Comparación de la bioactividad de TRAIL no pegilado y los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal (ensayo de la apoptosis)

Se examinaron TRAIL no pegilado y los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal para determinar la bioactividad, como se indica.

Se realizó un ensayo de la apoptosis para el TRAIL recombinante no pegilado y los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal usando células HeLa de carcinoma cervical humano y células HCT116 de carcinoma de colon humano. Las células HeLa se cultivaron en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), y las células HCT116 en RPMI-1640. Cada línea celular se sembró sobre una placa de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo, y se cultivó durante aproximadamente 24 h para estabilizarla. Las células se dosificaron con un TRAIL de control (adquirido en R&D systems), el hTRAIL recombinante se preparó de acuerdo con el método de los Ejemplos 1-1 y 1-2, y los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal (PEG5K-ILz-hTRAIL y PEG20K-ILz-hTRAIL) a una concentración final de 1 ng/ml a 5 µg/ml durante aproximadamente 24 h. Después, se añadieron 20 µl de una solución de MTS (Promega) a cada pocillo, y la placa se incubó durante aproximadamente 2 h. La absorbancia se midió a 490 nm, y la viabilidad celular se calculó a partir de la absorbancia. Los resultados se dan en las figuras 7, 8 y 9.

Como se muestra en las figuras 7 y 8, de forma similar a TRAIL no pegilado, se descubrió que los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal tenían citotoxicidad contra células HeLa de una manera dependiente de la dosis. Se observó que los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal tenían una citotoxicidad relativamente baja con un peso molecular creciente del PEG unido. Estos resultados fueron coherentes con los resultados microscópicos mostrados en la figura 8, en la que las células tratadas con TRAIL se observaron microscópicamente.

Como se muestra en la figura 9, los conjugados de PEG-TRAIL mostraron citotoxicidad contra las células HCT116 de carcinoma de colon de una manera similar a la observada en la figura 7. Además, el efecto del PEG sobre la citotoxicidad contra las células HCT116 fue similar a la observada contra las células HeLa.

Ejemplo experimental 2: Evaluación de la solubilidad en solución de conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal

El TRAIL recombinante no pegilado y los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal se examinaron para determinar la solubilidad en solución, como se indica a continuación.

La solubilidad del TRAIL no pegilado y pegilado se ensayó en el tiempo para investigar la estabilidad en solución del mismo. El TRAIL no pegilado y los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal se prepararon de forma individual a 200 µg/ml en tampón acetato 50 mM, se diluyeron en una relación 1:1 con tampón fosfato 100 mM para ajustar el valor del pH fisiológico, y después se analizaron para determinar la solubilidad en el tiempo a 37 °C. Las muestras se recogieron en pequeñas cantidades en 5, 15, 30, 60, 120 y 180 min. Las muestras recogidas se centrifugaron para separar las fracciones solubles y precipitadas. Para las fracciones solubles obtenidas de esta manera (como sobrenadantes), las concentraciones de proteína se determinaron usando un kit de ensayo de proteínas de BCA. Los resultados se dan en la figura 10.

Como se muestra en la figura 10, se observó una diferencia notable en la estabilidad en solución entre el TRAIL no pegilado y los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal. La mayor parte del TRAIL no pegilado (más del 80 % del mismo) se precipitó en 5 min. Por el contrario, los conjugados de PEG-TRAIL modificados en N-terminal mostraron una estabilidad en solución muy alta, y esta estabilidad aumentó con los pesos moleculares crecientes de PEG. PEG5K-ILz-hTRAIL mostró una estabilidad de aproximadamente el 70%, y PEG20K-ILz-hTRAIL mostró una estabilidad de aproximadamente el 95 %.

Ejemplo experimental 3: Evaluación de los perfiles farmacocinéticos de un conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal

El TRAIL no pegilado (ILz-hTRAIL) y el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal (PEG5K-ILz-hTRAIL) se examinaron para determinar los perfiles farmacocinéticos, como se indica a continuación.

