

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 791**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)

A61K 31/592 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 31/593 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2017 PCT/AT2017/060104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2017 WO17181213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2017 E 17723236 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3445777**

54 Título: **Proteína de unión a vitamina D desglicosilada de manera selectiva (Gcmf) y colecalciferol (calciol) así como procedimiento de preparación**

30 Prioridad:

21.04.2016 AT 503542016

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

19.11.2020

73 Titular/es:

**HG PHARMA GMBH (100.0%)
Antonigasse 97/6
1170 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**HERWIG, RALF y
GREILBERGER, JOACHIM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 794 791 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

Proteína de unión a vitamina D desglicosilada de manera selectiva (Gcmaf) y colecalciferol (calciol) así como procedimiento de preparación

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a proteína de unión a vitamina D desglicosilada de manera selectiva (Gcmaf) y colecalciferol (calciol) así como a un procedimiento de preparación.

Estado de la técnica

10 Colecalciferol, también denominado calciol, es, como es sabido, la forma fisiológica más importante de la vitamina D en seres humanos. Por tanto se usa con frecuencia en suplementos alimenticios. Se transforma en el organismo en calcitriol. Calcitriol se diferencia de calciol por dos grupos OH en las posiciones 1 y 25.

15 Calciol y también calcidiol y calcitriol son hidrófobos; por tanto la vitamina D se transporta en la sangre por la proteína de unión a vitamina D, que se designa también como gc-globulina (gc=group specific component). Si se desglicosila de manera selectiva la proteína de unión a vitamina D, se obtiene una molécula que es un activador de macrófagos eficaz. Esto se conoce por ejemplo por el párrafo [0009] de patcit0001:WO WO 01/85194 A --.

Esta molécula se designa por tanto a continuación con GcMAF (MAF=Makrophagen aktivierender Faktor, factor de activación de macrófagos). Por el documento mencionado se conoce que GcMAF es eficaz por ejemplo en la lucha contra tumores. Se supone que GcMAF activa los macrófagos, que entonces por su parte atacan a las células tumorales (párrafo [0010] del documento mencionado).

20 Por otro lado se conoce también que calcitriol es útil en la lucha contra tumores, en particular en el caso de carcinomas de próstata (párrafo [0064] de este documento).

Por tanto, en este documento se propone también administrar una composición que comprende GcMAF y calcitriol a pacientes con cáncer (párrafo [0016]), en particular en pacientes con cáncer de próstata y cáncer de mamá (párrafo [0066]). A falta de indicación de un procedimiento de preparación concreto puede partirse de que los dos componentes se encuentren uno junto a otro y no estén unidos químicamente uno a otro.

25 De acuerdo con patcit0002:WO WO 2014/202956 A -- se preparará un complejo trimérico de GcMAF, calcitriol y un ácido graso insaturado. Se deja reaccionar en primer lugar GcMAF con calcitriol, de modo que como producto intermedio se produce un complejo dimérico de GcMAF-calcitriol.

30 Se encontró ahora en el transcurso de la presente invención de manera sorprendente que un complejo de GcMAF-calcitriol era superior al complejo GcMAF-calcitriol: la actividad de fagocitosis es más alta y la formación de aniones de radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es más baja.

Descripción de la invención

35 Por tanto, la invención se refiere a un complejo dimérico de proteína de unión a vitamina D desglicosilada de manera selectiva (GcMAF) y colecalciferol (calciol), en particular como fármaco.

40 Tal como se determinó además en el contexto de la presente invención, la actividad depende significativamente de la calidad de la purificación. Por tanto, la invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de un complejo de este tipo, dejándose reaccionar proteína de unión a vitamina D con calciol y antes de esto o después de esto desglicosilándose de manera selectiva, en el que se separa finalmente el producto que resulta con un tamiz molecular con un valor de corte de más de 60 kDa de impurezas de peso molecular más grande, en particular de enzimas de la desglicosilación selectiva, preferentemente también se separa con un tamiz molecular con un valor de corte de como máximo 10 kDa de restos de azúcar disociados.

45 Según las mediciones realizadas en el contexto de la presente invención es la actividad de fagocitosis del complejo conocido GcMAF-calcitriol prácticamente idéntica con la actividad de fagocitosis de GcMAF sola; por el contrario, el complejo GcMAF-calcitriol tiene una actividad de fagocitosis significativamente más alta.

Una formación más baja de aniones de radicales superóxido es ventajosa: si bien los aniones de radicales superóxido dañan las células tumorales, sin embargo en medida similar también a las células sanas y a los macrófagos, que entonces durante la lucha contra el tumor pueden desarrollar tan sólo una acción más baja, lo que estropea más la

acción directa de los aniones de radicales superóxido.

