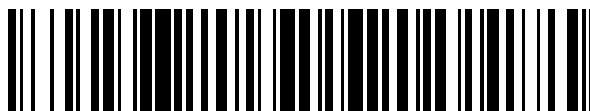


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 252**

51 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2005 PCT/US2005/011332**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2005 WO05097195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2005 E 05733155 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 1729810**

54 Título: **Métodos para reducir la agregación de IL-1ra**

30 Prioridad:

02.04.2004 US 559161 P

02.04.2004 US 558879 P

12.08.2004 US 601229 P

12.08.2004 US 601216 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2018

73 Titular/es:

SWEDISH ORPHAN BIOVITRUM AB (PUBL)
(100.0%)

112 76 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

RAIBEKAS, ANDREI y
KERWIN, BRUCE

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 694 252 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

Métodos para reducir la agregación de IL-1ra

5 CAMPO

La presente invención se refiere a métodos para reducir la agregación de un antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra). La divulgación también proporciona métodos para mejorar las formulaciones de fármacos que comprenden reducir la agregación de IL-1ra. La divulgación también son métodos para tratar enfermedades que
10 utilizan IL-1ra cuya agregación se ha reducido. Finalmente, la presente divulgación se refiere a composiciones y kits que comprenden un IL-1 ra cuya agregación se ha reducido.

ANTECEDENTES

15 La interleucina-1 alfa (IL-1 α), la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1ra) se unen cada uno al receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1RI), que se encuentra en la superficie de ciertos tipos de células. IL-1 α e IL-1 β tienen efectos fisiológicos sobre varias células diana diferentes, incluidas ciertas células que participan en las respuestas inflamatorias e inmunitarias. IL-1 ra, en contraste, se une a IL-1RI, pero no provoca respuestas biológicas aguas abajo comparables. Más bien, IL-1ra inhibe competitivamente la unión de IL-1 α e IL-1 β a IL-1RI.
20 Anakinra, una versión producida por *E. coli* de IL-1ra, se comercializa para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Chang B.S. et al., ("Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: Glass transition and protein conformation", Archives of Biochemistry and Biophysics, Nueva York, US. Vol. 331, N.º 2, 1996, págs. 249-258, ISSN: 0003-9861) y Chang B.S. et al., (Development of a stable freeze-dried formulation of
25 recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, Pharmaceutical Research, Nueva York, US, Vol. 13, N.º 2, 1996, págs. 243-249, ISSN: 0724-8741) divulgan métodos para estabilizar formulaciones secadas por congelación, liofilizadas de IL-1ra.

Chang B.S. et al., (Development of a stable freeze-dried formulation of recombinant human interleukin-1 receptor
30 antagonist, Pharmaceutical Research, Nueva York, US, Vol. 13, N.º 2, 1996, págs. 243-249)

RESUMEN

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de
35 tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia. La presente invención se refiere a un método para reducir la agregación de un antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra), o reducir la tasa de agregación de un IL-1ra en una composición acuosa incubando la composición acuosa que comprende IL-1ra con al menos una molécula accesoria a una concentración suficiente para reducir la agregación o reducir la tasa
40 de agregación de la IL-1ra en la composición acuosa, en el que al menos una de la al menos una molécula accesoria es eficaz en la reducción de la agregación entre 20 °C y 45 °C y se selecciona de un azúcar en una concentración del 1 al 3 por ciento y un anión de carga múltiple.

También se divulga un método para preparar una formulación de fármaco antagonista del receptor de interleucina-1
45 (IL-1 ra). El método comprende incubar la IL-1 ra de agregación con al menos una molécula accesoria. En ciertos casos, la agregación se reduce.

Se divulga un método para tratar a un paciente. Se divulga un método para tratar a un paciente que tiene artritis. Se divulga un método para tratar a un paciente que tiene artritis reumatoide. Se divulga un método para tratar a un
50 paciente que tiene osteoartritis. Se divulga un método para tratar a un paciente que tiene al menos una de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, glomerulonefritis o leucemia. Se divulga un método para tratar a un paciente que tiene un efecto adverso de IL-1. El método para tratar a un paciente comprende administrar al paciente una composición que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra) y (ii) al menos una molécula accesoria.

55 En ciertas formas de realización, al menos una molécula accesoria está en una concentración que reduce la agregación de un IL-1ra de agregación. En ciertas formas de realización, al menos una molécula accesoria está en una concentración que reduce la tasa de agregación de un IL-1ra de agregación. En ciertas formas de realización, al menos una molécula accesoria se selecciona de un azúcar y un anión de carga múltiple. En ciertas formas de

realización, al menos una molécula accesoria es un anión de carga múltiple. En ciertas formas de realización, al menos una molécula accesoria es pirofosfato 1 a 20 mM. En ciertas formas de realización, al menos una molécula accesoria es citrato 1 a 20 mM. En ciertas formas de realización, al menos una molécula accesoria es al menos un azúcar. En ciertas formas de realización, al menos uno de dichos azúcares es glicerol, sorbitol o sacarosa. El azúcar se encuentra en una concentración del 1 al 3 por ciento.

En ciertas formas de realización, al menos una molécula accesoria se selecciona de una molécula accesoria reactiva a la lisina y una molécula accesoria reactiva a la arginina. En ciertas formas de realización, al menos una molécula accesoria se selecciona de ácido 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)hexanoico (NBD-X), metil acetil fosfato (MAP), y anhídrido citracónico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el perfil de agregación de proteínas de tipo salvaje IL-1ra en el tiempo en PSE (fosfato 10 mM, pH 6,5, NaCl 140 mM, EDTA 0,5 mM) o CSE (citrato 10 mM, pH 6,5, NaCl 140 mM, EDTA 0,5 mM) analizado en el Ejemplo 2.

La Figura 2 muestra la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) de la proteína de tipo salvaje IL-1 ra derivatizada con NBD-X analizada en el Ejemplo 3. El panel superior muestra la absorbancia de IL-1ra marcada con NBD-X en 215 nm. El panel inferior muestra la emisión fluorescente a 535 nm después de la excitación a 480 nm.

La Figura 3 muestra las tasas de agregación para la proteína de tipo salvaje IL-1 ra en presencia de concentraciones crecientes de fosfato, pirofosfato y aniones de citrato analizadas en el Ejemplo 4.

La Figura 4 muestra las tasas de agregación para la proteína de tipo salvaje IL-1 ra en presencia de concentraciones crecientes de glicerol, sorbitol o sacarosa analizadas en el Ejemplo 5.

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) del precursor humano IL-1ra, que incluye una secuencia líder secretora.

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de IL-1 ra humano que carece de la secuencia líder secretora (SEQ ID NO: 3). El punto (•) indica la lisina en la posición 93. El signo más (+) indica la arginina en la posición 97. También se indican las ubicaciones del triptófano-16 (Δ) y la tirosina-34 (o).

La Figura 7 muestra una estructura cristalina de rayos X ejemplar de IL-1ra.

La Figura 8 muestra una porción de la interfaz entre las dos subunidades del dímero de IL-1 ra asimétrico en la estructura cristalina de rayos X descrita para la Figura 1.

La Figura 9 muestra el despliegue en equilibrio inducido por urea de IL-1ra detectado por el dicroísmo circular analizado en el Ejemplo 6.

La Figura 10 muestra el despliegue en equilibrio inducido por urea de IL-1ra detectado por fluorescencia intrínseca analizado en el Ejemplo 6.

La Figura 11 muestra el despliegue inducido por clorhidrato de guanidinio de IL-1 ra por el dicroísmo circular analizado en el Ejemplo 6.

La Figura 12 muestra el despliegue de IL-1 ra inducido por clorhidrato de guanidinio por fluorescencia intrínseca analizado en el Ejemplo 6.

La Figura 13 muestra la HPLC de fase inversa de IL-1ra marcada por afinidad con metil acetil fosfato (MAP) en presencia de citrato 10 mM, pH 6,5, analizada en el Ejemplo 7.

La Figura 14 muestra la HPLC de fase inversa de IL-1ra marcada por afinidad con metil acetil fosfato (MAP) en presencia de fosfato 10 mM, pH 6,5, analizada en el Ejemplo 7.

La Figura 15 muestra la superposición de los perfiles de HPLC de fase inversa de IL-1 ra marcada por afinidad con metil acetil fosfato durante 4,5 horas (270 minutos) en presencia de citrato 10 mM, pH 6,5, fosfato 10 mM, pH 6,5, o pirofosfato 10 mM, pH 6,4, analizada en el Ejemplo 7. Cuatro picos débilmente resueltos están marcados como 1, 2, 3 y 4.

La Figura 16 muestra la tasa de derivación de IL-1 ra con metil acetil fosfato en presencia de citrato 10 mM, pH 6,5, analizada en el Ejemplo 7. La Figura 16A muestra una reproducción de los cromatogramas de la Figura 13. La Figura 16B muestra los resultados de la deconvolución de cada cromatograma de la Figura 16A. La Figura 16C muestra una gráfica de la integración de cada uno de los picos en deconvolución de la Figura 16B frente al tiempo.

La Figura 17 muestra una comparación de las tasas de derivación de IL-1 ra con MAP en presencia de varios tampones a diversos pH, analizada en el Ejemplo 7.

La Figura 18 muestra la superposición de los perfiles de HPLC de fase inversa de IL-1 ra marcada por afinidad con metil acetil fosfato durante 5,5 horas en presencia de citrato 10 mM o fosfato 10 mM a diversos niveles de pH, analizada en el Ejemplo 7.

La Figura 19 muestra el perfil de agregación de proteína de tipo salvaje IL-1ra en el tiempo en diversas

concentraciones de fosfato en un tampón con NaCl 100 mM, pH 6,5, analizado en el Ejemplo 8.

La Figura 20 muestra la unión de citrato a IL-1ra en función del aumento de la concentración de citrato, como se analiza en el Ejemplo 9.

5 La Figura 21 muestra la competición por la unión de citrato a IL-1ra al aumentar las concentraciones de pirofosfato o fosfato, como se analiza en el Ejemplo 10.

La Figura 22 muestra una gráfica del K^d_{Lapp} para la unión de citrato a IL-1ra en función de la concentración de pirofosfato en la solución, como se analiza en el Ejemplo 10. La K^d_x para la unión de pirofosfato al sitio de unión a aniones de IL-1ra se calculó para ser 2,994 mM.

10 La Figura 23 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 4) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de un IL-1ra ejemplar.

La Figura 24 muestra la secuencia de aminoácidos de un IL-1ra ejemplar, denominado icIL-1ra (SEQ ID NO: 6). SEQ ID NO: 6 tiene la misma secuencia que SEQ ID NO: 3, pero con 7 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS FORMAS DE REALIZACIÓN EJEMPLARES

En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o

20 "componente" incluyen tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente otra cosa.

En diversas formas de realización, se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos, transformación y transfección. En diversas formas de realización, las reacciones

25 enzimáticas y las técnicas de purificación pueden realizarse de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. En diversas formas de realización, las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva y/o que se conocen por un

30 experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en relación con los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica que se describe en el presente documento es la bien conocida y usada en la técnica. En diversas formas de realización, las técnicas estándar pueden usarse

35 para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes. En ciertas formas de realización, cuando un aminoácido se "reemplaza" con otro aminoácido, ese reemplazo se puede hacer de forma recombinante, por ejemplo, mutando el codón en el polinucleótido que codifica el aminoácido con respecto al codón que codifica otro aminoácido. En ciertas formas de realización, la mutación del codón se puede hacer por cualquier método conocido en la técnica.

40 Definiciones

Según se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados:

45 El término "polinucleótido aislado" significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc o de origen sintético, o alguna combinación de los mismos, que (1) no está asociado con al menos una porción de un polinucleótido en el que se encuentra en la naturaleza, o (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no aparece en la naturaleza.

50 El término "unido operativamente" se refiere a componentes que están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia de codificación se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con el funcionamiento de las secuencias de control.

55 El término "secuencia de control" se refiere a secuencias polinucleotídicas que pueden efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control puede diferir dependiendo del organismo huésped. De acuerdo con ciertas formas de realización, las secuencias de control para procariotas pueden incluir promotores, sitios de unión ribosómicos y secuencias de terminación de la

transcripción. De acuerdo con ciertas formas de realización, las secuencias de control para eucariotas pueden incluir promotores y secuencia de terminación de la transcripción. En ciertas formas de realización, las "secuencias de control" pueden incluir secuencias líder y/o secuencias asociadas de fusión.

5 El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos que tiene ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos de origen natural y/o modificados que están unidos entre sí por uniones de origen natural y/o no naturales. En ciertas formas de realización, un polinucleótido tiene una longitud de al menos 10 bases. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN/ARN e híbridos de ADN/ARN, o formas modificadas de los mismos.

10

El término "oligonucleótido" incluye polímeros que tienen ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos de origen natural y/o modificados, que están unidos entre sí por uniones de origen natural y/o no naturales. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos y generalmente comprenden aproximadamente 200 bases o menos. En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos tienen una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 bases. En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos tienen una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 a 40. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

15

El término "nucleótidos de origen natural" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y/o grupos de bases de nucleótidos modificados o sustituidos, y similares. Los términos "unión oligonucleotídica" y "unión polinucleotídica" incluyen enlaces tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. Pat. de Estados Unidos N.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). En ciertas formas de realización, un oligonucleótido o polinucleótido puede incluir una etiqueta.

20

El término "de origen natural", aplicado a un objeto, se refiere a un objeto que se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluidos los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada por el hombre en el laboratorio o está presente de forma natural.

30

El término "proteína aislada" significa una proteína elaborada por medios sintéticos o una proteína codificada por ADN genómico, ADNc, ARN u otro polinucleótido, que (1) está libre de al menos algunas proteínas con las que normalmente se encontraría; o (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie; o (3) se expresa por una célula de una especie diferente; o (4) no aparece en la naturaleza. En la notación de polipéptido utilizada en el presente documento, la dirección a la izquierda es la dirección del terminal amino y la dirección a la derecha es la dirección del terminal carboxilo, de acuerdo con el uso y la convención estándar, a menos que se indique de otro modo.

40

De manera similar, a menos que se indique específicamente otra cosa, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarias es el extremo 5'; la dirección de la izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarias se conoce como la dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' a las transcripciones de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que están 5' con respecto al extremo 5' de la transcripción de ARN se denominan "secuencias aguas arriba" y están "aguas arriba de la región codificante"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que están 3' con respecto al extremo 3' de la transcripción de ARN se denominan "secuencias aguas abajo" y están "aguas abajo de la región codificante".

50

Como se usa en el presente documento, los términos "etiqueta" o "marcado" se refieren a la presencia de un resto detectable. Un resto detectable puede incorporarse durante la síntesis de un polinucleótido o polipéptido o puede unirse, covalentemente o no covalentemente, después de la síntesis. El marcado puede ser, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado, la unión de restos de biotina que pueden detectarse con avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un resto fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). En ciertas formas de realización, la etiqueta o el resto detectable pueden ser terapéuticos. En la técnica se conocen diversos métodos para marcar polipéptidos y/o polinucleótidos. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos y/o polinucleótidos incluyen, pero sin limitación: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por

55

ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos de biotín, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo). En ciertas formas de realización, las etiquetas están unidas por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial de impedimento estérico.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology--A Synthesis* (2ª Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales, tales como los aminoácidos α , α -disustituidos, los aminoácidos N-alquilo, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los aminoácidos no convencionales ejemplares no limitativos incluyen 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, α -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares.

Un experto en la técnica será capaz de identificar variantes adecuadas de un polipéptido con técnicas bien conocidas. En ciertas formas de realización, un experto en la técnica puede identificar regiones adecuadas de un polipéptido que pueden cambiarse sin destruir la actividad dirigiéndose a regiones que no se consideran importantes para la actividad. En ciertas formas de realización, se pueden identificar residuos y porciones de un polipéptido que se conservan entre polipéptidos similares. En ciertas formas de realización, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden ser susceptibles de sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, en ciertas formas de realización, un experto en la técnica puede revisar estudios de la función estructural e identificar residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de tal comparación, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. En ciertas formas de realización, un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos importantes predichos.

En ciertas formas de realización, un experto en la técnica puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con estructuras conocidas en polipéptidos similares. Además, en ciertas formas de realización, un experto en la técnica puede generar variantes de ensayo que contengan una sola sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. En ciertas formas de realización, las variantes se pueden cribar usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, si uno descubriera que un cambio en un residuo de aminoácido en particular resultara en una actividad destruida, reducida de forma no deseable, o inadecuada, se pueden evitar las variantes con tal cambio. En otras palabras, basándose en la información obtenida a partir de dichos experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos donde se deben evitar sustituciones adicionales en solitario o junto con otras mutaciones.

En ciertas formas de realización, se realizan delecciones, inserciones y/o sustituciones (denominadas individualmente o colectivamente como "variante(s)") dentro de la secuencia de aminoácidos de una proteína de tipo salvaje IL-1 ra. Como se usa en el presente documento, "proteína de tipo salvaje IL-1ra" se refiere a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, que tiene opcionalmente un residuo de metionina adicional en su extremo N, de modo que la secuencia N-terminal es MRPSGR.... La proteína terapéutica que tiene el nombre genérico "anakinra" está dentro de esta definición de proteína de tipo salvaje IL-1 ra. Anakinra tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5, que es idéntica a la SEQ ID NO: 3, pero con una metionina N-terminal. En ciertas formas de realización, las alteraciones de la proteína de tipo salvaje IL-1 ra, tales como la modificación química o enzimática, se realizan después de la traducción o síntesis de la proteína. Dichas proteínas IL-1 ra alteradas se denominan individualmente o colectivamente como "derivado(s)". El término IL-1ra incluye proteínas de tipo salvaje IL-1 ra, así como variantes y derivados de IL-1 ra de origen natural y no natural que tienen actividad antagonista para el receptor de IL-1 ra.

En ciertas formas de realización, un "aminoácido que no tiene una carga positiva" se selecciona de alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, serina, treonina, valina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos que no tienen una carga positiva también incluyen, pero sin limitación, aminoácidos no convencionales que no tienen una carga positiva. Un experto en la

técnica puede determinar si una variante de aminoácido particular tiene o no una carga positiva cuando se incorpora en un polipéptido.

En ciertas formas de realización, un "aminoácido que no tiene una carga" se selecciona de alanina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, serina, treonina, valina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos que no tienen una carga también incluyen, pero sin limitación, aminoácidos no convencionales que no tienen una carga. Un experto en la técnica puede determinar si una variante de aminoácido no convencional particular tiene o no una carga cuando se incorpora en un polipéptido.

En ciertas formas de realización, un "aminoácido polar que no tiene una carga" se selecciona entre cisteína, glicina, glutamina, asparagina, serina, treonina y tirosina. Los aminoácidos polares que no tienen una carga también incluyen, pero sin limitación, aminoácidos no convencionales que son polares pero que no tienen una carga. Un experto en la técnica puede determinar si una variante de aminoácido no convencional particular es polar y si tiene una carga cuando se incorpora en un polipéptido.

En ciertas formas de realización, un "aminoácido no aromático" se selecciona de alanina, arginina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, serina, treonina, y valina. Los aminoácidos no aromáticos también incluyen, pero sin limitación, aminoácidos no convencionales que no son aromáticos. Un experto en la técnica puede determinar si una variante de aminoácido no convencional particular es aromática cuando se incorpora en un polipéptido.

El término "interacción catión- π " se refiere a una interacción no covalente entre un aminoácido catiónico y un aminoácido aromático. En ciertas formas de realización, el aminoácido catiónico puede ser lisina. En ciertas formas de realización, el aminoácido catiónico puede ser arginina. En ciertas formas de realización, el aminoácido aromático puede ser fenilalanina. En ciertas formas de realización, el aminoácido aromático puede ser tirosina. En ciertas formas de realización, el aminoácido aromático puede ser triptófano. La interacción catión- π puede estar dentro de un único polipéptido (es decir, intramolecular) o la interacción catión- π puede estar entre dos o más polipéptidos (es decir, intermolecular).

