

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 503**

51 Int. Cl.:

C07K 14/565 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015 PCT/EP2015/057205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015 E 15773707 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3126379**

54 Título: **Nuevos análogos de la proteína IFN beta**

30 Prioridad:

04.04.2014 EP 14163483

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

02.01.2020

73 Titular/es:

**ARES TRADING SA (100.0%)
Zone Industrielle de l'Ouriettaz
1170 Aubonne, CH**

72 Inventor/es:

**PALINSKY, WOLF;
ROSSI, MARA y
PEZZOTTI, ANNA R**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 736 503 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

Nuevos análogos de la proteína IFN beta

Antecedentes de la invención

5 El interferón beta natural (IFN-beta) es producido por las células principalmente en respuesta a infecciones virales o después de una exposición a otros productos biológicos. El IFN-beta está implicado en actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras.

10 Varias preparaciones de interferón beta humano recombinante, conocidas como interferón beta 1a e interferón beta 1b, están disponibles comercialmente para el tratamiento de formas recurrentes de esclerosis múltiple (M Revel, Pharmacol Ther 2003, Oct, 100(1): 49-62). El IFN-beta 1a es una glicoproteína de 166 aminoácidos con una única cadena de carbohidratos unida al N en el resto Asn₈₀. La secuencia comprende tres cisteínas de las cuales dos forman un enlace disulfuro (Cys₃₁ y Cys₁₄₁) y una Cys₁₇ está libre y próxima a la superficie, pero enterrada. El interferón beta 1b no está glicosilado y tiene una mutación Cys17Ser.

15 El interferón beta ejerce su función antiviral de diferentes maneras; una es provocar la actividad antiviral de las células diana (inhibición de la replicación viral) y la otra es inducir la apoptosis en células infectadas (Taniguchi et al., Current Opinion in Immunology, Feb 2002, 14(1): 111-116). Además de esta acción directa, el interferón beta afecta a células del sistema inmunitario, así como induce la expresión de moléculas de MHC de clase I en la superficie celular. Las células infectadas por virus pueden eliminarse después mediante linfocitos citotóxicos T (CTL). Este mecanismo de eliminación se basa en el reconocimiento de CTL de antígenos virales presentados por MHC de clase I en la superficie de células infectadas.

20 La inmuno-oncología es un enfoque evolutivo para el tratamiento del cáncer centrado en redireccionar el sistema inmunitario del paciente para eliminar tumores.

Uno de los mecanismos inmunes para eliminar las células tumorales por el sistema huésped es la destrucción de las células tumorales por CTL. Este mecanismo de eliminación se basa en el reconocimiento de CTL de antígenos tumorales presentados por MHC de clase I en la superficie de las células tumorales.

25 Los virus y los tumores pueden utilizar mecanismos de evasión inmunológica que incluyen la modulación anterior de la expresión de MHC de clase I.

30 Las moléculas que son capaces de aumentar la respuesta antiviral directa y/o el mecanismo de eliminación de las células infectadas por CTL, así como las moléculas que tienen una actividad antiproliferativa directa y/o la capacidad de redireccionar el sistema inmunitario del huésped para matar las células tumorales tiene la potencialidad de actuar como un nuevo y más potente agente antiviral y terapéutico del cáncer.

El documento de Patente WO 2006/053134 identifica una proteína IFN-beta 1b que muestra un máximo del 40% de desamidación por almacenamiento a 25°C y 60% de humedad relativa durante 6 meses. Esta proteína tiene una mayor actividad antiviral y antiproliferativa. No se ha reportado un aumento de la actividad inmunomoduladora.

35 Por lo tanto, existe todavía la necesidad de proporcionar un análogo de IFN beta terapéutico novedoso y más potente, particularmente un análogo de IFN-beta 1a.

Se muestra en la presente memoria que la deamidación de IFN-beta 1a en una asparagina en la posición 25 del aminoácido conduce a un aumento de la inmunomodulación, por ejemplo, una regulación posterior de MHC de clase I y un aumento de la actividad antiviral. Además, se muestra que el aumento inducido por la deamidación en la actividad inmunomoduladora y antiviral es dependiente de la sialilación de IFN-beta 1a.

40 Además, los inventores de la presente invención encontraron condiciones de deamidación particulares que conducen a una casi completa deamidación de IFN-beta 1a.

45 La proteína IFN-beta desamidada puede, por lo tanto, producirse con una alta eficacia biológica y de manera rentable. Además, la proteína IFN-beta mostrada en la presente memoria puede mejorar la eficacia clínica de, por ejemplo, inmunoterapias contra el cáncer y terapias antivirales, tales como vacunas solas o en combinación con otros agentes o medios terapéuticos. Además, las terapias con IFN-beta pueden beneficiarse del uso de dosis más bajas de IFN-beta y una reducción de los efectos secundarios relacionados con el tratamiento con IFN-beta.

Compendio de la invención

50 Se describe en la presente memoria una composición que comprende una proteína interferón-beta (IFN-beta), preferiblemente IFN-beta 1a, al menos el 80% de la cual se desamida en un aminoácido asparagina localizado en una posición del aminoácido que corresponde a la posición 25 del aminoácido de una proteína interferón beta 1a según SEQ ID NO: 1.

Se describe además una proteína interferón-beta (IFN-beta) 1a modificada en donde el aminoácido asparagina en

una posición del aminoácido correspondiente a la posición 25 del aminoácido de una proteína interferón-beta 1a según SEQ ID NO:1 está desamidada.

Se describe además la composición o la proteína IFN-beta 1a modificada para su uso en terapia, para su uso como agente inmunomodulador, para su uso como una vacuna o en inmunoterapia del cáncer.

5 La proteína IFN-beta 1a modificada tiene una secuencia definida por SEQ ID NO:2.

Se describe además la composición o la proteína IFN-beta 1a modificada para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en infecciones virales, cáncer, y trastornos neuronales.

La invención proporciona además un método para desamidar una proteína, preferiblemente IFN-beta, más preferiblemente IFN-beta 1a, que comprende:

10 (a) Incubar la proteína para desamidarse bajo condiciones alcalinas durante aproximadamente de 16 a aproximadamente 24 horas, preferiblemente 20 horas; y

(b) Purificar la proteína desamidada,

en donde dicha incubación es a una temperatura de aproximadamente 23°C.

Breve descripción de las figuras

15 Las Figuras 1A y 1B muestran la estructura primaria (SEQ ID NO:1) y la estructura del modelo 3D del IFN-β-1a humano. El IFN-β-1a es una glicoproteína de 166 aminoácidos con una única cadena de carbohidratos unidos al N en el resto de Asn₈₀. La secuencia comprende tres cisteínas de las cuales dos forman un enlace disulfuro (Cys₃₁ y Cys₁₄₁) y una Cys₁₇ está libre y próxima a la superficie, pero enterrada.

20 La Figura 2A muestra los perfiles RP-UPLC o IFN-beta 1a degradada artificial; la Figura 2B es una ampliación parcial de la Figura 2A.

La Figura 3A muestra el nivel de desamidación de IFN-beta 1a no tratada; la Figura 3B es una ampliación parcial de la Figura 3A.

La Figura 4A muestra el nivel de desamidación de IFN-beta 1a desamidada artificialmente; la Figura 4B es una ampliación parcial de la Figura 4A.

25 La Figura 5 muestra el nivel de desamidación de IFN-beta 1a no tratada y IFN-beta 1a desamidada artificialmente en una superposición.

La Figura 6A muestra el nivel de desamidación de IFN-beta 1a artificialmente des-sialilada; la Figura 6B es una ampliación parcial de la Figura 6A.

30 La Figura 7A muestra el nivel de desamidación de IFN-beta 1a artificialmente desamidada y des-sialilada; la Figura 7B es una ampliación parcial de la Figura 7A.

La Figura 8A y B muestran el nivel de desamidación de IFN-beta 1a artificialmente des-sialilada y artificialmente desamidada y IFN-beta 1a des-sialilada en una superposición.

La Figura 9 muestra un bioanálisis inmunomodulador de MHC de clase I: curvas de respuesta a la dosis.

La Figura 10 muestra la actividad biológica inmunomoduladora de IFN-beta 1a.

35 La Figura 11 muestra la actividad antiviral mediante el sistema A549/EMCV: curvas de respuesta a la dosis.

La Figura 12 muestra la actividad antiviral de IFN-beta 1a.

Descripción detallada de la invención

40 La presente memoria describe una composición que comprende un interferón-beta (IFN-beta), preferiblemente IFN-beta 1a, una proteína que al menos el 80% de la cual se desamida en un aminoácido asparagina localizado en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 25 de aminoácido de una proteína del interferón-beta 1a según SEQ ID NO: 1 (véase la Figura 1).

Además, se describe una proteína IFN-beta 1a en donde el aminoácido asparagina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 25 de aminoácido de una proteína interferón-beta 1a según SEQ ID NO: 1 se desamida.

45 La proteína de IFN-beta 1a modificada como se describe en la presente memoria tiene una secuencia como se define en SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, al menos el 85%, 90%, 95% o al menos el 96% de la proteína IFN-beta, por ejemplo, IFN-beta 1a, se desamida en la composición, lo más preferible el 96%.

La desamidación es una de las rutas de modificación posibles de proteínas. Este tipo de modificación ocurre principalmente en restos de asparagina y glutamina. Para cada asparagina sometida a desamidación, se forman tres posibles productos modificados:

- El intermedio de succinimida (donde la proteína de asparaginilo ha perdido una molécula de amoniaco)
- La proteína de aspartilo (donde la asparagina se ha convertido en ácido aspártico)
- La proteína de isoaspartilo (donde la asparagina se ha convertido en ácido iso-aspártico; en este caso la columna vertebral de la proteína continúa en el COOH de la cadena lateral del ácido aspártico, en lugar del COOH del aminoácido)

Los dos últimos productos modificados producen un cambio en la carga neta de la proteína, ya que la cadena lateral de amida neutra de la asparagina se ha convertido en el grupo carboxilo más ácido del ácido aspártico.

Sin estar vinculado a ninguna teoría, se espera que según la posición espacial de Asn25 (véase Figura 1B), su desamidación a Asp25 incrementa las interacciones electrostáticas con un Arg147 espacialmente cercano con la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno adicionales con Arg147 y Thr144. La interacción electrostática entre el aspartato y arginina se puede distribuir sobre dos átomos de oxígeno del carboxilato y/o dos centros de nitrógeno del grupo arginina guanidinio como se muestra en la Figura 1B.

La composición como se describe en la presente memoria comprende una proteína IFN-beta desamidada, por ejemplo, IFN-beta 1a, en la que el resto de asparagina del aminoácido asparagina que se va a desamidar se sustituye por un resto de aspartato, un resto de iso-aspartato o un resto de imidida cíclica tal como succinimida. Preferiblemente, aproximadamente del 65% a aproximadamente el 70%, más preferiblemente aproximadamente el 68% del resto de asparagina se sustituye por aspartato, aproximadamente del 15% a aproximadamente el 20%, más preferiblemente aproximadamente el 18%, se sustituye por isoaspartato y aproximadamente del 8% a aproximadamente el 13%, preferiblemente aproximadamente el 11%, se sustituye por succinimida.

De manera similar, en la proteína de IFN-beta 1a modificada como se describe en la presente memoria, el resto de asparagina del aminoácido asparagina que se va a desamidar se sustituye por un resto de aspartato, un resto de iso-aspartato o un resto de imidida cíclica tal como succinimida.

Las composiciones como se describen en la presente memoria muestran además una actividad inmunomoduladora incrementada, preferiblemente una regulación posterior incrementada de los complejos de MHC de clase I en comparación con una proteína IFN-beta, preferiblemente de la SEQ ID NO:1, producida en células CHO. En particular, debido al aumento de la regulación posterior incrementada de MHC de clase I, las proteínas INF-beta tanto desamidadas como modificadas, como se describe en la presente memoria, pueden desempeñar un papel en la inmunoterapia del cáncer o la vacunación antiviral mediante la restauración de la presentación de antígenos en las superficies celulares del tumor o las células infectadas que a su vez daría como resultado un aumento en el número de dianas en las superficies celulares para la actividad de los CTL con el consiguiente aumento de la eficacia en términos de la actividad de destrucción de células por los CTL. Esta actividad inmunomoduladora podría explotarse en monoterapias con IFN-beta o en combinación con terapias convencionales, como las terapias antivíricas o contra el cáncer (inmunoterapia).

Las composiciones como se describe en la presente memoria muestran además una actividad antiviral incrementada (véase ejemplo 3.2).

Además, tanto la proteína IFN-beta 1a modificada como la composición descritas en la presente memoria podrían comprender una proteína IFN-beta que está glicosilada, particularmente sialilada. La glicosilación podría ser una glicosilación de unión al N unida a un nitrógeno de un resto de asparagina o arginina; una glicosilación de unión al O unida al oxígeno del hidroxilo de un resto de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina o hidroxiprolina; una glicosilación de unión a fosfo-serina unida a restos de serina o una glicosilación de unión al C unida a un carbono en un resto de triptófano. Preferiblemente, la glicosilación es una glicosilación de unión al N. Lo más preferible, la glicosilación se une a una asparagina que corresponde a la asparagina 80 de SEQ ID NO:1.

Además, tanto la proteína IFN-beta 1a modificada como la composición descritas en la presente memoria podrían comprender una proteína IFN-beta que tenga el patrón de glicosilación de una proteína IFN-beta producida en cualquier célula eucariótica, tal como las células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (293T), células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), células de leucemia de células T humanas (Jurkat), células de leucemia linfoblástica aguda de células T humanas (Molt4), línea de células B inmortalizadas con EBV humano (Dakiki), células de rhabdomyosarcoma humano (RD) y células de fibrosarcoma humano (HT1080), preferiblemente células CHO.

Las cadenas de glicano de la proteína IFN-beta 1a modificada podrían ser una organización tri o tetra-antenaria,

preferiblemente como se realiza en las células CHO.

