



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 318 575**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/565 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05818235 .3**
(96) Fecha de presentación : **10.11.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1809662**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

(54) Título: **Interferón β desamidado.**

(30) Prioridad: **10.11.2004 US 626837 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

(73) Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608-2916, US

(72) Inventor/es: **Furuya, Kenji;**
Johnson-Jackson, Deborah y
Ruscio, Diana, Tierra

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Interferón β desamidado.

5 Antecedentes

1. Campo técnico

Esta invención está en el área general de la química de proteínas biológicamente activas. Más específicamente se relaciona con análogos de interferón β mutacional y químicamente alterados que difieren de la proteína nativa por sustituciones, supresiones o modificaciones de cisteína, asparagina y de otros residuos.

2. Antecedentes en el estado del arte

Se ha encontrado que el interferón β es útil en el tratamiento de enfermedades humanas, en particular esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad crónica a menudo discapacitante del sistema nervioso central que se presenta cuando se rompen fibras nerviosas que rodean a la funda protectora. Aproximadamente treinta por ciento de los pacientes con MS sufren de una forma de remisión - recaída de la enfermedad en la cual los síntomas desaparecen total o parcialmente después de un recrudecimiento y son seguidos por un período de estabilidad que puede durar durante meses o años. Se ha demostrado que la administración de interferón β (interferón - β o IFN - β) reduce la frecuencia del recrudecimiento de la MS. Como resultado de esto, los compuestos farmacéuticos con base en interferón β se han convertido en valiosas herramientas en el manejo y el tratamiento de la MS.

Se han desarrollado técnicas de ADN recombinante (ADNr) para facilitar la fabricación a gran escala de compuestos farmacéuticos con base en interferón β . Un problema en particular que necesita ser manejado por estas técnicas fue que el interferón beta humano, la secuencia de aminoácidos suministrada en la Fig. 1 (SEQ ID NO: 1), contiene residuos de cisteína en las posiciones 17, 31 y 141, Gene (1980) 10: 11 - 15 y Nature (1980) 285: 542 - 547), algunos de los cuales al menos son no esenciales para su actividad pero son libres para formar enlaces intramoleculares o intermoleculares indeseables. En el transcurso de la preparación microbiana de IFN- β por medio de técnicas de ADNr, se ha observado que se forman dímeros y oligómeros de IFN- β en extractos que contienen altas concentraciones de IFN- β debido a su enlazamiento intermolecular. Esta formación multimérica hace que la purificación y el aislamiento de IFN- β sea muy laboriosa y demorada y que necesite de varias etapas adicionales en procedimientos de purificación y aislamiento tales como la reducción de la proteína durante la purificación y volver a oxidarla para restablecerla a su conformación original, incrementando así la posibilidad de la formación incorrecta de enlaces disulfuro. Además, esta formación multimérica ha sido asociada con baja actividad biológica específica.

Con el propósito de resolver estos problemas, se han desarrollado técnicas refinadas de ADNr para alterar los análogos de la proteína IFN- β biológicamente activa, producidos a través de microbios, en una forma que no afecte adversamente su actividad, sino que reduzca o elimine su habilidad para formar entrelazamientos intermoleculares o enlaces intramoleculares que causen que la proteína adopte una estructura terciaria indeseable (por ejemplo, una conformación que reduzca la actividad de la proteína). La técnica de mutagénesis dirigida ha sido exitosamente utilizada para formar análogos de proteína biológicamente activa alterada por mutación (un "análogo de proteína" se refiere aquí a una proteína sintética en la cual uno o más aminoácidos han sido genéticamente y/o químicamente modificados y que retienen una actividad biológica de la proteína progenitora) que retiene una actividad deseada de sus proteína progenitoras pero carece de la habilidad para formar enlaces intermoleculares o enlaces disulfuro intramoleculares indeseables. Los análogos de proteína sintética de la proteína biológicamente activa IFN- β que tienen el residuo de cisteína en la posición 17 suprimido o reemplazado por otro aminoácido, se ha encontrado que tienen las características y actividad deseadas.

En particular, el interferón β 1b (IFN- β 1b), un análogo sintético de proteína recombinante de IFN- β , es una proteína biológicamente activa que tiene el residuo de cisteína en la posición 17 que ha sido reemplazado por un residuo de serina. Ya que es una proteína producida a través de microbios, el IFN- β 1b no está glicosilado. También tiene una supresión de metionina N-terminal. El IFN- β ha sido formulado en una composición farmacéutica exitosa comercializada como Betaseron® que ha mostrado ser efectiva para el tratamiento y manejo de la MS. Este análogo de proteína, los materiales y las técnicas para su fabricación, su formulación como composición terapéutica y su uso para tratar MS están descritos y reivindicados en una cantidad de patentes estadounidenses y solicitudes que incluyen a la Solicitud No. 435.154, presentada el 19 de octubre de 1982; la patente No. 4.588.585, publicada el 13 de mayo de 1986; la patente No. 4.737.462, publicada el 12 de abril de 1988; y la patente No. 4.959.314, publicada el 25 de septiembre de 1990; cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia por su descripción de esas características.

La fabricación a gran escala de IFN- β para composiciones farmacéuticas está también se realizó a partir de fuentes de mamífero, en particular de células de ovario de hámster chino (CHO). Este análogo de IFN- β , denominado como IFN- β 1a, carece de la mutación Ser 17 de IFN- β 1b y está glicosilado. IFN- β 1a está formulado en productos terapéuticos comercializados como Avonex® y Rebith®.

WO 2004087753 describe derivados de IFN, en donde uno o dos de los residuos de aminoácidos en las posiciones 110, 117 ó 137 están mutados por asparagina, para formar así sitios de glicosilación adicionales dentro de la molécula. La glicosilación parece que mejora la actividad de los derivados de IFN, en un contexto antiviral y antiproliferativo; tales derivados también tienen una mejor biodisponibilidad y vida media *in vivo*.

Como con la mayoría de los compuestos terapéuticos, existe un deseo continuo por identificar y fabricar agentes activos biológicamente más potentes. En el caso de los compuestos farmacéuticos con base en IFN- β , sería deseable un análogo de IFN- β con mayor actividad biológica.

- 5 Además, algunas formulaciones farmacéuticas de IFN- β , incluido el Betaseron®, contienen albúmina humana (HA o HSA), un estabilizador común de proteína. HA es un producto de la sangre humana y se lo suministra cada vez menos. Por lo tanto, más recientemente ha existido el deseo por formulaciones de medicamento libres de HA, y sería deseable una formulación estable y efectiva de IFN- β libre de HA.

10 Resumen de la invención

- La presente invención aborda estas necesidades mediante el suministro de interferón- β desamidado. El IFN- β desamidado es un análogo de la proteína humana interferón- β en la cual la asparagina en la posición 25, numerada de acuerdo con el interferón- β , está desamidado. El producto desamidado exhibe una actividad biológica de interferón- β humano nativo en un mayor nivel y no requiere de HA para estabilización de la proteína.

- En una modalidad específica, el IFN- β desamidado es un análogo de la proteína interferón- β 1b humana sintética en la cual la cisteína en la posición 17, numerada de acuerdo con el interferón- β nativo, está suprimida o reemplazada por un aminoácido neutro, en particular serina, y la asparagina en la posición 25, está desamidada de tal manera que se convierte en una imida cíclica, un residuo de aspartato o de isoaspartato. El producto desamidado exhibe la actividad biológica deseada del interferón- β humano nativo (por ejemplo, efectos citopáticos celulares o actividad antiproliferativa, como se ha demostrado que se correlaciona con la reducción de la frecuencia de los recrudescimientos de la esclerosis múltiple) en un mayor nivel con relación a su proteína progenitora IFN- β . Además, se observa una mayor actividad biológica en una formulación libre de HA del análogo de la proteína.

- 25 Se proveen también formulaciones de los compuestos análogos de la proteína activa en composiciones terapéuticas y métodos para su elaboración y utilización.

- Además, se provee una técnica de mapa del péptido endoproteinasa-C que produce un perfil de huella para la proteína IFN- β utilizando una digestión enzimática de una muestra reducida de proteína a un pH relativamente bajo, seguido por la resolución cromatográfica de fragmentos de péptido, útil en control de calidad como una prueba de ID para los productos desamidados.

- Estos y otros objetivos y características de la invención se harán más evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos acompañantes.

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 es un diagrama de la secuencia de aminoácidos de IFN- β .

- La Fig. 2 es un diagrama de la secuencia de aminoácidos de IFN- β 1b indicando el sitio y la naturaleza de la desamidación de acuerdo con la presente invención.

- La Fig. 3 es un diagrama que ilustra la ruta para la desamidación de Asn con referencia a la desamidación de Asn25 de IFN- β de acuerdo con la presente invención.

Las Figs. 4 - 11 muestran esquemas de la potencia versus la cantidad de IFN- β 1b desamidado en diferentes medicamentos y lotes de producto para la estabilidad de IFN- β libre de HA de acuerdo con un aspecto de la invención.

- La Fig. 12A muestra mapas del péptido Glu-C de muestras para la estabilidad de IFN- β libre de HA de acuerdo con un aspecto de la invención.

La Fig. 12B muestra una vista expandida de una porción del mapa de la Fig. 12A.

- La Fig. 13 muestra el perfil por RP-HPLC de una muestra de control de IFN- β libre de HA (tiempo (min) versus respuesta (mV)).

La Fig. 14 muestra el perfil por RP-HPLC de la muestra de estabilidad de un lote de medicamento con IFN- β 1b libre de HA de acuerdo con un aspecto de la invención.

- La Fig. 15 muestra una gráfica de la Actividad de CPE para fracciones de RP-HPLC de una muestra para la estabilidad de IFN- β libre de HA de acuerdo con un aspecto de la invención.

- La Fig. 16A muestra una gráfica de resultados de una actividad antiproliferativa contra Hs294T para fracciones de RP-HPLC de una muestra de estabilidad de IFN- β libre de HA de acuerdo con un aspecto de la invención.

La Fig. 16B muestra una gráfica de resultados de una actividad antiproliferativa contra Daudi para fracciones de RP-HPLC de una muestra de estabilidad de IFN- β libre de HA de acuerdo con un aspecto de la invención.