En ciertas formas de realización, ciertos residuos de aminoácidos de IL-1ra están implicados en una interacción catión- π . La Figura 1 muestra una estructura cristalina de rayos X de IL-1ra. La estructura cristalina se preparó usando un archivo 1ILR.pdb y Vector NTI 3D Molecular Viewer (InforMax). IL-1 ra cristalizó como un dímero asimétrico. Véase, por ejemplo, Vigers et al., J. Biol. Chem., 269: 12874-12879 (1994). La Figura 2 muestra una porción de la estructura cristalina de la Figura 1. En esa estructura cristalina, la lisina-93 en una subunidad IL-1ra parece estar implicada en una interacción catión- π con triptófano-16 en la otra subunidad IL-1ra. De forma similar, la arginina-97 en una subunidad IL-1ra parece estar involucrada en una interacción catión- π con la tirosina-34 en la otra subunidad IL-1ra.

El término "fragmento de polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación amino-terminal y/o carboxi-terminal. En ciertas formas de realización, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5 a 201 aminoácidos. Se apreciará que, en ciertas formas de realización, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 110, 125, 150, 170, 175, 176, 177, 180, 185, 190, o 200 aminoácidos de longitud.

El término "muestra biológica", como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o anteriormente un ser vivo. Dichos seres vivos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, pero sin limitación, sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, huesos, médula ósea, ganglios linfáticos y piel.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente pura" significa que una especie macromolecular objeto es la especie macromolecular predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición). En ciertas formas de realización, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie macromolecular objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en peso) de todas las especies macromoleculares presentes. En ciertas formas de realización, en una composición sustancialmente pura, la especie macromolecular objeto comprenderá más de aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % en peso de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En ciertas formas de realización, la especie macromolecular objeto se purifica esencialmente a homogeneidad (es decir, las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición por métodos de detección convencionales). En ciertas formas de realización, la composición consiste esencialmente en una sola

especie macromolecular.

El término paciente incluye sujetos humanos y animales.

5 El antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como un inhibidor de la actividad de interleucina-1 y es un miembro de la familia IL-1, que también incluye IL-1 α e IL-1 β . Una lista no exclusiva, no limitativa, no exhaustiva de antagonistas del receptor de IL-1 incluye Kineret® (anakinra) (por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5), proteína de tipo salvaje IL-1ra (incluyendo, pero sin limitación, una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3, o una proteína que tiene la secuencia de

10 SEQ ID NO: 5), IL-1ra intracelular (icIL-1ra) (incluyendo, pero sin limitación, una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6), IL-1ra β (véase, por ejemplo, la Publicación PCT N.º WO 99/36541), variantes de IL-1 ra, y derivados de IL-1ra. Ciertos antagonistas del receptor de IL-1 ra, incluyendo IL-1 ra y variantes y derivados del mismo, así como los métodos de fabricación y uso de los mismos, se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.075.222; Patente de Estados Unidos N.º 6.599.873 B1; Patente de Estados Unidos N.º 5.863.769; Patente de

15 Estados Unidos N.º 5.858.355; Patente de Estados Unidos N.º 5.739.282; Patente de Estados Unidos N.º 5.922.573; Patente de Estados Unidos N.º 6.054.559; los documentos WO 91/08285; WO 91/17184; WO 91/17249; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 96/12022; WO 97/28828; WO 99/36541; WO 99/51744. Un antagonista del receptor de IL-1 puede estar glicosilado o no glicosilado.

20 Los ejemplos de IL-1 ra incluyen, pero sin limitación, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 2 y fragmentos, variantes y derivados de tal polipéptido que tienen una actividad antagonista para el receptor de interleucina-1; un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3 y fragmentos, variantes y derivados de tal polipéptido que tienen una actividad

25 antagonista para el receptor de interleucina-1; un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 5 y fragmentos, variantes y derivados de tal polipéptido que tienen una actividad antagonista para el receptor de interleucina-1; y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 y fragmentos, variantes y derivados de tal polipéptido que tienen una actividad antagonista para el receptor de interleucina-1.

30 En ciertas formas de realización, el término IL-1 ra incluye, pero sin limitación, variantes de IL-1 ra que tienen actividad antagonista para el receptor de interleucina-1. En ciertas formas de realización, las variantes de IL-1 ra son de origen natural. En ciertas formas de realización, las variantes de IL-1 ra se construyen artificialmente. Las variantes ejemplares de IL-1 ra incluyen, pero sin limitación, secuencias de aminoácidos que tienen una o más

35 sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, las variantes de IL-1 ra comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 95 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, las variantes de IL-1ra comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, las variantes de IL-1ra comprenden

40 una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 85 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, las variantes de IL-1ra comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 75 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En ciertas formas de realización, el término IL-1ra incluye, pero sin limitación, fragmentos de IL-1 ra que tienen

45 actividad antagonista para el receptor de interleucina-1. En ciertas formas de realización, los fragmentos de IL-1ra son de origen natural. En ciertas formas de realización, los fragmentos de IL-1ra se construyen artificialmente. Los fragmentos de IL-1 ra ejemplares incluyen, pero sin limitación, fragmentos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6. Los fragmentos de IL-1 ra son un subconjunto de variantes de IL-1 ra.

50 En ciertas formas de realización, el término IL-1 ra incluye, pero sin limitación, derivados de IL-1 ra que tienen actividad antagonista para el receptor de interleucina-1. En ciertas formas de realización, los derivados de IL-1 ra son de origen natural. En ciertas formas de realización, los derivados de IL-1 ra se construyen artificialmente. Los derivados de IL-1 ra ejemplares incluyen, pero sin limitación, formas modificadas química o enzimáticamente de la

55 secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6. Los derivados ejemplares de IL-1ra también incluyen, pero sin limitación, formas modificadas química o enzimáticamente de variantes de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6.

En ciertas formas de realización, el término IL-1 ra incluye, pero sin limitación, un IL-1 ra que tiene una secuencia

líder secretora. En ciertas formas de realización, IL-1 ra que tiene una secuencia líder secretora se denomina "IL-1ra precursor". Una secuencia de aminoácidos de IL-1 ra precursor ejemplar se expone en la SEQ ID NO: 2. El término "IL-1ra precursor" incluye fragmentos, variantes y derivados de SEQ ID NO: 2 que son capaces de secretarse y procesarse en una forma que tiene actividad antagonista para el receptor de interleucina-1.

5

El término IL-1 ra incluye tanto IL-1 ra de agregación como IL-1 ra que tiene una agregación reducida. Las proteínas IL-1 ra de agregación tienen una lisina en la posición 93 y una arginina en la posición 97, pero no todas las proteínas IL-1ra con una lisina en la posición 93 y una arginina en la posición 97 son IL-1ra de agregación. "IL-1 ra de agregación" incluye proteínas de variantes y derivados de IL-1 ra de tipo que se agregan a 39 °C de acuerdo con el siguiente ensayo. Una solución de 100 mg/ml de IL-1 ra objeto se incuba a 39 °C en fosfato 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 0,5 mM, pH 6,5 (PSE). Como referencia, una solución de 100 mg/ml de una proteína de tipo salvaje IL-1 ra que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5, se incuba en PSE a 39 °C. La densidad óptica de cada solución se mide a 405 nm, después de 2 horas de incubación a 39 °C. Si la IL-1ra objeto tiene una densidad óptica después de 2 horas de incubación que es al menos el 60 % de la densidad óptica de la proteína de tipo salvaje IL-1 ra después de 2 horas de incubación, entonces la IL-1 ra objeto es una IL-1ra de agregación.

10

"IL-1ra que tiene agregación reducida" incluye proteínas de variantes y derivados de IL-1 ra que tienen una densidad óptica que es inferior al 60 % de la densidad óptica de la proteína de tipo salvaje IL-1 ra en el ensayo descrito anteriormente.

20

En ciertas formas de realización, el término "una IL-1 ra que tiene actividad antagonista para el receptor de interleucina-1" se refiere a una proteína de tipo salvaje, de variante o derivado de IL-1 ra que es al menos un 50 % tan activa como una proteína de tipo salvaje IL-1 ra que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, en el ensayo de formación del complejo de señalización de IL-1ra descrito en el Ejemplo 3. "Al menos el 50 % tan activo" se determina comparando la CE50 de la IL-1 ra objeto con la CE50 de proteína de tipo salvaje IL-1 ra.

25

El término "Arginina-97" se refiere al residuo de aminoácidos en la posición 97 en la SEQ ID NO: 3 o la posición de aminoácidos en una IL-1 ra que corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 97 en la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el aminoácido que corresponde a la arginina-97 de la SEQ ID NO: 3 es la arginina en la posición 98 de la SEQ ID NO: 5. Esa arginina todavía se conoce como arginina-97 de IL-1ra. En ciertas formas de realización, la arginina-97 se denomina "R97", en la que R es el código de una sola letra para la arginina y 97 se refiere a su posición en la SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, si R97 se reemplaza con otro amino ácido, la mutación puede denominarse R97X, en la que X es el código de una sola letra para el aminoácido de reemplazo. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, si R97 se reemplaza por alanina, la mutación se puede denominar R97A.

30

El término "Lisina-93" se refiere al residuo de aminoácidos en la posición 93 en la SEQ ID NO: 3 o la posición de aminoácidos en una IL-1 ra que corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 93 en la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el aminoácido que corresponde a la lisina-93 de la SEQ ID NO: 3 es la lisina en la posición 94 de la SEQ ID NO: 5. Esa lisina todavía se conoce como lisina-93 de IL-1ra. En ciertas formas de realización, la lisina-93 se denomina "K93", en la que K es el código de una sola letra para la lisina y 93 se refiere a su posición en la SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, si K93 se reemplaza con otro amino ácido, la mutación puede denominarse K93X, en la que X es el código de una sola letra para el aminoácido de reemplazo. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, si K93 se reemplaza por alanina, la mutación se puede denominar K93A.

40

El término "Triptófano-16" se refiere al residuo de aminoácidos en la posición 16 en la SEQ ID NO: 3 o la posición de aminoácidos en una IL-1 ra que corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 16 en la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el aminoácido que corresponde al triptófano-16 de la SEQ ID NO: 3 es el triptófano en la posición 17 de la SEQ ID NO: 5. Ese triptófano todavía se conoce como triptófano-16 de IL-1ra. En ciertas formas de realización, el triptófano-16 se denomina "W16", en la que W es el código de una sola letra para el triptófano y 16 se refiere a su posición en la SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, si W16 se reemplaza con otro amino ácido, la mutación puede denominarse W16X, en la que X es el código de una sola letra para el aminoácido de reemplazo. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, si W16 se reemplaza por alanina, la mutación se puede denominar W16A.

50

El término "Tirosina-34" se refiere al residuo de aminoácidos en la posición 34 en la SEQ ID NO: 3 o la posición de aminoácidos en una IL-1 ra que corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 34 en la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el aminoácido que corresponde a la tirosina-34 de la SEQ ID NO: 3 es la tirosina en la posición 35 de la SEQ ID NO: 5. Esa tirosina todavía se conoce como tirosina-35 de IL-1ra. En ciertas formas de realización, la tirosina-34 se denomina "Y34", en la que Y es el código de una sola letra para la tirosina y 34 se refiere a su posición en la SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, si Y34 se reemplaza con otro amino ácido, la mutación puede

55

denominarse Y34X, en la que X es el código de una sola letra para el aminoácido de reemplazo. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, si Y34 se reemplaza por alanina, la mutación se puede denominar Y34A.

En ciertas formas de realización, la "agregación reducida" se define como (1) agregación de un polipéptido en la condición A que se reduce en relación con la agregación del polipéptido en la condición B; y/o (2) agregación de una variante polipeptídica en la condición A que se reduce en relación con la agregación del polipéptido de tipo salvaje en la misma condición A; y/o (3) agregación de una variante polipeptídica en la condición A que se reduce en relación con la agregación de una variante polipeptídica diferente en la misma condición A. Como ejemplo no limitativo, la agregación relativa se puede determinar para el caso (1) como se indica a continuación. La densidad óptica a 405 nm de un polipéptido en la condición A se mide en diversos tiempos. La densidad óptica a 405 nm del polipéptido en la condición B se mide entonces en los mismos diversos tiempos. La curva de agregación para el polipéptido objeto en cada condición se traza con densidad óptica en el eje y, y el tiempo en el eje x. Si el polipéptido en la condición A tiene una densidad óptica más baja en el tiempo t que el polipéptido en la condición B en el mismo tiempo t, entonces se dice que el polipéptido en la condición A tiene una agregación reducida con respecto al polipéptido en la condición B.

Los ejemplos de diferentes condiciones incluyen, pero sin limitación, diferencias en la composición del tampón, diferencias en la temperatura, diferencias en la concentración de polipéptidos, la presencia y ausencia de moléculas accesorias, diferencias en la concentración de moléculas accesorias, etc.

El término "molécula accesoria" se refiere a una molécula que reduce la agregación de uno o más polipéptidos. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de uno o más polipéptidos no específicamente. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación al interactuar con uno o más aminoácidos del polipéptido. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria interactúa covalentemente con uno o más aminoácidos del polipéptido y se denomina "molécula accesoria covalente". En ciertas formas de realización, una molécula accesoria interactúa de manera no covalente con uno o más aminoácidos del polipéptido y se denomina "molécula accesoria no covalente".

En ciertas formas de realización, la reducción en la agregación de un polipéptido está relacionada con la concentración de la molécula accesoria. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede eliminar sustancialmente la agregación de un polipéptido. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 10 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 20 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 30 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 40 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 50 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 60 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 70 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 75 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 80 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 85 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 90 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la agregación de un polipéptido en al menos un 95 %.

En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido. En ciertas formas de realización, la reducción en la tasa de agregación de un polipéptido depende de la concentración de la molécula accesoria. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria elimina sustancialmente la agregación de un polipéptido. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 10 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 20 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 30 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 40 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 50 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 60 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 70 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 75 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 80 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de

agregación de un polipéptido en al menos un 85 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 90 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reduce la tasa de agregación de un polipéptido en al menos un 95 %.

- 5 En ciertas formas de realización, una molécula accesoria interactúa covalentemente o no covalentemente con un polipéptido en uno o más residuos de aminoácidos. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria interactúa con uno o más residuos de aminoácidos específicos. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria no reduce sustancialmente la actividad del polipéptido. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria no reduce la actividad del polipéptido en más del 10 %. En ciertas formas de realización, las moléculas
- 10 accesorias no reducen la actividad del polipéptido en más del 20 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria no reduce la actividad del polipéptido en más del 30 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria no reduce la actividad del polipéptido en más del 50 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria no reduce la actividad del polipéptido en más del 75 %.
- 15 En ciertas formas de realización, una molécula accesoria elimina una carga presente en un residuo de aminoácidos. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria elimina una carga modificando covalentemente el residuo de aminoácidos. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria elimina una carga al interactuar de manera no covalente con el residuo de aminoácidos, "enmascarando" de este modo la carga.
- 20 Las moléculas accesorias covalentes ejemplares incluyen, pero sin limitación, ácido 6- (N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)hexanoico (NBD-X), metil acetil fosfato (MAP) y anhídrido citracónico.

Las moléculas accesorias no covalentes ejemplares incluyen, pero sin limitación, azúcares, aniones de carga única y aniones de carga múltiple. Los azúcares ejemplares que pueden ser moléculas accesorias incluyen, pero sin

25 limitación, glicerol, sacarosa, manitol y sorbitol. Los ejemplos de aniones de carga única que pueden ser moléculas accesorias incluyen, pero sin limitación, fosfato y cloruro. Los aniones ejemplares de carga múltiple que pueden ser moléculas accesorias incluyen, pero sin limitación, pirofosfato y citrato.

- El término "molécula accesoria reactiva a la arginina" se refiere a una molécula accesoria que interactúa
- 30 específicamente con los residuos de arginina. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la arginina interactúa únicamente con arginina. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la arginina interactúa con la arginina además de otros aminoácidos. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la arginina interactúa covalentemente con arginina. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la arginina interactúa no covalentemente con arginina. En ciertas formas de
- 35 realización, una molécula accesoria reactiva a la arginina no reduce sustancialmente la actividad del polipéptido que contiene la arginina.

- El término "molécula accesoria reactiva a la lisina" se refiere a una molécula accesoria que interactúa específicamente con los residuos de lisina. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la
- 40 lisina interactúa únicamente con lisina. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la lisina interactúa con lisina además de otros aminoácidos. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la lisina interactúa covalentemente con la lisina. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la lisina interactúa no covalentemente con la lisina. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria reactiva a la lisina no reduce sustancialmente la actividad del polipéptido que contiene la lisina.

- 45 El término "aniones de carga múltiple" se refiere a moléculas que comprenden más de una carga negativa a pH 6,5 y 25 °C. En ciertas formas de realización, los aniones de carga múltiple tienen en promedio más de una, pero menos de dos, cargas negativas a pH 6,5 y 25 °C. En ciertas formas de realización, los aniones de carga múltiple tienen en promedio dos o más cargas negativas a pH 6,5 y 25 °C. En ciertas formas de realización, los aniones de carga
- 50 múltiple tienen en promedio entre dos y cuatro cargas negativas a pH 6,5 y 25 °C. En diversas formas de realización, un experto en la técnica puede determinar si un anión particular es un anión de carga múltiple a pH 6,5 y 25°C, por ejemplo, a partir de los valores de pKa publicados para el anión. El término "anión de carga única" se refiere a un anión que tiene en promedio una carga negativa, o menos de una, a pH 6,5 y 25 °C. En diversas formas de
- 55 realización, un experto en la técnica puede determinar si un anión particular es un anión de carga única a pH 6,5 y 25°C, por ejemplo, a partir de los valores de pKa publicados para el anión.

El término "azúcar" se refiere a un carbohidrato. Los azúcares ejemplares incluyen, pero sin limitación, monosacáridos, disacáridos y trisacáridos. Los azúcares ejemplares no limitantes incluyen, pero sin limitación, glicerol, sacarosa, manitol y sorbitol.

- Se considera que una enfermedad o afección médica es una "enfermedad mediada por interleucina-1" si la enfermedad o afección médica espontánea o experimental está asociada con niveles elevados de IL-1 en fluidos corporales o tejido y/o si las células o tejidos tomados del cuerpo producen niveles elevados de IL-1 en cultivo. En
- 5 ciertas formas de realización, dichas enfermedades mediadas por interleucina-1 también son reconocidas por una o más de las siguientes dos condiciones: (1) los hallazgos patológicos asociados con la enfermedad o afección médica pueden imitarse experimentalmente en animales mediante la administración de IL-1 o la regulación positiva de expresión de IL-1; y/o (2) una patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o afección
- 10 condición médica puede inhibirse o eliminarse mediante el tratamiento con agentes que inhiben la acción de la IL-1. En ciertas formas de realización, una o más de las condiciones anteriores se cumplen en una enfermedad mediada por IL-1. En ciertas formas de realización, todas las condiciones se cumplen en una enfermedad mediada por IL-1.