Además, tanto la proteína IFN-beta 1a modificada como la composición descritas en la presente memoria podrían comprender una proteína IFN-beta que está sialilada, preferiblemente con ácido N-acetilneuramínico, al final de las cadenas de glicano unidas a dicha proteína IFN-beta 1a modificada. Dado que la modificación del grupo amino del ácido siálico (por ejemplo, por un grupo acetilo o glicolilo) y la cantidad del ácido siálico por cada antena de glicano (por ejemplo, tri o tetra sialilación) es específica del tejido, la sialilación de las cadenas de glicano es preferiblemente la sialilación como se realiza por las células CHO. En una realización preferida particular, todas las cadenas laterales de glicano están sialiladas, por ejemplo, como se realiza por las células CHO.

La composición como se describe en la presente memoria podría comprender como agente activo una proteína IFN-beta sola o una proteína IFN-beta en combinación con otros agentes terapéuticos como se describe en la presente memoria, opcionalmente junto con un vehículo, adyuvante o aditivo farmacéuticamente aceptable como se describe en la presente memoria, por ejemplo, como una disolución acuosa opcionalmente con vehículos, adyuvantes o aditivos adicionales como se describe en la presente memoria.

De manera similar, la proteína IFN-beta 1a modificada, como se describe en la presente memoria se puede utilizar sola o en combinación con otros agentes terapéuticos o vehículos farmacéuticamente aceptables, ambos como se describen en la presente memoria.

La composición como se describe en la presente memoria podría comprender un vehículo, adyuvante o aditivo farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos, adyuvantes o aditivos se conocen en la técnica y dependen de la indicación y localización de la aplicación en el cuerpo. La elección de ellos también podría considerar la tasa de liberación del agente terapéutico, por ejemplo, liberación inmediata o con retraso. Tanto las composiciones como la proteína IFN-beta 1a modificada, tal como se describen en la presente memoria, son preferiblemente para administración sistemática. La composición o la proteína IFN-beta 1a modificada se pueden administrar por vía oral, localmente, por ejemplo, en la piel, o por vía parenteral, preferiblemente mediante inyección de infusión.

Los vehículos, adyuvantes o aditivos para administración parenteral son agua esterilizada, reactivos que influyen en el pH, tales como ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos, tampones para ajuste del pH, agentes de isotonicidad, tales como cloruro de sodio, hidrógeno carbonato de sodio, glucosa, fructosa, detergentes y emulgentes, tales como Tween®, Cremophor®, aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de ricino, éster de ácido graso sintético, vehículos poliméricos, agentes complejantes, conservantes y estabilizantes.

La composición como se describe en la presente memoria podría comprender además un antioxidante, tal como sulfito de sodio o metionina, preferiblemente metionina.

De manera similar, la proteína IFN-beta 1a modificada como se describe en la presente memoria podría estar en combinación con un antioxidante como se describe en la presente memoria.

Tanto la composición o la proteína IFN-beta 1a modificada como se describen en la presente memoria es para uso en terapia, como agente inmunomodulador, como una vacuna o en inmunoterapia del cáncer.

Tanto la composición como la proteína IFN-beta 1a modificada como se describe en la presente memoria podrían estar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes antivirales, por ejemplo, ribavirina, vacunas, inmunomoduladores tales como agentes inmunoterapéuticos de tumores, citoquinas, interleucinas o quimioquinas (L-BLP-25 u otros antígenos asociados a tumores).

Una terapia inmunomoduladora se podría diseñar para provocar o amplificar una respuesta inmune. Alternativamente, la terapia inmunomoduladora podría reducir o suprimir la respuesta inmune. En una realización preferida de la invención, la terapia inmunomoduladora provoca o amplifica la respuesta inmune. Tanto la composición de la invención como la proteína IFN-beta 1a modificada como se describen en la presente memoria como agentes inmunomoduladores se podrían utilizar solos o en combinación con otros inmunomoduladores como se describe en la presente memoria.

La vacuna como se describe en la presente memoria podría ser un profiláctico, una vacuna terapéutica o una vacuna contra el cáncer. La vacuna podría comprender además vehículos farmacéuticamente aceptables para inyección, nano-parches o administración oral de la vacuna. Dichos vehículos son conocidos por los expertos en la técnica y podrían comprender adyuvantes, tales como albúmina, conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, formaldehído o timerosal, antibióticos y/o estabilizantes, tales como MSG o 2-fenoxietanol.

Tanto la composición como la proteína IFN-beta 1a modificada como se describe en la presente memoria se podría utilizar en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en infecciones virales, cáncer y trastorno neuronal en un sujeto.

Tanto la composición como la proteína IFN-beta 1a modificada como se describe en la presente memoria se podría utilizar en el tratamiento de infecciones virales causadas por ejemplo por el virus de hepatitis C (HCV), gripe, Dengue, etc. En particular, el VHC puede causar hepatitis C o enfermedades crónicas relacionadas con el hígado,

como cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular, que también se tratan tanto con la composición de la invención como con la proteína IFN-beta 1a modificada como se describe en la presente memoria.

5 Los cánceres que se pueden tratar tanto con la composición como con la proteína IFN-beta 1a modificada descritos en la presente memoria podrían seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, como cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer biliar, cáncer de páncreas, etc.

10 Tanto la composición como la proteína IFN-beta 1a modificada como se describen en la presente memoria se podrían utilizar también para el tratamiento de trastornos neuronales, tales como los traumatismos nerviosos. Por ejemplo, se pueden utilizar para la regeneración de nervios, tales como la regeneración del nervio visual, por ejemplo, en donde dicho tratamiento comprende la regulación de la plasticidad sináptica o la mejora de axonal.

Tanto la composición como la proteína IFN-beta 1a modificada como se describen en la presente memoria se pueden utilizar también para el tratamiento de trastornos neuronales, tales como la esclerosis múltiple.

Un sujeto preferido como se describe en la presente memoria puede ser un paciente de diálisis con una infección por HCV.

15 Los tratamientos como se describen en la presente memoria podrían comprender inmunomodulación, preferiblemente regulación posterior de complejos de MHC de clase I como se describe en la presente memoria.

20 Tanto la composición como la proteína IFN-beta 1a modificada como se describen en la presente memoria podrían utilizarse además como se describe en la presente memoria en combinación con quimioinmunoterapia, quimioterapia, radioterapia, una vacuna y/o un agente terapéutico adicional, tal como un agente antiviral tal como ribavirina, una citoquina tal como IL-2 o IFN-alfa o un anticuerpo quimioterapéutico tal como rituximab.

Por ejemplo, tanto la composición como la proteína IFN-beta 1a modificada como se describen en la presente memoria podrían utilizarse en combinación con quimioinmunoterapia, tal como inmunoterapias que se basan en antígenos asociados a tumores, por ejemplo, en combinación con L-BPL25.

25 La proteína IFN-beta 1a modificada como se describe en la presente memoria se puede utilizar como se describe en la presente memoria en combinación con quimioterapia y/o radioterapia. En particular, la proteína modificada o composición deberían utilizarse para mejorar la respuesta inmune antitumoral a través de la citotoxicidad de las células T durante la quimioterapia metronómica, así como para aumentar la eficacia de la quimio (o radio-) terapia combinada.

La invención proporciona además un método de desamidación de una proteína, que comprende:

- 30 (a) incubar la proteína que se va a desamidar bajo condiciones alcalinas durante aproximadamente de 16 horas a aproximadamente 24 horas, preferiblemente 20 horas; y
- (b) purificar la proteína desamidada,

en donde dicha proteína es IFN-beta, particularmente IFN-beta 1 y en donde dicha incubación es a una temperatura de aproximadamente 23°C.

35 Preferiblemente, la proteína que se va a desamidar es IFN-beta, particularmente IFN-beta 1a.

La incubación como se describe en la presente memoria se podría realizar a un pH de aproximadamente 8,9 a aproximadamente 9,5, preferiblemente a aproximadamente pH 9,2.

40 Además, la incubación como se describe en la presente memoria se podría realizar en cualquier tampón adecuado para la desamidación. Dichos tampones son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, la incubación se lleva a cabo en hidrógeno carbonato de amonio, más preferiblemente en una concentración final de 0,2M.

La purificación como se describe en la presente memoria puede comprender cualquier método de purificación conocido en la técnica. Preferiblemente, la purificación comprende ultra filtración, más preferiblemente ultra filtración con acetato de amonio a pH 3,8.

Ejemplos

45 1. Preparación de IFN-beta desamidada

Se prepararon diferentes formas degradadas de IFN-β-1a mediante tratamiento químico (pH básico para desamidado), y enzimática (sialidasa para des-sialilado) del material de IFN—1a DS (sustancia farmacéutica).

50 El diseño experimental preveía la caracterización físico-química y biológica de IFN-β-1a no tratada y desamidada artificialmente destinada a evaluar el impacto de la desamidación en la actividad inmunomoduladora y antiviral de IFN-β-1a. Además, el diseño incluyó el ensayo de las muestras no tratadas y desamidadas después de la

eliminación del ácido siálico, así como para evaluar el papel, si lo hubiera, de la sialilación en la regulación de estas actividades biológicas específicas.

Las muestras degradadas artificialmente se han preparado como se describe a continuación:

- 5 • La desamidación se llevó a cabo incubando la IFN-beta-1a DS en bicarbonato de amonio 1,2M a pH 9,2, a 23°C durante 20 horas. La concentración final de bicarbonato de amonio antes de la incubación es aproximadamente de 0,2M y la concentración de IFN-beta-1a es aproximadamente de 0,3 mg/ml. Las condiciones alcalinas se utilizan generalmente para inducir la conversión de asparagina en ácido aspártico y se ha demostrado en el pasado que desamidán eficientemente y consistentemente IFN-β-1a.
- 10 • La des-sialización se llevó a cabo incubando la proteína con Sialidasa de Glyko (ref. GK80040) a pH 6,0, 37°C durante 1 hora. Esta enzima es capaz de liberar específicamente el ácido siálico unido a las estructuras de glicano. Este tratamiento se aplicó a IFN-β-1a tanto nativa como artificialmente desamidada.

Después de cada tratamiento, las muestras se han ultrafiltrado para intercambiar sus tampones con acetato de amonio 50 mM, pH 3,8 (IFN-beta-1a tampón DS) para tener una matriz comparable a la DS sin tratar. Cada muestra degradada de IFN-β-1a se ensayó después para confirmar el éxito del tratamiento, la extensión de la degradación específica y su impacto en la actividad biológica.

2. Resultados en la caracterización físico-química

2.1 Ensayo por RP-UPLC- Resultados

En la Figura 2, se resumen los resultados obtenidos en términos de perfiles de UV y concentración de proteínas para todas las muestras preparadas. Todos los perfiles en la Figura 2 muestran un pico agudo de IFN-β-1a, lo que demuestra un rendimiento cromatográfico óptimo tanto para el IFN-β-1a no tratado, así como para todas las muestras degradadas artificialmente.

Tabla 1: Contenido de proteínas por RP-UPLC

Muestra	Contenido de IFN-β-1a µg/mL
IFN-β-1a DS desamidada artificialmente	898
IFN-β-1a DS desamidada y des-sialilada artificialmente	691
IFN-β-1a DS des-sialilada artificialmente	300
IFN-β-1a DS no tratada	382

Los datos reportados anteriormente se han empleado como contenido de referencia dentro del estudio.

25 La muestra correspondiente a IFN-beta 1a no tratada muestra el contenido de proteína alineado con el valor esperado para un IFN-beta-1a no tratado (~ 300 µg/ml). El contenido de proteína detectado tanto para IFN-beta 1a desamidado artificialmente como IFN-beta 1a desamidado y des-sialilado artificialmente es mayor que IFN-beta 1a no tratada debido a la ultrafiltración de la muestra y la concentración en Amicon Ultra.

30 Todas las muestras han mostrado una concentración de IFN-β-1a y una cantidad adecuadas para llevar a cabo todos los ensayos de caracterización planificados.

2.2 Nivel de desamidación mediante Peptide Mapping/UPLC- Resultados

Como se muestra en las Figuras 3 a 8, hay un cambio evidente en la abundancia máxima relacionada con las especies desamidadas. Esta observación ha sido confirmada y cuantificada en la siguiente Tabla.

Tabla 2: nivel de desamidación mediante peptide mapping/UPLC

Nombre de la muestra	% de desamido
IFN-β-1a DS desamidada artificialmente	96,76
IFN-β-1a DS desamidada y des-sialilada artificialmente	96,67
IFN-β-1a DS des-sialilada artificialmente	18,00
IFN-β-1a DS no tratada	17,32

35 Como se reporta en la Tabla anterior, se ha demostrado claramente que el tratamiento de desamidación aplicado garantiza una desamidación de IFN-β-1a casi completa con un nivel de casi el 97%. Además, el tratamiento de des-

sialilacion no altera el nivel de desamidación con respecto a la muestra no tratada.

3. Resultados en la caracterización biológica

Los resultados relativos a la expresión de MHC de clase I, así como a la actividad antiviral se reportan en las secciones actuales.

5 3.1 Expresión de MHC de clase I mediante bioensayos inmunomoduladores

El ensayo inmunomodulador se basa en la capacidad de IFN- β -1a para regular la expresión de MHC de clase I en células A549 de forma relacionada con la dosis. La expresión de MHC de clase I se detecta mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo marcado con un fluorescente específico.

10 Brevemente, las células A549 (32.000 células/pocillo) se incubaron con 12 concentraciones diferentes de IFN- β -1a que varían desde 0,000381 ng/mL hasta 1600 ng/mL durante 48 horas a 37°C, 5% de CO₂. Para evaluar el nivel de expresión basal de MHC de clase I, también se procesaron células no tratadas. Después, las células se recolectaron y la expresión de MHC de clase I se evaluó mediante análisis FACS utilizando un anticuerpo anti-hMHC de clase I conjugado con FITC. El análisis FACS se realizó según el procedimiento interno.

15 La curva de respuesta a la dosis de la referencia y de las muestras se ajusta mediante el algoritmo 4PL y la concentración capaz de dirigir el 50% de la expresión máxima posible (EC₅₀) se calcula automáticamente.