Con el fin de estimar el comportamiento *in vivo* del TRAIL no pegilado y el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal, se realizó previamente un análisis farmacocinético usando ratas Sprague-Dawley de 6 semanas. Con el fin de facilitar la recogida de muestras de sangre del animal, la vena yugular derecha de cada una de las ratas se canuló insertando un extremo de una longitud de entubado PE-10 en la vena yugular aproximadamente 2,5 cm de profundidad, y suturándola en el lugar. El otro extremo del entubado se pasó a través de la espalda del animal y se conectó a un tubo de recogida de sangre en el exterior. Después, se dejó que las ratas se aclimatasen y se recuperasen durante aproximadamente 24 h. El TRAIL no pegilado y el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal se administraron por vía subcutánea a las ratas en una dosificación de 10 µg/kg. Las muestras de sangre (0,2 ml cada vez) se recogieron en puntos temporales determinados durante un periodo de 48 h (la primera muestra de sangre se recogió en 5 min). Después de la centrifugación de las muestras de sangre recogidas, las muestras de plasma se analizaron para determinar el comportamiento *in vivo* del TRAIL no pegilado y el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal usando un kit ELISA de TRAIL humano. Los resultados se dan en las figuras 11 y 12, respectivamente.

Como se muestra en las figuras 11 y 12, hubo una diferencia en el comportamiento *in vivo* entre el TRAIL no pegilado y el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal. El TRAIL no pegilado (ILz-hTRAIL) se absorbió rápidamente, y mostró la mayor concentración en la sangre después de aproximadamente una hora, pero la concentración de sangre del mismo se disminuyó mediante excreción renal rápida y la metabolización. Por el contrario, el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal (PEG5K-ILz-hTRAIL) se absorbió lentamente de la región subcutánea administrada, y se mantuvo a altas concentraciones en la sangre durante un largo periodo de 48 h o más. Esto se consideró que se debía a la baja excreción renal y la baja metabolización hepática de TRAIL resultante de la pegilación.

Los resultados del análisis farmacocinético se dan en la Tabla 1.

TABLA 1

Perfiles farmacocinéticos de TRAIL no pegilado y el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal		
	ILz-hTRAIL	PEG5K-ILz-hTRAIL
AUC (ng.h/ml)	7,71 ± 1,1,	7628,2 ± 321,6
C _{máx} (ng/ml)	3,38 ± 0,48	298,3 ± 24,8
T _{máx} (h)	0,96 ± 0,19	19,0 ± 1,0
T _{1/2} (h)	0,79 ± 0,01	24,5 ± 4,0

Como se muestra en la Tabla 1, en comparación con ILz-hTRAIL, PEG5K-ILz-hTRAIL existía a niveles más altos en la sangre, y tenía un T_{máx} (tiempo hasta alcanzar la concentración máxima) más de 19 veces más alto y T_{1/2} 30 veces más largo. Estos resultados indican que el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la presente invención es un fármaco farmacocinéticamente bueno.

En lo sucesivo en el presente documento, se darán formulaciones ejemplares del presente conjugado de PEG-TRAIL.

Ejemplos de formulación: Preparación de formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden el conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la presente invención se prepararon como se indica a continuación.

1. Preparación de polvos

conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal	2 g
Lactosa	1 g

Los componentes anteriores se mezclaron y se pusieron en un envase hermético, dando de este modo polvos.

2. Preparación de comprimidos

conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal	100 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg
Estearato de magnesio	2 mg

5

Los componentes anteriores se mezclaron y se formaron en comprimidos de acuerdo con un procedimiento de preparación de comprimidos común, dando de esta manera comprimidos.

3. Preparación de capsulas

conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal	100 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg
Estearato de magnesio	2 mg

10 Los componentes anteriores se mezclaron y se cargaron en cápsulas de gelatina de acuerdo con un procedimiento de preparación de cápsulas común, dando de esta manera capsulas.