- Las enfermedades mediadas por interleucina-1 aguda y crónica (IL-1) incluyen, pero sin limitación, pancreatitis aguda; esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig); enfermedad de Alzheimer;
- 15 caquexia/anorexia, incluyendo, pero sin limitación, caquexia inducida por el SIDA; asma y otras enfermedades pulmonares; aterosclerosis; vasculitis autoinmune; síndrome de fatiga crónica; enfermedades asociadas a Clostridium, incluyendo, pero sin limitación, diarrea asociada a Clostridium; afecciones e indicaciones coronarias, incluyendo, pero sin limitación, insuficiencia cardíaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (por ejemplo, relacionada con sepsis) e injerto de derivación de arteria coronaria; cáncer,
- 20 incluyendo, pero sin limitación, leucemias, incluyendo, pero sin limitación, leucemia de mieloma múltiple y mielógena (por ejemplo, AML y CML) y metástasis tumoral; diabetes (incluyendo, pero sin limitación, diabetes dependiente de insulina); endometriosis; fiebre; fibromialgia; glomerulonefritis; enfermedad de injerto contra huésped y/o rechazo de trasplante; choque hemorrágico; hiperalgesia; enfermedad inflamatoria intestinal; afecciones inflamatorias de una articulación, incluyendo, pero sin limitación, osteoartritis, artritis psoriásica y artritis reumatoide; enfermedad
- 25 inflamatoria del ojo, incluyendo, pero sin limitación, las asociadas con, por ejemplo, trasplante de córnea; isquemia, incluyendo, pero sin limitación, isquemia cerebral (incluyendo, pero sin limitación, lesión cerebral como resultado de, por ejemplo, traumatismo, epilepsia, hemorragia o ictus, cada uno de los cuales puede provocar neurodegeneración); enfermedad de Kawasaki; deterioro del aprendizaje; enfermedades pulmonares (incluyendo, pero sin limitación, síndrome de dificultad respiratoria aguda, o ARDS); esclerosis múltiple; miopatías (por ejemplo, el
- 30 metabolismo de las proteínas musculares, incluyendo, pero sin limitación, metabolismo de las proteínas musculares en la sepsis); neurotoxicidad (incluyendo, pero sin limitación, tal afección inducida por el VIH); osteoporosis; dolor, incluyendo, pero sin limitación, dolor relacionado con el cáncer; enfermedad de Parkinson; enfermedad periodontal; parto prematuro; psoriasis; lesión por reperfusión; choque séptico; efectos secundarios de la radioterapia; enfermedad de la articulación mandibular temporal; alteración del sueño; uveítis; y afecciones inflamatorias resultado
- 35 de, por ejemplo, tensión, esguince, daño del cartílago, traumatismo, cirugía ortopédica, infección u otros procesos de enfermedades.

Descripción detallada de ciertas formas de realización ejemplares

- 40 Se proporcionan métodos para reducir la agregación de una IL-1ra de agregación. En ciertas formas de realización, la IL-1 ra de agregación, cuya agregación debe reducirse, comprende la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, la IL-1ra de agregación cuya agregación debe reducirse, comprende un fragmento, variante o derivado de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6, donde ese
- 45 fragmento, variante o derivado tiene una actividad antagonista para el receptor de interleucina-1.

- La agregación de IL-1 ra puede ser resultado de una o más interacciones catión-pi entre los residuos de superficie de dos polipéptidos de IL-1 ra. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 2, la lisina-93 de un polipéptido IL-1 puede formar una interacción catión-pi con el triptófano-16 de un segundo polipéptido IL-1. De manera similar, la
- 50 arginina-97 de un polipéptido puede formar una interacción catión-pi con la tirosina-34 de un segundo polipéptido. Esas interacciones pueden hacer que dos polipéptidos IL-1ra se unan entre sí. Además, debido a que la unión es asimétrica, lo que significa que la unión no se produce entre la misma cara en ambos polipéptidos, cada polipéptido puede ser capaz de unirse a dos polipéptidos IL-1 ra simultáneamente. De hecho, si son posibles contactos de unión asimétricos adicionales entre los polipéptidos IL-1 ra, un polipéptido IL-1 ra puede ser capaz de unirse a más de dos
- 55 polipéptidos IL-1 ra simultáneamente. Si cada polipéptido IL-1 ra es capaz de unirse al menos a otros dos polipéptidos IL-1 ra, por ejemplo, a través de la interacción catión-pi asimétrica que se muestra en la Figura 8, entonces esas interacciones pueden conducir a la agregación de IL-1 ra en solución.

En ciertas formas de realización, la agregación de una IL-1 ra de agregación puede reducirse reduciendo la carga

positiva en la lisina-93, en la arginina-97, o tanto en la lisina-93 como en la arginina-97. En ciertas formas de realización, si la carga positiva en una o ambas de esas posiciones se reduce lo suficiente, la interacción catión-pi puede no formarse, o puede debilitarse de modo que ya no sea lo suficientemente estable como para causar la agregación de IL-1ra. En ciertas formas de realización, la agregación de una IL-1 ra de agregación puede reducirse por otros mecanismos. El método no está limitado por el mecanismo de la reducción en la agregación. Cualquiera de los métodos descritos para reducir la agregación puede producirse por el mecanismo propuesto ejemplar analizado anteriormente o por cualquier otro mecanismo que logre el resultado descrito. Las moléculas que son capaces de reducir la agregación de una IL-1 ra de agregación se denominan colectivamente "moléculas accesorias", independientemente de su mecanismo de reducción de la agregación y de si actúan de forma covalente o no covalente.

En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede reducir la agregación de una IL-1 ra de agregación al reducir la carga positiva en una o ambas de lisina-93 o arginina-97. En diversas formas de realización, una molécula accesoria puede reducir la carga positiva en la lisina-93, en la arginina-97 o tanto en la lisina-93 como la arginina-97 de forma covalente o no covalente. Una molécula accesoria postulada para reducir la carga positiva en uno o ambos de estos aminoácidos también puede reducir la agregación a través de otros mecanismos, o puede actuar por otros mecanismos en su totalidad.

En ciertas formas de realización, la incubación de una IL-1 ra de agregación con moléculas aniónicas de carga única o aniónicas de carga múltiple puede reducir la agregación de IL-1ra. En ciertas formas de realización, la incubación de una IL-1 ra que tiene una agregación reducida con moléculas aniónicas de carga única o aniónicas de carga múltiple puede reducir aún más la agregación de IL-1ra. En ciertas formas de realización, esa reducción en la agregación puede ser resultado de la molécula aniónica de carga única o aniónica de carga múltiple que interactúa con la carga positiva en la lisina-93, en la arginina-97, o tanto en lisina-93 como arginina-97. Como se analiza en el trabajo descrito en el Ejemplo 2 y se muestra en la Figura 1, la incubación de una IL-1 ra de agregación en CSE, que contiene citrato 10 mM, redujo la agregación (medida por la densidad óptica a 405 nm) con el tiempo más que la incubación de IL-1 ra de agregación en PSE, que contiene fosfato 10 mM. En ese experimento, la agregación en CSE alcanzó una DO_{405} de aproximadamente 0,55, mientras que la agregación en PSE alcanzó una DO_{405} de aproximadamente 1,2. Por lo tanto, la incubación en CSE redujo la agregación en más del 50 % en relación con la agregación en PSE en ese experimento.

De manera similar, en el trabajo descrito en el Ejemplo 2, la tasa de agregación de IL-1ra de agregación en CSE fue más baja que la tasa de agregación de IL-1ra de agregación en PSE. La tasa de agregación en PSE en la Figura 1 está representada por la pendiente de la línea marcada como K_{agg} . Se puede trazar una línea similar para CSE en la Figura 1, y esa línea tendrá una pendiente más baja, lo que indica una disminución de la tasa de agregación en CSE en relación con PSE.

En ciertas formas de realización, el citrato puede ser más eficaz para reducir la agregación porque tiene una carga negativa mayor que el fosfato a un pH de 6,5. En ciertas formas de realización, ciertas cantidades de carga negativa pueden ser más eficaces que otras para reducir la agregación. Además, en ciertas formas de realización, ciertas configuraciones de carga negativa, por ejemplo, la distancia entre las cargas negativas en una molécula accesoria y cómo están "fijadas" esas cargas negativas en el espacio, también pueden afectar a la eficacia de las moléculas accesorias. Por lo tanto, en ciertas formas de realización, la eficacia de diversas moléculas accesorias puede verse afectada por la cantidad de carga negativa, pero la cantidad de carga negativa puede no ser siempre determinativa. En ciertas formas de realización, un anión de carga múltiple puede ser más eficaz para reducir la agregación que un anión de carga única. En diversas formas de realización, un experto en la técnica puede seleccionar moléculas accesorias y determinar cuál es apropiada para la aplicación específica contemplada. Por ejemplo, ciertas moléculas accesorias pueden ser más o menos eficaces a ciertas temperaturas. En diversas formas de realización, un experto en la técnica puede seleccionar una molécula accesoria que sea eficaz a la temperatura particular a la que se incubará o se almacenará la IL-1ra de agregación. De acuerdo con la invención, se selecciona una molécula accesoria que sea eficaz en la reducción de la agregación entre aproximadamente 20 °C y 45 °C. En ciertas formas de realización, se selecciona una molécula accesoria que sea eficaz en la reducción de la agregación entre aproximadamente 25 °C y 45 °C. En ciertas formas de realización, se selecciona una molécula accesoria que sea eficaz en la reducción de la agregación entre aproximadamente 30 °C y 45 °C. En ciertas formas de realización, se selecciona una molécula accesoria que sea eficaz en la reducción de la agregación entre aproximadamente 35 °C y 45 °C.

En ciertas formas de realización, la alteración de la concentración de una molécula accesoria puede afectar a la reducción en la agregación o la reducción en la tasa de agregación de una IL-1ra de agregación. El trabajo analizado

en el Ejemplo 4 y mostrado en la Figura 3 consideró la tasa de agregación de una IL-1ra de agregación incubada en diversas concentraciones de fosfato, citrato o pirofosfato. En ese experimento, el citrato y el pirofosfato mostraron una correlación similar entre una reducción en la tasa de agregación y la concentración de la molécula accesoria. Tanto el citrato como el pirofosfato mostraron una reducción de casi el 90 % en la tasa de agregación en una molécula accesoria 10 mM. Esa reducción aumentó tanto para el citrato como para el pirofosfato a 20 mM, y luego se estabilizó hasta más de 100 mM. En contraste, el fosfato mostró solo una reducción de aproximadamente el 20 % en la tasa de agregación a 10 mM, y la reducción no se estabilizó hasta aproximadamente 80 mM. Los resultados del experimento analizado en el Ejemplo 4 sugieren que el pirofosfato y el citrato son sustancialmente igualmente eficaces para reducir la tasa de agregación de una IL-1 ra de agregación a 29 °C. Tanto el citrato como el pirofosfato tienen una mayor carga negativa que el fosfato a pH 6,5, lo que sugiere que, en ciertas formas de realización, la cantidad de carga negativa puede afectar a la eficiencia de ciertas moléculas accesorias.

En ciertas formas de realización, un azúcar puede ser una molécula accesoria. Los azúcares ejemplares que pueden ser moléculas accesorias incluyen, pero sin limitación, sacarosa, glicerol, manitol y sorbitol. El Ejemplo 5 describe un experimento ejemplar en el que las concentraciones crecientes de sacarosa, glicerol o sorbitol redujeron la tasa de agregación de una IL-1ra de agregación (véase la Figura 4). Al 3 %, cada uno de los tres azúcares redujo la tasa de agregación a menos de 5 unidades de agregación (a.u.; 1 a.u. es igual a un aumento de 1 mili-unidad de densidad óptica a 405 nm por minuto usando un volumen de 200 μ l y un Espectrofotómetro de lectura de placas SpectroMax™), en comparación con una tasa de agregación de más de 20 a.u. en azúcar al 0 %.

En diversas formas de realización, un experto en la técnica puede determinar la concentración apropiada de una molécula accesoria no covalente para una aplicación particular usando, por ejemplo, los métodos del Ejemplo 4 o del Ejemplo 5. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede estar presente a una concentración de 1 a 100 mM. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede estar presente en una concentración de 1 a 50 mM. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede estar presente en una concentración de 1 a 20 mM. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede estar presente en una concentración de 10 mM.

En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede estar presente en una concentración de entre el 0 y el 10 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede estar presente en una concentración de entre el 0 y el 5 %. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede estar presente en una concentración del 1 %, 2 % o el 3 %.

En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1 ra es inferior a 10 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1ra es inferior a 7 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1 ra es inferior a 5 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1ra es inferior a 4 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1ra es inferior a 3 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1 ra está entre 0,1 mM y 5 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1ra está entre 1 mM y 5 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1 ra está entre 0,1 mM y 4 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1 ra está entre 1 mM y 4 mM. En ciertas formas de realización, la K_d de una molécula accesoria no covalente para IL-1 ra está entre 2 mM y 4 mM.

En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede reducir la agregación modificando covalentemente una IL-1ra de agregación. En ciertas formas de realización, una molécula accesoria puede reducir adicionalmente la agregación modificando covalentemente una IL-1 ra que tiene una agregación reducida. En ciertas formas de realización, la modificación covalente elimina una carga positiva en la lisina-93, en la arginina-97, o tanto en la lisina-93 como en la arginina-97. En ciertas formas de realización, una molécula covalente accesoria puede reducir la agregación mediante otro mecanismo, por ejemplo, inhibiendo estéricamente la formación de una o más interacciones catión- π u otras interacciones entre los polipéptidos IL-1 ra de agregación.

Las moléculas accesorias ejemplares no limitativas que pueden modificar covalentemente una IL-1ra incluyen, pero sin limitación, NBD-X, MAP y anhídrido citracónico. En ciertas formas de realización, NBD-X forma un derivado con aminos primarios. En el trabajo analizado en el Ejemplo 3 y mostrado en la Figura 2, la incubación de la proteína de tipo salvaje IL-1ra con NBD-X, SE dio lugar a la derivación del grupo amino terminal del polipéptido y de la lisina-93. En ciertas formas de realización, la derivación con NBD-X puede eliminar la carga positiva en la lisina-93 y puede dar como resultado una agregación reducida de IL-1ra derivatizada. En ciertas formas de realización, MAP acetila residuos de lisina y los grupos amino N-terminales de polipéptidos. En el trabajo analizado en el Ejemplo 7 y

mostrado en las Figuras 13-15, la incubación de IL-1 ra con MAP en varios tiempos de incubación, dio como resultado la derivación del grupo amino N-terminal de IL-1ra; la derivación del grupo amino N-terminal y lisina-6 de IL-1ra; la derivación del grupo amino N-terminal, lisina-6 y lisina-93 de IL-1ra; o la derivación del grupo amino N-terminal, lisina-6, lisina-93 y lisina-96 de IL-1ra. En ciertas formas de realización, la derivación con MAP puede
5 eliminar la carga positiva en la lisina-93 y puede dar como resultado una agregación reducida de IL-1 ra derivatizada.

En ciertas formas de realización, otras moléculas reactivas a amina pueden reducir la agregación de una IL-1 ra de agregación al eliminar una o más cargas positivas o mediante otro mecanismo. En ciertas formas de realización, IL-1ra que se ha derivado con una molécula accesoria covalente es al menos un 90 % tan activa como una proteína de
10 tipo salvaje IL-1ra que no se ha derivado de manera similar. En ciertas formas de realización, IL-1 ra que se ha derivado con una molécula accesoria covalente es al menos un 80 % tan activa como una proteína de tipo salvaje IL-1 ra que no se ha derivado de manera similar. En ciertas formas de realización, IL-1ra que se ha derivado con una molécula accesoria covalente es al menos un 75 % tan activa como una proteína de tipo salvaje IL-1ra que no se ha derivado de manera similar. En ciertas formas de realización, IL-1 ra que se ha derivado con una molécula accesoria
15 covalente es al menos un 50 % tan activa como una proteína de tipo salvaje IL-1ra que no se ha derivado de manera similar.

A continuación, se describen los kits que comprenden IL-1ra y al menos una molécula accesoria. Los kits pueden incluir opcionalmente instrucciones para combinar la IL-1 ra y la al menos una molécula accesoria, si los
20 componentes se proporcionan por separado. Los kits pueden incluir instrucciones para usar la IL-1 ra y la al menos una molécula accesoria. Los kits pueden comprender al menos una molécula accesoria covalente y/o al menos una molécula accesoria no covalente. Cuando el kit comprende al menos una molécula accesoria covalente, el kit puede comprender además instrucciones para eliminar cualquier molécula accesoria sin reaccionar restante de la IL-1 ra derivatizada después de la incubación de IL-1 ra con la molécula accesoria covalente. Los kits pueden contener IL-
25 1ra que ya se ha derivado con al menos una molécula accesoria covalente. De manera similar, en ciertas formas de realización, un kit puede contener una IL-1ra que ya está en una composición con al menos una molécula accesoria no covalente.

Como se describe a continuación, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-1ra junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o
30 adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Los materiales de formulación aceptables pueden ser no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas.
35

Una composición farmacéutica puede comprender materiales de formulación para modificar, mantener y/o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción y/o penetración de la composición. Los materiales de formulación ejemplares incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina y lisina);
40 antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio e hidrógeno-sulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos y otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol y glicina); agentes quelantes (tal como ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina e hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa y dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica,
45 gelatina e inmunoglobulinas); agentes colorantes, saporíferos y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tal como el sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol y polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol y sorbitol); agentes de
50 suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa y sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, tales como cloruro de sodio y potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y adyuvantes farmacéuticos. (Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición,
55 A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

Una IL-1 ra y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden estar unidos a un vehículo que prolonga la semivida. Los vehículos ejemplares incluyen, pero sin limitación, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Se describen ciertos vehículos ejemplares, por ejemplo, en la Solicitud de Estados Unidos N.º de Serie 09/428.082 y la

Solicitud PCT N.º WO 99/25044 publicada.

- Un experto en la técnica determinará una composición farmacéutica óptima dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente. En ciertas formas de realización, dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de depuración *in vivo* de la IL-1ra.

- El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido ceforraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos ejemplares adicionales. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón de acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado para el mismo. Una composición que comprende una IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, puede prepararse para el almacenamiento mezclando la composición seleccionada con el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, una composición que comprende una IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados, tal como sacarosa.

- Las composiciones farmacéuticas pueden seleccionarse para administración parenteral. Las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de los conocimientos de la técnica.

- Cuando se contempla la administración parenteral, una composición terapéutica puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende la IL-1ra deseada, con o sin al menos una molécula accesoria y/o una o más agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo para inyección parenteral puede ser agua destilada estéril en la que la IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, se formula como una solución isotónica estéril, debidamente conservada. La preparación puede involucrar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto que luego puede ser administrado a través de un depósito de inyección. También se puede usar ácido hialurónico, y puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Se pueden usar dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la molécula deseada.

- Una composición farmacéutica puede formularse para inhalación. Una IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, puede formularse como un polvo seco para inhalación. Una solución de inhalación que comprende una IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, puede formularse con un propulsor para la administración de aerosol. Las soluciones pueden nebulizarse. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la solicitud PCT n.º PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

- Además, se contempla que las formulaciones pueden administrarse por vía oral. Una IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, que se administra de esta manera puede formularse con o sin los vehículos utilizados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y capsulas. Puede diseñarse una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Se puede incluir al menos un agente adicional para facilitar la absorción e la IL-1ra y/o cualquier molécula accesoria y/o cualquier agente terapéutico adicional. También se pueden emplear diluyentes, saporíferos, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de comprimidos y aglutinantes.

- Una composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Al disolver los comprimidos en agua estéril u otro vehículo apropiado, las soluciones se pueden preparar en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio o bicarbonato, lactosa o fosfato

de calcio; o agentes de unión, tales como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, incluidas las formulaciones que implican IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, en formulaciones de administración sostenida o controlada. En ciertas formas de realización, las técnicas para formular una diversidad de otros productos de administración sostenida o controlada, tales como vehículos de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e depósitos de inyección, también se conocen por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Solicitud PCT N.º PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 3.773.919 y EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), acetato de etilvinilo (Langer et al., anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); los documentos EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La composición farmacéutica que se usa para la administración *in vivo* es típicamente estéril. Esto se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez formulada la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles en forma de una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

Se pueden proporcionar kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits pueden contener cada uno un primer recipiente que tiene una proteína seca y un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. Se pueden incluir kits que contengan jeringas precargadas de una sola cámara y varias cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, para ser empleados terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, de acuerdo con ciertas formas de realización, variarán de este modo dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación para la cual se utiliza la IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y la salud general) del paciente. En ciertas formas de realización, el médico puede valorar la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. La dosificación puede variar de 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.

La frecuencia de dosificación puede tener en cuenta los parámetros farmacocinéticos de IL-1ra y/o cualquier molécula accesoria y/o cualquier agente terapéutico adicional en la formulación utilizada. Un médico puede administrar la composición hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) con el tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. El refinamiento adicional de la dosis apropiada se realiza de forma rutinaria por los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas que habitualmente realizan. Pueden determinarse dosificaciones apropiadas mediante el uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.

La ruta de administración de la composición farmacéutica es según los métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral, mediante inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; por sistemas de liberación sostenida o por dispositivos de implantación. Las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de forma continua mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación.