5 El ensayo estándar para determinar vitamina D en sangre, un ensayo ELISA, es selectivo con respecto a calcidiol (que tienen en la posición 25 un grupo OH). En este ensayo es necesario separar en primer lugar el calcidiol de la proteína de unión a vitamina D, ya que el complejo Gc-calcidiol no se une a los sitios de receptor del ensayo ELISA. Dado que los sitios de receptor del ensayo ELISA son similares a los receptores de vitamina D del organismo humano, puede concluirse a partir de esto que este complejo tampoco se une a estos receptores de vitamina D. Lo mismo se aplica para el complejo GcMAF-calcitriol. De manera sorprendente se ha mostrado que el complejo GcMAF-calcitriol se une muy bien a los sitios de receptor del ensayo ELISA y por consiguiente también a los receptores de vitamina D del organismo humano; esto es probablemente una razón de la acción superior.

10 **Modo(s) para la realización de la invención**

Por medio de la siguiente descripción se explica en más detalle la invención.

Se describe en primer lugar el procedimiento de preparación: El complejo de acuerdo con la invención se prepara a partir de proteína Gc o proteína Gc recombinante con posterior unión a colecalciferol.

15 Preparación de las enzimas inmovilizadas por medio de Sepharose 4B o perlas magnéticas activadas con ciano u otras posibilidades de disociación

Tampones o bien soluciones usados:

20 Tampón de acoplamiento: disolver 16,8 g de NaHCO₃ y 58,44 g de NaCl en 2 l de agua
 Tampón de glicina 0,2 M: disolver 15,01 g de glicina en 1 l de agua
 Concentrado de NaOH 8 M: disolver 32 g de NaOH en 100 ml de agua
 Tampón acetato 0,1 M: añadir 5,76 ml de ácido acético glacial (100 %) a 1 l de agua, en esto disolver 29,22 g (0,5 M) de NaCl y añadir gota a gota concentrado de NaOH 8 M hasta obtener pH 4,0 (al menos 50 gotas)
 agua: purificada de manera osmótica (apropiada también para operaciones; conductividad < 0,2 µS/cm)

A.) Sepharose 4B activada con ciano:

25 1) hinchar 1,2 g de Sepharose 4B activada con ciano en 240 ml de HCl 1 M (frío; 83,3 g en 1 l) 30 min. Transferir esto a columna de cromatografía y lavar con 60 ml de agua. Después equilibrar 60 ml de tampón de acoplamiento a través de la columna de cromatografía. Tras el cambio de tamponamiento se transfiere el gel en 15 ml de tampón de acoplamiento a dos tubos de 7,5 ml y se centrifuga durante 2 min a 3000 rpm.
 El sobrenadante se desprende hasta obtener 4,5 ml.

2.) Los geles están ahora activados para la unión de en cada caso:

30 1 ml de tampón de acoplamiento con 2 mg de galactosidasa o bien
 1 ml de tampón de acoplamiento con 5U de neuraminidasa
 En cada caso añadir una sustancia a los dos 4,5 ml de geles y agitar durante 2 h a 26 °C.

3.) Bloquear los grupos CN activados restantes de Sepharose con glicina:

35 Los dos geles con las enzimas se transfieren a una columna de cromatografía y con 5 x 5 ml de tampón de acoplamiento se liberan de enzimas no unidas. (También posible por medio de centrifugación: 6000 r/min, Desprender el tampón del gel y lavar con tampón de acoplamiento y centrifugación repetida; en total 5 veces) Finalmente:

40 Transferir en 2 x 5 ml de tampón de acoplamiento a tubos de 15 ml y centrifugar durante 2 min a 3000 r/min. Entonces añadir en cada caso 10 ml de glicina 0,2 M pH 8,0 y dejar reposar durante 20 horas a 4-6 °C; agitar varias veces.

4.) Purificación del gel activado con enzima de glicina no unida:

45 Los tubos se centrifugan y se quita el sobrenadante.
 La purificación del gel de enzima se realiza mediante adición 5 veces de tampón de acoplamiento y centrifugación en 3000 r/min, 2 min y desprendimiento del sobrenadante.
 Después el mismo modo de proceder con adición 5 veces del tampón acetato en lugar del tampón de acoplamiento.
 El almacenamiento se realiza tras el lavado de cinco veces con 5 ml de solución de NaCl 1 M, a la que se añadió el 0,05 % de azida sódica.