Descripción de modalidades específicas de la invención

Los compuestos, composiciones, materiales y técnicas asociadas y usos de la presente invención serán descritos ahora con referencia a diferentes modalidades. Las propiedades importantes y características de las modalidades descritas están ilustradas en las estructuras en el texto. Aunque la invención será descrita junto con estas modalidades, se debe entender que la invención no pretende quedar limitada a estas modalidades. Por el contrario, la invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos con el propósito de permitir una comprensión profunda de la presente invención. La presente invención puede ser practicada sin algunos o todos estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito en detalle operaciones con procesos conocidos con el propósito de no hacer innecesariamente confusa la presente invención.

Introducción

La presente invención provee interferón β desamidado. El IFN- β desamidado es un análogo de la proteína humana interferón- β en la cual la asparagina en la posición 25, numerada de acuerdo con el interferón- β nativo, está desamidada. Asn se desamina hasta Asp o iso-Asp a través de un intermediario de imida cíclica. El producto desamidado exhibe una actividad biológica de interferón- β humano nativo en un mayor nivel y no requiere de HA para estabilización de la proteína. Se proveen también las formulaciones de los compuestos análogos de la proteína activa en composiciones terapéuticas y los métodos para su elaboración y uso.

Un "análogo de proteína" se refiere aquí a una proteína sintética en la cual uno o más aminoácidos han sido genética y/o químicamente modificados y que retiene una actividad biológica de la proteína progenitora, tal como efectos citopáticos celulares o actividad antiproliferativa. Tal actividad biológica ha mostrado estar correlacionada con otras actividades biológicas específicas, tales como la reducción de la frecuencia de los recrudescimientos de la esclerosis múltiple.

En una modalidad específica, el IFN- β desaminado es un análogo de la proteína humana interferón- β 1b sintética en la cual la cisteína en la posición 17, numerada de acuerdo con el interferón- β nativo, está suprimida o reemplazada por un aminoácido neutro, en particular serina, y la asparagina en posición 25, está desamidada. En modalidades específicas, la Asn25 es desamidada hasta un aspartato, isoaspartato o residuo de imida cíclica (por ejemplo, IFN- $\beta_{\text{ser17, asp25}}$, IFN- $\beta_{\text{ser17, iso-asp25}}$ o IFN- $\beta_{\text{ser17, imidacíclica25}}$, respectivamente). El producto desamidado exhibe una actividad biológica de interferón- β humano nativo en un nivel creciente con relación a IFN- β 1b. Además, la actividad biológica mejorada es observada en una formulación libre de HA del análogo de la proteína de la invención, permitiendo un IFN- β libre de HA terapéutico.

En el análogo de la proteína sintética de la invención, el residuo 17 de cisteína puede ser reemplazado por una serina, treonina, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, histidina, tirosina, fenilalanina, triptófano o metionina. En una modalidad específica, la sustitución es serina 17. El residuo 25 de asparagina ha sido reemplazado por un aspartato, isoaspartato o una imida cíclica. Con referencia a la Fig. 2, se ilustra la estructura primaria (secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2)) y la secundaria (plegada, entrecruzada) del análogo de la proteína IFN- β 1b de acuerdo con la presente invención. En la posición 25, el residuo de Asn nativa está desamidado. La desamidación de la asparagina se presenta a través de un intermediario de imida cíclica. Esta ruta está ilustrada en la Fig. 3. Como se describe con más detalle más adelante, los resultados del mapa del péptido Glu-C indican que las formas principales de desamidación son iso-Asp (IFN- $\beta_{\text{ser17, iso-asp25}}$) e imida cíclica (IFN- $\beta_{\text{ser17, imida cíclica25}}$).

El análogo de la proteína puede ser elaborado por medio de una combinación de técnicas recombinantes de modificación química y sintética. Inicialmente, el análogo de la proteína sintética IFN- β se elabora típicamente por medio de técnicas recombinantes de mutagénesis dirigidas al ADN, como se describe en las patentes referenciadas anteriormente en la sección de Antecedentes de la solicitud. Las técnicas de mutagénesis dirigida son bien conocidas y han sido revisadas por Lather, R. F. y Lecoq, J. P. en Genetic Engineering Academic Press (1983) páginas 31 - 50. La mutagénesis dirigida de Oligonucleótidos es específicamente revisada por Smith, M. y Gillam, S. en Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press (1981) 3: 1 - 32.

El análogo de la proteína IFN- β es luego sometido a un tratamiento químico que desamina el residuo de asparagina en la posición 25. Existen una cantidad de técnicas posibles de desamidación que pueden ser efectivas y adecuadas para adopción en la fabricación farmacéutica a gran escala y cualquier técnica que logre la desamidación mientras retiene una actividad biológica nativa, preferiblemente una mayor actividad biológica, puede ser utilizada. Generalmente hablando, la desamidación de proteínas IFN- β se puede lograr por medio de incubación a una temperatura entre moderada y alta (por ejemplo, aproximadamente 25 - 60°C) y una variedad de pH, desde bajo (por ejemplo, aproximadamente 0 - 4) moderado (por ejemplo, aproximadamente 4 - 10) hasta alto (por ejemplo, aproximadamente 10 - 14) con tiempos de reacción aproximadamente desde 1 minuto hasta aproximadamente 90 días o más, dependiendo de las condiciones. Por ejemplo, se puede lograr la desamidación por medio de incubación de IFN- β (por ejemplo, IFN- β 1a o IFN- β 1b) de hasta 60°C; o aproximadamente entre 25 y 40°C, por ejemplo aproximadamente 40°C, a un pH aproximadamente de 4 al menos durante 24 horas, por ejemplo hasta 40 días. Se puede disminuir el tiempo de reacción y/o disminuir la temperatura de reacción elevando el pH, por ejemplo hasta un pH neutro o básico aproximadamente desde 7 hasta 14, por ejemplo aproximadamente de 8 a 12, por ejemplo, aproximadamente 8,5. En un ejemplo, la actividad biológica (CPE) de una muestra de IFN- β 1b se incrementa casi dos veces después de un tratamiento a un pH de 8,4 a 2 - 8°C durante 14 días aproximadamente hasta 4,5 IU/mg. Se han observado también incrementos sustanciales de

actividad para tratamientos con temperatura moderada (por ejemplo, temperatura ambiente) a alta (por ejemplo, 37 - 40°C) durante 14 - 40 días.

Las técnicas para preparar el análogo de la proteína IFN- β desamidada pueden producir un producto que sea parcial o sustancialmente puro. Por ejemplo, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75% o sustancialmente todo el análogo de la proteína sintética en el producto puede ser desamidado en la posición 25, numerada de acuerdo con el interferón β nativo. Donde menos de la casi totalidad del producto está desamidado, el producto puede mostrar sin embargo mayor actividad biológica y estabilidad libre de HA. En algunos casos, puede ser deseable purificar y aislar el(los) análogo(s) de la proteína desamidada en el producto. Esta purificación y aislamiento se pueden lograr por medio de HPLC de intercambio catiónico utilizando por ejemplo las siguientes condiciones:

Cromatografía de Fase Estacionaria: Pharmacia Mono S HR 5/5, o equivalente;

Búfer de Elución: Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 con Empigen al 0,5%;

Gradiente: gradiente lineal de NaCl hasta 200 mM o superior en el búfer de elución.

Para la fabricación, esta técnica se puede realizar a gran escala.

En una modalidad preferida, cuando se produce a través de microbios el análogo de la proteína sintética, no está glicosilada. También el análogo de la proteína tiene una supresión de metionina N-terminal. En otras modalidades, el análogo de la proteína se puede ser producido en células de mamífero y por lo tanto estar glicosilada.

Como se describe con más detalle más adelante, diferentes ensayos de actividad demuestran que los análogos de la proteína IFN- β desamidada tienen una mayor bioactividad con relación a sus proteínas progenitoras IFN- β . Y los resultados de estabilidad han sido obtenidos con muestras libres de HA indicando que los análogos de la proteína IFN- β desamidada de la presente invención son adecuados para una formulación libre de HA como compuestos terapéuticos. Para formar una composición terapéutica, el análogo de la proteína, parcial o sustancialmente puro como se describió anteriormente, puede ser mezclado con un medio portador farmacéuticamente aceptable, como se conoce bien para este tipo de producto terapéutico.

Además de ser una propiedad ventajosa de las composiciones de la presente invención que ellas exhiban estabilidad libre de HA, también se puede llevar a cabo la desamidación para formulaciones que contienen HA y estas no están excluidas del alcance de la presente invención. Además, aunque la invención está principalmente descrita aquí con referencia a los análogos de la proteína IFN- β 1b, la invención también es aplicable a otros análogos de IFN- β , incluyendo los análogos de IFN- β 1a.

Los análogos de la proteína IFN- β y las composiciones de la presente invención exhiben actividad biológica que sugiere utilidad terapéutica en una cantidad de aplicaciones incluyendo la regulación del crecimiento celular en una paciente, el tratamiento de un paciente por una enfermedad viral y la estimulación de la actividad natural asesina de células en una paciente. Un uso particular es para el tratamiento de la esclerosis múltiple en un paciente, en particular la recaída - remisión de la MS. En este sentido, los compuestos terapéuticos de acuerdo con la presente invención son útiles en el tratamiento para reducir la frecuencia de los recrudescimientos de la esclerosis múltiple. El mayor nivel de actividad biológica de los análogos de la proteína IFN- β desamidada indica mejores efectos como compuestos terapéuticos, por ejemplo en el tratamiento y el manejo de la MS.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se provee una técnica del mapa del péptido endoproteinasa-C (Glu-C). El mapa del péptido produce un perfil de la huella para proteína utilizando una digestión enzimática de una muestra reducida de proteína a un pH relativamente bajo, seguido por resolución cromatográfica líquida (por ejemplo, RP-HPLC) de los fragmentos de la digestión. El mapeo del péptido puede ser utilizado en control de calidad como un ensayo de ID para el producto análogo de la proteína IFN- β desamidada de acuerdo con la invención. También es una herramienta poderosa monitorear las modificaciones menores de la estructura primaria en una proteína de eventos tales como recorte, mutación y degradación debidos a oxidación o a desamidación.