La composición puede administrarse localmente a través de la implantación de una membrana, una esponja u otro material apropiado sobre el cual se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede realizarse mediante difusión, bolo de liberación programada o administración continua.

Puede ser deseable usar una composición farmacéutica que comprenda una IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, de manera *ex vivo*. En tales casos, las células, tejidos y/u órganos que se han extraído del paciente se exponen a una composición farmacéutica que comprende una IL-1ra, con o sin al menos una molécula accesoria y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales, después de lo cual las células, tejidos y/u órganos se implantan de nuevo en el paciente.

En ciertos casos, una IL-1 ra que tiene una agregación reducida y/o cualquier molécula accesoria y/o cualquier agente terapéutico adicional puede administrarse mediante la implantación de ciertas células que han sido modificadas genéticamente, utilizando métodos conocidos en la técnica, para expresar y segregar los polipéptidos. Dichas células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Las células pueden ser inmortalizadas. Para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son, por lo general, cerramientos o membranas poliméricas semipermeables y biocompatibles que permiten la liberación del producto o productos de proteínas, pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Producción de proteína de tipo salvaje IL-1ra

El antagonista del receptor de interleucina-1 recombinante humano (IL-1ra) que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5, puede prepararse en las instalaciones de fabricación de Amgen de acuerdo con el método analizado en la Patente europea N.º EP 0 502 956 B1, en la que la etapa de recuperación celular es opcional. Como alternativa, la anakinra, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, puede obtenerse en Amgen Inc., Thousand Oaks, CA. La IL-1ra humana purificada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se usó en los ejemplos descritos en el presente documento.

Ejemplo 2

Agregación de IL-1 ra

La agregación de IL-1 ra en tampón fosfato y tampón citrato a 39 °C se determinó de la siguiente manera. Diez ml de una solución madre de IL-1 (200-220 mg/ml de proteína en citrato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 0,5 mM, pH 6,5 (CSE)) se dializaron durante una noche a 4 °C frente a 2 x 2 l de fosfato 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 0,5 mM, pH 6,5 (PSE) o 2 x 2 l de CSE. La solución dializada se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y la concentración de proteína IL-1 ra se ajustó a 140 mg/ml diluyendo con el tampón apropiado.

La agregación de IL-1ra en cada tampón se midió utilizando una placa de vidrio de 96 pocillos (Zissner) y un espectrofotómetro de lectura de placas de temperatura controlada, SpectraMax Plus (Molecular Devices). El tamaño de la muestra por pocillo fue de 180 µl. Las placas se incubaron en el espectrofotómetro a 39 °C y la densidad óptica se midió a 405 nm cada 1 minuto. La Figura 1 muestra la densidad óptica a 405 nm representada en función del tiempo para este experimento. La tasa de agregación se determinó como la pendiente de la región lineal inicial de la

curva de saturación utilizando el programa SoftMax Pro (Molecular Devices). La tasa de agregación de IL-1 ra incubada en CSE se reduce en relación con la tasa de agregación de IL-1 ra incubada en PSE. Además, la extensión de la agregación de IL-1ra incubada en CSE se reduce con relación a la extensión de la agregación de IL-1 ra incubada en PSE.

5

Ejemplo 3

Marcado con NBD-X de IL-1 ra

- 10 Los grupos amino expuestos en la superficie se identificaron marcando IL-1 ra con NBD-X, SE (6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)hexanoato de succinimidilo, Molecular Probes). NBD-X se convierte en fluorescente tras la derivación con grupos amino. Se diluyeron veinte μ l de IL-1 ra 0,2 mM en PSE con 480 μ l de PSE. Se añadieron ocho μ l de 50 μ g/ μ l de NBD-X, solución de SE en dimetilformamida a la solución de IL-1 ra en aumentos de 2 μ l a temperatura ambiente. La reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente, luego se detuvo mediante la
- 15 adición de 50 μ l de una solución 1,5 M de hidroxilamina, pH 8,5. La mezcla de reacción se pasó a través de una columna de filtración de gel desalinizante que se preequilibró con PSE. El pico de proteína se recogió y se analizó adicionalmente por RP-HPLC y LC-MS/MS de la siguiente manera.

- La HPLC de fase inversa se realizó utilizando una columna Phenomenex Jupiter™ 5 μ C4 (300 Å, 250 x 4,6 mm) y un
- 20 sistema HP1100 HPLC equipado con detectores de absorbancia y fluorescencia en línea. La absorbancia se midió a 215 nm para detectar la presencia del polipéptido. La emisión fluorescente se midió a 535 nm después de la excitación a 480 nm para detectar la presencia de NBD-X derivada de amina. La elución se realizó con un gradiente lineal del 30-45 % de metanol en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % y agua (v/v/v). La Figura 2 muestra la absorbancia de IL-1ra marcada con NBD-X a 215 nm y la emisión fluorescente de IL-1ra marcada con NBD-X a 535
- 25 nm después de la excitación a 480 nm para este experimento. La identidad de los picos fluorescentes se determinó como se indica a continuación.

- Se identificaron dos picos de fluorescencia principales, un pico de elución temprana a los 16,75 minutos y un pico de elución posterior a los 17,5 minutos. Véase la Figura 2, panel inferior. Los picos se recogieron manualmente y se
- 30 digirieron con endoproteinasa Lys-C de la siguiente manera. Cada pico se recogió de cinco formas de realización de HPLC separadas. Todas las fracciones que contenían principalmente el pico de 16,75 se agruparon juntas. Todas las fracciones que contenían principalmente el pico de 17,5 minutos se agruparon juntas. Las dos muestras reunidas se secaron luego con centrifugación utilizando un concentrador SpeedVac. Cada una de las muestras reunidas se disolvió luego en 490 μ l de tampón de digestión, que contenía Tris 10 mM, clorhidrato de guanidinio 0,8 M, pH 8,0.
- 35 Después, se añadieron 10 μ l de una solución de proteinasa Lys-C, preparada disolviendo 5 μ g de proteinasa Lys-C (grado de secuenciación, Roche Diagnostics) en 50 μ l de tampón de digestión, a cada muestra agrupada. Las muestras se digirieron durante una noche a 37 °C. Después de la digestión, los péptidos generados se sometieron a LC-MS/MS utilizando un Finnegan LCQ Deca equipado con una HPLC Beckman System Gold de acuerdo con el protocolo del fabricante estándar.

40

- Para el pico de elución temprana (16,75 min), la digestión produjo un péptido único de masa 1107,8 m/z , correspondiente a un péptido amino-terminal de IL-1 ra con una masa añadida de 276 amu, lo que sugiere la presencia de un derivado de NBD. El análisis de MS/MS del péptido produjo fragmentos consistentes con la secuencia de aminoácidos MRPSGRK más una masa extra de 276 amu en el residuo de metionina, lo que sugiere
- 45 que la metionina amino-terminal de IL-1 ra se derivatizó con NBD-X.

- La digestión del pico de elución posterior (17,5 min) produjo un péptido único de masa de 1145,9 m/z , que sugirió un péptido IL-1 ra correspondiente a los residuos 72-96 que comprenden un derivado de NBD. El análisis de MS/MS del péptido produjo fragmentos consistentes con la secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 72-96 con
- 50 una lisina derivatizada con NBD en la posición 93.

- De acuerdo con los resultados anteriores, la lisina en la posición 93 de IL-1ra es capaz de derivatizar con NBD-X en las condiciones utilizadas en este experimento. Estos resultados también sugieren que la lisina en la posición 93 está expuesta y es un residuo accesible al disolvente en la proteína IL-1ra intacta.

55

Ejemplo 4

Tasa de agregación de IL-1ra en presencia de fosfato, citrato o pirofosfato

La tasa de agregación de IL-1 ra se determinó en varias composiciones de tampón diferentes. Diez ml de una solución madre de IL-1 (220 mg/ml en CSE) se dializaron contra 2 x 4 l de NaCl 140 mM usando un tubo de diálisis Pierce Snakeskin (3,5 kDa de corte) a 4 °C. Las alícuotas de la solución de IL-1 ra dializada se llevaron a diversas concentraciones de citrato, fosfato o pirofosfato mediante la adición de citrato 0,45 M, fosfato 0,5 M o soluciones madre de pirofosfato 0,45 M (todas con pH 6,5) y un volumen apropiado de NaCl 140 mM para dar como resultado una concentración final de IL-1 ra en cada muestra de 140 mg/ml. La concentración final de citrato, fosfato o pirofosfato en cada muestra varió de 1 a 125 mM.

La agregación de IL-1ra en cada muestra se controló durante 4 horas a 29 °C midiendo la dispersión de la luz a 405 nm a intervalos de un minuto como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior. La tasa de agregación se determinó como la pendiente de la región lineal de la curva de saturación calculada utilizando el programa SoftMax Pro (Molecular Devices). La Figura 3 muestra que en este experimento, la tasa de agregación de IL-1 ra disminuyó con concentraciones crecientes de citrato, fosfato o pirofosfato. Particularmente, la tasa de agregación de IL-1ra en tampón citrato o pirofosfato disminuyó más rápidamente que la tasa de agregación en tampón fosfato.

Las pKa estimadas de los tres hidrógenos ionizables sobre fosfato son 2,148, 7,198 y 12,35 a pH 6,5 y 39 °C. Las pKa estimadas de los tres hidrógenos ionizables en citrato son 3,128, 4,761 y 6,396 a pH 6,5 y 39 °C. Las pKa estimadas de los cuatro hidrógenos ionizables en pirofosfato son 0,83, 2,26, 6,72 y 9,46 a pH 6,5 y 39 °C. Véase, por ejemplo, Goldberg et al., Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers. J. Phys. Chem. Ref. Data, 31(2):231-370 (2002). Por consiguiente, se prevé que el fosfato tendrá predominantemente una carga negativa a pH 6,5 y 39 °C, mientras que se prevé que el citrato tendrá tres cargas negativas a pH 6,5 y 39 °C, y se prevé que el pirofosfato tendrá entre dos y tres cargas negativas a pH 6,5 y 39 °C, según lo estimado de acuerdo con las pKa indicadas en la bibliografía analizadas anteriormente.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que los aniones de carga múltiple pueden reducir la tasa de agregación de IL-1 ra más eficazmente que los aniones de carga única a un pH particular. De acuerdo con esa conclusión, se encontró que el NaCl, que es un anión de carga única, tiene un perfil de tasa de agregación similar al del fosfato (datos no mostrados).

Ejemplo 5

Tasa de agregación de IL-1 ra en presencia de sacarosa, glicerol o sorbitol

La tasa de agregación de IL-1 ra se determinó en presencia de varios azúcares diferentes. Se dializaron diez ml de una solución madre de IL-1 (220 mg/ml en CSE) frente a 2 x 4 l de NaCl 140 mM usando un tubo de diálisis Pierce Snakeskin (3,5 kDa de corte) a 4 °C. Las alícuotas de la solución de IL-1 ra dializada se llevaron a varias concentraciones porcentuales de sacarosa, glicerol o sorbitol mediante la adición del 25 % de sacarosa, 25 % de glicerol o 25 % de soluciones madre de sorbitol y un volumen apropiado de NaCl 140 mM para dar como resultado una concentración final de IL-1 ra en cada muestra de 140 mg/ml. La concentración final de sacarosa, glicerol o sorbitol en cada muestra fue del 0 %, 1 %, 2 % o 3 %. La tasa de agregación se determinó midiendo la densidad óptica de cada solución de IL-1 ra a 39 °C utilizando el método descrito en el Ejemplo 2. La Figura 4 muestra que en este experimento, las concentraciones crecientes de azúcar dieron como resultado tasas de agregación decrecientes de IL-1 ra. En azúcar al 0 %, la tasa de agregación de IL-1ra en este experimento fue de aproximadamente 22 unidades de agregación (a.u., medidas como el aumento de la densidad mili-óptica a 405 nm por minuto). Al 3 % de sacarosa, glicerol o sorbitol, la tasa de agregación de IL-1 ra se redujo a entre 0 y 5 a.u.

Ejemplo 6

Despliegue inducido por urea y clorhidrato de guanidinio de IL-1 ra

El despliegue en equilibrio de IL-1 inducido por urea se realizó de la siguiente manera. Para estudios de dicroísmo circular de UV lejano, se envolvieron en papel de aluminio 1-1,5 ml de muestras de 0,86 mg/ml de IL-1 ra y diversas concentraciones de urea (entre aproximadamente 0 y 10 M) para protegerlas de la luz y se incubaron durante una noche (>12 horas) a temperatura ambiente. El dicroísmo circular a 230 nm se determinó para cada muestra a 23 °C. La Figura 9 muestra la señal de dicroísmo circular a 230 nm para IL-1ra incubada en diversas concentraciones de urea para este experimento. Los datos se representaron gráficamente y la curva de despliegue se ajustó a un modelo de 3 estados, estado nativo <-> estado intermedio <-> estado desplegado. En este modelo, m1, que es la pendiente de la primera transición, y C_{m1}, que es el punto medio de la primera transición, estaban restringidos. Estos parámetros estaban restringidos porque los CD UV lejanos no pueden distinguir entre los estados nativos e

intermedios. Los valores restringidos para m_1 y C_{m1} se obtuvieron promediando los valores de varias mediciones de fluorescencia, que fueron capaces de distinguir el estado nativo del estado intermedio. Como se muestra en la Figura 9, IL-1ra experimentó una transición de despliegue global entre aproximadamente 4 y 6 M de urea en este experimento.

5

Para los estudios de fluorescencia, se envolvieron en papel de aluminio 1-1,5 ml de muestras de 0,086 mg/ml de IL-1ra y diversas concentraciones de urea (entre aproximadamente 0 y 10 M) para protegerlas de la luz y se incubaron durante una noche (>12 horas) a temperatura ambiente. La Figura 10 muestra la fluorescencia intrínseca a 353 nm de IL-1 ra incubada en diversas concentraciones de urea. Los datos se representaron gráficamente y la curva de despliegue se ajustó al modelo de 3 estados analizado anteriormente. No se aplicaron restricciones en este experimento. Como se muestra en la Figura 10, el experimento de fluorescencia sugiere la presencia de una transición de despliegue entre 0 y aproximadamente 1,5 M de urea. Dado que esa transición no se observa en el experimento de CD UV lejano, puede reflejar la acumulación de un estado intermedio con una estructura secundaria de tipo nativo. Ese estado intermedio puede implicar más cambios locales en la estructura, por ejemplo, desestabilización de los bucles de superficie, mientras que el núcleo hidrófobo de IL-1 ra puede permanecer sustancialmente imperturbable.

El despliegue inducido por el clorhidrato de guanidinio en equilibrio (GuHCl) se realizó de la siguiente manera. Para estudios de dicroísmo circular de UV lejano, se envolvieron en papel de aluminio 1-1,5 ml de muestras de 0,86 mg/ml de IL-1ra y diversas concentraciones de GuHCl (entre aproximadamente 0 y 5 M) para protegerlas de la luz y se incubaron durante una noche (>12 horas) a temperatura ambiente. El dicroísmo circular a 230 nm se determinó para cada muestra a 23 °C. La Figura 11 muestra la señal de dicroísmo circular a 230 nm para IL-1ra incubada en diversas concentraciones de GuHCl. Los datos se representaron gráficamente y la curva de despliegue se ajustó al modelo de 3 estados, estado nativo $\leftrightarrow$ estado intermedio $\leftrightarrow$ estado desplegado. En este modelo, m_1 , C_{m1} , "ns", que es la pendiente del valor inicial del estado nativo, e "is", que es la pendiente del valor inicial del estado intermedio, estaban restringidos. Los valores restringidos de m_1 y C_{m1} para el despliegue inducido por GuHCl se determinaron sustancialmente como se ha descrito anteriormente para el despliegue inducido por urea. "Ns" e "is" estaban restringidos a ser mayores de cero. Estos parámetros estaban restringidos porque los CD UV lejanos no pueden distinguir entre los estados nativos e intermedios. Como se muestra en la Figura 11, IL-1ra experimentó una transición de despliegue global entre aproximadamente 1 y 2 M de GuHCl en este experimento.

Para los estudios de fluorescencia, se envolvieron en papel de aluminio 1-1,5 ml de muestras de 0,086 mg/ml de IL-1ra y diversas concentraciones de GuHCl (entre aproximadamente 0 y 5 M) para protegerlas de la luz y se incubaron durante una noche (>12 horas) a temperatura ambiente. La Figura 12 muestra la fluorescencia intrínseca a 353 nm de IL-1 ra incubada en diversas concentraciones de urea. Los datos se representaron gráficamente y la curva de despliegue se ajustó al modelo de 3 estados analizado anteriormente. No se aplicaron restricciones en este experimento. La Figura 12 muestra la fluorescencia intrínseca a 353 nm de IL-1 ra incubada en diversas concentraciones de GuHCl. Los datos se representaron gráficamente y la curva de despliegue se ajustó al modelo de 3 estados analizado anteriormente. No se aplicaron restricciones en este experimento. Como se muestra en la Figura 12, los datos de fluorescencia sugieren la presencia de una transición de despliegue entre aproximadamente 0 y 0,6 M de GuHCl. Dado que esa transición no se observa en el experimento de CD UV lejano, puede reflejar la acumulación de un estado intermedio con una estructura secundaria de tipo nativo. Ese estado intermedio puede implicar más cambios locales en la estructura y/o implicar la desestabilización de los bucles de superficie, mientras que el núcleo hidrófobo de IL-1ra puede permanecer sustancialmente imperturbable.

45

La diferencia entre los datos de fluorescencia para el despliegue inducido por urea y el despliegue inducido por GuHCl puede ser resultado de los efectos diferenciales de los dos desnaturizantes sobre la fluorescencia intrínseca de IL-1ra.

Además, la diferencia entre los datos de CD y los datos de fluorescencia para cada desnaturizante puede deberse a la capacidad de la fluorescencia intrínseca del triptófano para detectar cambios locales en la estructura terciaria de la proteína, mientras que la CD detecta cambios en la estructura secundaria de la proteína.

Ejemplo 7

55

Derivación de IL-1ra con metil acetil fosfato (MAP)

En ciertas formas de realización, el acetil fosfato de metilo (MAP) acetila residuos de lisina y las aminas N-terminales de polipéptidos. MAP se preparó como se describe en Kluger et al. (1980) J. Org. Chem., 45: 2723. La identidad del

producto se confirmó mediante RMN y espectrometría de masas.

La IL-1 ra se derivó con MAP en presencia de citrato o fosfato como se indica a continuación. Para la derivación en presencia de citrato, se añadieron 20 µl de MAP (solución madre 10 mM en agua) y 20 µl de IL-1 ra (solución madre 10 mM en CSE) a 160 µl de citrato 10 mM, pH 6,5 en un vial de HPLC. La reacción se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas de 25 µl utilizando un automuestreador de HPLC en 0, 45, 90, 135, 180, 225 y 270 minutos. Cada alícuota se analizó mediante HPLC de fase inversa utilizando una HPLC Agilent 110 equipada con una columna de HPLC de fase inversa Jupiter 5u C4 300A (4,6 x 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA), un detector UV en línea y una bandeja de muestras de 100 pocillos de temperatura controlada fijada a 37 °C. El caudal se ajustó a 1 ml/min y la columna se mantuvo a una temperatura de 50 °C. La columna se equilibró previamente durante 15 min (caudal de 1 ml/min) con 65 % de tampón A (ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA) en agua) y 35 % de tampón B (acetonitrilo al 90 %, TFA al 0,1 % en agua). Después de la carga, los analitos se eluyeron utilizando un gradiente de aumento del 35 % al 50 % de tampón B (acetonitrilo al 90 %, TFA al 0,1 % en agua) durante 25 minutos.

Para la derivación en presencia de fosfato, se añadieron 20 µl de MAP (solución madre 10 mM en agua) y 20 µl de IL-1 ra (solución madre 10 mM en CSE) a 160 µl de fosfato 10 mM, pH 6,5 en un vial de HPLC. La reacción se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas de 25 µl utilizando un automuestreador de HPLC en 0, 45, 90, 135, 180, 225 y 270 minutos. Cada alícuota se analizó mediante HPLC de fase inversa como se ha descrito anteriormente para la derivación en presencia de citrato.