ES 2 794 791 T3

Finalmente se transfiere el gel a un tubo estéril y se almacena a 4-6 °C (= listo para usar)

B.) Perlas magnéticas activadas con ciano (CN-MB):

1.) Lavar varias veces 1,2 g de CN-MB en 100 ml de HCl 1 M (frío; 83,3 g en 1 l) (por medio de centrifugación y unión a imán). Después lavar con agua y equilibrar con tampón de acoplamiento.

5 Tras el cambio de tamponamiento se transfieren los 1,2 g de CN-MB a dos tubos de 0,5 ml y se centrifugan durante 2 min a 3000 r/min. El sobrenadante se desprende.

2.) Las perlas magnéticas están ahora activadas para la unión de en cada caso:

1 ml de tampón de acoplamiento con 2 mg de galactosidasa

1 ml de tampón de acoplamiento con 5U de neuraminidasa

10 En cada caso añadir una sustancia a los en cada caso 0,6 g de CN-MB y agitar durante 2 h a 26 °C.

3.) Bloquear los grupos CN activados restantes de las perlas magnéticas con glicina:

Se retienen las dos CN-MB-enzimas por medio de imanes y se desprende el sobrenadante. Adición de 1 ml de tampón de acoplamiento, agitar y de nuevo la unión magnética de la CN-MG-enzima y desprender el sobrenadante. Repetir 4 veces. Debido a ello se separan las enzimas no unidas.

15 Entonces añadir en cada caso 1 ml de glicina 0,2 M pH 8,0 y dejar reposar durante 20 horas a 4-6 °C; agitar varias veces.

4.) Purificación de las perlas magnéticas activadas con enzima de glicina no unida:

En principio unión a imán y desprendimiento de tampón de purificación

20 Adición de 5 veces de en cada caso 1 ml de tampón de acoplamiento, después el mismo modo de proceder con adición de 5 veces de 1 ml del tampón acetato.

El almacenamiento de galactosidasa- y sialidasa-MB se realiza tras el lavado de cinco veces con 1 ml de solución de NaCl 1 M, a la que se añadió el 0,05 % de azida sódica, en 0,5 ml de una solución de este tipo a 4-6 °C (= lista para usar)

25 Separación de galactosa o bien ácido siálico (ácido neurámico) con CN-Sepharose 4B activado por medio de galactosidasa y sialidasa (o bien neuraminidasa) o perlas magnéticas activadas con CN.

Tampón usado:

Tampón fosfato 0,1 M pH 6,0 y 7,0

1 mg de proteínas Gc se disuelven en 1 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 6,0.

30 Se dializan 400 µg de esto en 250 ml de agua a temperatura ambiente (tubo de diálisis; tubos de filtración); Duración: 24 h con 3 x cambio.

A.) Disociación de neuraminidasa:

La proteína Gc purificada se lleva a contacto en tubos de 10 ml con la neuraminidasa (sialidasa) inmovilizada, tal como se ha preparado anteriormente, o bien con 3 ml de Sepharose activada o con 0,5 ml de perlas magnéticas activadas y se incuba a 37 °C, 500 r/min, durante 2 h.

35 Tras la incubación

a.) Para gel de Sepharose activada con neuraminidasa: Centrifugación en 6000 r/min durante 2 min, después quitar 900 µl. Mezclar el gel de sialidasa con 1 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 (= lavar posteriormente una vez) y centrifugar de nuevo durante 2 min en 6000 r/min y de nuevo quitar 900 µl. Lavar posteriormente aún otras dos veces, centrifugar y quitar. Combinar los sobrenadantes desprendidos.

40 b.) Para perlas magnéticas activadas con neuraminidasa: Las perlas magnéticas se retienen y se desprenden 900 µl.

Añadir a las MB 1 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0, mezclar y de nuevo quitar 900 µl. Realizar el proceso una tercera vez y combinar los sobrenadantes desprendidos.

45 Etapas de purificación para productos de disociación de a) y b): centrifugar a través de un filtro (filtro de 10000 Da) en 6000 r/min durante 5 min, para separar los restos de azúcar disociados.

Suspender el sobrenadante en 4 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 y filtrar de nuevo. Realizar esto aún una tercera

vez. Suspender el sobrenadante en 1 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0.

B.) La disociación con galactosidasa se realiza de manera análoga a la disociación con sialidasa o bien neuraminidasa a través de Sepharose activada o bien perlas magnéticas.

Aislamiento de los productos disociados. Cambio de tamponamiento. Purificación

5 a) para Sepharose:

Convertir en suspensión el residuo de filtro con 1 ml de solución al 0,9 % de NaCl. Después centrifugar durante 2 min en 6000 r/min y desprender 1 ml.