4. Preparación de una solución inyectable

conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal	10 µg/ml
Ácido clorhídrico diluido BP	hasta pH 3,5
Cloruro sódico inyectable BP	máximo 1 ml

15 El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal se disolvió en un volumen adecuado de cloruro sódico inyectable BP, y se ajustó a un pH de 3,5 usando ácido clorhídrico diluido BP. Se añadió adicionalmente cloruro sódico inyectable BP para conseguir un volumen deseado, y la solución se mezcló suficientemente. Después, la solución de mezcla se cargó en una ampolla de 5 de tipo I hecha de vidrio transparente. El vidrio se fundió para sellar la ampolla, que se trató en autoclave a 120 °C durante 15 min, dando de esta manera una solución inyectable.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de PEG (polietilenglicol)-TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral) modificado en N-terminal que comprende:
 - 5 un TRAIL trimérico que comprende los motivos de cremallera de aminoácidos que favorecen la formación de trímeros en los N-terminales de los mismos; y
 - un PEG,
 en el que el PEG está unido al N-terminal de un monómero del TRAIL trimérico.
2. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el PEG tiene una forma lineal o ramificada.
- 10 3. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el PEG es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en propionato de metoxipolietilenglicol succinimidilo, metoxipolietilenglicol N-hidroxisuccinimida, metoxipolietilenglicol aldehído, metoxipolietilenglicol maleimida y polietilenglicol de múltiples ramificaciones, preferiblemente metoxipolietilenglicol aldehído.
- 15 4. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el PEG tiene un peso molecular entre 1.000 y 100.000, tal como entre 1.000 y 40.000, preferiblemente entre 5.000 y 40.000.
5. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el TRAIL se obtiene en una forma nativa o modificada genéticamente (recombinante).
6. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el TRAIL es TRAIL humano, que tiene una secuencia aminoacídica de 281 aminoácidos de longitud.
- 20 7. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el TRAIL tiene una secuencia aminoacídica de arginina-114 a glicina-281 de la forma TRAIL humana de longitud completa (1-281).
8. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el motivo de cremallera de aminoácidos es una cremallera de isoleucina.
- 25 9. Un método de preparación del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de la reivindicación 1, que comprende hacer reaccionar una amina N-terminal de un TRAIL trimérico que comprende los motivos de cremallera de aminoácidos en los N-terminales de los mismos con un grupo aldehído de un PEG en presencia de un agente reductor.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el PEG y el TRAIL reaccionan en una relación molar (PEG/TRAIL) de 2 a 10, preferiblemente de 5 a 7,5.
- 30 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el motivo de cremallera de aminoácidos es una cremallera de isoleucina.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el agente reductor es NaCNBH_3 o NaBH_4 .
- 35 13. Uso del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar el cáncer, preferiblemente uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en carcinoma de colon, glioma, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, tumor cerebral y mieloma múltiple.
14. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de la reivindicación 1, para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer, preferiblemente uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en carcinoma de colon, glioma, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, tumor cerebral y mieloma múltiple.
- 40 15. Uso del conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad autoinmune, preferiblemente una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en encefalomiелitis autoinmune experimental, artritis reumatoide y diabetes de tipo I.
16. El conjugado de PEG-TRAIL modificado en N-terminal de la reivindicación 1, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmune, preferiblemente una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en encefalomiелitis autoinmune experimental, artritis reumatoide y diabetes de tipo I.