Los resultados se expresan como porcentaje de actividad con respecto al material de referencia sobre la base de los valores de EC₅₀. Para cada muestra, los resultados son el promedio de tres ensayos independientes realizados en tres semanas diferentes y cada uno de los cuales está compuesto por dos ejecuciones independientes (un total de 6 ejecuciones analíticas).

20 Antes de calcular la actividad biológica, se comprobó el comportamiento biológico de todas las muestras como se muestra en la Figura 9.

Las curvas de dosis-respuesta de todas las muestras tenían una meseta y una pendiente superior e inferior comparables, lo que demuestra la similitud de la curva necesaria para una evaluación adicional. Los valores de potencia se recogen en la Figura 10 junto con una representación gráfica para comprender mejor las diferencias.

25 Los datos reportados en la Figura 10 anterior muestra una regulación posterior de la expresión de MHC de clase I mediada por las muestras de IFN- β -1a desamidada comparado con la IFN- β -1a no tratada y la IFN- β -1a des-sialilada. Concluyendo a partir de los datos obtenidos, que el proceso de desamidación conduce a un IFN- β -1a con una doble capacidad adquirida para regular después la expresión de su punto final biológico revelado. Este resultado es evidente al comparar la IFN- β -1a desamidada frente a la IFN- β -1a no tratada, así como la IFN- β -1a desamidada/des-sialilada frente a la IFN- β -1a des-sialilada. Se puede observar que el aumento de la actividad biológica dependiente de la desamidación depende de la sialilación de IFN- β -1a.

3.2 Actividad antiviral mediante el sistema A549/EMCV

35 La actividad antiviral de IFN-beta-1a se evaluó midiendo la protección ejercida por IFN-beta-1a en células A549 frente al efecto citopático del virus de la encefalomiocarditis (EMCV). Una breve descripción del método se muestra a continuación.

40 Las células A549 se colocaron en placas (40.000 células/pocillo) de microtitulación de 96 pocillos que contenían IFN-beta-1a en un intervalo de concentración que varía desde 0,016 ng/ml hasta 2 ng/ml y después se incubaron durante 20 horas a 37°C, 5% de CO₂. Al final del tiempo de incubación, la suspensión de EMCV se añadió a cada pocillo. Después de aproximadamente 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂, se agregó ATPLite 1 Step y los cps se midieron en cada pocillo con un lector de microplacas de luminómetro para evaluar la proliferación y la vitalidad de las células.

La curva de respuesta a la dosis de la referencia y las muestras se ajusta mediante el algoritmo 4PL y la concentración capaz de dirigir el 50% de la expresión máxima posible (EC₅₀) se calcula automáticamente.

45 Los resultados se expresan como porcentaje de actividad con respecto al material de referencia sobre la base de los valores de EC₅₀. Para cada muestra, los resultados son el promedio de tres ensayos independientes realizados en tres días diferentes.

Antes de calcular la actividad biológica, se verificó el comportamiento biológico de todas las muestras como se muestra en la Figura 11.

50 Los valores de potencia que miden la actividad biológica de cada muestra de IFN- β -1a ensayados se evaluaron sobre la base de la EC₅₀ recogida, como relación en porcentaje entre la EC₅₀ de RHS IFN- β -1a y la EC₅₀ de cada muestra ensayada (% de potencia relativa estimada). Los experimentos se realizaron de forma independiente en un número de n = 2 veces y se calculó el CV% (coeficiente de varianza). Los resultados se muestran en la Figura 12.

Los datos indicados en la Figura 12 muestran una mayor actividad antiviral en las células A549 mediada por las muestras de IFN- β -1a desamidada en comparación con la IFN- β -1a no tratadas.

A partir de los datos obtenidos, el proceso de desamidación conduce a una IFN- β -1a con una mayor capacidad adquirida para aumentar la respuesta biológica revelada.

- 5 Por el contrario, esta característica desamidada no se puede ver en una muestra de IFN- β -1a desamidada/des-sialilada cuando se compara con la IFN- β -1a des-sialilada, el proceso de desamidación en este caso no es capaz de rescatar el efecto del proceso de des-sialización en la actividad biológica.

Listado de secuencias

- 10 <110> ARES Trading S. A.
<120> Nuevos análogos de la proteína IFN-beta
<130> P 14/051 WO/PCT
15 <150> EP14163483.2
<151> 04.04.2014
<160> 2
20 <170> Patente en versión 3.5
<210> 1
<211> 166
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

ES 2 736 503 T3

```

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1          5          10

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20          25          30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35          40          45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50          55          60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65          70          75          80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85          90          95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100          105          110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115          120          125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130          135          140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145          150          155          160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

```

- <210> 2
- <211> 166
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> IFN-beta 1a desamidada
- 10 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (25)..(25)
- <223> Xaa es aspartato, isoaspartato o succinimida
- 15 <400> 2

ES 2 736 503 T3

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Xaa Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

REIVINDICACIONES

1. Un método de desamidación de una proteína, que comprende:
 - (a) incubar la proteína que se va a desamidar bajo condiciones alcalinas durante aproximadamente de 16 a aproximadamente 24 horas, preferiblemente 20 horas; y
 - 5 (b) purificar la proteína desamidata,
en donde dicha proteína es IFN-beta, particularmente IFN-beta 1 y en donde dicha incubación es a una temperatura de aproximadamente 23°C.
2. El método según la reivindicación 1 en donde dicha incubación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 8,9 a aproximadamente 9,5.
- 10 3. El método según la reivindicación 2 en donde dicha purificación comprende ultra-filtración.

Figura 1a: secuencia de aminoácidos de r-hIFN-β-1a

1	M	S	Y	N	L	L	G	F	L	Q	R	S	S	N	F	Q	C	Q	K	L	20
	L	W	Q	L	N	G	R	L	E	Y	C	L	K	D	R	M	N	F	D	I	30
	P	E	E	I	K	Q	L	Q	Q	F	Q	K	E	D	A	A	L	T	I	Y	40
	E	M	L	Q	N	I	F	A	I	F	R	Q	D	S	S	S	T	G	W	N	50
	E	T	I	V	E	N	L	L	A	N	V	Y	H	Q	I	N	H	L	K	T	60
	V	L	E	E	K	L	E	K	E	D	F	T	R	G	K	L	M	S	S	L	70
	H	L	K	R	Y	Y	G	R	I	L	H	Y	L	K	A	K	E	Y	S	H	80
	C	A	W	T	I	V	R	V	E	I	L	R	N	F	Y	F	I	N	R	L	90
	T	G	Y	L	R	N														100	
																					110
																					120
																					130
																					140
																					150
																					160
																					166