Se sabe que una variante del IFN- β desamidado contiene imida cíclica, una forma intermedia de la desamidación. Esta forma de la imida cíclica se encuentra en cantidades crecientes en muestras para estabilidad. La mayoría de las enzimas incluyendo la Lys-C, que es utilizada en un mapa convencional del péptido para IFN- β , digiere proteínas en forma óptima con un pH entre neutro y alto. Con un pH entre neutro y alto, la imida cíclica es inestable y además se induce artificialmente desamidación adicional. Por lo tanto, es necesario el mantenimiento de la muestra en un ambiente de pH bajo durante la reducción y la digestión para monitorear el nivel nativo tanto de la imida cíclica como de otras formas de desamidación (Asp, iso-Asp) en la muestra.

El mapa del péptido endoproteinasa-C (Glu-C) se acopla con un agente de reducción que es funcional a un pH por debajo de 8, por ejemplo en el rango aproximado de 3 - 8, por ejemplo aproximadamente de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 o aquellos pH intermedios. Un agente de reducción adecuado es la tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP). Se pueden utilizar otros agentes funcionales de reducción a un pH aproximadamente de 3 - 8, tales como ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol, cisteína, glutatona reducida, 2-mercaptoetilamina y ácido tioglicólico. El mapa del péptido Glu-C tiene dos pH óptimos, pH 7,8 y pH 4,0, para su actividad enzimática. Como se observó anteriormente, se sabe que

la TCEP es funcional a un pH por debajo de 8,0. En una modalidad, el nuevo mapa del péptido Glu-C utiliza la preparación de la muestra que incluye tanto la reducción por TCEP como la digestión a pH bajo, 4,0, que es el rango óptimo de pH para preservar el nivel nativo de las formas desamidadas, por ejemplo, imida cíclica, en la muestra. Esta nueva técnica de mapa puede ser utilizada para caracterizar al fragmento de la digestión que contiene formas desamidadas, incluyendo imida cíclica, en las muestras de IFN- β .

Se pueden analizar las muestras de IFN- β por medio del mapa del péptido Glu-C para identificar el sitio de desamidación y su forma (por ejemplo, Asp, Iso-Asp, imida cíclica). Las muestras de proteína en formulaciones amortiguadas (por ejemplo, una muestra de proteína de 0,5 ml con una concentración de 0,1 hasta 10, por ejemplo, 0,5 mg/ml en búfer de formulación de un búfer de 2 a 500 mM, o en algunos casos 50 a 100 mM, de una sal tal como aspartato, bicarbonato (por ejemplo, bicarbonato de amonio), carbonato (por ejemplo, carbonato de amonio), acetato (por ejemplo, acetato de amonio), fosfato (por ejemplo, fosfato de sodio), citrato, formato, succinato, MES, PIPES, ACES, MOPS, MOPSO, HEPES, TES, TRIS-HCl, BIS-TRIS, BIS-TRIS Propano, ADA, BES, DIPSO, TAPSO, HEPPSO, POPSO, EPPS, TEA, etc., la selección apropiada y el uso de los cuales será conocido por aquellos capacitados en el arte para el pH deseado (por ejemplo, ácido aspártico 2 mM, pH 4)) se pueden reducir utilizando TCEP, por ejemplo utilizando una proporción molar de 1:2 hasta 1:30, por ejemplo, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10 ó 1:20 de proteína para TCEP, tal como 1:10. Se incubaba la muestra, por ejemplo, aproximadamente entre 30 - 40°C (por ejemplo, 37°C), hasta que se reduce el material de la muestra. Los tiempos de incubación adecuados pueden ser aproximadamente de 5 minutos hasta 24 horas dependiendo de la inestabilidad de la muestra, por ejemplo 3 horas. Se digiere posteriormente el material reducido con Glu-C, por ejemplo 1 a 10, por ejemplo, 4 mg/ml, en una relación 1:1 hasta 20:1 (o cualquier proporción intermedia adecuada incluyendo 2:1, 3:1, 4:1, 10:1, etc.), por ejemplo, una proporción en masa de 5:1, de proteína con respecto a Glu-C y se incubaba, por ejemplo aproximadamente entre 30 - 40°C (por ejemplo, 37°C), hasta que se digiere el material de la muestra. Los tiempos de digestión adecuados pueden ser aproximadamente de 5 minutos hasta 24 horas dependiendo de la inestabilidad de la muestra, por ejemplo 4 horas. Los fragmentos del péptido se pueden resolver por medio de cromatografía líquida, por ejemplo, RP-HPLC.

Un experimento específico del mapa del péptido y sus resultados son descritos en la sección de Ejemplos más adelante.

30 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran aspectos de la presente invención, pero no pretenden de ninguna manera limitar la invención. En varios de estos ejemplos, se hace una distinción entre la imida cíclica y otras formas desamidadas (Asp e iso-Asp), las dos especies más distinguibles que mostraron un incremento de potencia. Todas son formas desamidadas, pero donde se hace una distinción entre la imida cíclica y otras formas desamidadas (Asp e iso-Asp), la anterior se denomina algunas veces como una "imida cíclica" mientras que la última es denominada algunas veces como "desamidadá" o "desamidación", particularmente en los rótulos de la figura.

Ejemplo 1

40 *Incremento de Potencia en la Muestra de Estabilidad de IFN- β 1b libre de HA*

Resumen

Se ha observado un incremento de potencia en las muestras de estabilidad de IFN- β libre de HA. Los bioensayos de los efectos citopáticos (CPE) mostraron un incremento de potencia en las muestras de estabilidad de IFN- β libre de HA a 25°C en el transcurso del tiempo (T = 0 - 6 meses). Se ha observado también que el producto final de la desamidación y su intermediario, la imida cíclica, han incrementado la estabilidad de las muestras a 25°C.

El mapeo del péptido Glu-C identificó el sitio de desamidación en Asn25 y reveló que las formas principales de desamidación en las muestras de estabilidad de IFN- β 1b libre de HA fueron los análogos de iso-Asp y de la imida cíclica, mientras que la forma Asp se incrementó ligeramente.

Los resultados obtenidos a partir del método de RP-HPLC indicaron que las formas desamidadas (imida cíclica, Asp e iso-Asp) se incrementaron significativamente en la muestra de estabilidad de IFN- β libre de HA.

Las formas desamidadas en la muestra de estabilidad de IFN- β libre de HA mostraron mayor actividad biológica que la IFN- β progenitora (amidada) por medio de ensayos de CPE y antiproliferativos.

Con base en estos hallazgos, se considera que la desamidación (que forma análogos de Asp, iso-Asp e imida cíclica) mejora la actividad biológica del IFN- β libre de HA. Por lo tanto, se pudo preparar una forma desamidadá de IFN- β con el propósito de mejorar la actividad biológica de los compuestos terapéuticos con base en IFN- β , ya sea libres de HA o conteniendo HA. Los análogos desamidados se pueden preparar por medio de incubación de una solución de IFN- β (ya sea libre de HA o conteniendo HA) a una temperatura entre moderada y alta, y/o a un pH bajo, moderado o alto. Los productos desamidados de esta invención reducirán la dosis clínica requerida e incrementarán la estabilidad de las formulaciones líquidas de IFN- β a temperatura ambiente. Disminuyendo la dosis clínica, la proporción de pacientes que experimentan una reacción inmune adversa (por ejemplo, anticuerpos de neutralización), se reduce. Los datos que respaldan la invención, obtenidos a partir de diferentes estudios de estabilidad y de análisis de las preparaciones de IFN- β 1b se presentan a continuación.

ES 2 318 575 T3

1. Datos de Estabilidad de IFN-β Libre de HA

Como se muestra más abajo en la Tabla 1 (Sustancia del Medicamento: en ácido aspártico 2 mM, pH 4,0, Trehalosa al 0,9%), el bioensayo de los efectos citopáticos (CPE) mostró un incremento en la potencia en las muestras para estabilidad del IFN-β 1b libre de HA a 25°C con el transcurso del tiempo (T = 0 - 6 meses):

TABLA 1

Datos de Estabilidad del Bioensayo de CPE para la Sustancia del Medicamento con Interferón Beta 1b Libre de HA

Método Analítico: Bioensayo de CPE						
Criterio de Aceptación: 1,3 - 5,1 x 10 ⁷ IU/mg						
Lote No.:	Prueba	TA2040	TA2085	Prueba	TA2040	TA2085
Descripción:	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml
Estudio No.:	1402	1411	1414	1403	1412	1415
Almacenamiento:	5°C	5°C	5°C	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR
Orientación:	Derecha	Derecha	Derecha	Derecha	Derecha	Derecha
Meses	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷
0	2,8	2,8	2,9	2,8	2,8	2,9
1,5	NR	NR	NR	4,2	3,5	3,6
3	3,0	2,9	2,8	4,6	4,2	4,1
4,5	NR	NR	NR	5,7	4,9	5,0
6	3,3	3,1	2,9	6,3	5,4	4,8
NR: No Realizado HR: Humedad Relativa						

TABLA 2

Datos de Estabilidad del Bioensayo de CPE para el Producto del Medicamento con Interferón Beta 1b Libre de HA

Lote No.:	14159-49 (no clínico)	25FEB03 (Prueba)	TA2158	TA2451
Descripción:	1,2 ml; 0,25 mg/ml	1,2 ml; 1,0 mg/ml	1,2 ml; 1,0 mg/ml	1,2 ml; 1,0 mg/ml
Estudio No.:	1335	1438	1442	1444
Almacenamiento:	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR
Orientación:	Invertido	Invertido	Invertido	Invertido
Meses	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷
0	2,8	2,7	2,7	2,6
1,5	3,2	3,7	3,5	3,6
3	4,3	4,4	4,4	4,2
4,5	4,1	4,8	4,6	4,6
6	4,6	5,3	5,5	5,4

ES 2 318 575 T3

Como se observa en las Tablas 3 y 4, más abajo, la (CEX)-HPLC de intercambio catiónico demuestra que los datos de estabilidad para las muestras a 25°C de la sustancia del medicamento y del producto del medicamento, respectivamente, también mostraron un incremento en la desaminación (D-IFN-β):

TABLA 3

Datos de Estabilidad por CEX-HPLC para la Sustancia del Medicamento con Interferón beta 1b Libre de HA