Los resultados de la derivación en presencia de citrato se muestran en la Figura 13. Los resultados de la derivación en presencia de fosfato se muestran en la Figura 14. Ambos perfiles de HPLC revelan cuatro picos de IL-1ra nuevos, de resolución débil, resultado de la derivación con MAP en este experimento.

La IL-1 ra también se derivó con MAP en presencia de pirofosfato 10 mM, pH 6,4. Se añadieron veinte µl de MAP (solución madre 10 mM en agua) y 20 µl de IL-1 ra (solución madre 10 mM en CSE) a 160 µl de pirofosfato 10 mM, pH 6,4 en un vial de HPLC. La reacción se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas de 25 µl utilizando un automuestreador de HPLC en 0, 45, 90, 135, 180, 225 y 270 minutos. Cada alícuota se analizó mediante HPLC de fase inversa como se ha descrito anteriormente para la derivación en presencia de citrato. La Figura 15 muestra una superposición de los resultados de la HPLC de fase inversa de la derivación de IL-1ra con MAP durante 4,5 horas (270 minutos) en presencia de citrato, en presencia de fosfato y en presencia de pirofosfato. Se identificaron cuatro picos resueltos débilmente en este experimento y se indican en la Figura 15.

Cada uno de los picos a partir del punto de tiempo de 270 minutos para la derivación en presencia de citrato, que se muestra en la Figura 15, se analizó adicionalmente para determinar la identidad de cada uno, como se indica a continuación. Los cuatro picos principales se recogieron de la forma de realización de HPLC analizada anteriormente. Las muestras se concentraron en un SpeedVac a un volumen final de 5-10 µl. Después, se añadieron noventa µl de tampón de digestión (tris 50 mM, guanidinio 0,8 M-HCl, pH 8,0) a cada muestra, seguidos de 10 µl de endoproteinasa lys-C (1 µg en 10 µl de tampón de digestión). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

Los péptidos resultantes se analizaron por LC-MS/MS utilizando una HPLC Agilent 110 equipada con una detección de MS en línea con una trampa de iones Finnegan. La columna de HPLC utilizada fue una columna de HPLC de fase inversa Jupiter 5u C18 100A (2 x 150 mm, Phenomenex, Torrance, CA). El caudal se ajustó a 0,2 ml por minuto y la columna se mantuvo a una temperatura de 50 °C. La columna se equilibró previamente durante 22 minutos con un 98 % de tampón A ((TFA al 0,1 % en agua) y un 2 % de tampón B (acetonitrilo al 90 %, TFA al 0,1 % en agua). Después de la carga, los analitos se eluyeron de la columna de HPLC usando un gradiente de aumento del 2 % al 45 % de tampón B durante 50 minutos. El diez por ciento del eluyente de la columna de HPLC se sometió a un análisis por MS. La presencia de un grupo acetilo adicional en un péptido dio como resultado un aumento de 42 m/z en el perfil de MS en relación con el péptido no modificado. La identidad de los péptidos detectados y los residuos de aminoácidos específicos que se modificaron se verificó mediante MS/MS.

El polipéptido IL-1 ra del pico 1 parecía derivarse solo en su amina N-terminal. El polipéptido IL-1 ra del pico 2 pareció derivarse en su amina N-terminal y en la lisina-6. El polipéptido IL-1ra del pico 3 pareció derivarse en su amina N-terminal, en la lisina-6 y en la lisina-93. Finalmente, el polipéptido IL-1 ra del pico 4 pareció derivatizarse en su amina N-terminal, en la lisina-6, en la lisina-93 y en la lisina-96.

El nivel de derivación en todas las posiciones, excepto la amina N-terminal, parece ser mayor en presencia de fosfato que en presencia de citrato o pirofosfato. Estos resultados sugieren que el citrato y/o el pirofosfato pueden proteger los grupos de lisina cargados positivamente en IL-1ra de la derivación con MAP mejor que el fosfato. Estos resultados pueden sugerir que el citrato y/o el pirofosfato tienen una afinidad más fuerte por los residuos de lisina

cargados positivamente que el fosfato.

La velocidad de derivación de IL-1 ra con MAP se determinó utilizando los datos mostrados en la Figura 13 (y reproducidos en la Figura 16A) para la derivación de IL-1 ra en presencia de citrato. En particular, cada cromatograma de la Figura 16A se sometió a deconvolución utilizando PeakFit™ (Systat Software Inc.). Después, se integró el área debajo de cada uno de los picos en deconvolución (picos 1-4) en cada punto de tiempo (0, 45, 90, 135, 180, 225 y 270 minutos). En la Figura 16B se muestra un perfil en deconvolución ejemplar para un punto de tiempo. Los picos 1-4 en deconvolución están marcados en la Figura 16B y el área integrada bajo de cada uno se muestra a continuación. El pico 1 tenía un área integrada de 160,28590. El pico 2 tenía un área integrada de 190,41964. El pico 3 tenía un área integrada de 181,76548. El pico 4 tenía un área integrada de 178,18844. El área integrada del pico 4 en deconvolución en los puntos de tiempo 0, 45, 90, 135, 180 minutos se representó entonces en función del tiempo de incubación de la reacción que produjo ese pico. Ese gráfico se muestra en la Figura 16C. La línea resultante tiene una pendiente de 68,931 hora⁻¹.

La velocidad de derivación de IL-1 ra con MAP se calculó entonces para diversos experimentos en presencia de diversos tampones y a diversos pH, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Las distintas tasas se representaron entonces en un gráfico de barras, que se muestra en la Figura 17. Específicamente, la velocidad de derivación de IL-1 ra con MAP se determinó en presencia de fosfato 10 mM, pH 6,3; citrato 10 mM, pH 6,3; pirofosfato 10 mM, pH 6,3; fosfato 10 mM, pH 6,5; fosfato 20 mM, pH 6,5; citrato 10 mM, pH 6,5; citrato 20 mM, pH 6,5; pirofosfato 10 mM, pH 6,5; pirofosfato 20 mM, pH 6,5; fosfato 10 mM, pH 6,7; citrato 10 mM, pH 6,7; y pirofosfato 10 mM, pH 6,7.

En cada pH, la tasa de derivación de IL-1 ra con MAP fue más lenta en tampón citrato o pirofosfato que en tampón fosfato. Véase la Figura 17. Además, la velocidad de derivación en presencia de citrato o pirofosfato 20 mM fue más lenta que la velocidad de derivación en presencia de citrato o pirofosfato 10 mM. Estos resultados sugieren que el citrato y/o el pirofosfato pueden proteger los residuos de lisina de IL-1ra de la derivación con MAP de manera más eficaz que el fosfato. Por lo tanto, la velocidad de derivación de IL-1 ra con MAP es más lenta en presencia de tampón citrato o pirofosfato que en presencia de tampón fosfato.

Finalmente, la IL-1ra también se derivó con MAP en presencia de citrato 10 mM a pH 6,3, pH 6,5 o pH 6,7; o en presencia de fosfato 10 mM, pH 6,3, pH 6,5 o pH 6,7, durante 5,5 horas, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. La Figura 18 muestra una superposición de los resultados de la HPLC de fase inversa de la derivación de IL-1 ra con MAP durante 5,5 horas en presencia de cada uno de esos tampones. Esa figura muestra que la IL-1ra se deriva en mayor medida en presencia de fosfato que en presencia de citrato en todos los niveles de pH analizados. Esos resultados sugieren que el citrato puede proteger los residuos de lisina de IL-1ra de la derivación con MAP de manera más eficaz que el fosfato.

Los datos mostrados en la Figura 18 también sugieren que la IL-1 ra se deriva en mayor medida a medida que aumenta el pH.

Ejemplo 8

Agregación de IL-1 ra en presencia de diversas concentraciones de fosfato

Se dializaron diez ml de IL-1ra (220 mg/ml en CSE) a 4 °C durante 48 horas frente a un total de 8 l (2 l con tres cambios de tampón de 2 l cada uno) de fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5. La concentración de IL-1ra se ajustó a 167 mg/ml con fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5. Se preparó una solución madre de fosfato 1 M disolviendo una cantidad apropiada de fosfato de sodio en el fosfato 10 mM, pH 6,5, NaCl 100 mM. Se hicieron soluciones madre de trabajo veinte mM, 60 mM, 110 mM, 210 mM, 310 mM, 410 mM, 510 mM, 610 mM, 710 mM, 810 mM, 910 mM, y 1 M de fosfato, pH 6,5 a partir de la solución madre 1 M por dilución con fosfato 10 mM, pH 6,5, NaCl 100 mM.

La agregación de IL-1ra en diversas concentraciones de fosfato se midió utilizando una placa de vidrio de 96 pocillos (Zissner) y un espectrofotómetro de lectura de placas de temperatura controlada, SpectraMax Plus (Molecular Devices). Se añadieron ciento ochenta microlitros de la solución madre de 167 mg/ml de IL-1ra a cada pocillo. Después, se añadieron veinte µl de una solución madre de trabajo de fosfato a cada pocillo (una solución madre de trabajo por pocillo). La concentración final de fosfato en los pocillos fue 0 mM, 2 mM, 6 mM, 11 mM, 21 mM, 31 mM, 41 mM, 51 mM, 61 mM, 71 mM, 81 mM, 91 mM, 100 mM. La placa se incubó en el espectrofotómetro a 39 °C y la densidad óptica se midió a 405 nm cada 1 minuto. La Figura 19 muestra la densidad óptica a 405 nm representada en función del tiempo para cada concentración de fosfato para este experimento. Los datos en la Figura 19 sugieren

que la extensión de la agregación de IL-1ra disminuye con el aumento de la concentración de fosfato.

Ejemplo 9

5 Medición de la unión de citrato a IL-1 ra

El número de sitios de unión a ión de citrato y la K_d de unión de citrato a IL-1 ra se determinaron como se indica a continuación. Se prepararon soluciones de 1 ml de IL-1ra 1 mM en tampones que tenían diversas concentraciones de citrato, pH 6,5 diluyendo la solución madre de IL-1 ra (220 mg/ml en CSE) en tampones apropiados.

- 10 Específicamente, se prepararon 1 ml de soluciones 1 mM de IL-1 ra en cada uno de citrato 5 mM, 10 mM y 20 mM, pH 6,5. Cada solución también contenía NaCl 70 mM. Se pusieron 400 microlitros de cada solución en una columna de centrifugación Microsep™-10 (Pall Corporation; una solución por columna). Las columnas se centrifugaron a 18 °C durante 35 minutos a 4000 xg. Después de la centrifugación, la IL-1 ra permanece en el retenido, unido a parte del citrato, mientras que parte del tampón que contiene citrato no unido pasa a través del filtro como filtrado.
- 15 Después de la centrifugación, aproximadamente la mitad de la solución había pasado a través del filtro como filtrado.

La cantidad de citrato en cada retenido y filtrado se determinó de la siguiente manera. Se cargaron veinte µl de filtrado o retenido en una columna de HPLC de fase inversa (columna Supelcosil™ LC-18, 15 cm x 4,6 mm, Sigma-Aldrich, cat. n.º 58985). El caudal fue de 1 ml por minuto con ácido fosfórico 0,1 M como tampón de realización (elución isocrática). La elución se realizó a temperatura ambiente. La cantidad de ácido cítrico eluido de la columna se midió a 215 nm. La concentración de citrato en la muestra que se ensaya (el retenido o el filtrado) se calculó entonces a partir de esa medición (el sistema se calibró con estándares de solución de citrato 0-10 mM, pH 6,5).

- La Figura 20 muestra un gráfico de la concentración de citrato unido a IL-1 ra (determinada como la concentración de citrato en el retenido menos la concentración de citrato en el filtrado) frente a la concentración de citrato total en la solución. La concentración máxima de citrato unido, $B_{máx}$, se extrapola a partir de esos datos para que sea 1,8218 mM. Los datos de la Figura 20 se usaron para crear un gráfico de Scatchard para determinar la K_d para la unión de citrato a IL-1ra. La K_d se calculó como 3,846 mM para este experimento (datos no mostrados). Además, el número de sitios de unión para citrato en IL-1ra se determinó a partir de la intersección x en el gráfico de Scatchard. El
- 25 número de sitios de unión fue de 0,94 para este experimento (datos no mostrados). Estos datos sugieren que hay un sitio de unión de citrato en IL-1ra.

Ejemplo 10

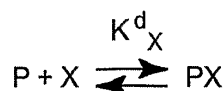
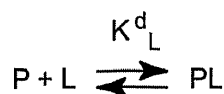
35 Competición por el sitio de unión al anión ra IL-1

La competición por el sitio de unión de citrato en IL-1ra por pirofosfato se determinó como se indica a continuación. Cuatrocientos microlitros de una solución que contenía IL-1ra 1 mM, citrato 10 mM, pH 6,5, NaCl 70 mM y una concentración de ensayo de pirofosfato se pusieron en una columna de centrifugación Microsep™-10 (Pall Corporation) y se centrifugaron a 18 °C durante 35 minutos a 4000 xg. Las concentraciones de pirofosfato ensayadas fueron 0 mM, 5 mM, 10 mM y 20 mM. Después de la centrifugación, aproximadamente la mitad de la solución pasó a través del filtro como filtrado, mientras que la solución restante permaneció por encima del filtro como retenido. La IL-1 ra permanece en el retenido, unido a parte del citrato y/o pirofosfato, mientras que parte del tampón que contiene citrato no unido y pirofosfato pasará a través del filtro como filtrado. La concentración de citrato

40 tanto en el retenido como en el filtrado se determinó como se ha analizado anteriormente en el Ejemplo 9. La competición por el sitio de unión de citrato en IL-1 ra por fosfato se determinó como se ha descrito anteriormente para el pirofosfato.

- La Figura 21 muestra un gráfico de la concentración de citrato unido por IL-1 ra frente a la relación de la concentración total de anión de competición (pirofosfato o fosfato) con respecto a la concentración total de citrato en la solución. Los datos sugieren que el pirofosfato es más eficaz en la competición con el citrato por el sitio de unión de citrato en IL-1ra que el fosfato. Debido a que tanto el pirofosfato como el fosfato parecen ser capaces de competir por el sitio de unión a IL-1ra (es decir, el sitio no es específico para citrato), se hace referencia a la unión de citrato en el sitio de IL-1 ra como el sitio de unión de aniones.

- 55 A partir de los datos mostrados en la Figura 21, la K_d para la unión de pirofosfato al sitio de unión de anión en IL-1 ra se determinó usando los siguientes cálculos. Véase, por ejemplo, Stinson y Holbrook, Biochem. J. (1973) 131: 719-728. La competición entre la unión de citrato y pirofosfato se puede expresar como dos equilibrios separados:



Donde P = proteína, que es IL-1 ra en este caso; L = ligando, que es citrato en este caso; y X = anión de competición, que es pirofosfato en este caso. K_L^d es la K_d para la unión del ligando a la proteína y es igual a la concentración de P (proteína libre) por la concentración de L (ligando libre), dividida por la concentración de PL (proteína unida al ligando). K_X^d es la K_d para la unión de anión competitiva a la proteína y es igual a la concentración de P (proteína libre) por la concentración de X (anión de competición libre), dividida por la concentración de PX (proteína unida al anión de competición).

La K_d aparente, u observada de citrato (K_{Lapp}^d) se puede expresar de la siguiente manera:

$$K_{Lapp}^d = \frac{(L_{libre}) [(P_{libre}) + (PX)]}{(PL)}$$

Donde L_{libre} es la concentración de ligando libre (citrato), P_{libre} es la concentración de proteína libre (IL-1 ra), PX es la concentración de proteína unida a un anión competitivo (pirofosfato), y PL es la concentración de proteína unida al ligando. Al reemplazar el término (PX) con $(X_{libre})(P_{libre})/K_X^d$, que se deriva de la ecuación de equilibrio que se muestra anteriormente, la expresión para K_{Lapp}^d se puede reducir a:

$$K_{Lapp}^d = K_L^d [1 + (X_{libre} / K_X^d)]$$

Por lo tanto, si K_{Lapp}^d se representa frente a X_{libre} , la intersección y será igual a K_L^d y la pendiente será igual a K_L^d/K_X^d . Reorganizando, K_X^d será igual a la intersección y dividida por la pendiente.

K_{Lapp}^d para la unión de citrato se calcula a cada concentración de anión de competición como la concentración de proteína libre (IL-1 ra) por la concentración de ligando libre (citrato), dividida por la concentración de ligando unido (citrato unido a IL-1ra). Se calcula que la concentración de proteína libre es la concentración total de proteína en la muestra menos la concentración de proteína unida (que es igual a la concentración de ligando unido). X_{libre} , o la concentración de anión competidor libre, es igual a la concentración total de anión competidor menos el cambio en la concentración de ligando unido (citrato unido a IL-1 ra) a medida que aumenta la concentración total de anión competidor (es decir, según se reemplaza el citrato en los sitios de unión a anión de IL-1ra por el anión competidor). En otras palabras,

$$X_{libre} = X_{total} - \Delta X_{bound} \text{ a medida que aumenta } X_{total}.$$

La figura 22 muestra una gráfica de K_{Lapp}^d para citrato frente a la cantidad de pirofosfato libre, que se calcula utilizando los datos de la figura 20 y los cálculos analizados anteriormente. La K_X^d para pirofosfato se calculó como 2,994 mM para este experimento. Como se ha indicado anteriormente, la intersección y debe ser igual a K_L^d , que es la K_d del citrato. En este experimento, la K_L^d fue de 3,894 mM, lo que concuerda con la determinación experimental previa de la K_d para la unión de citrato a IL-1ra, 3,846 mM, según se analizó en el Ejemplo 9.

Se creó un gráfico similar (datos no mostrados) para los datos de fosfato que se muestran en la Figura 21. En este experimento, se calculó que la K_X^d para fosfato era 12,641 mM. La K_L^d para citrato, según se determinó a partir de la intersección y de la gráfica para este experimento (datos no mostrados), fue de 4,996 mM.