Figura 1B: representación esquemática de la estructura de r-hIFN- β -1^a

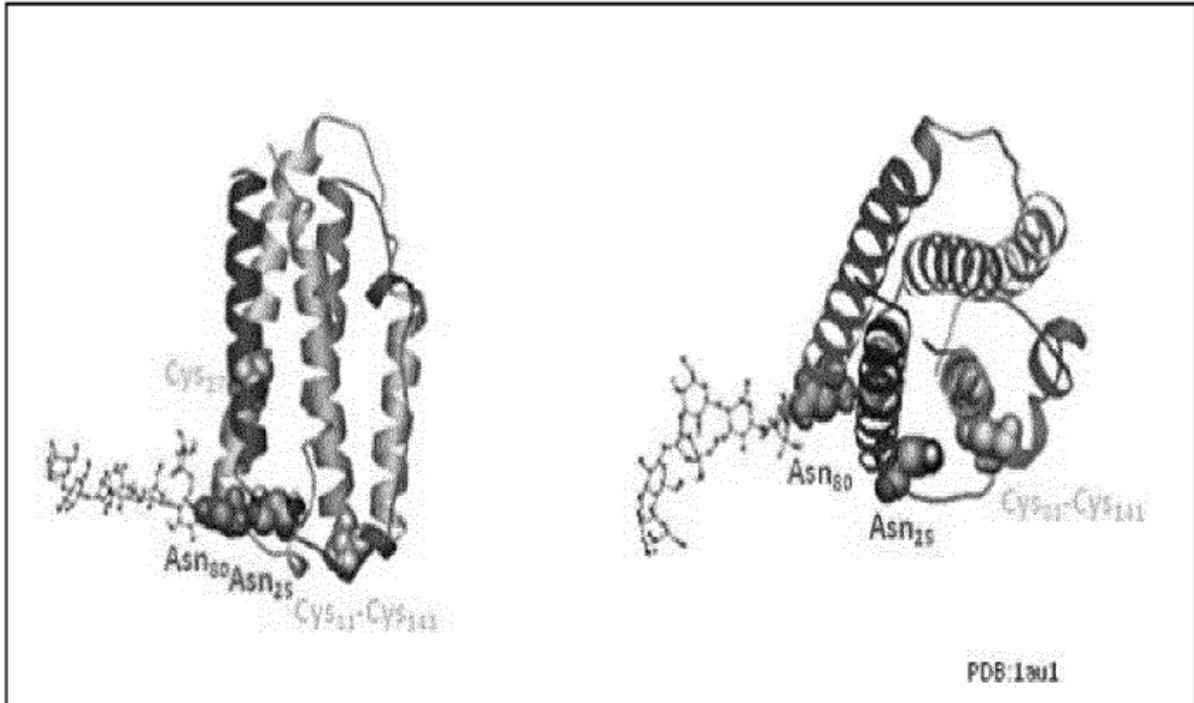


Figura 2a: perfil RP-UPLC de IFN- β -1a degradada artificialmente

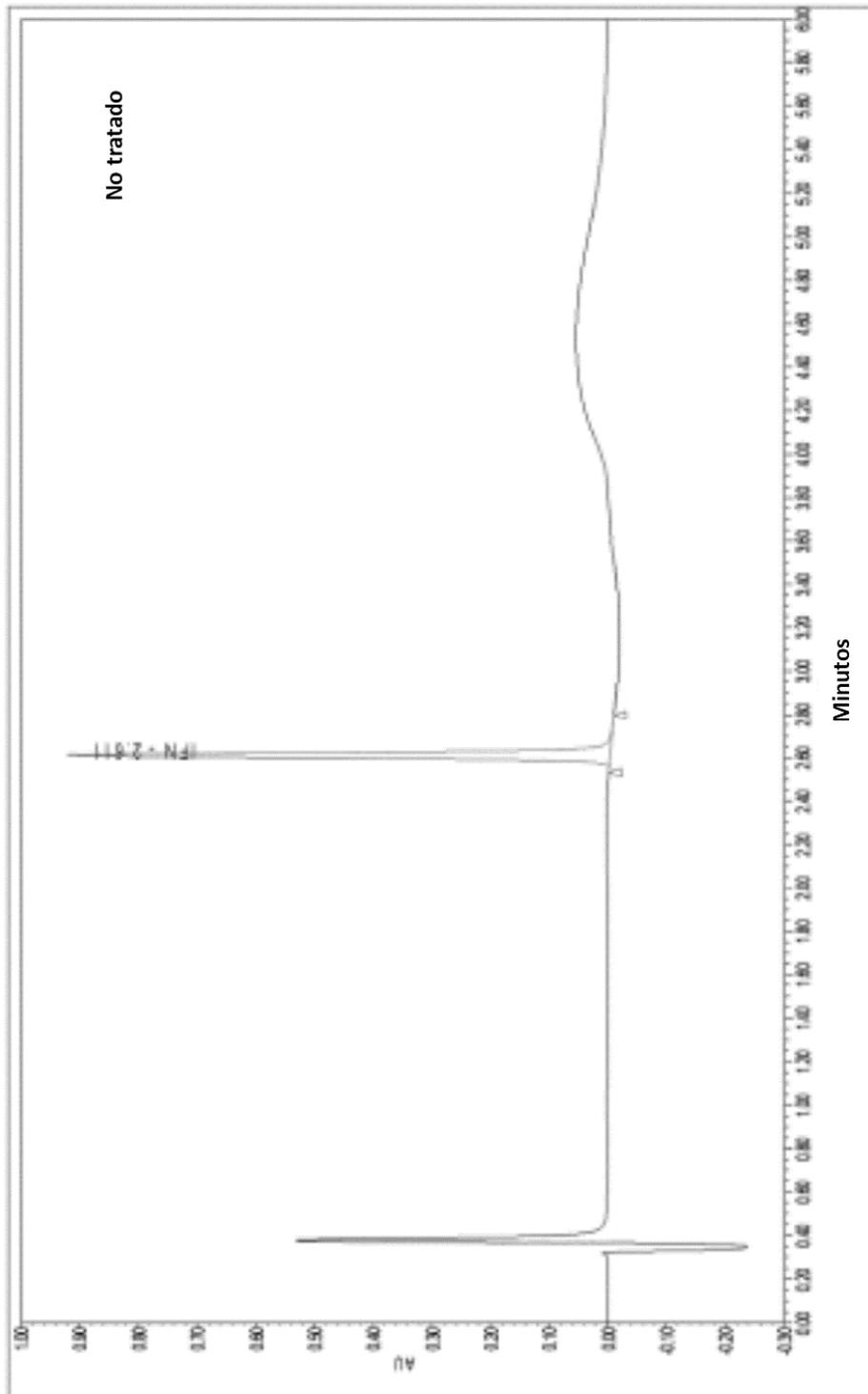


Figura 2a: continuación

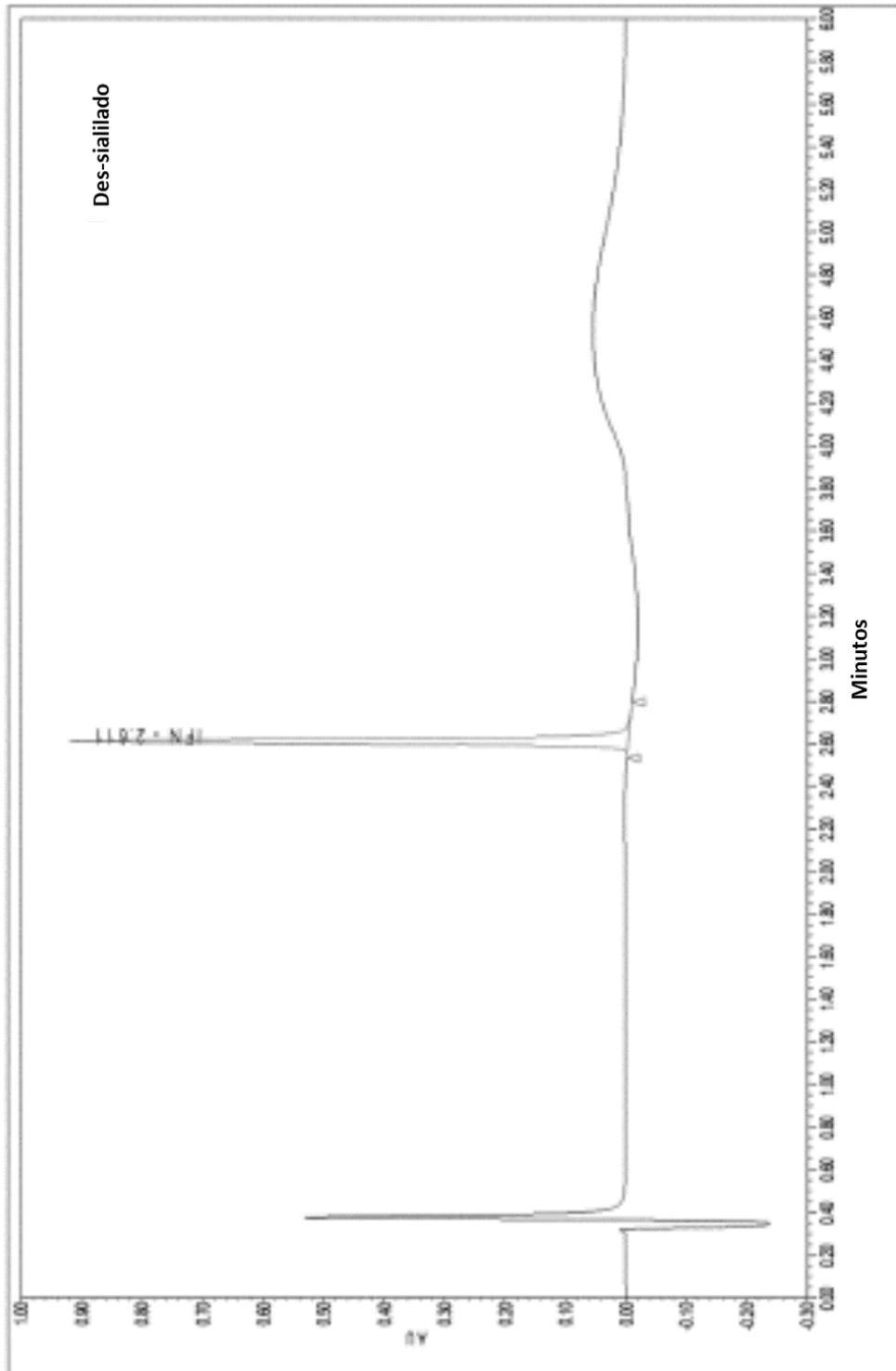


Figura 2A: continuación

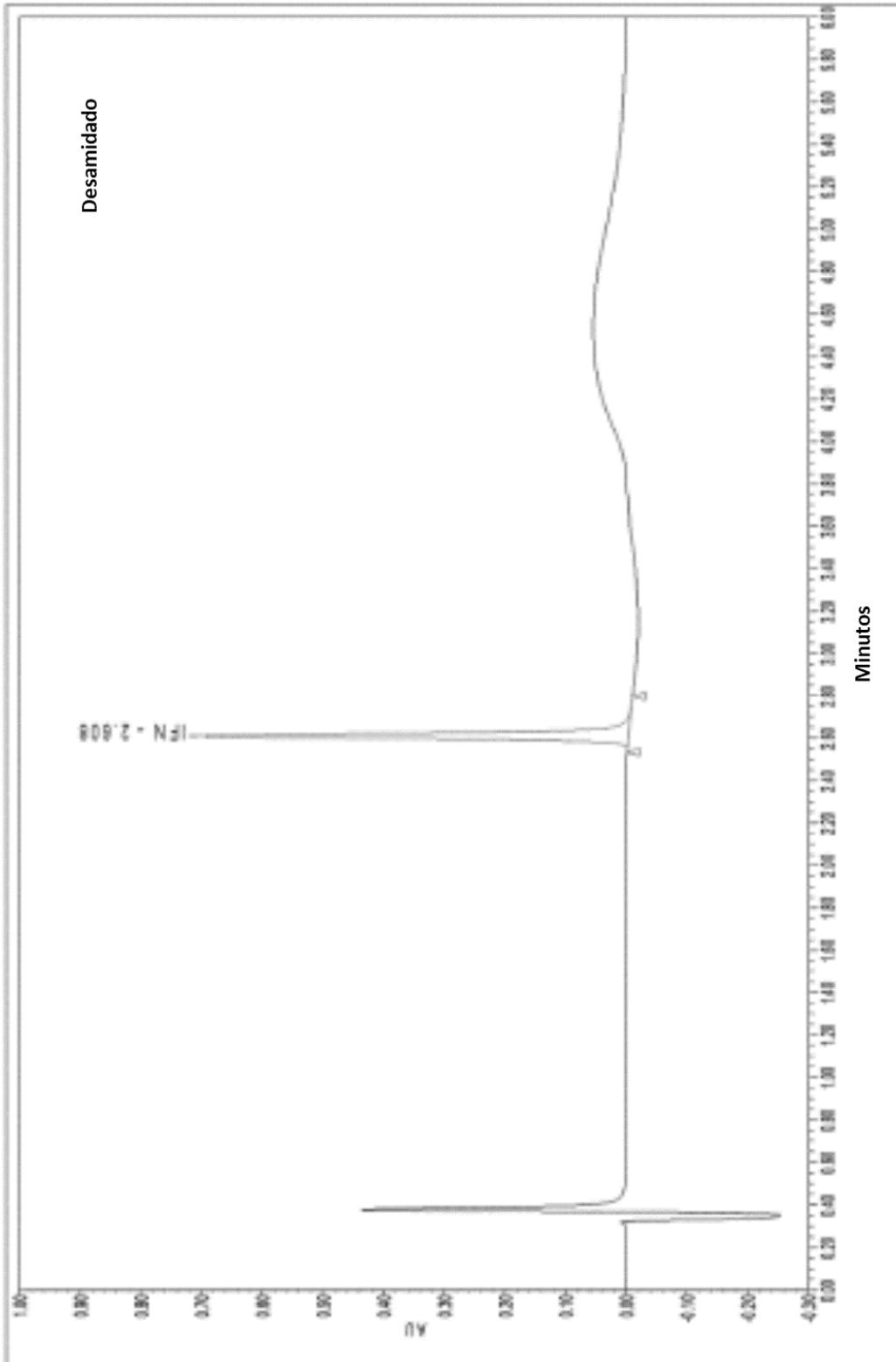


Figura 2A: continuación

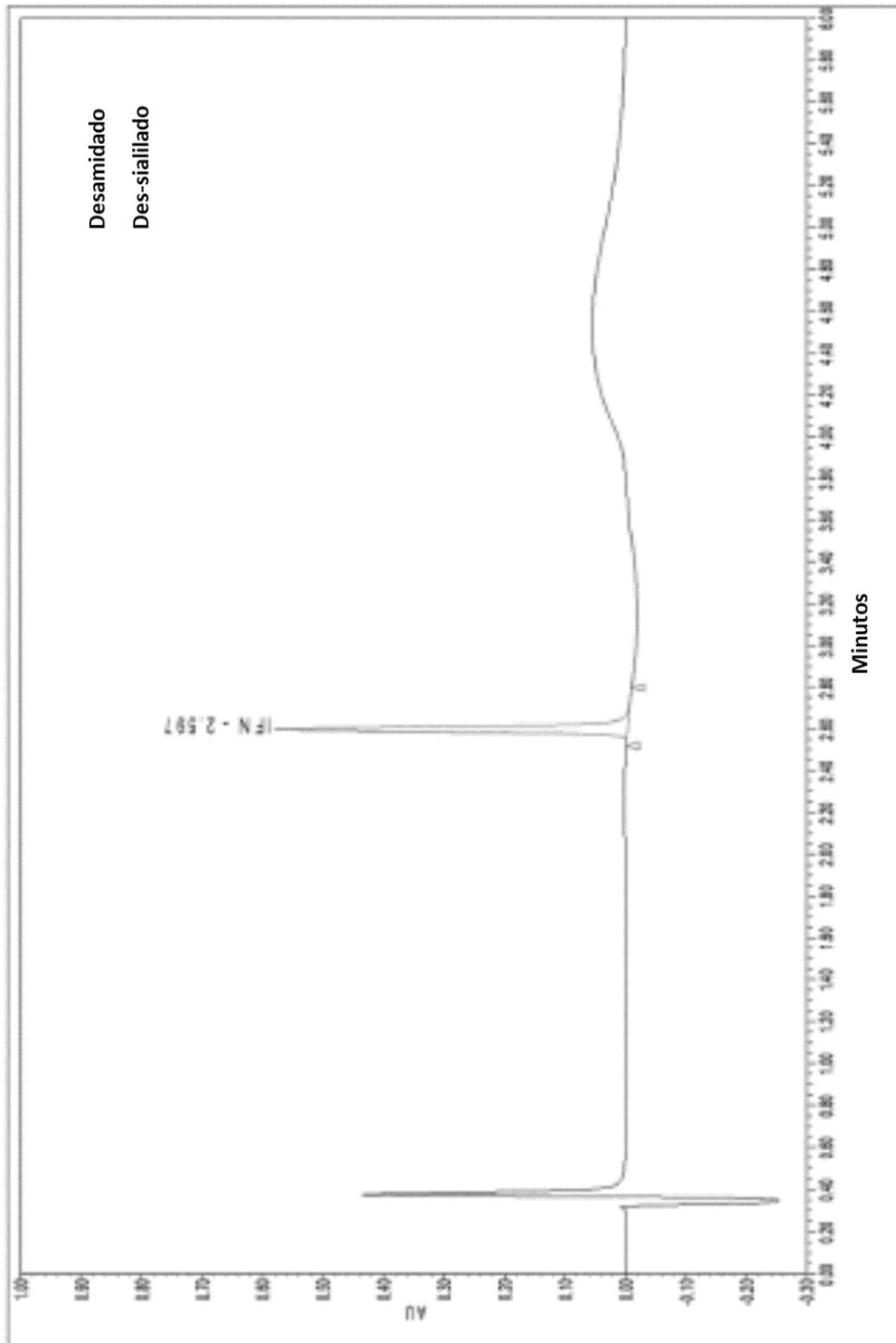


Figura 2B: RP-UPLC no tratado y ampliado/des-sialilado/desamidado/des-sialilado-desamidado