Método Analítico: CEX HPLC						
Criterio de Aceptación: Reporte del % de Desaminación						
Lote No.:	Prueba	TA2040	TA2085	Prueba	TA2040	TA2085
Descripción:	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml
Estudio No.:	1402	1411	1414	1403	1412	1415
Almacenamiento:	5°C	5°C	5°C	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR
Orientación:	Derecha	Derecha	Derecha	Derecha	Derecha	Derecha
Meses	% de Desaminación	% de Desaminación	% de Desaminación	% de Desaminación	% de Desaminación	% de Desaminación
0	6	6	6	6	6	6
1,5	NR	NR	NR	10	10	9
3	7	6	7	14	14	13
4,5	NR	NR	NR	20	20	18
6	5	6	6	22	22	20
NR: No Realizado						

TABLA 4

Datos de Estabilidad por CEX-HPLC para el Producto del Medicamento con Interferón beta 1b Libre de Ha

Lote No.:	14159-49 (no clínico)	25FEB03 (Prueba)	TA2158	TA2451
Descripción:	1,2 ml; 0,25 mg/ml	1,2 ml; 1,0 mg/ml	1,2 ml; 1,0 mg/ml	1,2 ml; 1,0 mg/ml
Estudio No.:	1335	1438	1442	1444
Almacenamiento:	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR
Orientación:	Invertida	Invertida	Invertida	Invertida
Meses	% Desaminación	% Desaminación	% Desaminación	% Desaminación
0	4	7	7	7
1,5	7	11	13	12
3	12	18	18	17
4,5	16	24	24	22
6	18	37 ¹	35 ¹	40 ¹
10	FIN	IP	IP	IP
FIN				

Las Tablas 5 y 6, más abajo, muestran que un incremento en el Pico D, que representa a la forma intermedia de la imida cíclica de la desaminación, fue también observada en el transcurso del tiempo por medio del uso de una técnica de (RP)-HPLC en fase reversa en muestras a 25°C de sustancia de medicamento y de producto de medicamento, respectivamente:

Tabla 5: Datos de Estabilidad por RP-HPLC para la Sustancia del Medicamento con Interferón beta 1b Libre de HA

Método Analítico: RP-HPLC															
Criterio de Aceptación: Reporte del % de Áreas de Pico															
Lote No.:	Prueba	TA2040				TA2085									
Descripción:	6 ml; 2 mg/ml	6 ml; 2 mg/ml				6 ml; 2 mg/ml									
Estudio No.:	1403	1412				1415									
Almacenamiento:	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR				25°C /60% de HR									
Orientación:	Derecha	Derecha				Derecha									
Meses	Pico A	Principal (D + B)	Pico D	Pico B	Otro	Pico A	Principal (D + B)	Pico D	Pico B	Otro.	Pico A	Principal (D + B)	Pico D	Pico B	Otro
0	2	96	12	85	2	2	96	11	85	2	2	96	11	86	2
1,5	2	95	17	78	3	2	96	17	79	2	2	96	16	80	3
3	1	93	20	73	6	1	92	19	73	7	1	92	19	73	7
4,5	2	91	24	67	7	2	90	24	66	8	1	91	23	68	8
6	2	93	26	67	5	1	93	25	68	5	1	94	25	68	5

Tabla 6: Datos de Estabilidad por RP-HPLC para el Producto del Medicamento con Interferón beta 1b Libre de HA

Método Analítico: RP-HPLC																
Criterio de Aceptación: Reporte del % de Áreas de Pico																
Lote No.:	25FEB03 (Prueba)	TA2158					TA2451									
Descripción:	1,2 ml; 1,0 mg/ml	1,2 ml; 1,0 mg/ml					1,2 ml; 1,0 mg/ml									
Estudio No.:	1438	1442					1444									
Almacenamiento:	25°C /60% de HR	25°C /60% de HR					25°C /60% de HR									
Orientación:	Invertida	Invertida					Invertida									
Meses		Pico A	Principal (D + B)	Pico D	Pico B	Otro	Pico A	Principal (D + B)	Pico D	Pico B	Otro	Pico A	Principal (D + B)	Pico D	Pico B	Otro
0		1	93	12	81	6	1	93	11	82	6	1	93	12	81	6
1,5		1	92	16	76	6	1	92	17	74	7	1	91	17	75	8
3		2	90	22	68	8	2	91	21	69	8	2	91	21	70	7
4,5		2	94	23	71	5	1	94	22	72	5	1	94	22	72	4
6		1	94	24	70	5	1	94	24	71	5	1	95	24	71	4
FIN																

Las Figs. 4 - 11 muestran gráficas de la potencia versus la cantidad de IFN- β 1b desamidado (“% de D-IFN” o “% de Pico D”) en diferentes sustancias del medicamento para estabilidad de la IFN- β libre de HA y de lotes d producto de acuerdo con un aspecto de la invención. Estos datos demuestran que existe una correlación entre el incremento de la potencia y el nivel de desamidación del IFN- β libre de HA.

2. Caracterización de las Muestras para Estabilidad del IFN- β Libre de HA

En la Fig. 3 se muestra la secuencia primaria de IFN- β 1b. Se ha encontrado que la desamidación se presenta en Asn25. La naturaleza de esa desamidación y las propiedades de los productos desamidados fueron exploradas en los ensayos descritos a continuación:

2.1 Mapa del Péptido Glu-C

Un mapa del péptido produce un perfil de huella para las proteínas utilizando una digestión enzimática seguida por RP-HPLC. El mapeo del péptido es comúnmente utilizado en control de calidad como un ensayo de ID. Es también una herramienta poderosa para monitorear modificaciones menores de la estructura primaria en una proteína a partir de eventos tales como recorte, mutación y degradación debidos a oxidación o a desamidación. Se sabe que el IFN- β libre de HA contiene imida cíclica, un intermediario de la desamidación. Esta imida cíclica es una variante degradada clave en el IFN- β libre de HA y se encuentra en cantidades crecientes en muestras para estabilidad. La mayoría de las enzimas incluyendo a la Lys-C, que es utilizada en el mapa actual del péptido para IFN- β libre de HA, digiere proteínas en forma óptima a pH entre neutro y alto. A un pH entre neutro y alto, la imida cíclica es inestable y se induce artificialmente la desamidación. Por lo tanto, se hace necesario mantener la muestra en un ambiente de pH bajo durante la reducción y la digestión para monitorear el nivel nativo de imida cíclica y de desamidación en la muestra.

Se ha desarrollado un nuevo mapa del péptido endoproteinasa-C (Glu-C) acoplado con tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP) como agente reductor para caracterizar el fragmento que contiene formas desamidadas, incluyendo la imida cíclica, en IFN- β libre de HA. Se sabe que el mapa del péptido Glu-C tiene dos pH óptimos, pH 7,8 y pH 4,0, para su actividad enzimática. Se sabe que la TCEP es funcional a pH por debajo de 8,0. Se desarrolló el nuevo mapa del péptido Glu-C utilizando la preparación de la muestra que incluye tanto reducción como digestión a pH bajo, 4,0, que está en el rango óptimo de pH para preservar el nivel nativo de formas desamidadas, por ejemplo, imida cíclica, en la muestra. Ya que el mapa del péptido desarrollado aquí emplea preparaciones de la muestra a pH bajo, se logra exitosamente el monitoreo preciso del nivel nativo de formas desamidadas en IFN- β libre de HA.

Las muestras para estabilidad del lote del producto del medicamento con IFN- β 1b libre de HA, TA2451 (3, 6 y 9 meses a 25°C) fueron analizadas por medio del mapa del péptido Glu-C para identificar el sitio de desamidación y su forma (por ejemplo, Asp, Iso-Asp, imida cíclica). Cada 0,5 ml de muestra de proteína con una concentración de 0,5 mg/ml en búfer de formulación de ácido aspártico 2 mM, pH 4,0 fueron reducidos utilizando TCEP. Utilizando una proporción molar de 1:10 de proteína para TCEP, se incubó la muestra a 37°C durante 3 horas. Se digirió posteriormente el material reducido con 4 mg/ml de Glu-C con una proporción de masa de 5:1 de proteína con respecto a Glu-C y se incubó a 37°C durante 4 horas. Se resolvieron los fragmentos del péptido por medio de cromatografía RP-HPLC (ThermoHypersil BioBasic C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m), utilizando un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% como búfer de elusión, con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y una temperatura de columna a 38°C.

La Fig. 12A muestra mapas del péptido Glu-C de muestras para estabilidad de IFN- β libre de HA de acuerdo con un aspecto de la invención. La Fig. 12B muestra una vista expandida de la porción a RT en 22 - 26 minutos del mapa de la Fig. 12A.

Como se muestra en las figuras, el pico del fragmento E1 disminuye con el transcurso del tiempo, mientras que los picos que representan a Iso-Asp, a la imida cíclica, y a Asp se incrementan. Aquellos picos son formas desamidadas de Asn en la posición 25 en el fragmento E1. Esta caracterización del pico fue llevada a cabo por medio de espectrometría de masas y secuenciación de Edman de los subfragmentos E1 obtenidos por digestión con Lisil endopeptidasa de fragmentos relacionados con E1. El residuo Asn25 tiene una secuencia de aminoácidos seguida por glicina. Esta secuencia de Asn-Gly es conocido por tener una tasa rápida de desamidación.

Con base en este resultado del mapa del péptido Glu-C, se identificaron las formas principales de desamidación en las muestras para estabilidad del IFN- β libre de HA como iso-Asp e imida cíclica. Hubo también un ligero incremento en el nivel de la forma Asp.

2.2. RP-HPLC

La RP-HPLC separa los compuestos con base en su hidrofobicidad. Las muestras de IFN- β 1b libre de HA fueron analizadas por medio del método RP-HPLC para caracterizar las variantes de IFN- β (por ejemplo, Asp, iso-Asp, imida cíclica). Las muestras del ensayo fueron inyectadas sobre una columna cromatográfica Zorbax 300SB-CN, 150 x 4,6 mm, 3,5 μ m de tamaño de partícula, y se separaron las variantes de IFN- β 1b utilizando un gradiente de acetonitrilo en búfer de elución de ácido trifluoroacético al 0,1%. El resultado de la muestra de control se muestra en la Fig. 13.