Figura 1

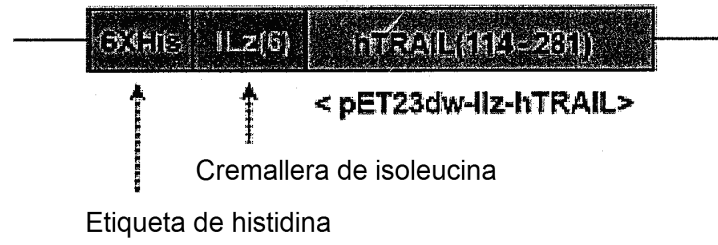


Figura 2

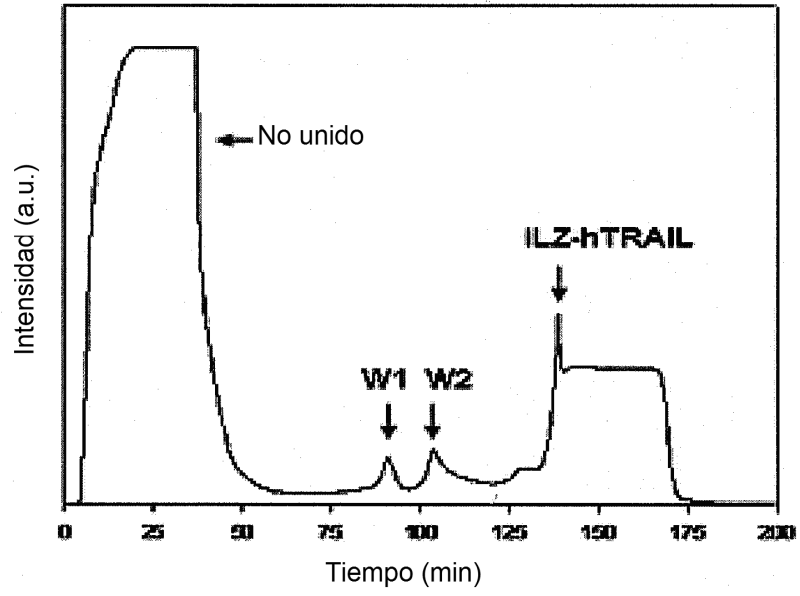


Figura 3

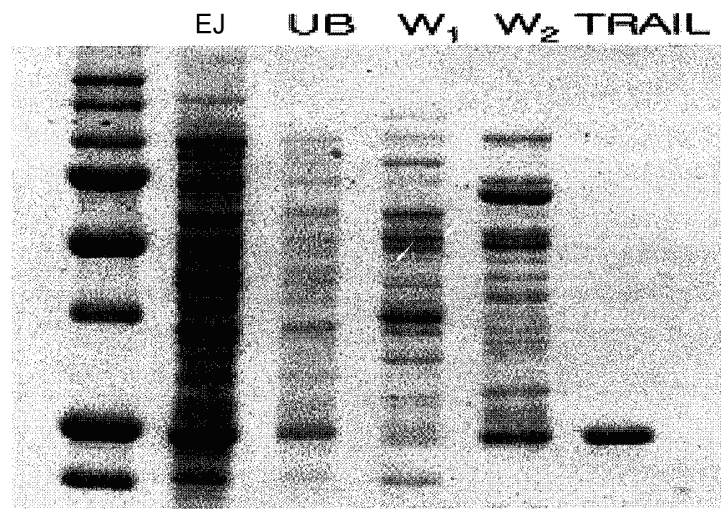