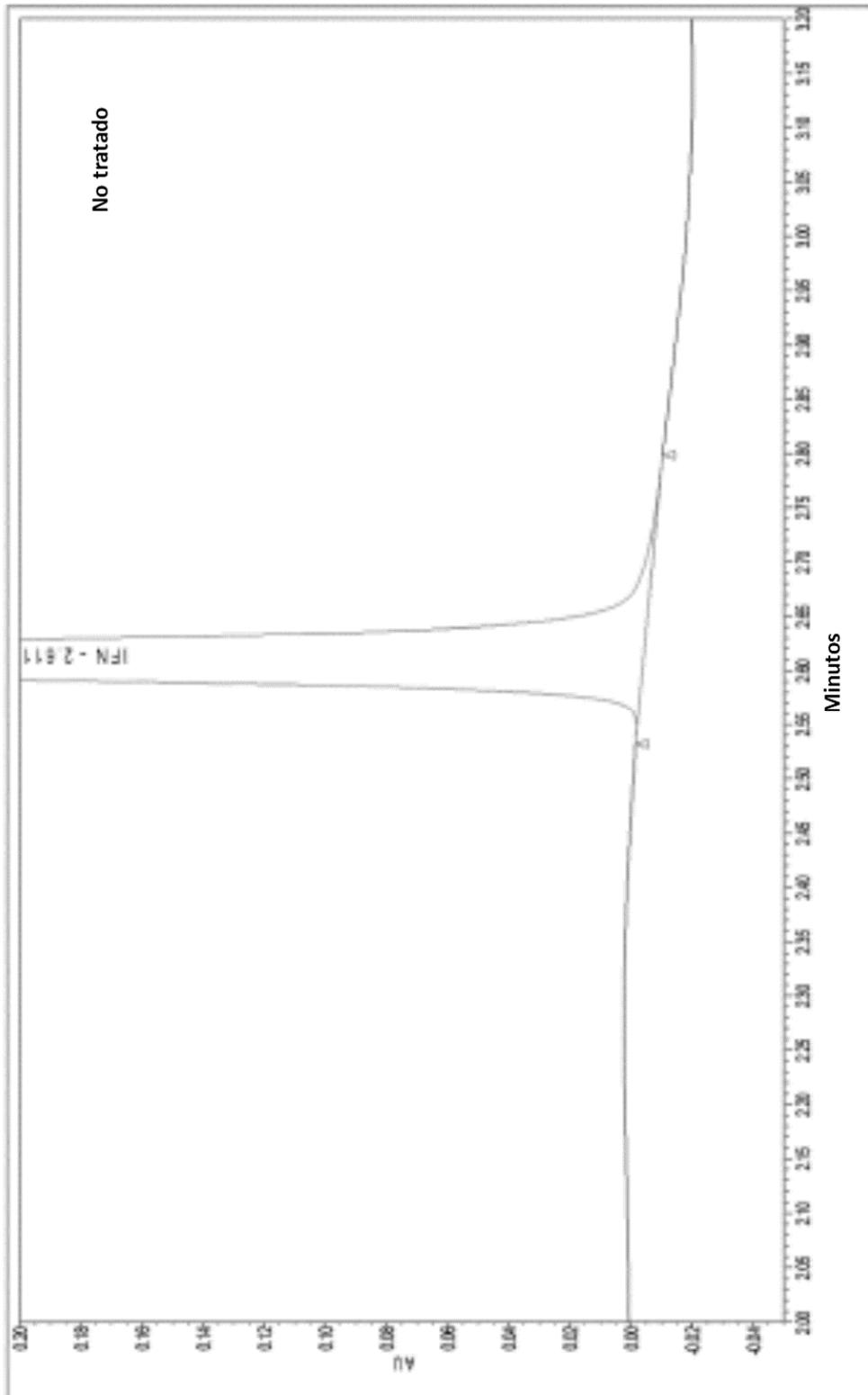


Figura 2B: continuación

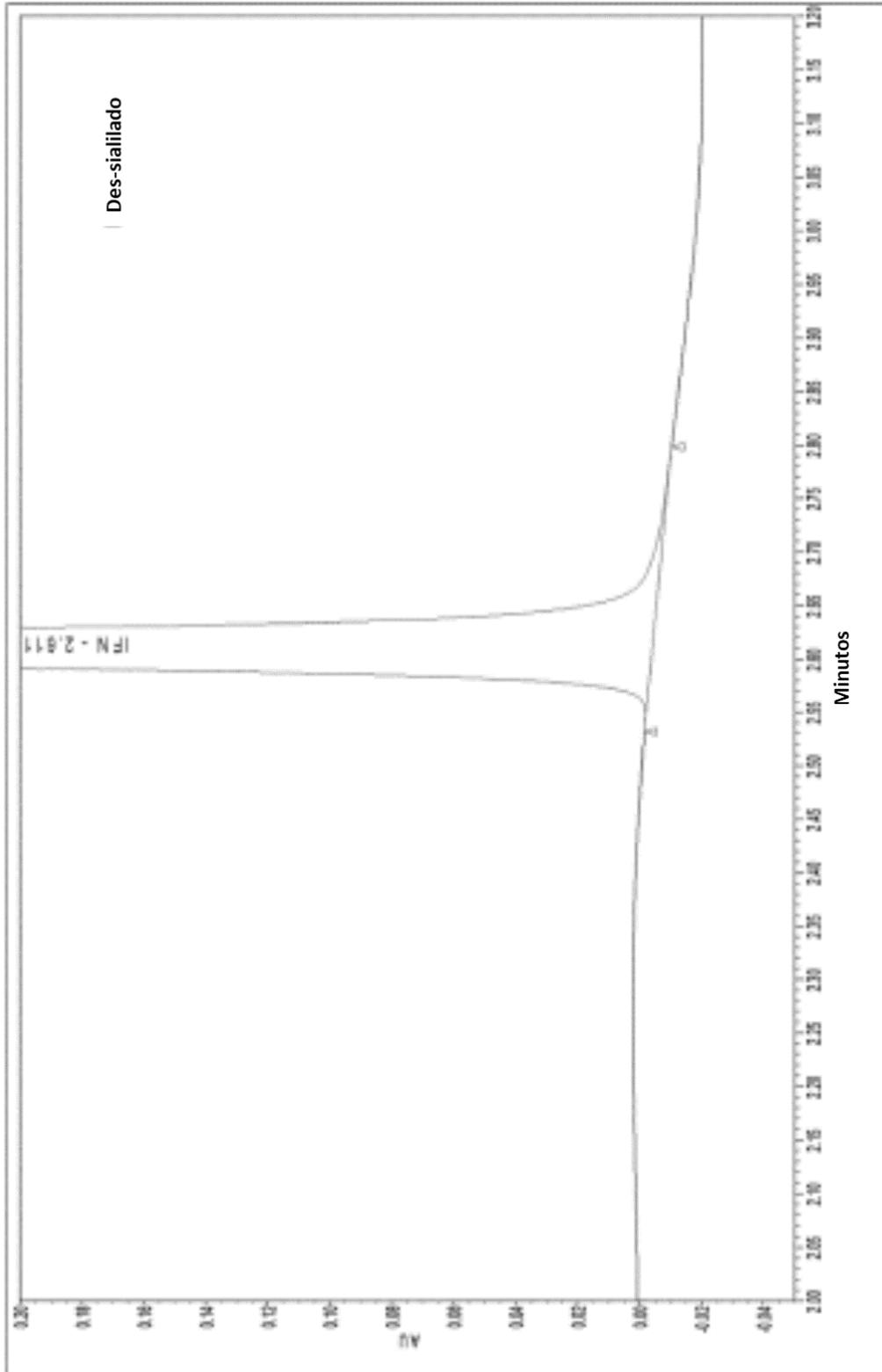


Figura 2B: continuación

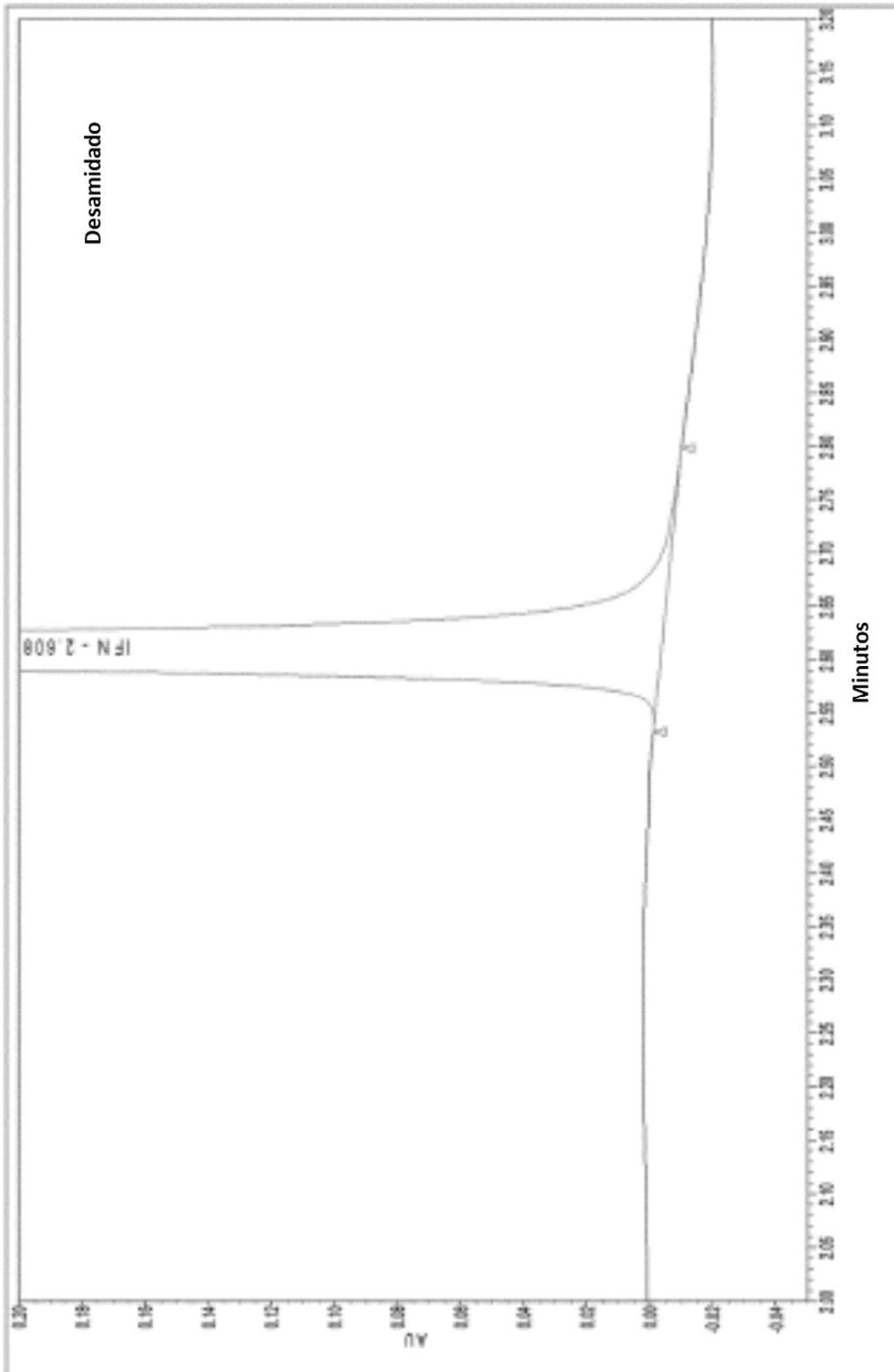


Figura 2B: continuación

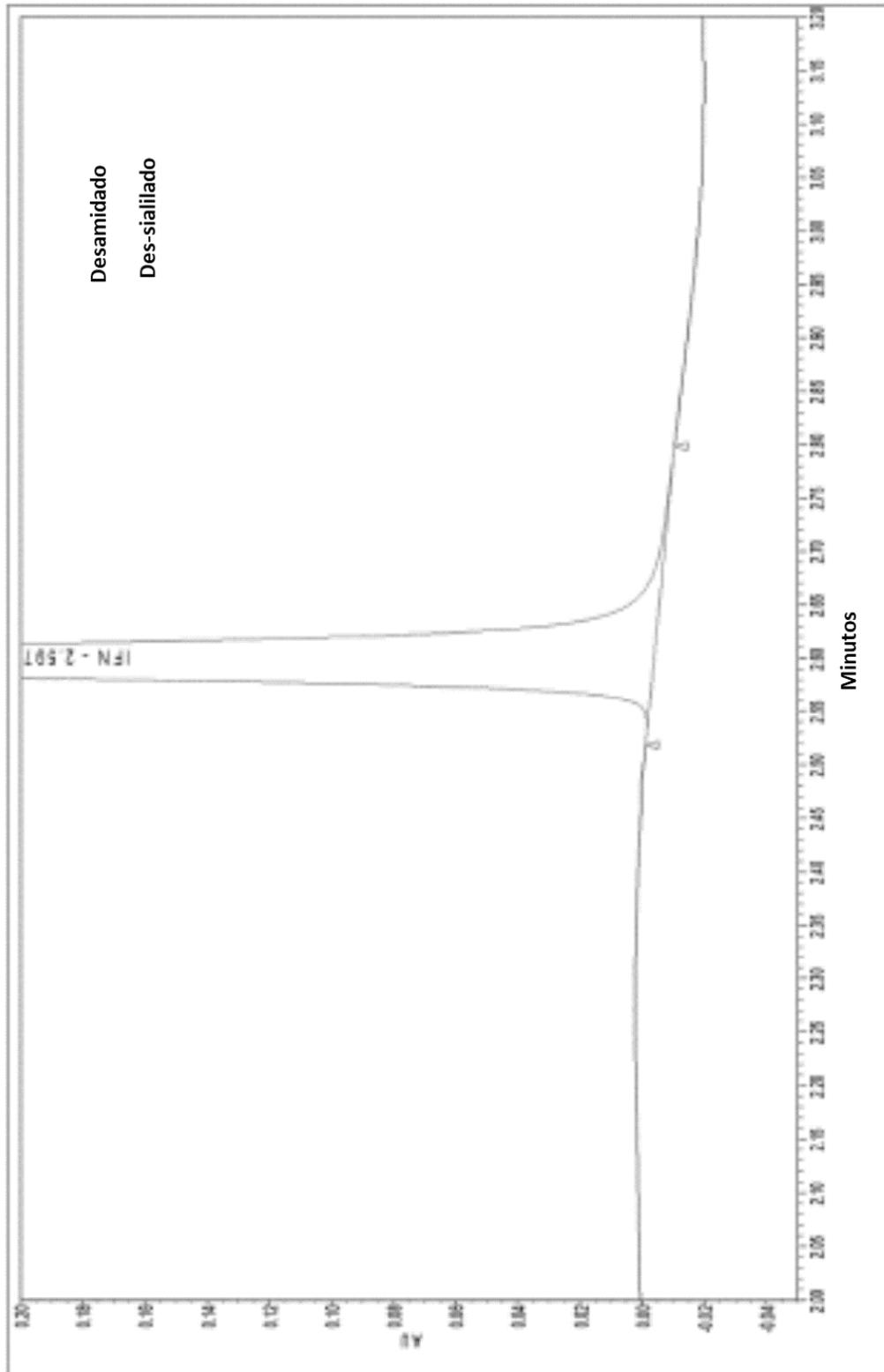


Figura 3A: nivel de desamidación de IFN-β-1a no tratada

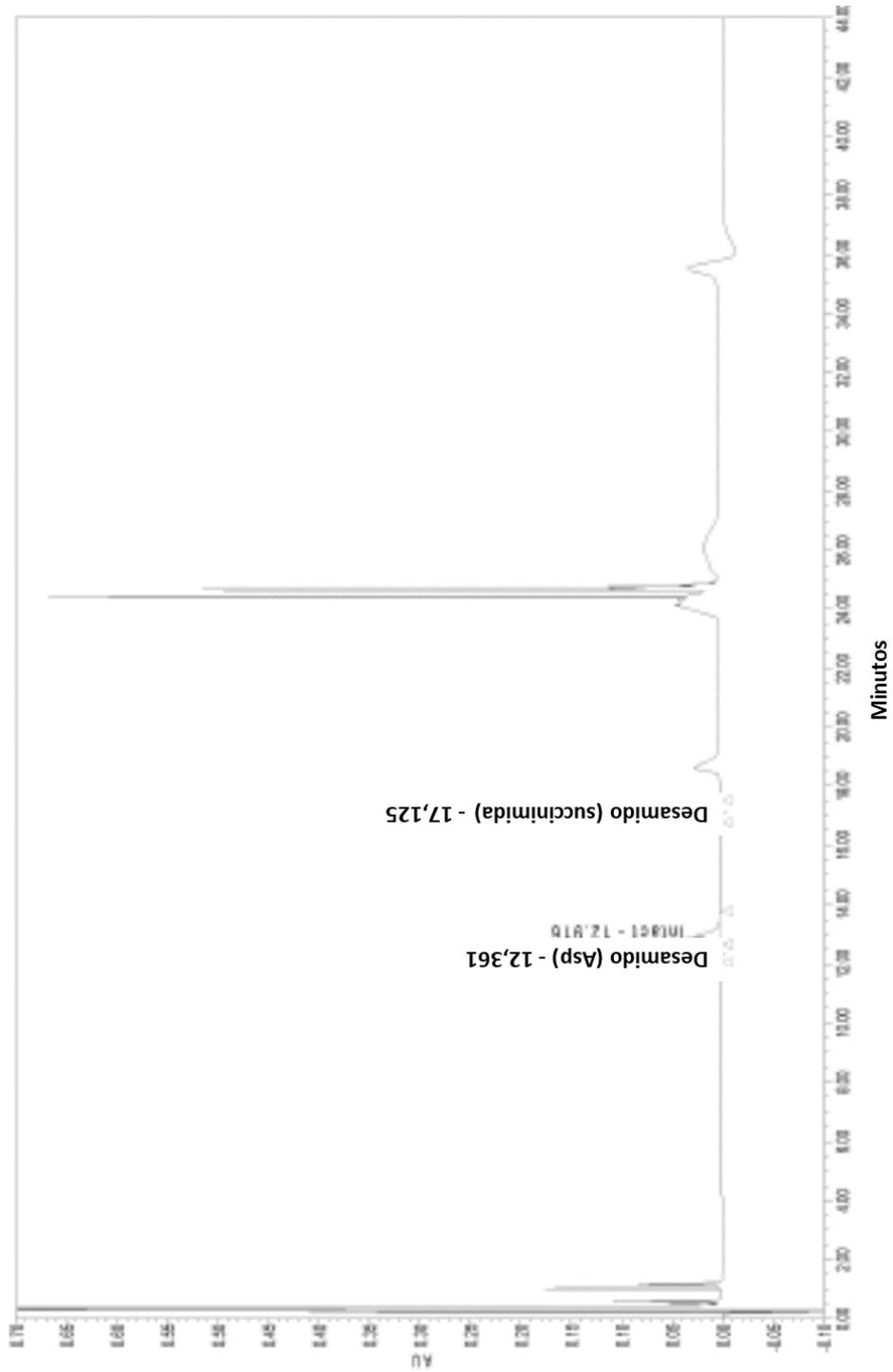