La identificación del pico mostrado en la figura se realizó por medio del análisis espectrométrico de masas/LC en línea (RP-HPLC/Q-TOF/ESI-MS). Se dividió el flujo de HPLC aproximadamente en una proporción de 1:20, y se dirigieron aproximadamente 50 uL/m a la fuente de iones del espectrómetro de masas. El espectrómetro de masas era un instrumento Micromass Q-TOF2, con una fuente de ionización por electrospray. El voltaje de los iones se programó en 3200, con el voltaje de cono programado en 50. Se recogieron los datos con el analizador de tiempo de vuelo (TOF) entre m/z 300 y 2500. Los datos de LC/masa en línea revelan que existe más de una variante de proteína que eluye conjuntamente bajo algunos de los picos de RP-HPLC.

La Fig. 14 muestra el perfil de RP-HPLC de la muestra de estabilidad del lote de producto del medicamento con IFN- β 1b (aproximadamente 10 meses a 25°C). Como se muestra en la figura, el perfil es diferente de aquel de la muestra de control (Fig. 13) y de la imida cíclica (Pico D) y se incrementa significativamente la desamidación (Asp y/o iso-Asp) (Pico Medio) en IFN- β 1b libre de HA. Se observan otras variantes múltiples menores desamidadas y de imida cíclica. Estas son variantes desamidadas y de imida cíclica con modificaciones estructurales y químicas adicionales que se separan debido a sus diferentes propiedades hidrófobas.

2.3. Bioensayo de CPE

El IFN- β induce un estado antiviral en células de mamífero en las cuales se inhibe la replicación de algunos tipos de virus y provocan efectos citopáticos celulares (CPE). Se utilizaron células de carcinoma de pulmón humano A549 y virus de encefalomiocarditis de mudo (EMC) para evaluar la actividad biológica de las fracciones de RP-HPLC obtenidas a partir de la muestra de estabilidad del lote de producto del medicamento con IFN- β 1b libre de HA (aproximadamente 10 meses a 25°C).

Se cultivaron las células en placas de 96 pozos y se las trató con diluciones seriales de IFN- β 1b durante la noche antes de la adición del virus. Se incubaron luego los cultivos durante un período adecuado de tiempo para permitir la replicación del virus. Las células tratadas con suficiente IFN- β 1b fueron protegidas del reto virus y permanecieron viables. Las células no protegidas sufrieron cambios citopáticos y murieron. Se cuantificó la dosis de interferón dependiente del CPE utilizando técnicas de coloración y se preparó una curva de respuesta a la dosis a partir de una gráfica de viabilidad celular (medición de la Densidad Óptica) versus la concentración de IFN- β . Se calculó la actividad de IFN- β como la concentración requerida para la protección celular máxima media (concentración ED₅₀).

Como se muestra en la Fig. 15, la actividad de CPE en la fracción desamidada (Pico Medio, Fracción 16) es significativamente mayor que aquella en la fracción progenitora de IFN- β 1b (Pico B, Fracción 18). La fracción de imida cíclica (Pico D, Fracción 15) también muestra mayor actividad de CPE que la fracción progenitora de IFN- β 1b.

2.4. Ensayo Antiproliferativo

El INF- β muestra actividad antiproliferativa contra una cantidad de líneas de células establecidas de tumores humanos. Se utilizaron dos líneas de células, la línea de células de melanoma humano Hs294T-a y la línea de linfoblastos B humana Daudi-a derivada del linfoma de Burkitt, para evaluar la actividad biológica de las fracciones de RP-HPLC obtenidas de la muestra de estabilidad del lote de producto del medicamento con IFN- β 1b libre de HA (aproximadamente 10 meses a 25°C).

Se llevaron a cabo varias diluciones de las muestras de prueba con IFN- β en placas de 96 pozos. Se prepararon células respondedoras en medio de cultivo de tejido y se las añadió a las placas del ensayo. Después de 3 días de incubación, se tiñeron las células con Alamar Blue y se utilizó un contador Coulter para medir la respuesta de crecimiento. Se inhibió el crecimiento de las células en respuesta al IFN- β en una forma que depende de la dosis. Se preparó una curva de respuesta a la dosis a partir de una gráfica del número de células (medición de la Densidad Óptica) versus la concentración de IFN- β . Se calculó la actividad del IFN- β como la concentración requerida para el crecimiento celular máximo medio (concentración ED₅₀).

Como se muestra en las Figs. 16A (Hs294T) y 16B (Daudi), la actividad antiproliferativa en la fracción de desamidación (Pico Medio, Fracción 16) y en la fracción de imida cíclica (Pico D, Fracción 15) es significativamente superior que aquella en la fracción progenitora de IFN- β (Pico B, Fracción 18).

3. Conclusiones

Con base en los datos de estabilidad y en resultados obtenidos a partir de los estudios descritos anteriormente, la desamidación (Asp, iso-Asp e imida cíclica que reemplazan a Asn en la posición 25) mejora una actividad biológica de IFN- β . Por lo tanto, se puede preparar intencionalmente una forma desamidada de un IFN- β , por ejemplo, IFN- β 1b con el propósito de mejorar la actividad biológica del compuesto. La forma desamidada se puede preparar incubando IFN- β a una temperatura entre moderada y alta, o en un ambiente de pH bajo, moderado o alto. Los productos desamidados de esta invención reducirán la dosis clínica requerida e incrementarán la estabilidad de las formulaciones líquidas de IFN- β , incluidas las formulaciones del IFN- β que contiene HA, a temperatura ambiente. Disminuyendo la dosis clínica, la proporción de pacientes que experimentan una reacción inmune adversa (por ejemplo, anticuerpos de neutralización), se reduce.

Ejemplo 2

Datos sobre la Posibilidad de su Fabricación

- 5 Se llevaron a cabo experimentos para demostrar diferentes técnicas de desamidación, como se describió anteriormente. Los datos obtenidos a partir del bioensayo del CPE evidencian que se prepara fácilmente el IFN- β desamidado por medio de procesos adecuados para producción farmacéutica a gran escala. En particular, se observaron incrementos significativos de bioactividad en diferentes muestras fabricadas bajo Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) incubadas a temperaturas entre moderadas (por ejemplo, temperatura ambiente) hasta altas (por ejemplo, 37 - 40°C) durante 14 - 40 días, y se obtuvieron incrementos de bioactividad de casi dos veces por incubación de una muestra bajo GMP a temperatura ambiente y pH 8,8 aproximadamente durante 1 hora, y a 2 - 8°C a pH 8,4 aproximadamente durante 14 días.

Resultados del Bioensayo de CPE

Ensayo 1

Nombre de la Muestra	IU/mg
TR090602 a Granel	2,79E + 07
TR090602, Estab. a Temp. Amb., 20 días	3,87E + 07
TR090602, Estab. a 37°C, 20 días	4,11E + 07
Control Libre de HA, Estresado	2,95E + 07
Base Libre de HA, Estresado, pH ²	4,52E + 07
Estresado, Libre de HA, 40°C, 30 días	5,06E + 07
Ensayo de Control del CPE con IFN	2,94E + 07

Ensayo 2

Nombre de la Muestra	IU/mg
TR090602 a Granel	3,62E + 07
TR090602, Estab. a Temp. Ambiente, 40 días	6,52E + 07
TR090602, Estab. a 37°C, 40 días	1,56E + 08
GMP#1 a Granel	2,67E + 07
GMP#1 a Granel, Estab. a 37°C, 40 días	3,51E + 07
GMP#1 a Granel, pH 8,8 ³	4,79E + 07
Control Libre de HA, Estresado	2,26E + 07
Libre de HA, Estresado, 40°C, 14 días	3,44E + 07
Libre de HA, Estresado, 40°C, 30 días	4,05E + 07
Ensayo de Control del CPE con IFN	2,93E + 07
¹⁾ Temperatura Ambiente	
²⁾ Se incubó la muestra en pH 8,4 a 2 - 8°C durante 14 días	
³⁾ Se incubó la muestra en pH 8,8 a TA durante 1 hora	

Conclusión

- Aunque la invención anterior ha sido descrita con algún detalle para propósitos de claridad en su comprensión, será claro que se pueden practicar algunos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anexas. Debe observarse que existen muchas formas alternativas de implementación tanto de los procesos como de las composiciones de la presente invención. Por lo tanto, las presente modalidades se deben considerar como ilustrativas y no restrictivas, y que la invención no se limita a los detalles dados aquí, sino que se pueden modificar dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 435154 A [0005]
- US 4959314 A [0005]
- US 4588585 A [0005]
- WO 2004087753 A [0007]
- US 4737462 A [0005]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- *Gene*, 1980, vol. 10, 11 - 15 [0003]
- *Nature*, 1980, vol. 285, 542 - 547 [0003]
- **LATHER**, R. F.; **LECOQ**, J. P. Genetic Engineering. *Academic Press*, 1983, 31 - 50 [0021]
- **SMITH**, M.; **GILLAM**, S. Genetic Engineering: Principles and Methods. *Plenum Press*, 1981, vol. 3, 1 - 32 [0021].