Convertir en suspensión el resto con 1 ml de solución al 0,9 % de NaCl de nuevo centrifugar durante 2 min en 6000 r/min y desprender 1 ml. Repetir esto una segunda vez.

10 b) para perlas magnéticas:

Convertir en suspensión el residuo de filtro con 1 ml de solución al 0,9 % de NaCl. Después retener las perlas de manera sencilla con un imán y desprender la proteína (=alfa-globulin-N-acetil-glucosamina). Después añadir en cada caso 1 ml de solución al 0,9 % de NaCl, mezclar, aplicar con imán y desprender el sobrenadante. Repetir el proceso 3 veces.

15 Centrifugar todas las fracciones juntas en filtro de 10000 Da durante 8 min en 6000 r/min, para concentrar la solución. (Como alternativa puede usarse una diálisis a presión.)

Añadir al residuo 4 ml de solución al 0,9 % de NaCl y filtrar de nuevo durante 10 min en 6000 r/min. El residuo es aproximadamente 500 µl.

20 Añadir de nuevo 4 ml de solución al 0,9 % de NaCl y filtrar otra vez durante 10 min en 6000 r/min; convertir en suspensión el residuo en 1 ml de solución al 0,9 % de NaCl.

Resultado: ácido siálico separado; galactosa separada; ningún ADN, ARN.

Finalmente se realiza una filtración a través de un filtro de 100.000 Da por medio de centrifugación. GcMAF se encuentra en el filtrado (tiene aproximadamente 53 kDa), las posibles enzimas del material inmovilizado se han separado en el residuo de filtro. Con ello se proporciona una purificación máxima del producto de más del 99,5 %.

25 Después se añade colecalciferol, para formar el complejo GcMAF-colecalciferol. El complejo que resulta se separa del colecalciferol en exceso mediante un filtro molecular de 10000 Da (centrifugar tres veces durante 10 min con 6000 r/min y lavar con PBS 10 mM pH 7,4). La determinación de proteína dio como resultado 398 ng/ml del complejo deseado.

30 Sin embargo, del mismo modo, es posible dejar reaccionar colecalciferol al inicio con la proteína Gc y separar después los restos de azúcar tal como se ha descrito.

Para los siguientes ensayos de comparación se realizó el mismo procedimiento de preparación con calcitriol en lugar de colecalciferol. Se obtuvo como resultado a este respecto 440 ng/ml del complejo.

35 La determinación de la activación de la fagocitosis se realizó tal como se ha descrito por Hammarstrom S and Kabat EA en "Studies on specificity and binding properties of the blood group A reactive hemagglutinin from Helix pomatia", Biochemistry 10: 1684-1692, 1971:

40 Se colocaron en capa células de ratón peritoneales en una placa de 24 pocillos en cubreobjetos. Tras tres horas del tratamiento con fármacos se sometieron a estudio los cultivos para determinar la actividad fagocítica. Los glóbulos rojos de oveja (SRBC) se opsonizaron mediante suero de conejo hemolítico (anti-glóbulos rojos de oveja C12HSB, Serotec Ltd. England). Los SRBC opsonizados (0,5 %) en RPMI 1640 (libre de suero) se sobrepusieron en cada cubreobjeto revestido con macrófagos y se cultivaron durante 90 minutos. Los eritrocitos no internalizados se lisaron mediante inmersión del cubreobjeto en una solución hipotónica (1/5 PBS). Los macrófagos se lisaron con metanol, se al aire y se tiñeron con tinción de Giemsa. El número de los eritrocitos fagocitados por célula se determinó de manera microscópica; se contaron 250 macrófagos para cada punto de datos. Los datos se expresan como índice de fagocitosis, que se define como porcentaje de macrófagos con eritrocitos absorbidos multiplicado por el número
45 promedio de eritrocitos por macrófagos.

Se muestra el siguiente resultado:

[Tabla 0001]

Tabla 1

Sustancia	Actividad de macrófago
GcMAF-calciol	83,5
GcMAF-calcitriol	73,2
GcMAF, preparado tal como se ha descrito	73,0
GcMAF, comprado de Metavectrum, Alemania	68

5 La actividad más alta del propio GcMAF preparado se encuentra probablemente en la mejor purificación, en particular en la filtración final con el filtro de 100.000 Da.