Figura 3B

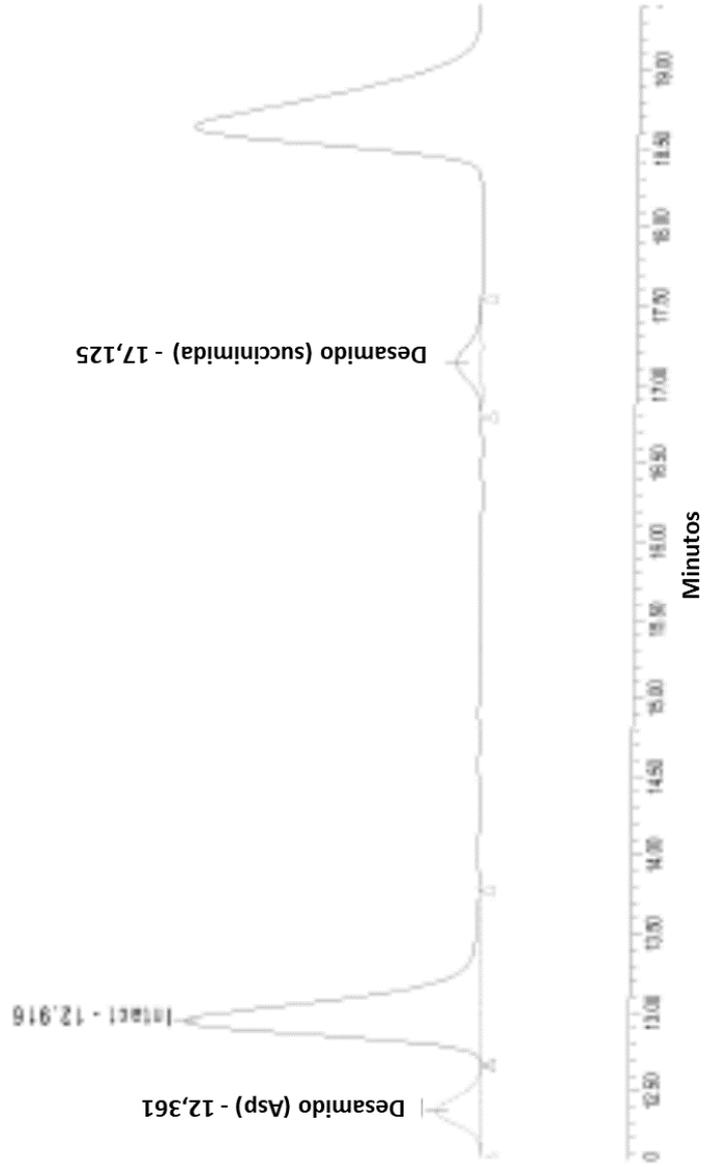


Figura 4A: nivel de desamidación de IFN-β-1a DS desamidado artificialmente

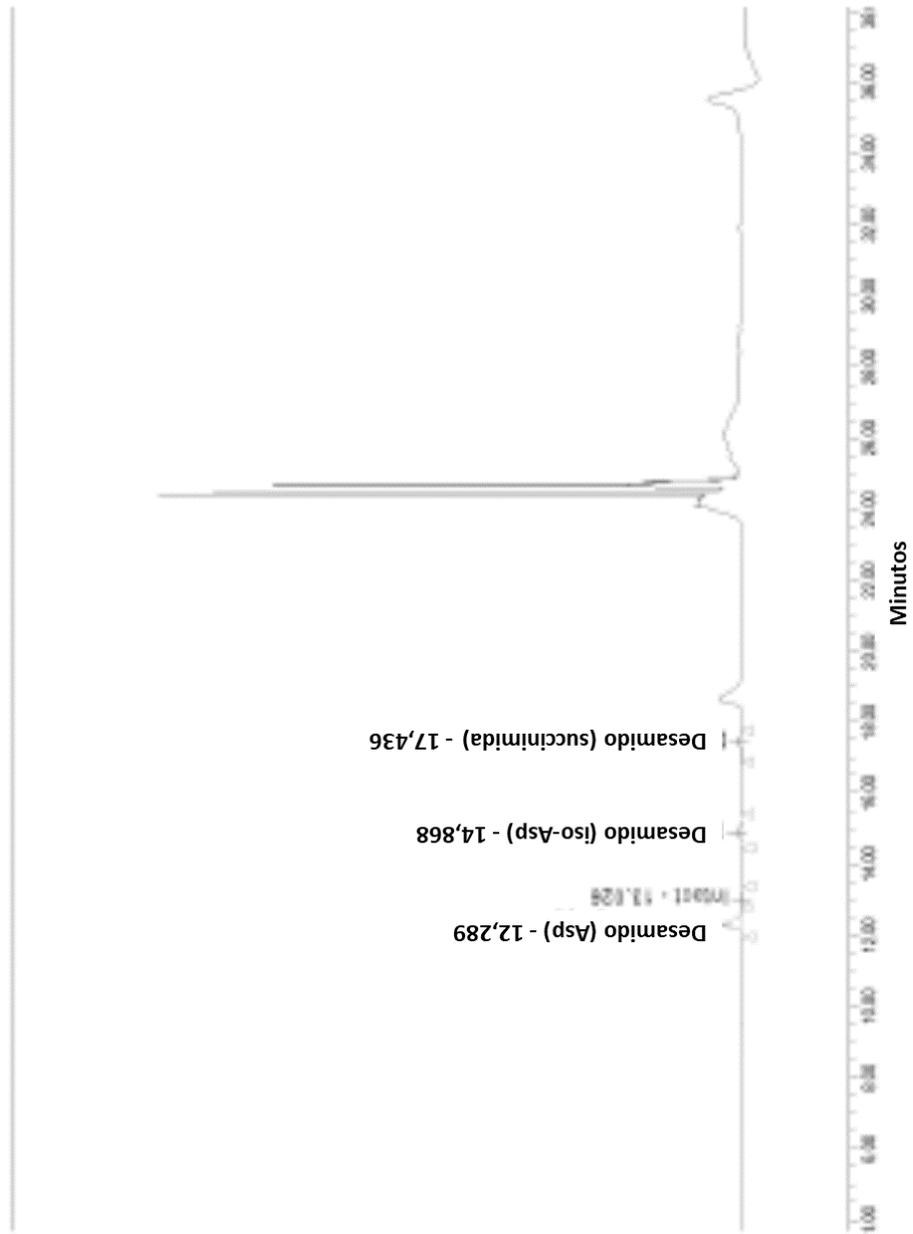


Figura 4B

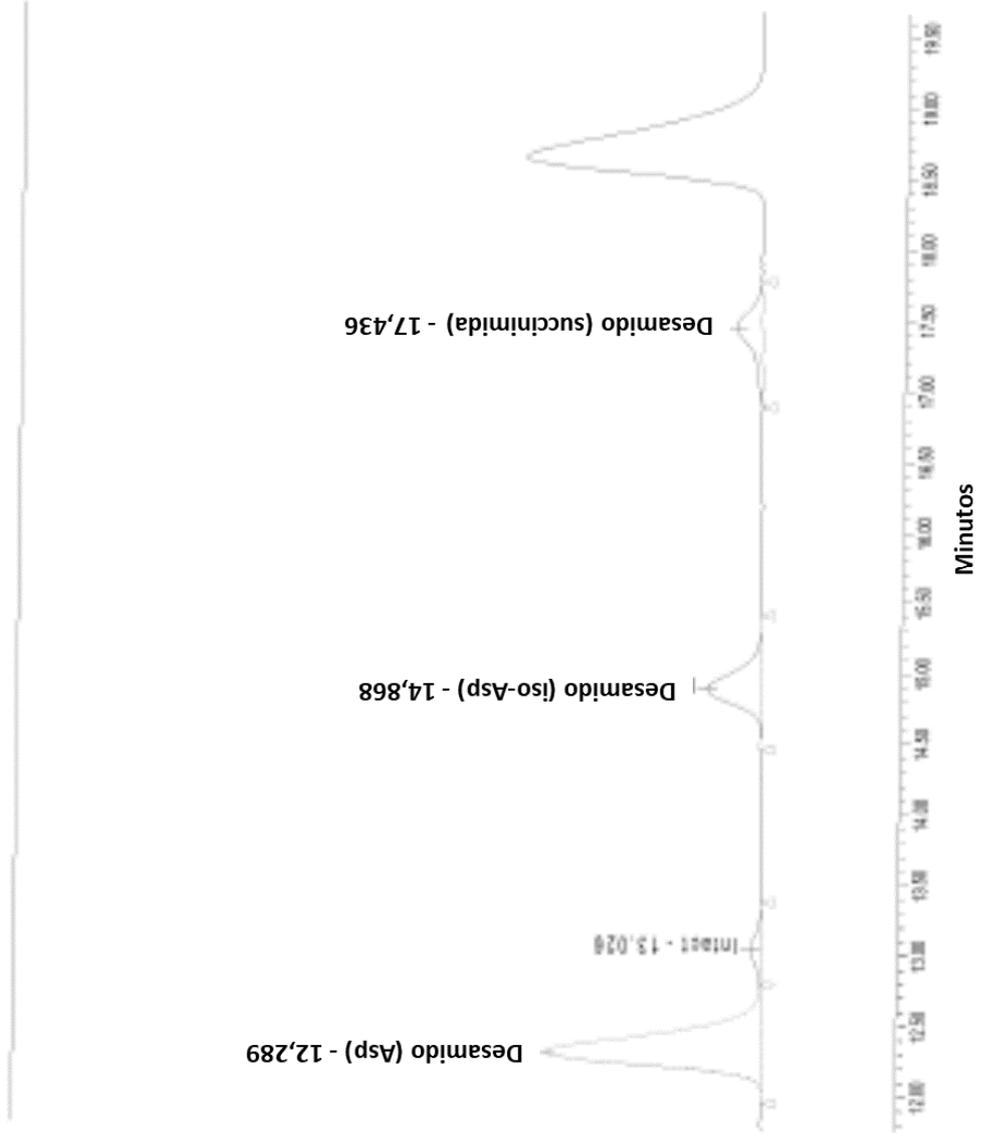


Figura 5: perfil ampliado de la superposición de IFN-β-1a sin tratar y desaminada artificialmente