REIVINDICACIONES

1. Un análogo purificado y aislado de la proteína humana interferón β sintética, en donde,
5 la asparagina en la posición 25, numerada de acuerdo con el interferón β nativo, está desamidada, y,
dicho análogo de proteína exhibe una actividad biológica del interferón β humano nativo.
2. El análogo de la proteína sintética de la reivindicación 1, en donde la cisteína en la posición 17, numerada de
10 acuerdo con el interferón β nativo, está suprimido o reemplazado por un aminoácido neutro.
3. El análogo de la proteína sintética de la reivindicación 2, en donde dicho residuo de cisteína ha sido reemplazado
por un residuo de serina.
- 15 4. El análogo de la proteína sintética de la reivindicación 3, en donde dicho residuo de asparagina ha sido reempla-
zado por un residuo seleccionado del grupo que consiste de aspartato, isoaspartato e imida cíclica.
5. El análogo de la proteína sintética de la reivindicación 4, en donde el análogo de la proteína no está glicosilado.
- 20 6. El análogo de la proteína sintética de la reivindicación 5, en donde el análogo de la proteína tiene una supresión
de metionina N-terminal.
7. El análogo de la proteína sintética de la reivindicación 4, en donde el análogo de la proteína tiene una actividad
25 biológica mayor a la del IFN- β_{ser17} .
8. Una composición terapéutica que tiene una actividad de IFN- β que comprende una cantidad terapéuticamente
efectiva del análogo de la proteína sintética de la reivindicación 4 mezclada con un medio portador farmacéuticamente
aceptable.
- 30 9. La composición de la reivindicación 8, en donde al menos 50% del análogo d la proteína sintética está desami-
dado en la posición 25, numerado de acuerdo con el interferón β nativo.
10. La composición de la reivindicación 8, en donde sustancialmente todo el análogo de la proteína sintética está
35 desamidado en la posición 25, numerado de acuerdo con el interferón β nativo.
11. La composición de la reivindicación 8, en donde la composición está libre de HA.
12. Un método de elaboración del análogo desamidado de IFN- β , que comprende:
40 incubar una proteína IFN- β bajo condiciones adecuadas a una temperatura entre moderada y alta de apro-
ximadamente 25 - 60°C;
 purificar y aislar el análogo de la proteína desamidada.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, que comprende:
 la incubación a una temperatura de aproximadamente 40°C aproximadamente durante 14 días.
- 50 14. El método de la reivindicación 13, que comprende además que la incubación se lleva a cabo a un pH de al
menos 4.
15. El método de la reivindicación 14, que comprende: incubación a un pH de 7 - 14.
- 55 16. El método de la reivindicación 15, en donde la incubación es a pH 8 - 9 aproximadamente durante 14 días.
17. La composición de la reivindicación 8 para uso en terapia.
18. La composición de la reivindicación 17, en donde la terapia es para regular el crecimiento celular en el paciente
60 y la composición se utiliza en una cantidad que regula el crecimiento celular.
19. La composición de la reivindicación 17, en donde la terapia es para una enfermedad viral del paciente y la
composición se utiliza en una cantidad que inhibe la enfermedad viral.
- 65 20. La composición de la reivindicación 17, en donde la terapia es para estimular la actividad celular asesina natural
en el paciente y la composición se utiliza en una cantidad que estimula a la célula asesina natural.

ES 2 318 575 T3

21. La composición de la reivindicación 17, en donde la terapia es para esclerosis múltiple en el paciente y la composición se utiliza en una cantidad terapéuticamente efectiva.

5 22. La composición de la reivindicación 21, en donde la terapia comprende la reducción de la frecuencia de los recrudescimientos de la esclerosis múltiple.

23. La composición de la reivindicación 22, en donde dicha esclerosis múltiple es del tipo de remisión - recaída.

10 24. Un método de mapeo de un péptido, que comprende:

la incubación de una muestra de proteína en una solución amortiguada por debajo de pH 8 que contiene un agente reductor;

15 la digestión de la muestra incubada con endoproteinasa-C; y

resolver los fragmentos del péptido de la digestión por medio de cromatografía líquida.

en donde la muestra de proteína es un IFN- β desamidado.

20 25. El método de la reivindicación 24, en donde el agente reductor es tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP).

26. El método de la reivindicación 25, en donde la incubación se realiza con un pH aproximadamente de 4.

25 27. El método de la reivindicación 26, en donde la cromatografía líquida es RP-HPLC.

5	10	15	20
MetSerTyrAsnLeu	LeuGlyPheLeuGln	ArgSerSerAsnPhe	GlnCysGlnLysLeu
25	30	35	40
LeuTrpGlnLeuAsn	GlyArgLeuGluTyr	CysLeuLysAspArg	MetAsnPheAspIle
45	50	55	60
ProGluGluIleLys	GlnLeuGlnGlnPhe	GlnLysGluAspAla	AlaLeuThrIleTyr
65	70	75	80
GluMetLeuGlnAsn	IlePheAlaIlePhe	ArgGlnAspSerSer	SerThrGlyTrpAsn
85	90	95	100
GluThrIleValGlu	AsnLeuLeuAlaAsn	ValTyrHisGlnIle	AsnHisLeuLysThr
105	110	115	120
ValLeuGluGluLys	LeuGluLysGluAsp	PheThrArgGlyLys	LeuMetSerSerLeu
125	130	135	140
HisLeuLysArgTyr	TyrGlyArgIleLeu	HisTyrLeuLysAla	LysGluTyrSerHis
145	150	155	160
CysAlaTrpThrIle	ValArgValGluIle	LeuArgAsnPheTyr	PheIleAsnArgLeu
165	170	175	180
ThrGlyTyrLeuArg	Asn---		