Figura 4

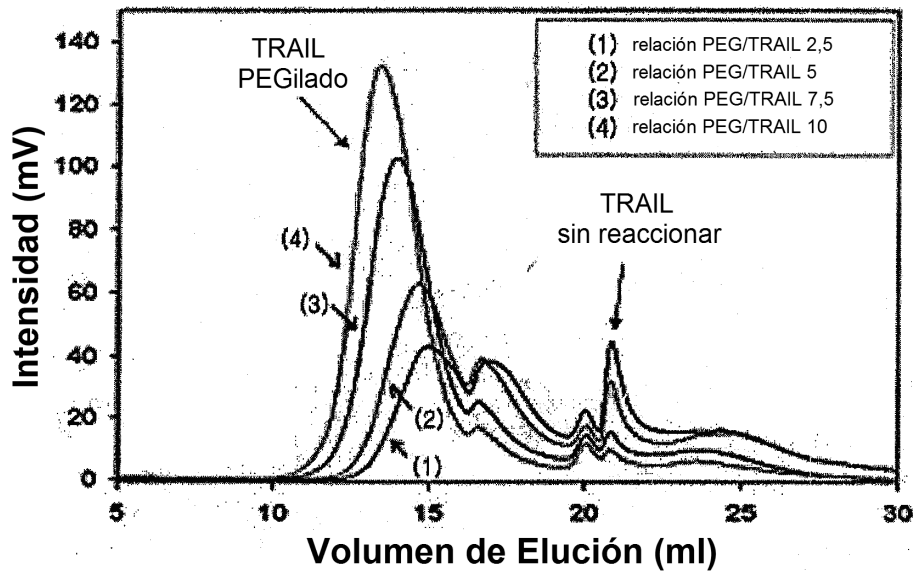


Figura 5

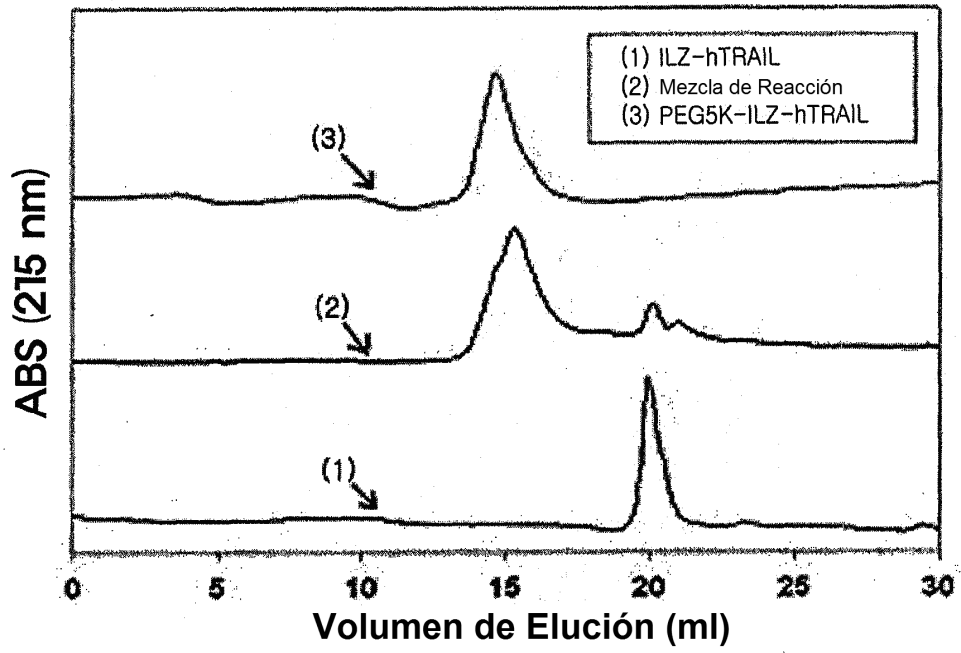
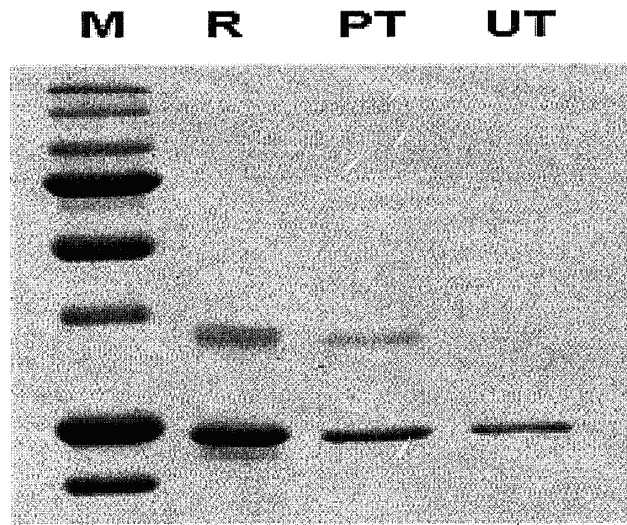