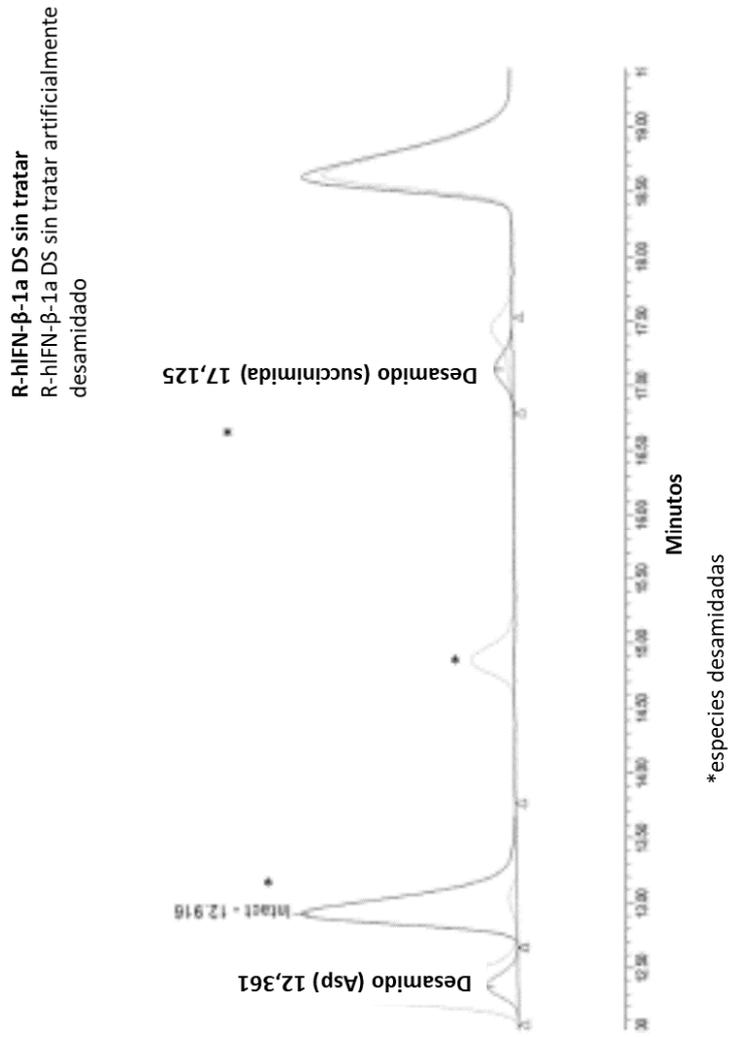


Figura 6A: nivel de desamidación de IFN- β -1a DS des-sialilado artificialmente

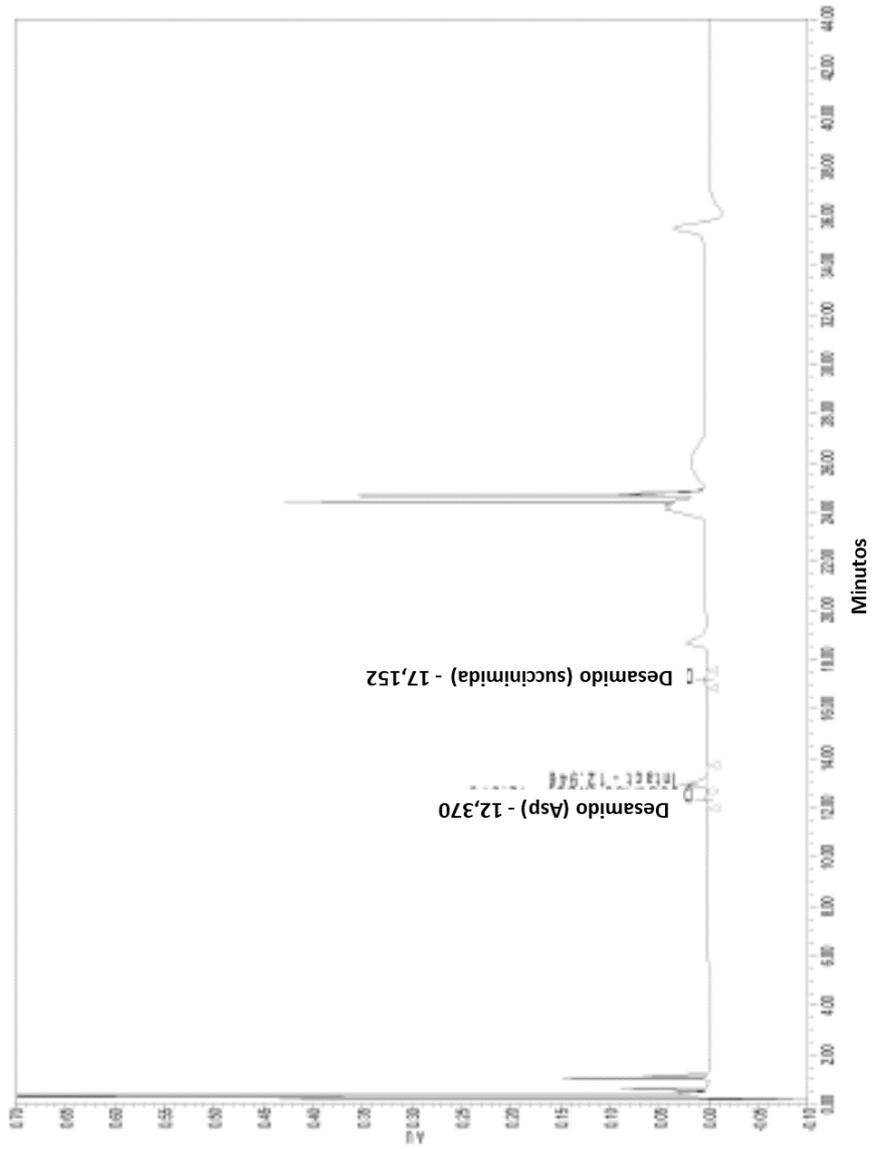


Figura 6B

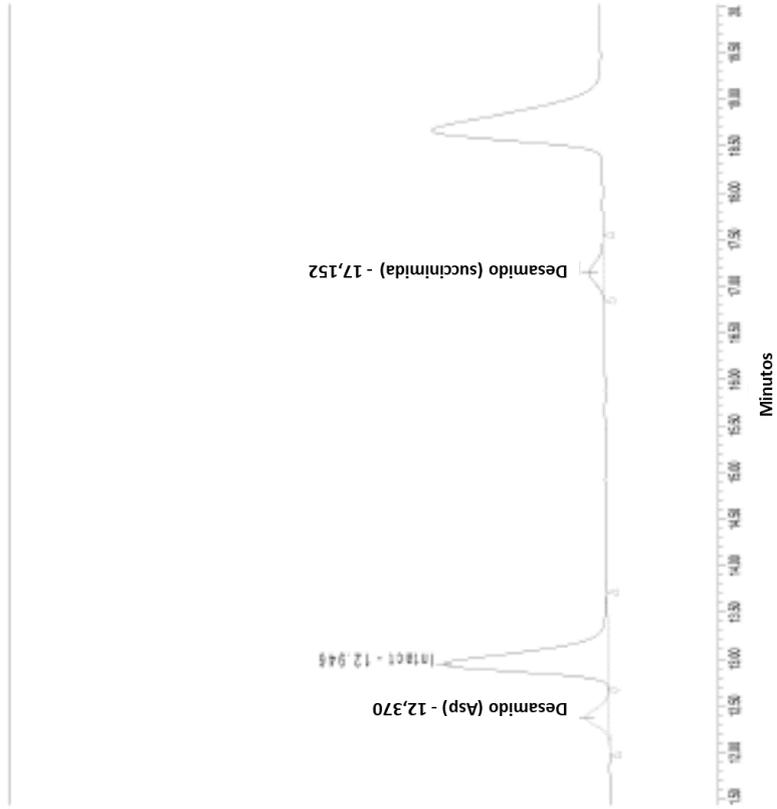


Figura 7A: nivel de desamidación de IFN-β-1a DS desaminada y des-sialilada artificialmente

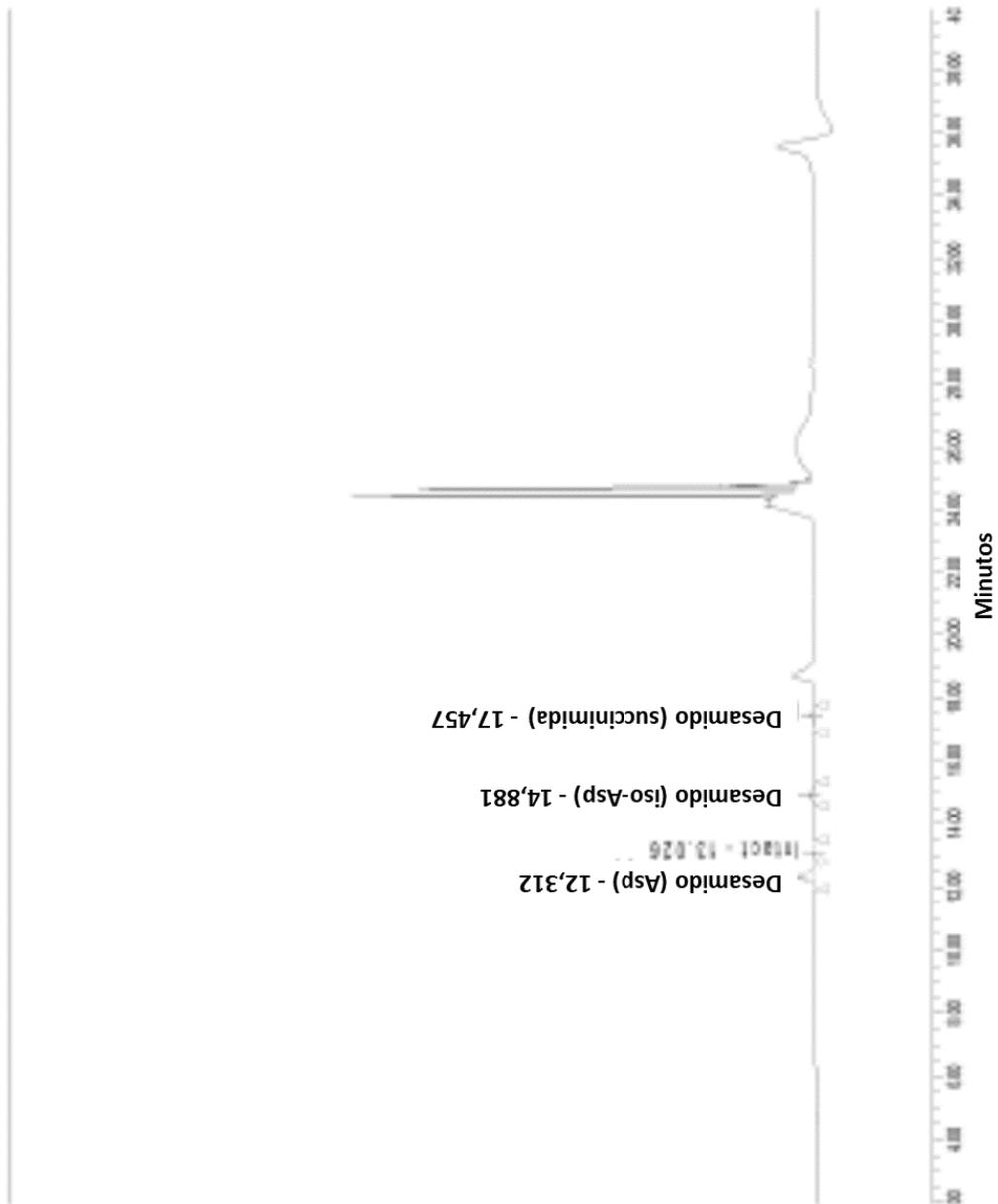


Figura 7B

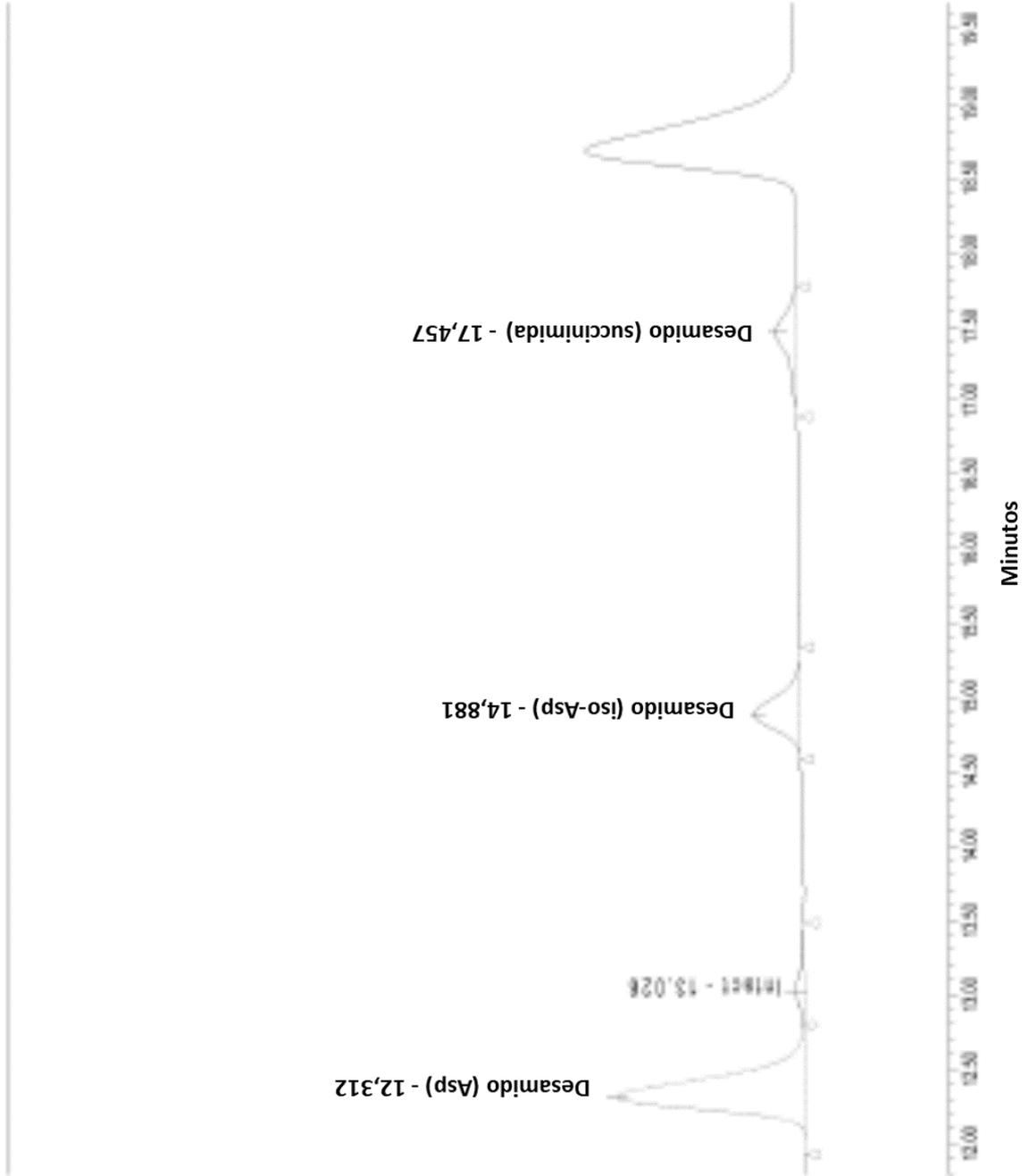
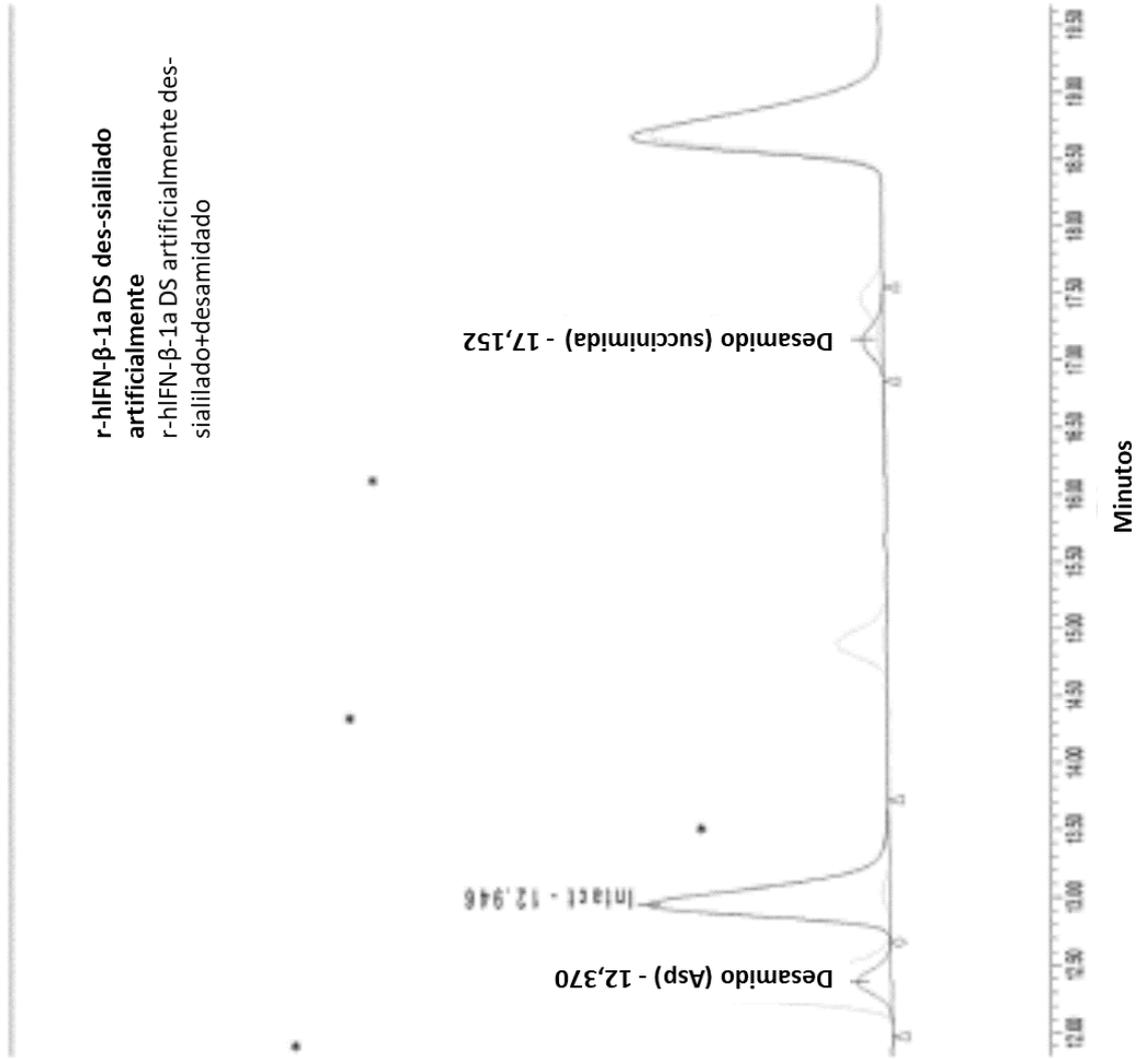