FIG. 1

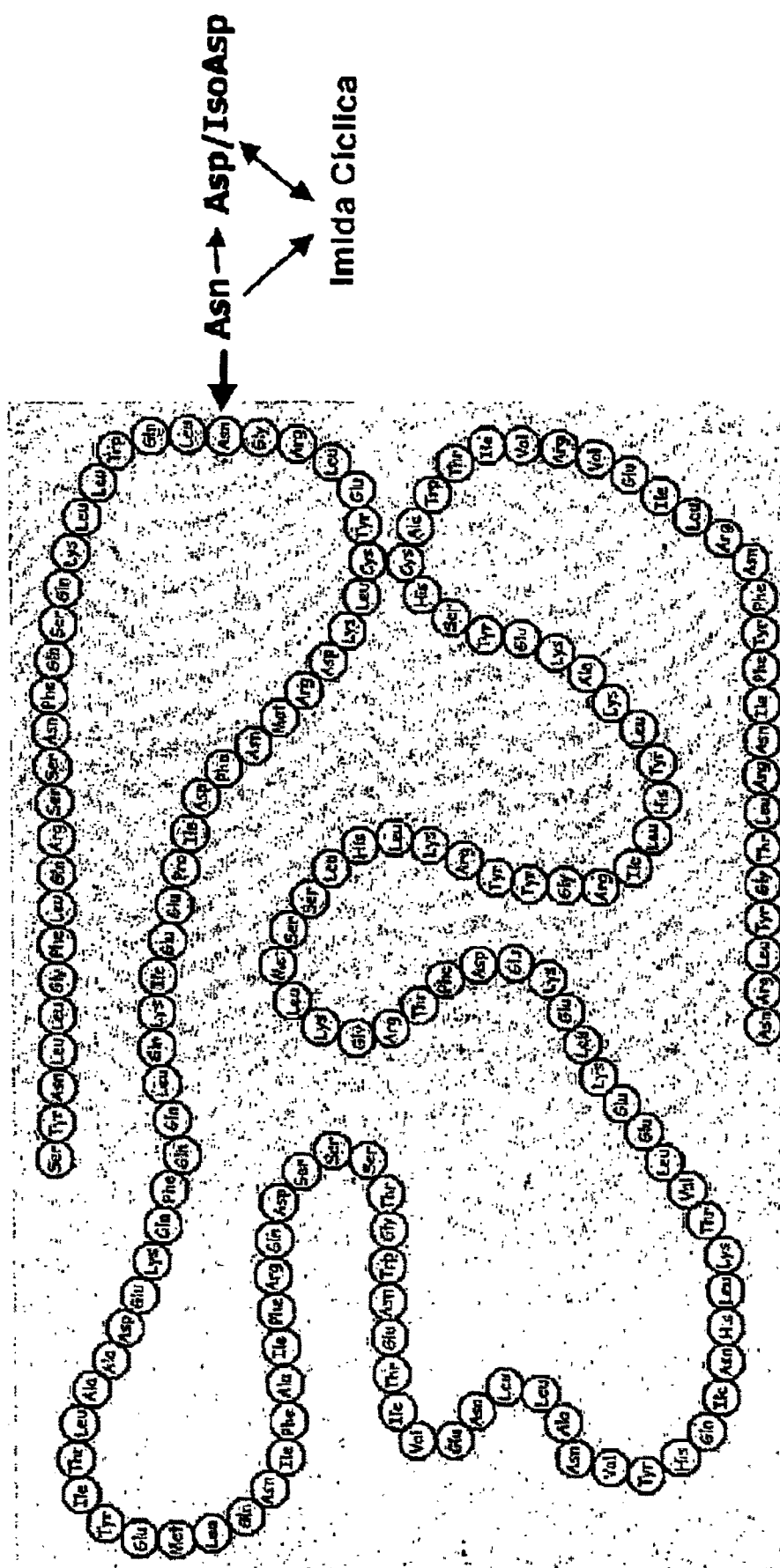


FIG. 2

Ruta de Desamidación de Asn

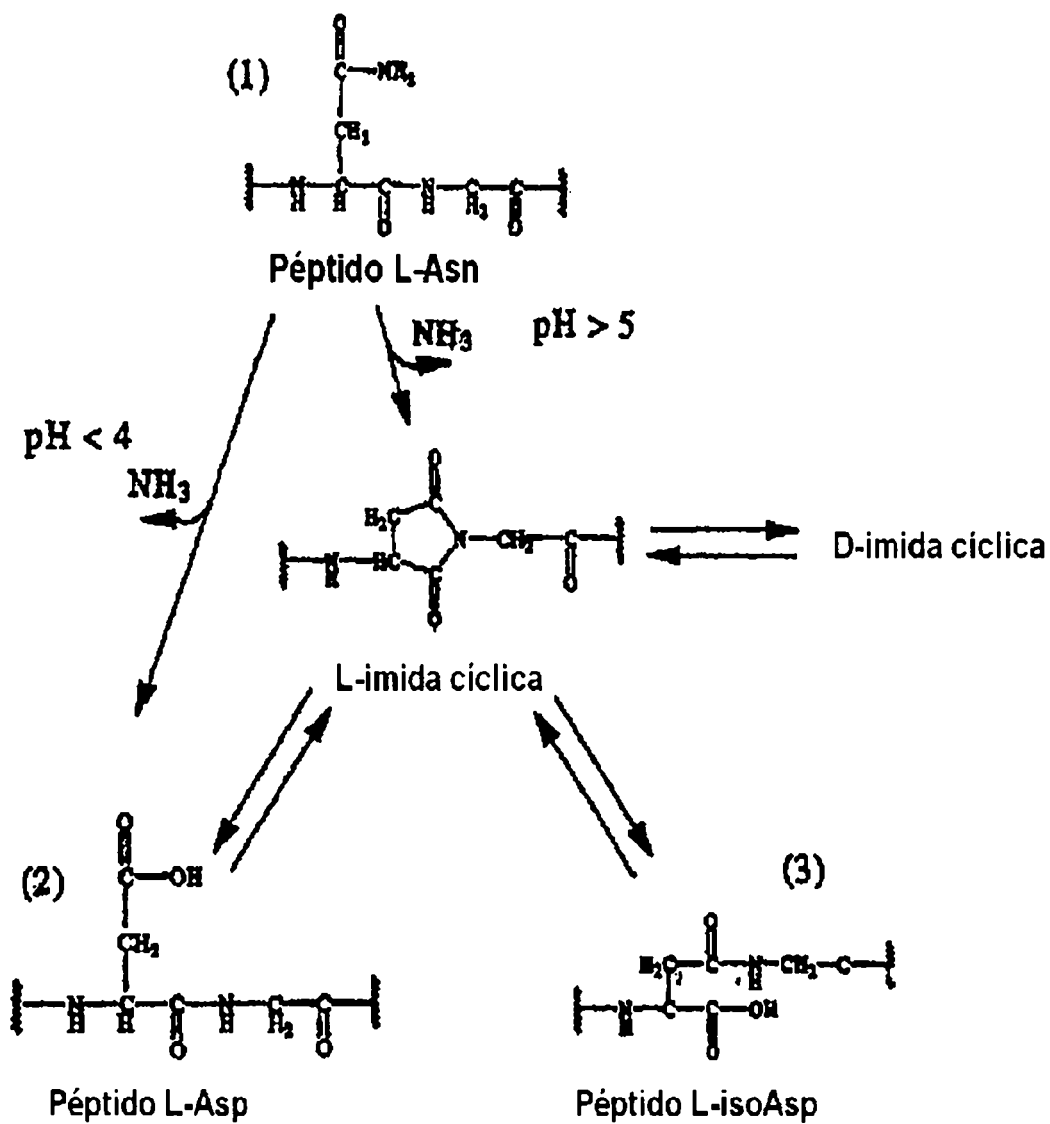


FIG. 3

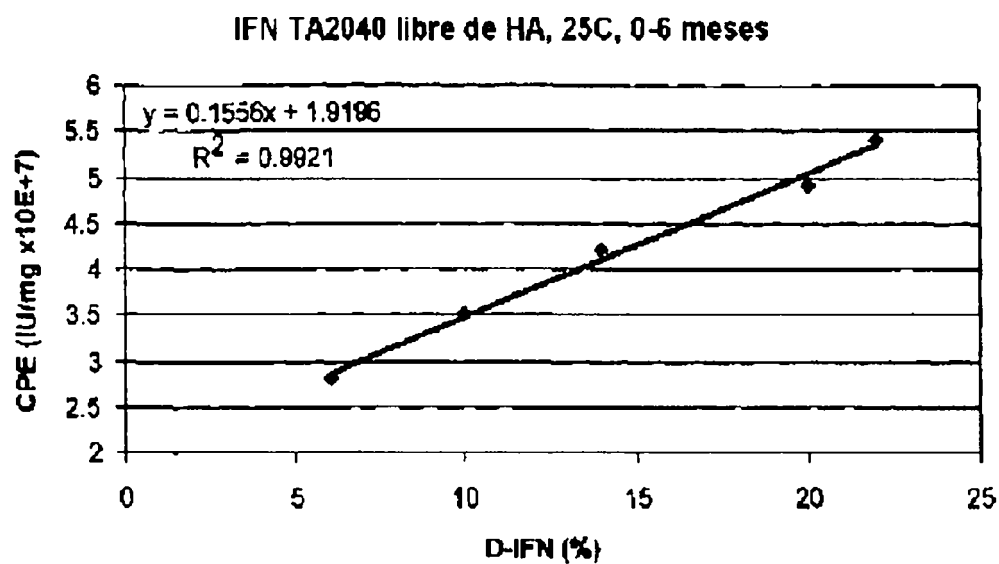


FIG. 4

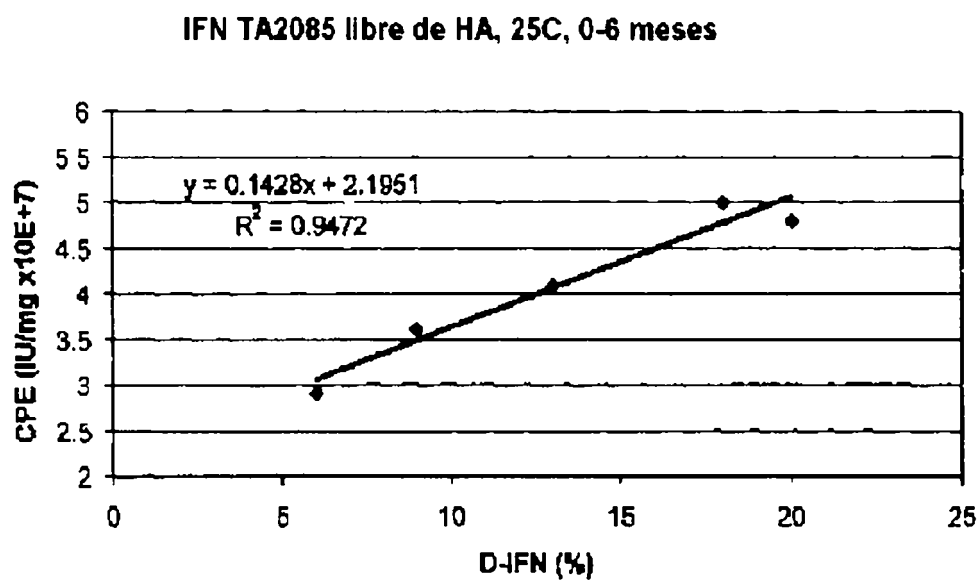


FIG. 5

IFN TA2158 libre de HA, 25C, 0-4,5 meses

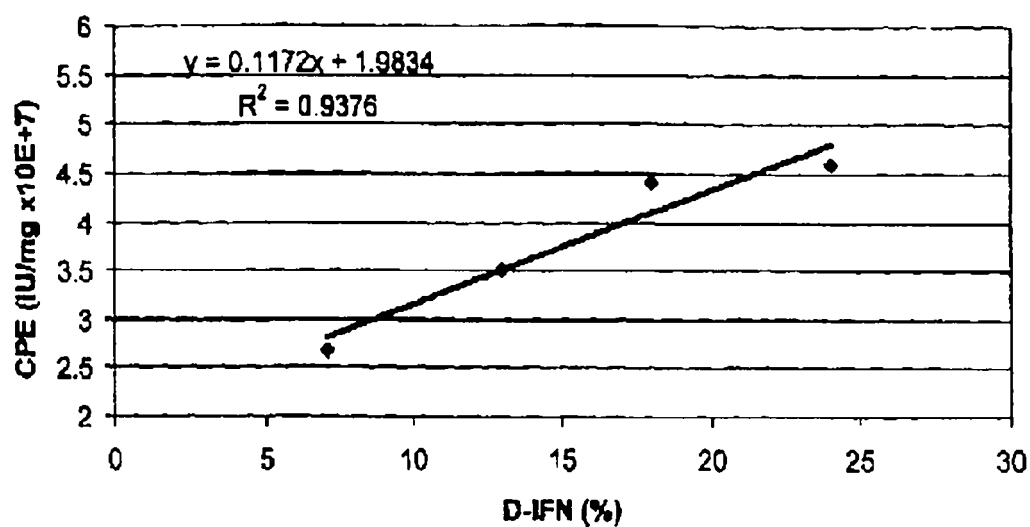


FIG. 6

IFN TA2451 libre de HA, 25C, 0-4,5 meses