La determinación de la formación de aniones de radicales superóxido en monocitos de sangre completa humana se realizó tal como sigue:

10 El aislamiento de células mononucleares periféricas se realiza por medio de centrifugación con gradiente de densidad de sangre completa heparinizada. La sangre se diluye con PBS (sin Ca/Mg) 1:2 y se aplica en capa en 15 ml de Histopaque-1077. Después se centrifuga la suspensión celular durante 30 min en 700 g y 20 °C. La interfase con las células mononucleares se quita cuidadosamente con una pipeta Pasteur, se rellena con 30 ml de PBS (sin Ca/Mg) y se centrifuga durante 5 min en 350 g. El sobrenadante se decanta, las células se suspenden en medio RPMI 1640 y se recuentan en el citómetro de flujo. Las células se ajustan en 10⁵ monocitos/ml. Para la mezcla básica de ensayo se
15 (GcMAF, GcMAF-calciol o bien GcMAF-calcitriol) se usan en una concentración de 50 pg/ml. Las células se incuban en total durante 3 h en la estufa incubadora con CO₂. 15 min antes del final de la incubación se añaden en cada caso 5 µl de anticuerpo CD45-V450 y 1 µl de una solución madre MitoSOX 1 mM. Después se rellena la suspensión celular con en cada caso 2 ml de medio RPMI y se centrifuga durante 5 min en 350 g a temperatura ambiente. El sobrenadante se decanta y las células se resuspenden en 500 µl de medio RPMI. Las células se miden en el citómetro de flujo y se
20 analizan. La evaluación se realiza por medio de la intensidad de fluorescencia promedio, tal como se describe por Saharuddin Bin Mohamad, Hideko Nagasa Wa, Yoshihiro Uto and Hitoshi Hori en "Preparation of Gc Protein-derived Macrophage Activating Factor (GcMAF) and its Structural Characterization and Biological Activities", Anticancer Research 22: 4297-4300 (2002):

Ensayo para la formación de superóxido

25 El procedimiento se modificó partiendo de los descrito por Johnston *et al.*. De manera abreviada, tras el tratamiento de tres horas de las muestras se lavaron las placas dos veces con PBS (-) y una vez con tampón fosfato de Krebs-Ringer, pH 7,4, y se añadieron 1,5 ml de citocromo C 50 µM en tampón fosfato de Krebs-Ringer, y se añadió miristatoacetato de forbol (PMA) para obtener una concentración final de 5 µg/ml en cada pocillo y se cultivó durante 90 minutos en una incubadora humectada.

30 La reacción se detuvo por medio de un baño de hielo. El medio cultivado se añadió a un tubo Eppendorf y se centrifugó en 8000 g. La densidad óptica del sobrenadante se determinó mediante espectrometría en 550 nm con referencia en 540 nm (U-2000, Hitachi) usando mezclas de placas sin células como medición en blanco. La concentración de citocromo C reducido se determinó usando la ecuación $E_{550nm} = 2,1 \cdot 10^{-1} M^{-1} cm^{-1}$.

Se muestra el siguiente resultado:

35 [Tabla 0002]

Tabla 2

Sustancia	Actividad de superóxido
GcMAF-calciol	142
GcMAF-calcitriol	188
GcMAF, preparado tal como se ha descrito	199
GcMAF, comprado de Metavectrum, Alemania	150

40 Se observa que la actividad de superóxido del complejo de acuerdo con la invención es la más baja de todas las sustancias sometidas a ensayo y es comparable con GcMAF puro. Por tanto, mediante la unión de calciol a GcMAF puede aumentarse su actividad de macrófago significativamente, sin que esto deba adquirirse mediante el inconveniente de un aumento de la actividad de superóxido.

El complejo de acuerdo con la invención puede administrarse por vía oral. Se midió el contenido en vitamina D en la sangre tras la administración oral, y éste aumenta de 35,9 nM (antes de la administración) hasta 44,25 nM (12 horas tras la administración). El complejo de acuerdo con la invención se absorbe por el organismo por tanto con la administración oral. El complejo de acuerdo con la invención además no es tóxico.

- 5 Pudo mostrarse también un aumento significativo de células monocitarias, que se transforman a continuación en macrófagos, tras administración oral del complejo de acuerdo con la invención.

REIVINDICACIONES

1. Complejo dimérico de proteína de unión a vitamina D desglucosilada de manera selectiva (GcMAF) y colecalciferol (calciol).
2. Complejo según la reivindicación 1 como fármaco.
- 5 3. Procedimiento para la preparación de un complejo según la reivindicación 1, **caracterizado por que** se deja reaccionar proteína de unión a vitamina D con calciol y antes de esto o después de esto se desglucosila de manera selectiva, en el que se separa finalmente el producto que resulta con un tamiz molecular con un valor de corte de más de 60 kDa de impurezas de peso molecular más grande, en particular de enzimas de la desglucosilación selectiva.
- 10 4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado por que** se separa el producto que resulta con un tamiz molecular con un valor de corte de como máximo 10 kDa de restos de azúcar separados.