Figura 6



M: Marcador
R: Mezcla de Reacción
PT: TRAIL PEGilado
UT: TRAIL sin reaccionar

Figura 7

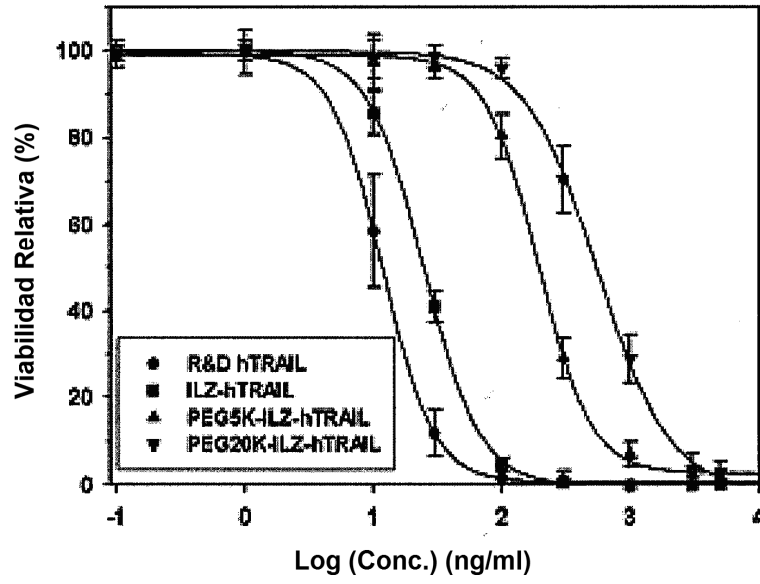


Figura 8

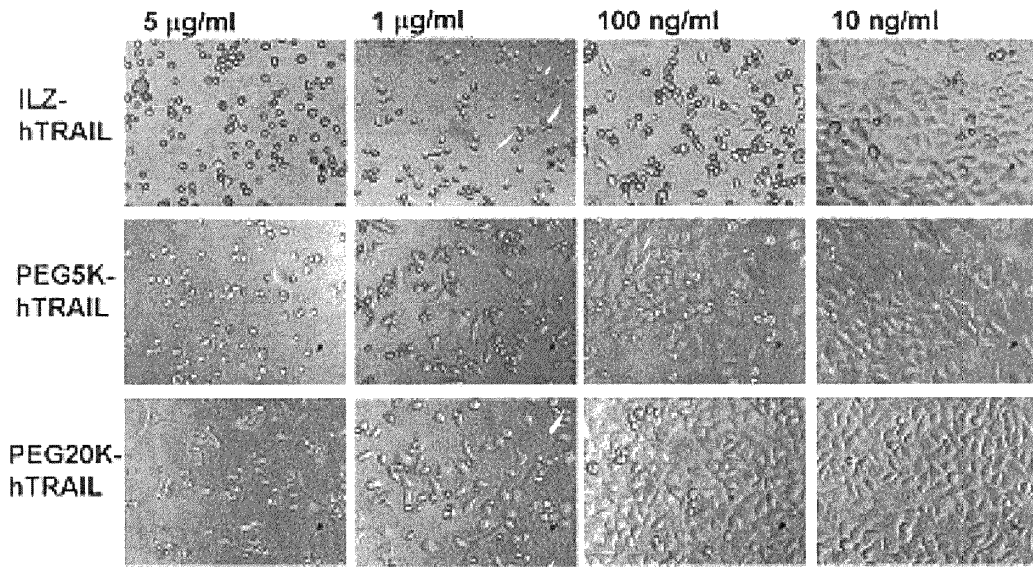