Estos datos sugieren que el citrato y el pirofosfato tienen una K_d inferior para el sitio de unión de anión de IL-1ra. Además, el pirofosfato puede tener una K_d ligeramente más baja que el citrato para el sitio de unión de anión. La menor K_d observada en este experimento se correlaciona con la mayor capacidad del pirofosfato y el citrato para reducir la agregación de IL-1ra, como se muestra en los Ejemplos 2 y 4.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Raibekas, Andrei Kerwin, Bruce

<120> MÉTODOS PARA REDUCIR LA AGREGACIÓN DE IL-1ra

<130> 06843.0093-00304

5 <150> 60/558.879
<151> 02-04-2004

<150> 60/559.161
10 <151> 02-04-2004

<150> 60/601.216
<151> 12-18-2004

15 <150> 60/601.229
<151> 12-18-2004

<160> 6

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 600
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens

<400> 1
gaattccggg ctgcagtcac agaattggaaa tctgcagagg cctccgcagt cacctaataca 60
ctctcctcct ctctcctgttc cattcagaga cgatctgccg accctctggg agaaaatcca 120
gcaagatgca agccttcaga atctgggatg ttaaccagaa gaccttctat ctgaggaaca 180
accaactagt tgctggatac ttgcaaggac caaatgtcaa tttagaagaa aagatagatg 240
tggtacccat tgagcctcat gctctgttct tgggaatcca tggagggag atgtgcctgt 300
cctgtgtcaa gtctggtgat gagaccagac tccagctgga ggcagttaac atcactgacc 360
tgagcgagaa cagaaagcag gacaagcgct tcgccttcat ccgctcagac agtggcccca 420
ccaccagttt tgagtctgcc gcctgccccg gttggttcct ctgcacagcg atggaagctg 480
accagcccgt cagcctcacc aatatgcctg acgaaggcgt catggtcacc aaattctact 540
tccaggagga cgagtagtac tgcccaggcc tgctgttcca ttcttgcatg gcaaggactg 600

30 <210> 2
<211> 177
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 2
Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu Leu
1 5 10 15

Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser
20 25 30
Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe
35 40 45
Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn
50 55 60
Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala
65 70 75 80
Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys
85 90 95
Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp
100 105 110
Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser
115 120 125
Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp
130 135 140
Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn
145 150 155 160
Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp
165 170 175

Glu

<210> 3

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp
1 5 10 15

Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala
20 25 30

Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val
35 40 45

5

10

Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys
50 55 60

Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu
65 70 75 80

Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys
85 90 95

Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu
100 105 110

Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp
115 120 125

Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr
130 135 140

Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
145 150

<210> 4
<211> 475
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia codificante para anakinra

<400> 4
catatgcgac cgtccggccg taagagctcc aaaatgcagg ctttccgtat ctgggacgtt 60
aaccagaaaa cttctacct gcgcaacaac cagctgggtg ctggctacct gcagggtccg 120
aacgttaacc tggaagaaaa aatcgacgtt gtaccgatcg aaccgcacgc tctgttcctg 180
ggatccacg gtggtaaaaat gtgcctgagc tgcgtgaaat ctggtgacga aactcgtctg 240
cagctggaag cagttaacat cactgacctg agcgaaaacc gcaaacagga caaacgtttc 300
gcattcatcc gctctgacag cggcccgaacc accagcttcg aatctgctgc ttgcccgggt 360
tggttcctgt gactgctat ggaagctgac cagccggtaa gcctgaccaa catgccggac 420
gaaggcgtga tggtaaccaa atttacttc caggaagacg aataatggga agctt 475

<210> 5
<211> 153
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia de anakinra

<400> 5

ES 2 694 252 T3

Met Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile
1 5 10 15

Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val
20 25 30

Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp
35 40 45

Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly
50 55 60

Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln
65 70 75 80

Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp
85 90 95

Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe
100 105 110

Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala
115 120 125

Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val
130 135 140

Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
145 150

<210> 6
<211> 159
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia de iclL-1ra

<400> 6
Met Ala Leu Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys
1 5 10 15

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu
20 25 30

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn
35 40 45

ES 2 694 252 T3

Leu₅₀ Glu Glu Lys Ile Asp Val₅₅ Val Pro Ile Glu Pro₆₀ His Ala Leu Phe
 Leu₆₅ Gly Ile His Gly₇₀ Gly Lys Met Cys Leu₇₅ Ser Cys Val Lys Ser Gly₈₀
 Asp Glu Thr Arg₈₅ Leu Gln Leu Glu Ala Val₉₀ Asn Ile Thr Asp₉₅ Leu Ser
 Glu Asn Arg₁₀₀ Lys Gln Asp Lys Arg Phe₁₀₅ Ala Phe Ile Arg Ser₁₁₀ Asp Ser
 Gly Pro Thr₁₁₅ Thr Ser Phe Glu₁₂₀ Ser Ala Ala Cys Pro Gly₁₂₅ Trp Phe Leu
 Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp₁₃₅ Gln Pro Val Ser₁₄₀ Leu Thr Asn Met Pro
 Asp₁₄₅ Glu Gly Val Met Val₁₅₀ Thr Lys Phe Tyr Phe₁₅₅ Gln Glu Asp Glu

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la agregación de un antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra), o reducir la tasa de agregación de un IL-1ra, en una composición acuosa, en el que el método comprende reducir la agregación o reducir la tasa de agregación de IL-1ra en la composición acuosa mediante la incubación de la composición acuosa que comprende IL-1ra con al menos una molécula accesoria a una concentración suficiente para reducir la agregación o reducir la tasa de agregación de IL-1ra en la composición acuosa, en el que al menos una de las al menos una molécula accesoria es eficaz para reducir la agregación entre 20 °C y 45 °C y se selecciona de un azúcar en una concentración del 1 al 3 por ciento y un anión de carga múltiple.
2. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una molécula accesoria es un anión de carga múltiple.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho anión de carga múltiple es pirofosfato 1 a 20 mM.
4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho anión de carga múltiple es citrato 1 a 20 mM.
5. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una molécula accesoria es un azúcar.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho azúcar es glicerol, sorbitol o sacarosa.
7. Un método para preparar una formulación de fármaco antagonista del receptor de interleucina-1 que comprende reducir la agregación de un antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra), o reducir la tasa de agregación de un IL-1ra, en una composición acuosa incubando la composición acuosa que comprende la IL-1ra con al menos una molécula accesoria a una concentración suficiente para reducir la agregación o reducir la tasa de agregación de la IL-1ra en la composición acuosa, en el que al menos una de las al menos una molécula accesoria es eficaz en la reducción de la agregación entre 20 °C y 45 °C y se selecciona de un azúcar en una concentración del 1 al 3 por ciento y un anión de carga múltiple, en el que la agregación se reduce.
8. El método de la reivindicación 7, en el que al menos una molécula accesoria es un anión de carga múltiple.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anión de carga múltiple es pirofosfato 1 a 20 mM.
10. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anión de carga múltiple es citrato 1 a 20 mM.
11. El método de la reivindicación 7, en el que al menos una molécula accesoria es un azúcar.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho azúcar es glicerol, sorbitol o sacarosa.

Figura 1
Agregación de IL-1ra a 39°C (405 nm)

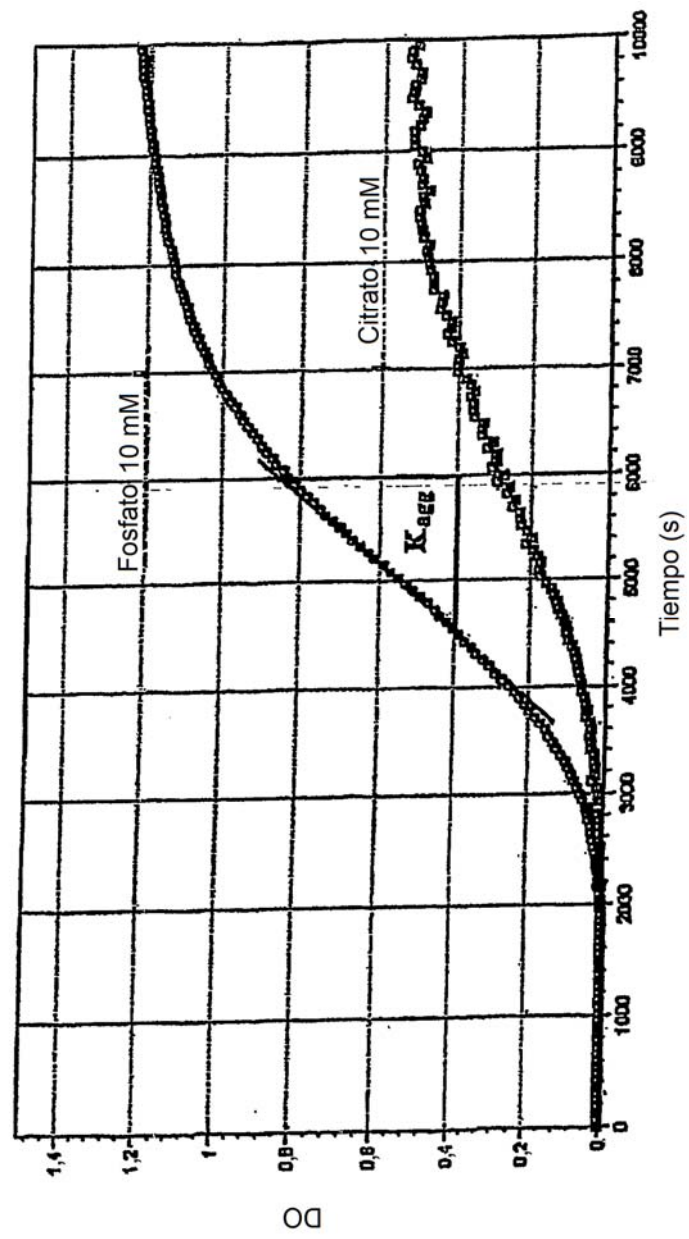


Figura 2
RP HPLC de IL-1ra, marcada con NBD-X a pH 6,5

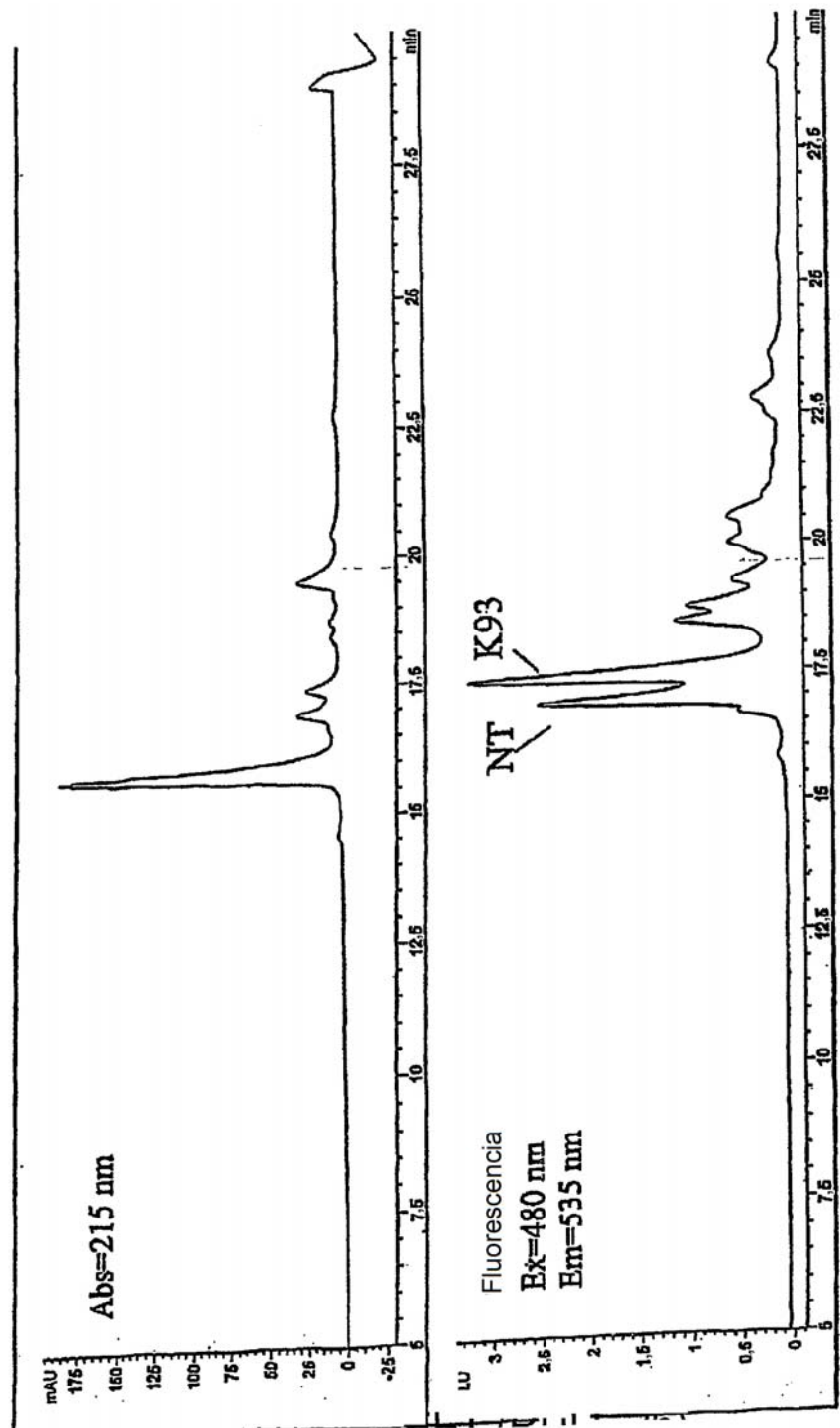


Figura 3

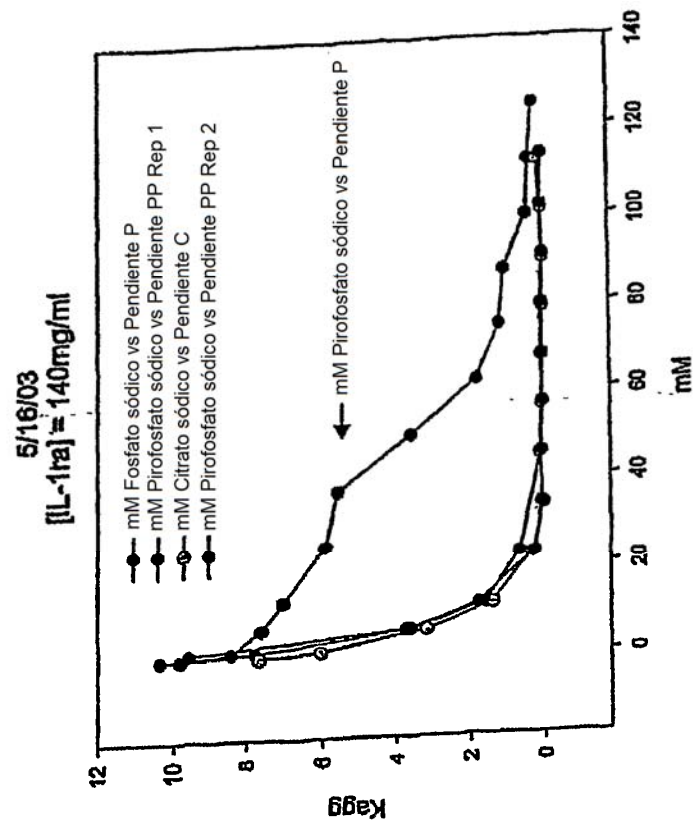


Figura 4

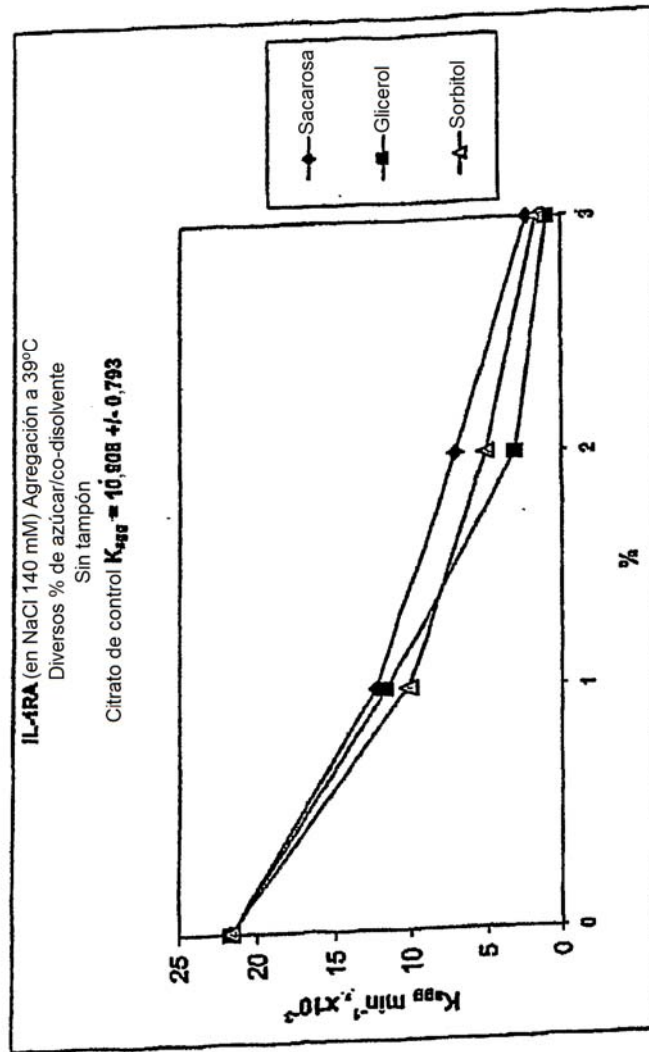


FIG. 5

10 20 30 40 50 60
 GAATTCGGGCTGCAGTCACAGAATGGAAATCTGCAGAGGCCTCCGCAGTCACCTAATCA
 H E I C R G L R S H L I

70 80 90 100 110 120
 CTCTCCTCCTCTTCTGTTCCATTTCAGAGACGATCTGCCGACCTCTGGGAGAAAATCCA
 T L L L F L F H S E T I C (R) P S G R K S

130 140 150 160 170 180
 GCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCTGAGGAACA
 S K M Q A F R I W D V N Q K T F Y L R N

190 200 210 220 230 240
 ACCAAGTAGTTGCTGGATCTTGCAAGGACCAAAATGTCAATTTAGAAAGAAAGATAGATG
 N Q L V A G Y L Q G P N V N L E E K I D

250 260 270 280 290 300
 TGGTACCEATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGAATCCATGGAGGGAAGATGTGCCTGT
 V V P I E P H A L F L G I H G G K M C L

310 320 330 340 350 360
 CCTGTGTCAAAGTCTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAGGCAGTTAACATCACTGACC
 S C V K S G D E T R L Q L E A V N I T D

370 380 390 400 410 420
 TGAGCGAGAAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGCCTTCATCCGCTCAGACAGTGGCCCCA
 L S E N R K Q D K R F A F I R S D S G P

430 440 450 460 470 480
 CCACCAGTTTTGAGTCTGCCGCCTGCCCGGTTGGTTCTCTGCACAGCGATGGAAGCTG
 T T S P E S A A C P G W F L C T A M E A

490 500 510 520 530 540
 ACCAGCCCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAAAATTTCTACT
 D Q P V S L T N M P D E G V M V T K F Y

550 560 570 580 590 600
 TCCAGGAGGACGAGTAGTACTGCCAGGCCTGCTGTTCCATTCTTGCATGGCAAGGACTG
 F Q E D E *

FIG. 6

(R) P S G R K S S K H Q A F R I
 Δ W D V N Q K T F Y L R N N Q L V A G Y L O
 Q G P N V N L E E K I D V V P I E P H A
 L F L G I H G G K M C L S C V K S G D E
 T R L Q L E A V N I T D L S E N R K Q D
 + K R F A F I R S D S G P T T S F E S A A
 C P G W F L C T A M E A D Q P V S L T N
 H P D E G V M V T K F Y F Q E D E

Figura 7



Figura 8

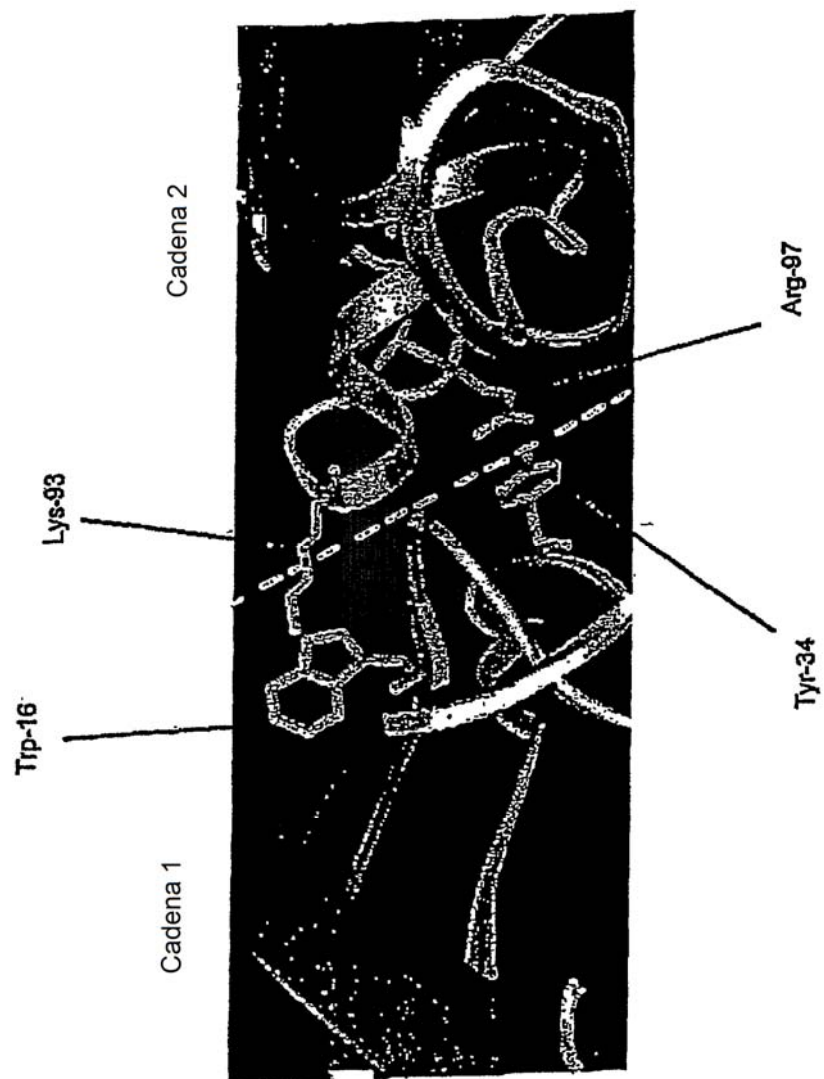


Figura 9

Ajuste de curva basado en modelo de 3 estados: $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$
(Restricción de $m1$ y C_{m1})