Figura 8A: Superposición del perfil de desamidación en la IFN- β -1a DS des-sialilada artificialmente y desaminada artificialmente + perfil de la ampliación de la des-sialilada



*especies desamidadas

Figura 8B

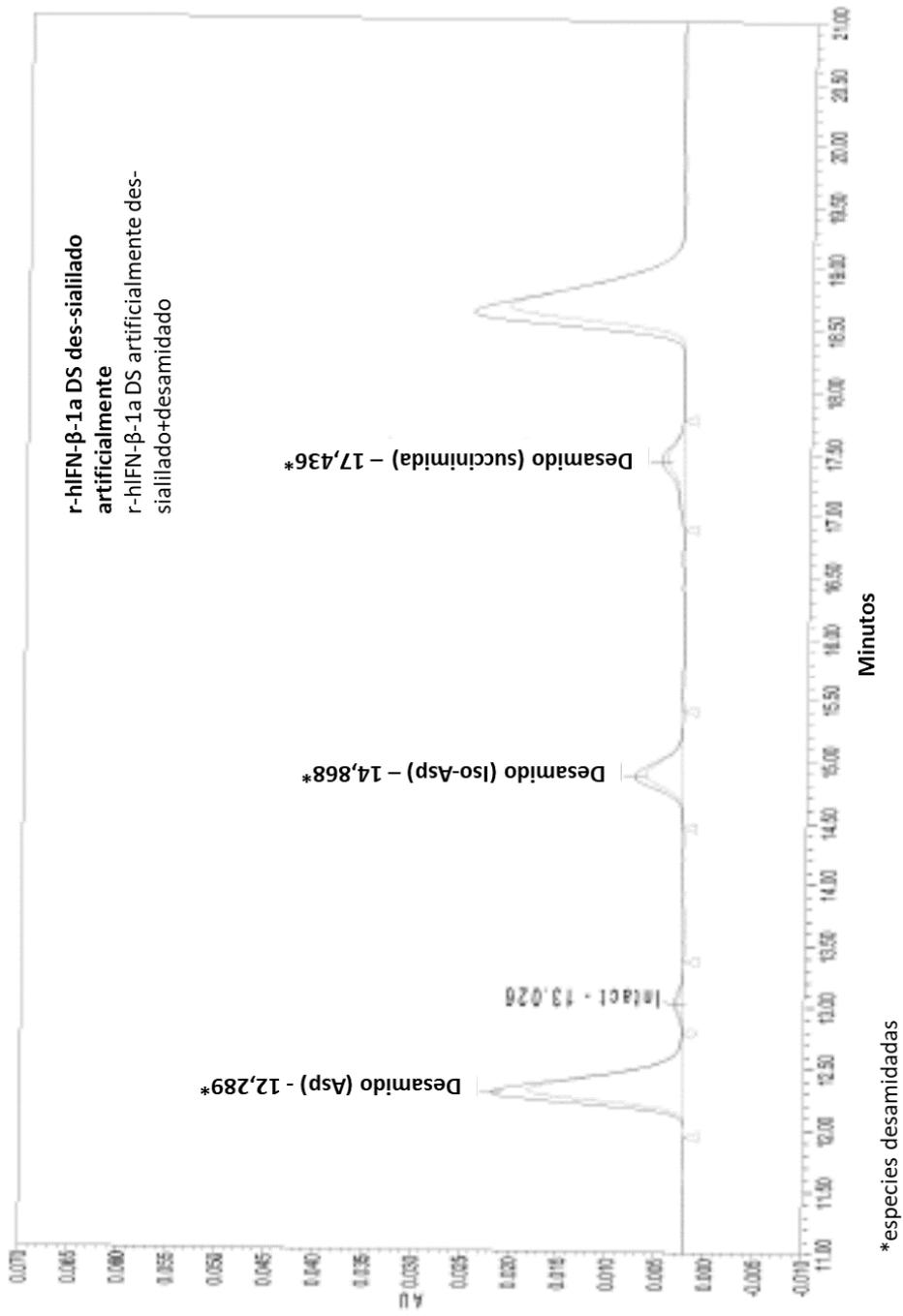


Figura 9: Bioensayo inmunomodulador de MHC de clase I: curvas de respuesta a la dosis

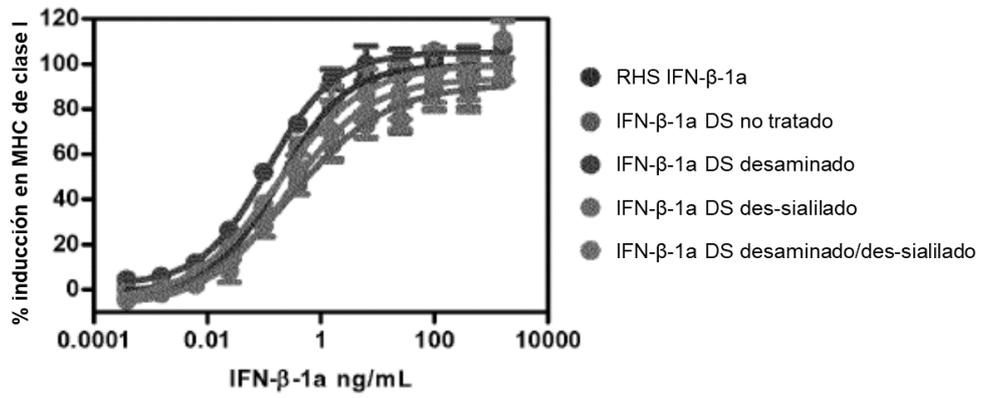


Figura 10: actividad biológica inmunomoduladora de IFN-β-1a

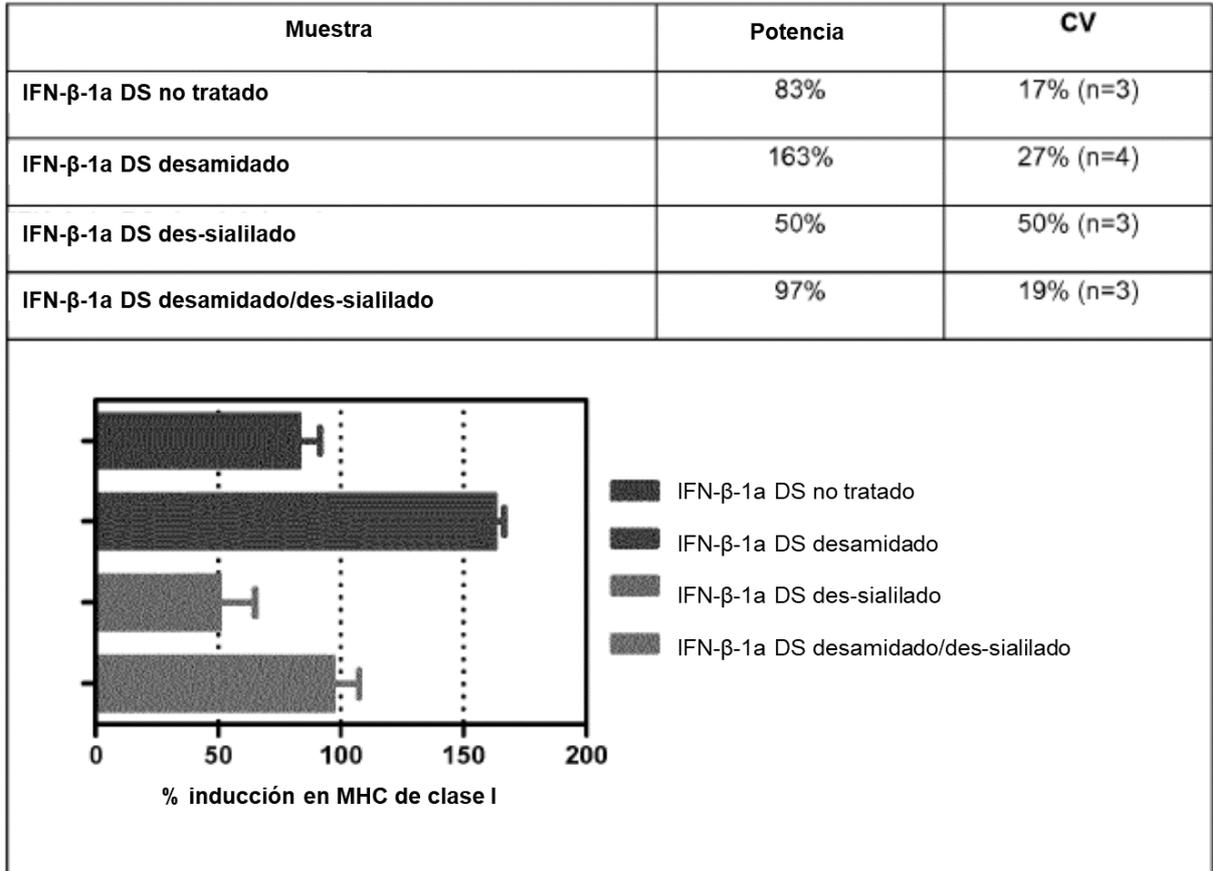


Figura 11: actividad antiviral mediante el sistema A549/EMCV: curvas de respuesta a la dosis

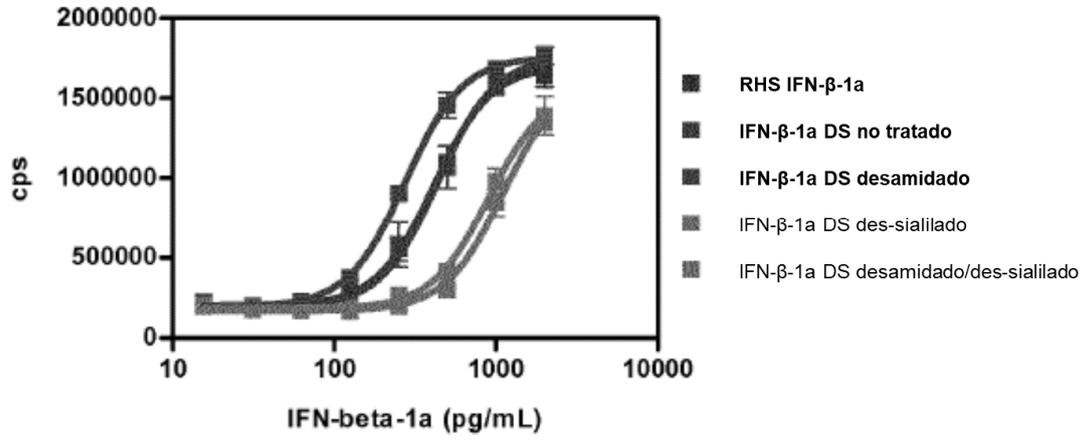


Figura 12: actividad antiviral de IFN-β-1a