Figura 9

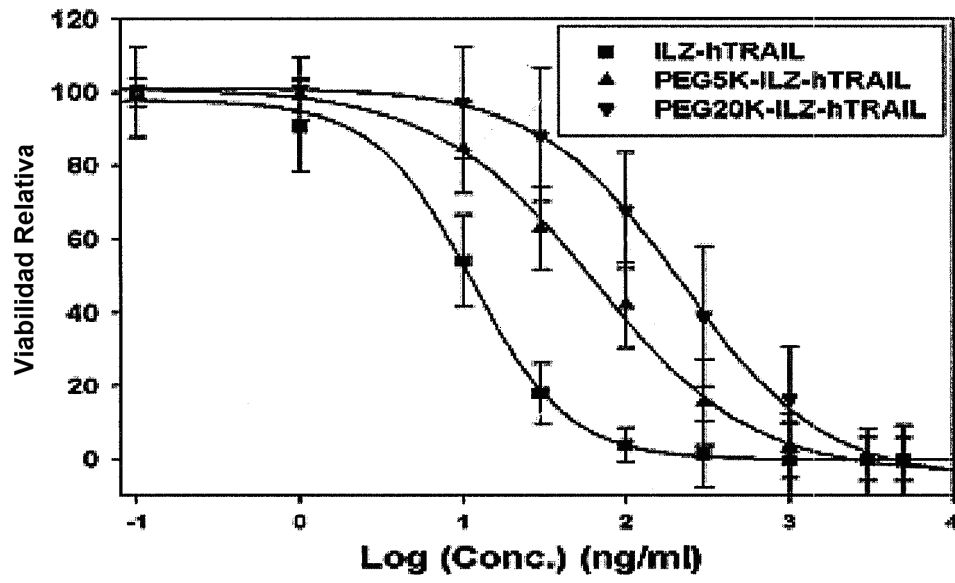


Figura 10

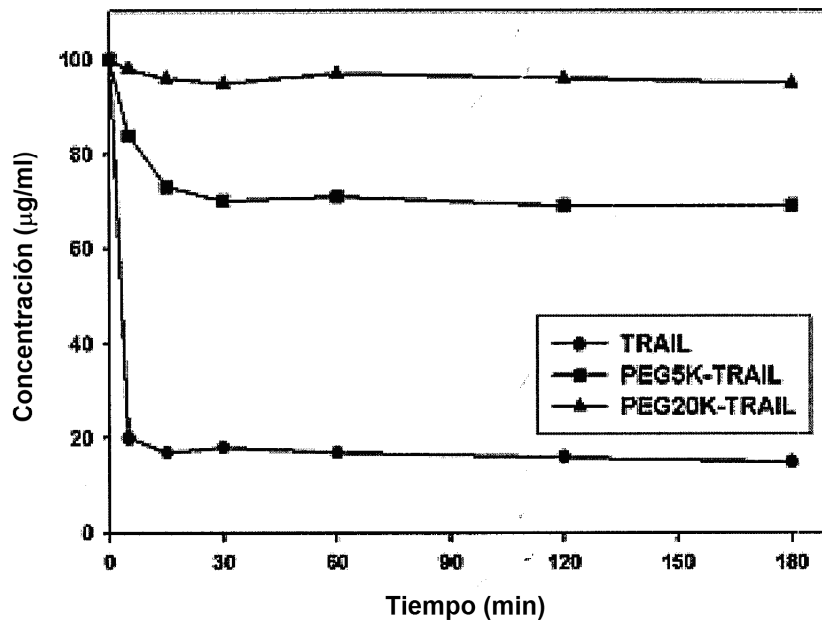


Figura 11

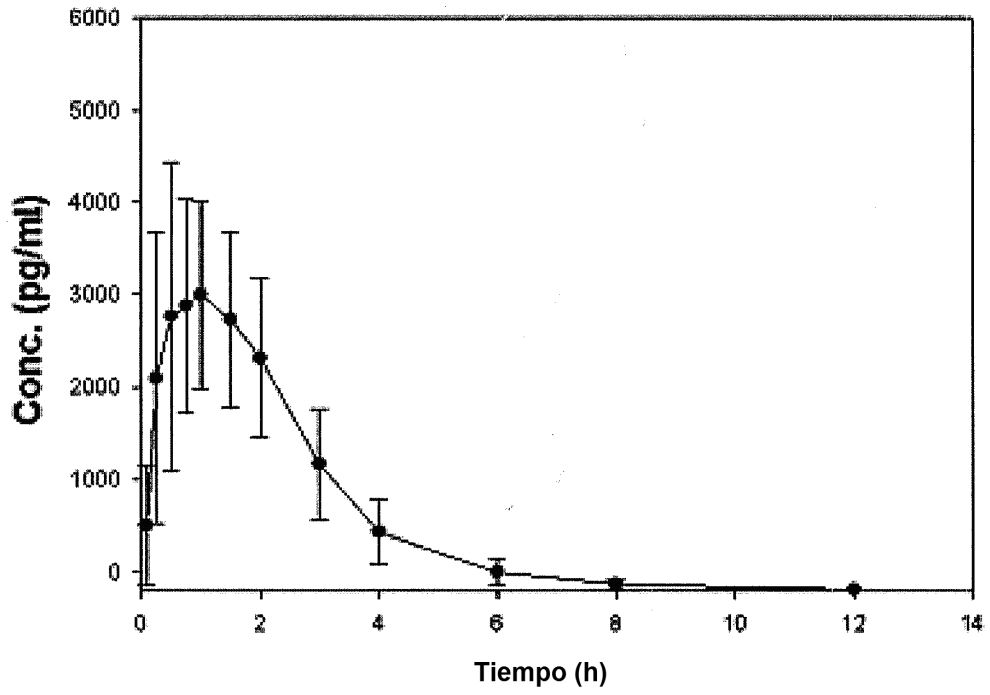


Figura 12