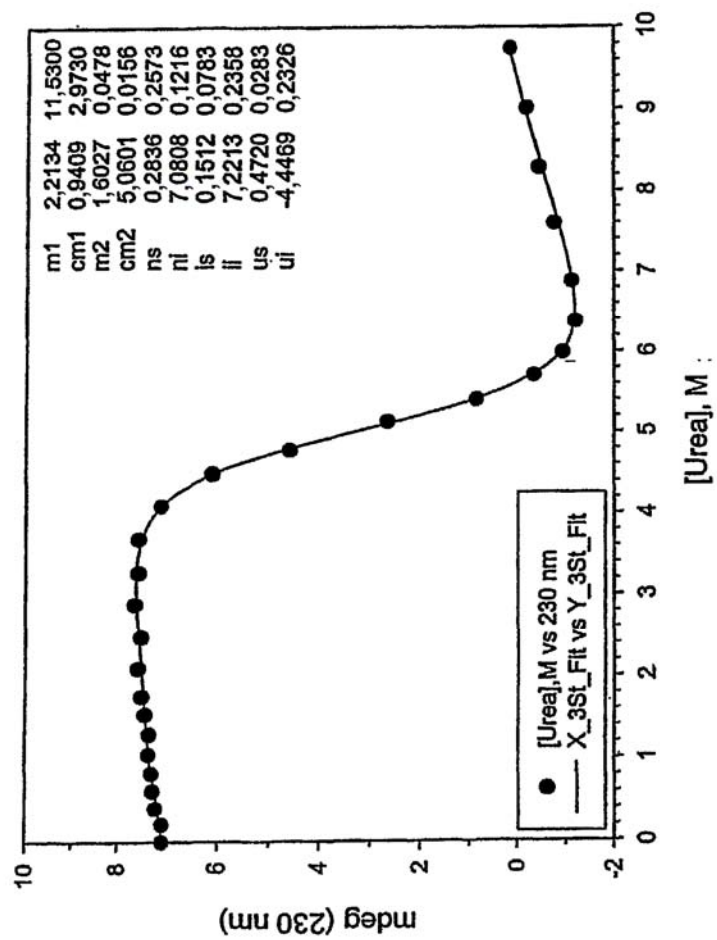


Figura 10

Ajuste de curva basado en modelo de 3 estados: $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$

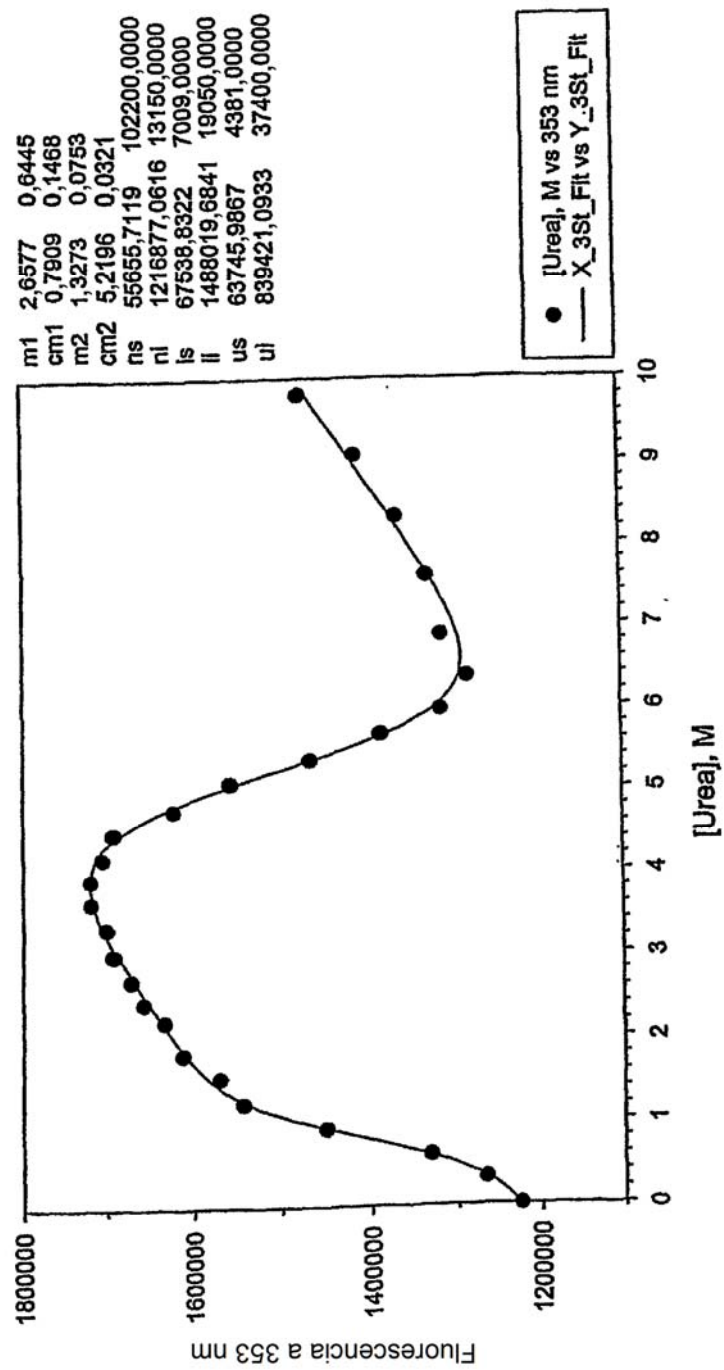


Figura 11

Ajuste de curva basado en modelo de 3 estados: $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$
 (Restricciones: $m1, C_{m1}, ns>0, ls>0$)

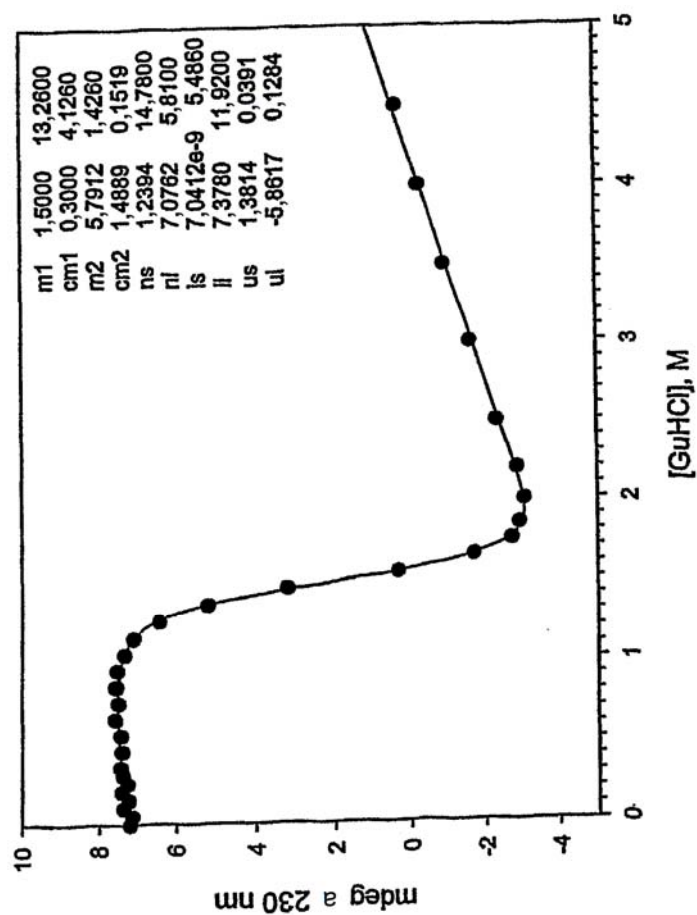


Figura 12

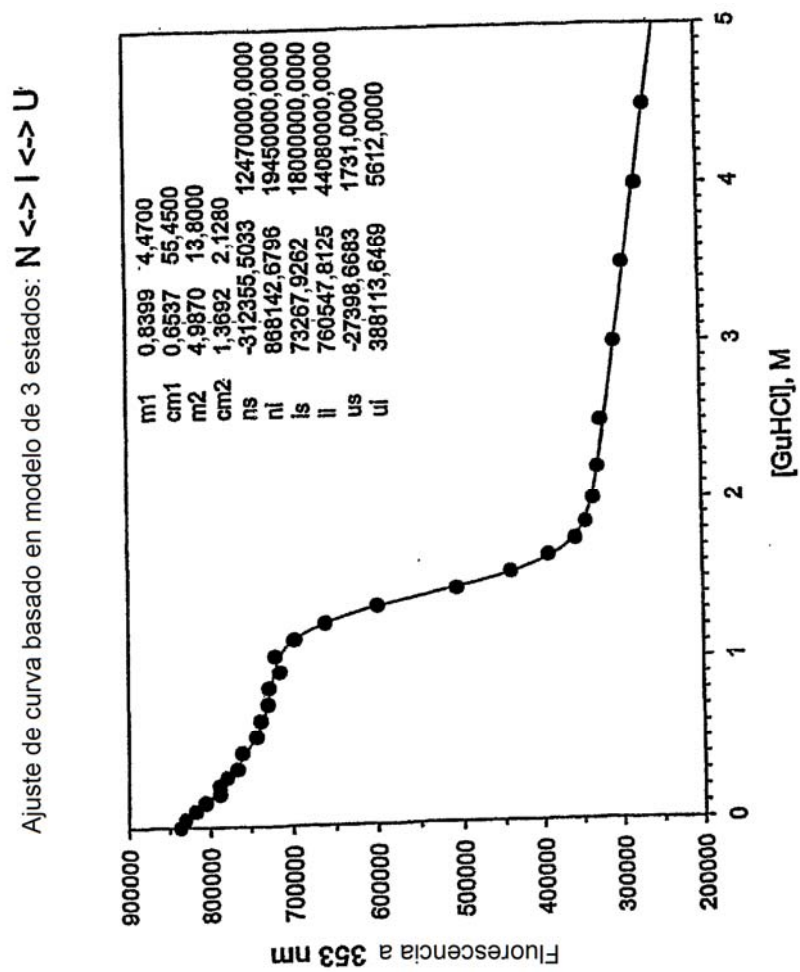
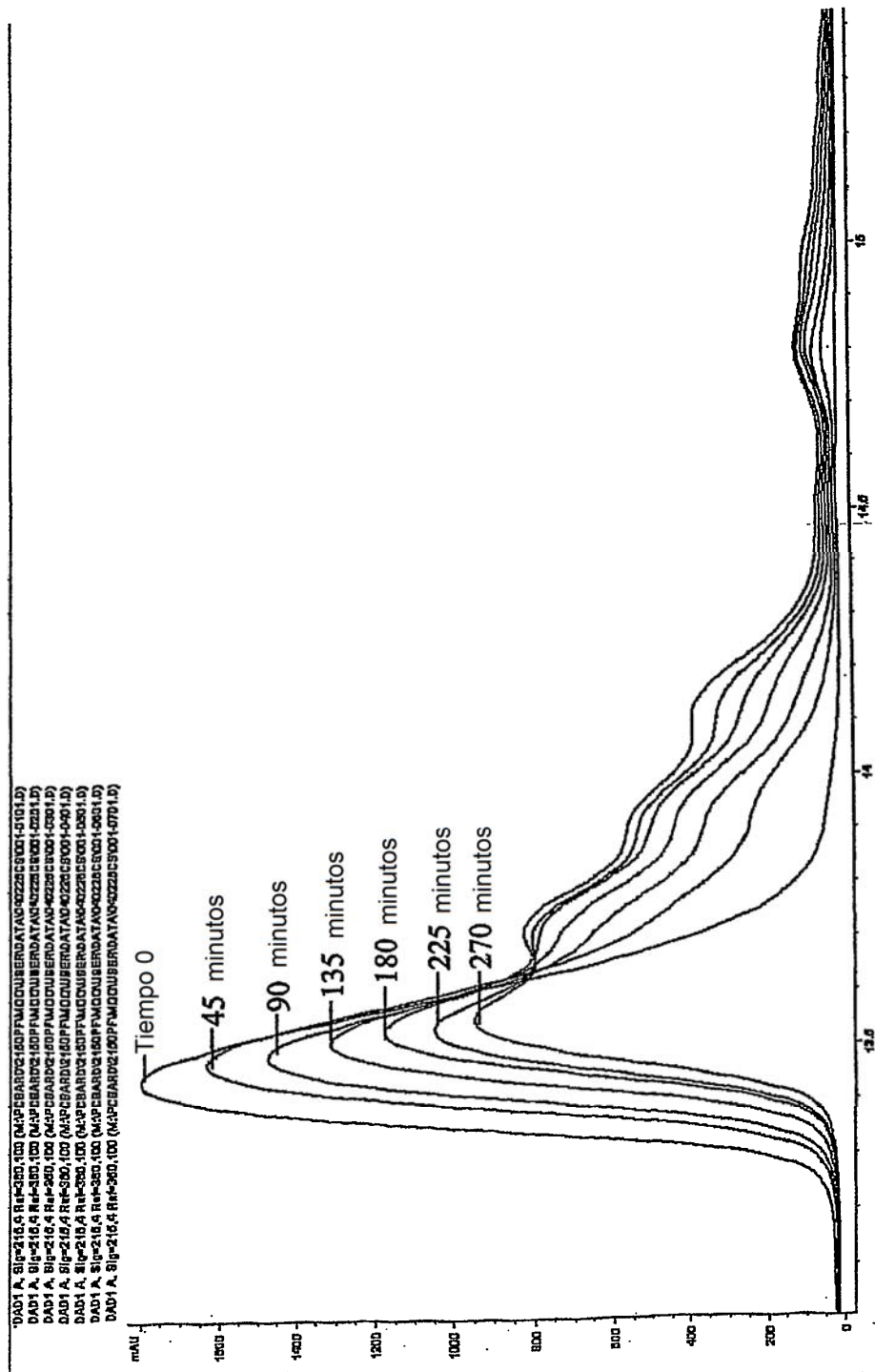


Figura 13



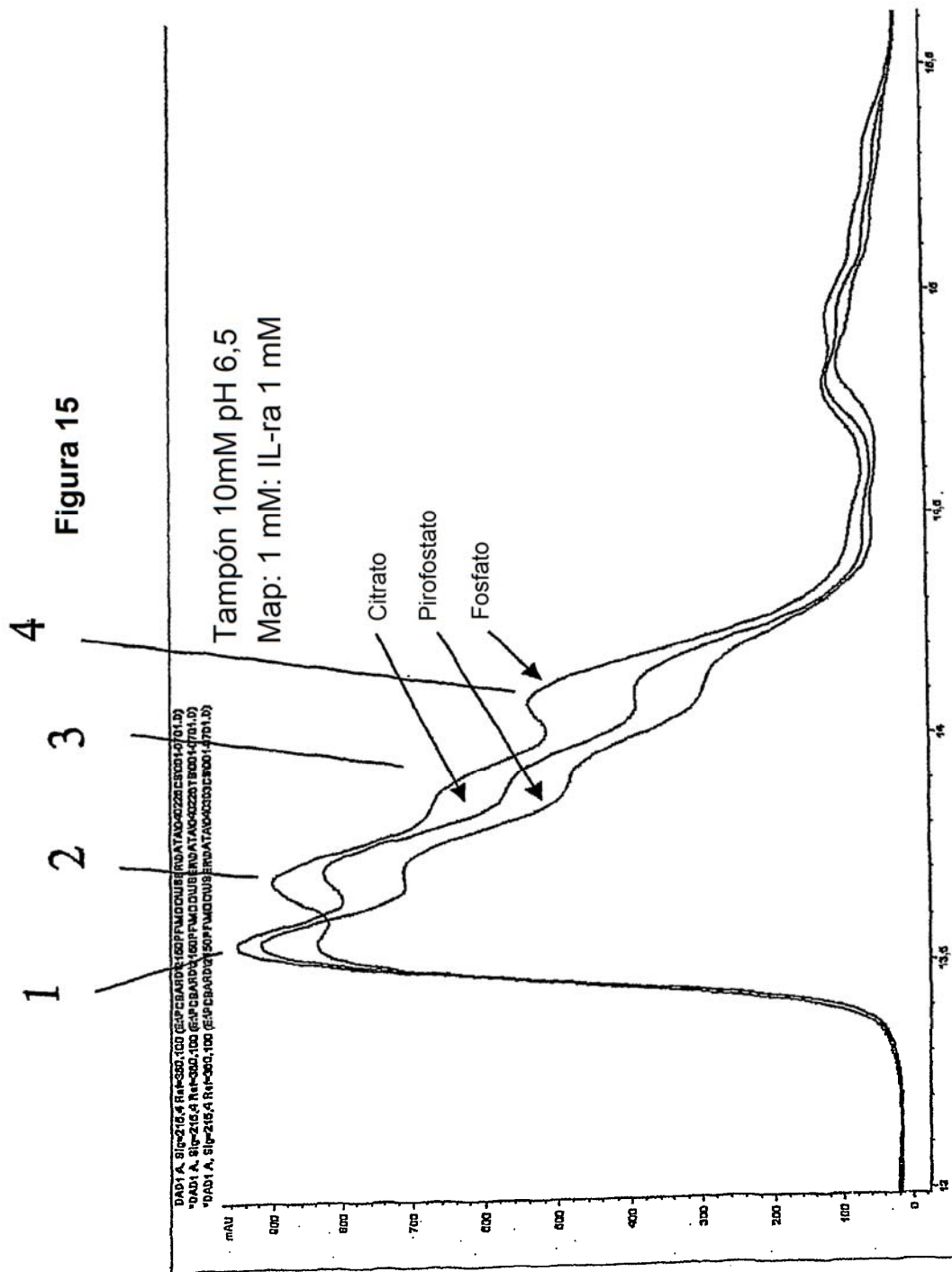


Figura 16

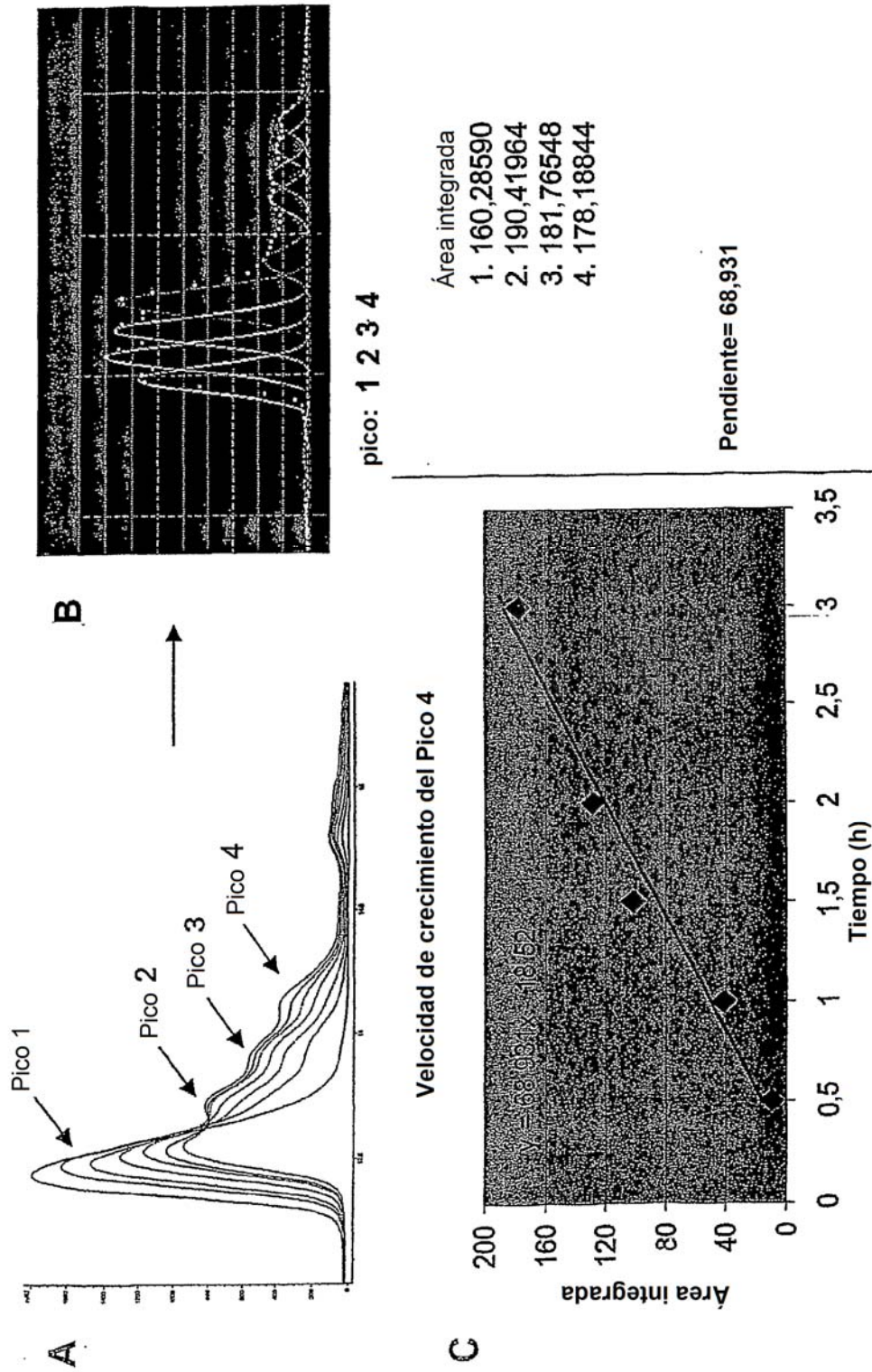


Figura 17

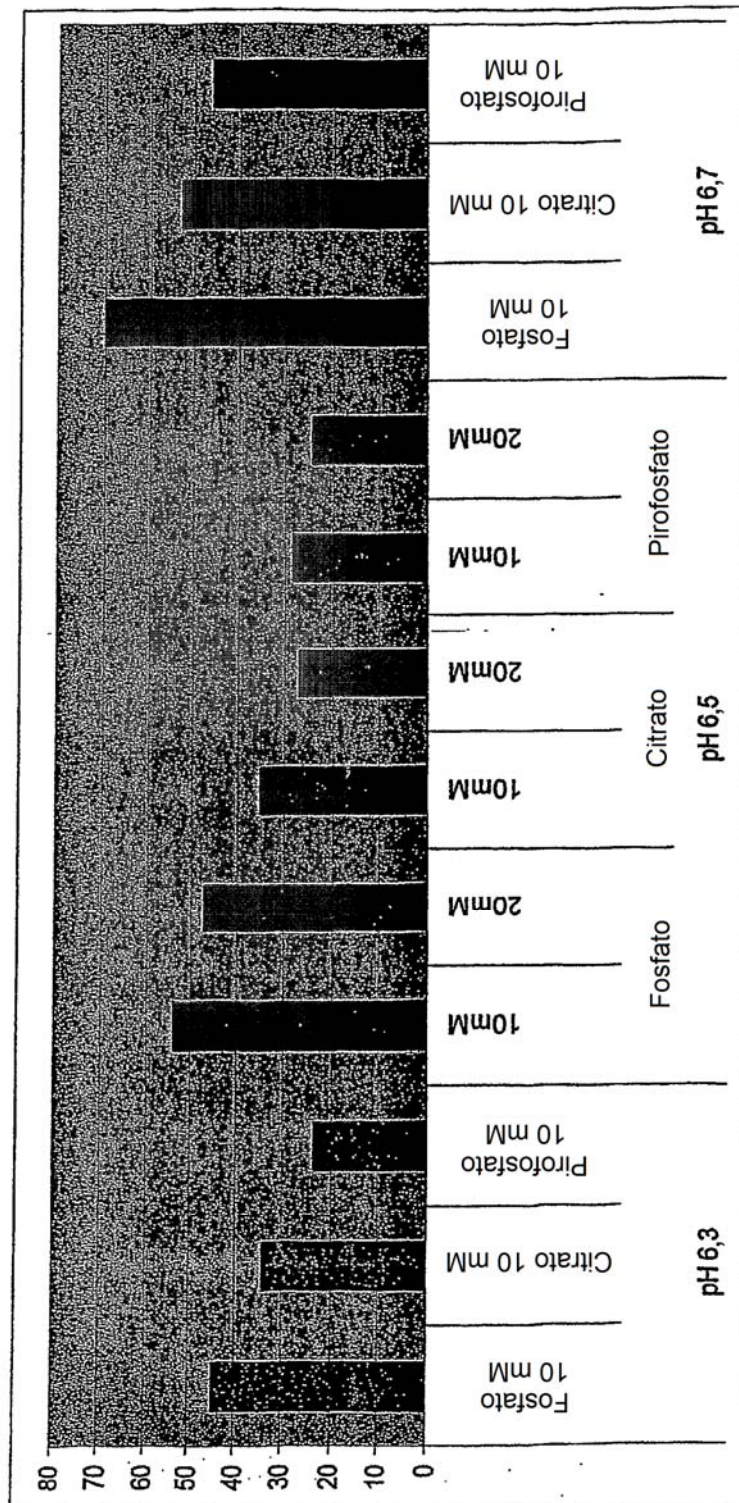


Figura 18

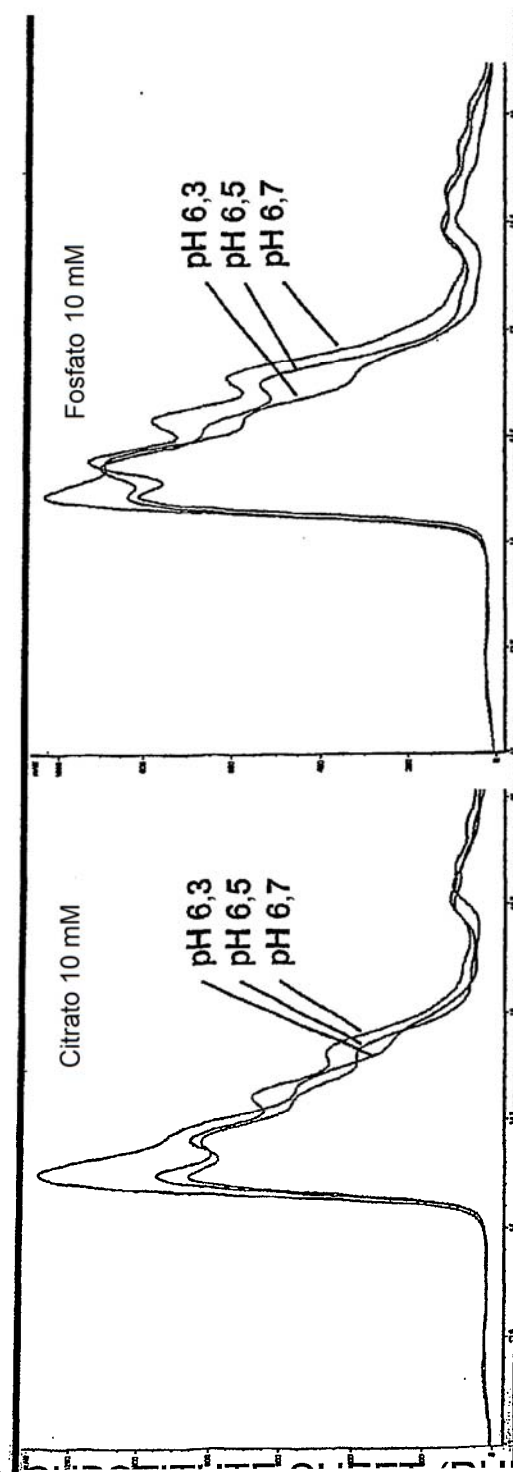


Figura 19

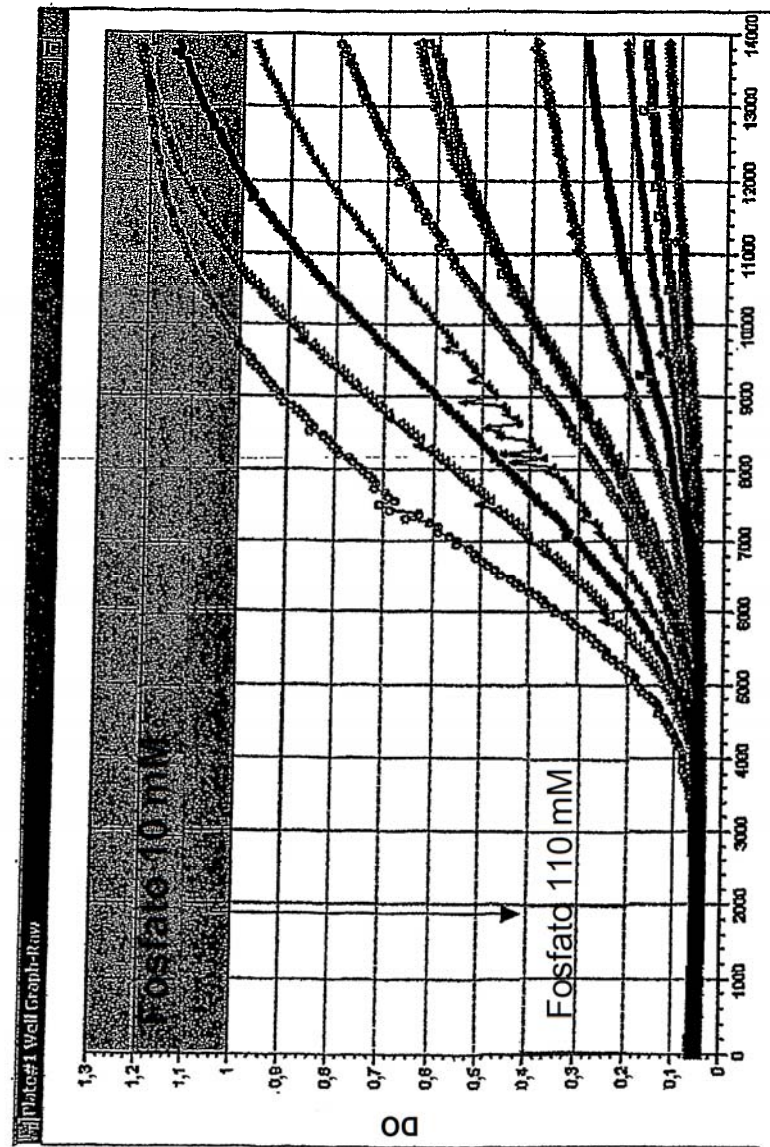


Figura 20

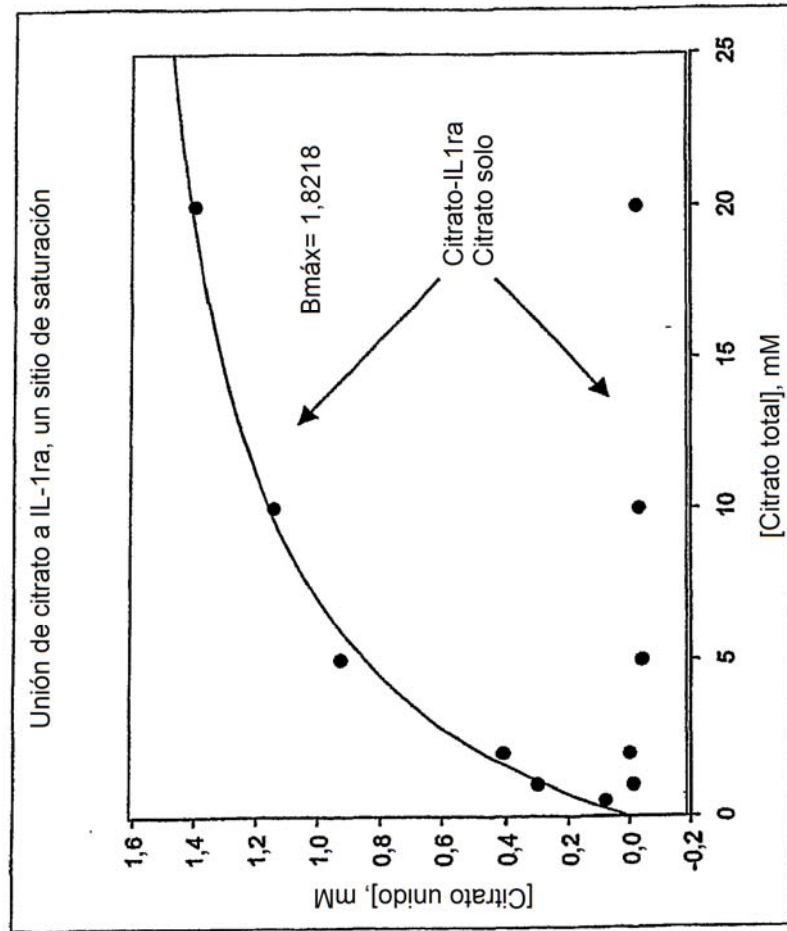


Figura 21

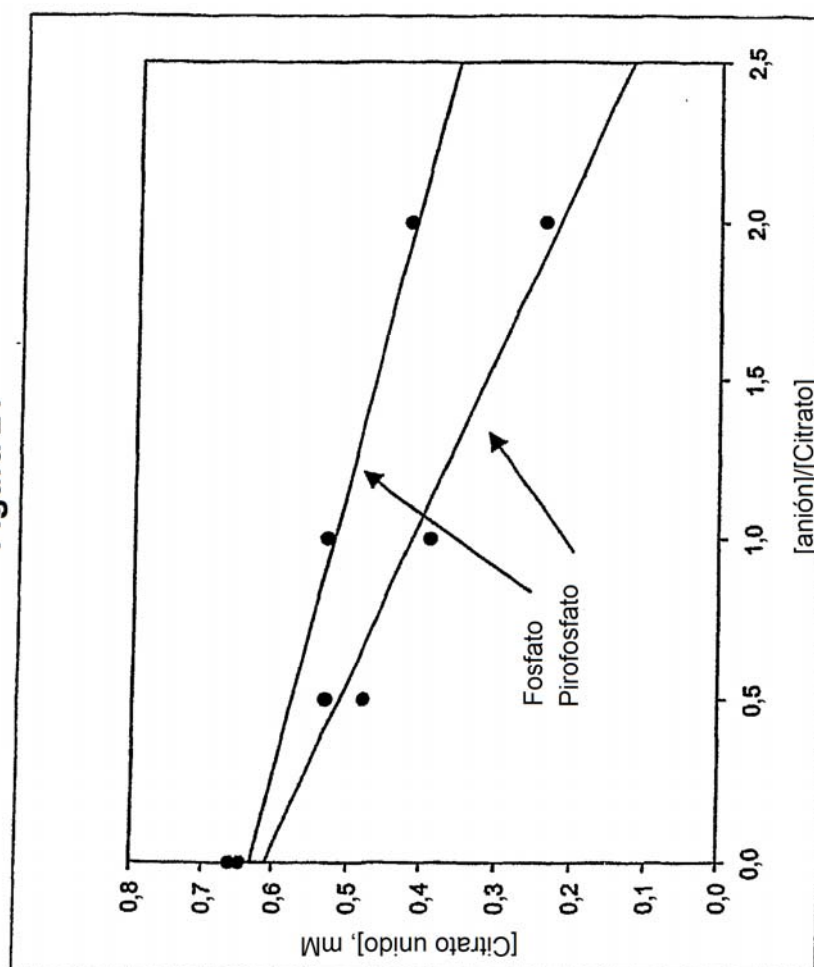


Figura 22

[Pirofosfato] Xtotal	[Citrato] total Ltotal	[Citrato-IL-1ra] PL	[IL-1ra]total Ptotal	[IL-1ra]libre Plibre	[Citrato] libre Llibre	Delta [Citrato-IL-1ra] según aumenta [pirofosfato] DeltaPL	[Pirofosfato] [X] [mM]
0,000	10,000	1,129	1,750	0,621	8,871	0,000	0,000
5,000	10,000	0,837	1,750	0,913	9,163	0,292	5,000
10,000	10,000	0,703	1,790	1,087	9,297	0,426	10,000
20,000	10,000	0,433	1,790	1,357	9,567	0,696	20,000

Unión competitiva con pirofosfato

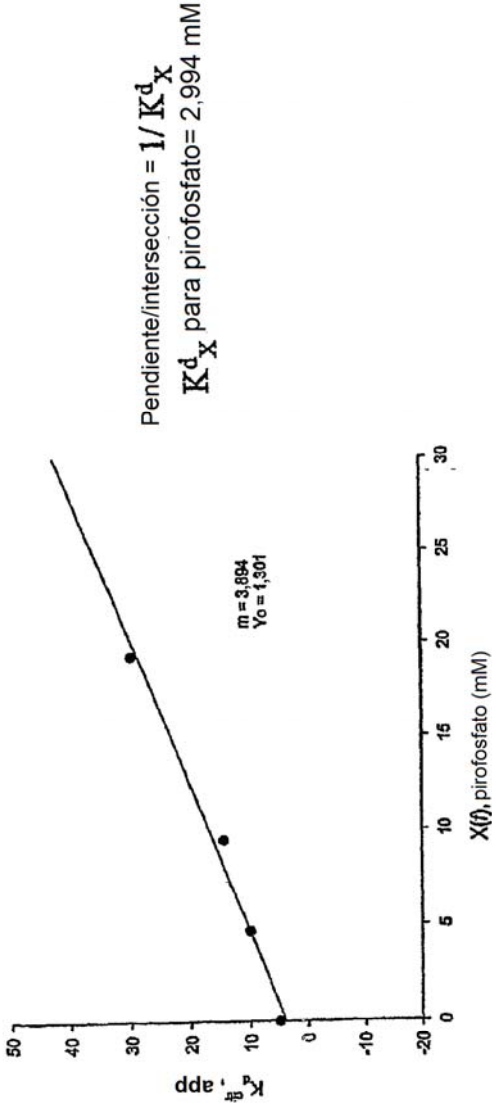


Figura 23

```

1 cat
4 atgCGaccgtccggccgtaagagctccaaaatgcaggctttccgt
1 M R P S G R K S S K M Q A F R
49 atctgggacgttaaccagaaaaccttctacctgcgcaacaaccag
16 I W D V N Q K T F Y L R N N Q
94 ctggttgctggctacctgcagggtccgaacgttaacctggaagaa
31 L V A G Y L Q G P N V N L E E
139 aaaatcgacgttgtagcgcgatcgaaccgcacgctctgttcctgggt
46 K I D V V P I E P H A L F L G
184 atccacggtggtaaaatgtgcctgagctgcgtgaaatctgggtgac
61 I H G G K M C L S C V K S G D
229 gaaactcgtctgcagctggaagcagttaacatcactgacctgagc
76 E T R L Q L E A V N I T D L S
274 gaaaaccgcaaacaggacaaacgtttcgcattcatccgctctgac
91 E N R K Q D K R F A F I R S D
319 agcggcccgcaccaccagcttcgaatctgctgcttgcccgggttg
106 S G P T T S F E S A A C P G W
364 ttctgtgcactgctatggaagctgaccagccggtaagcctgacc
121 F L C T A M E A D Q P V S L T
409 aacatgccggacgaaggcgtgatggtaaccaaattctacttccag
136 N M P D E G V M V T K F Y F Q
454 gaagacgaataatgggaagctt 465 SEQ ID NO: 4
151 E D E * SEQ ID NO: 5

```

Figura 24

1 MALETICRPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNVNLE 50
51 EKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENRK 100
101 QDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMV 150
151 TKFYFQEDE 159 SEQ ID NO: 6