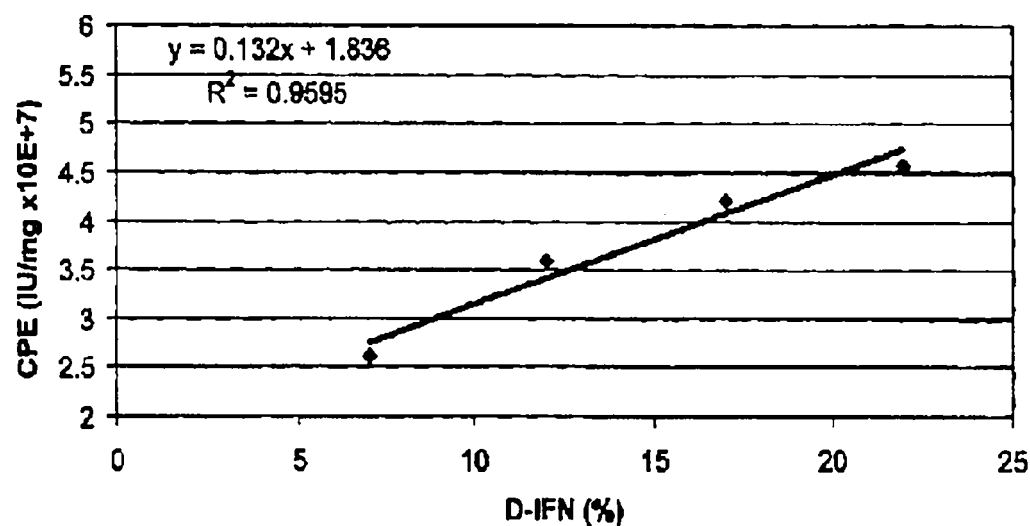


FIG. 7

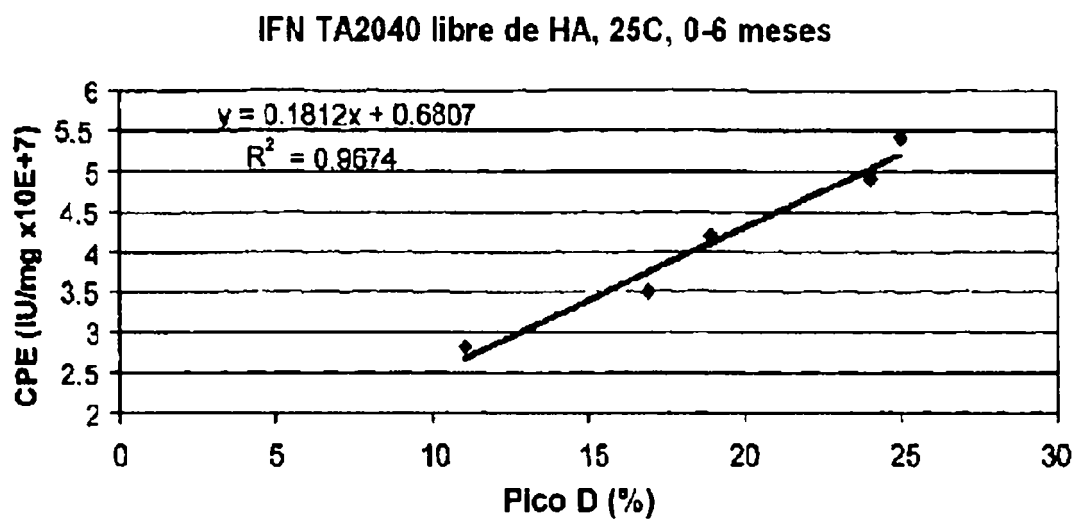


FIG. 8

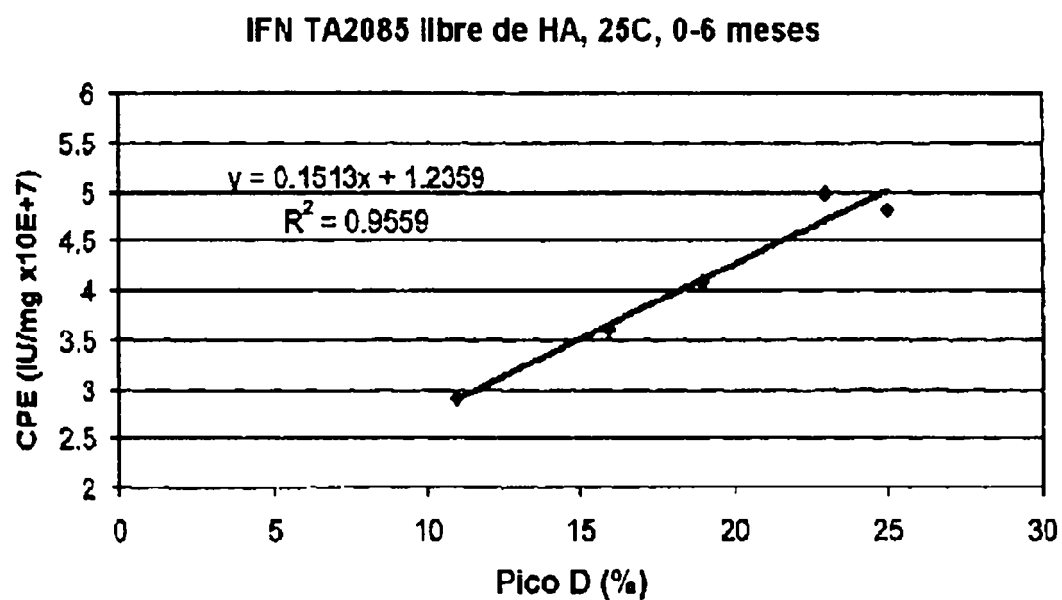


FIG. 9

IFN TA2158 libre de HA, 25C, 0-6 meses

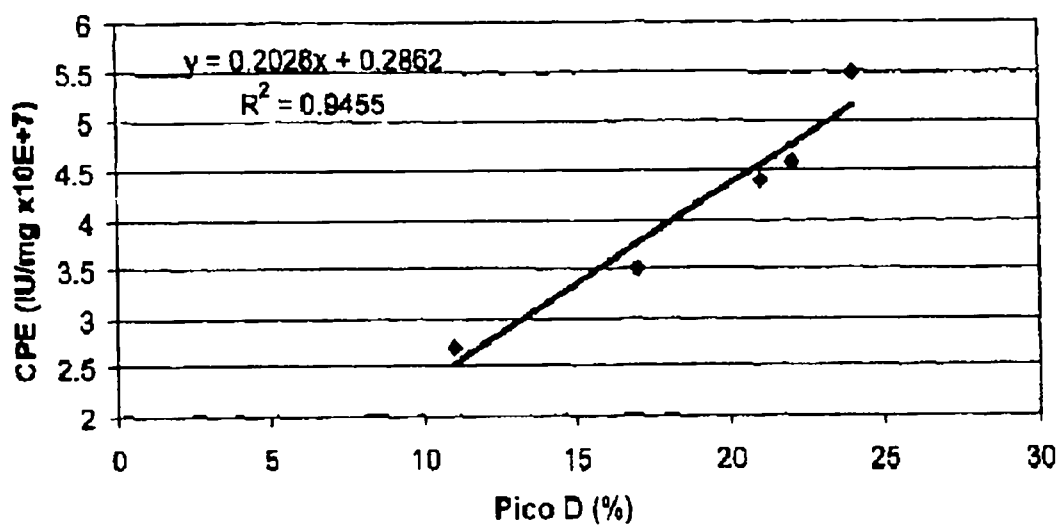


FIG. 10

IFN TA2451 libre de HA, 25C, 0-6 meses

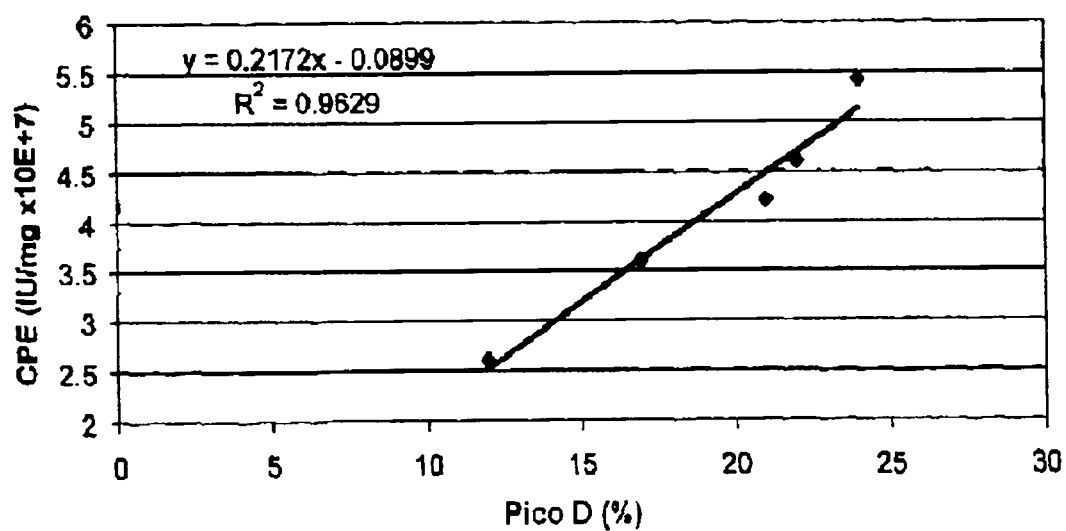


FIG. 11

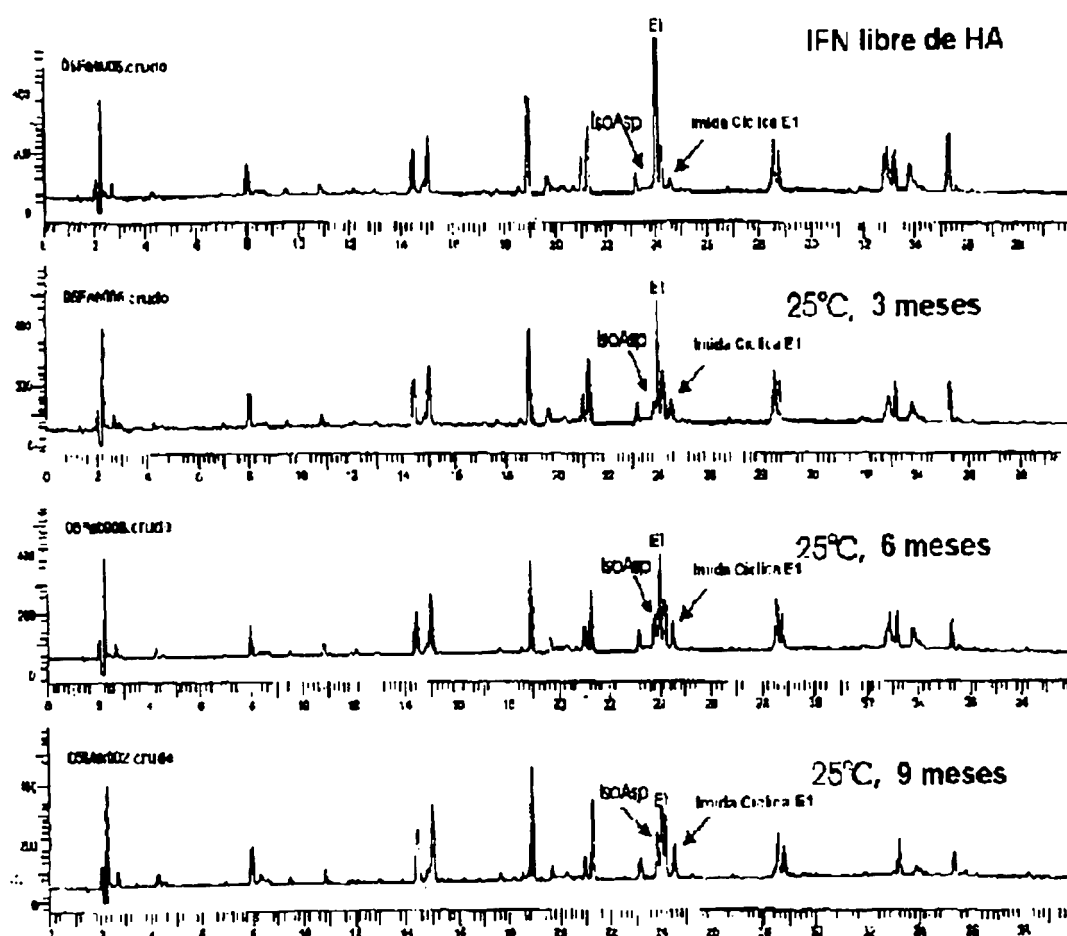


Fig. 12A

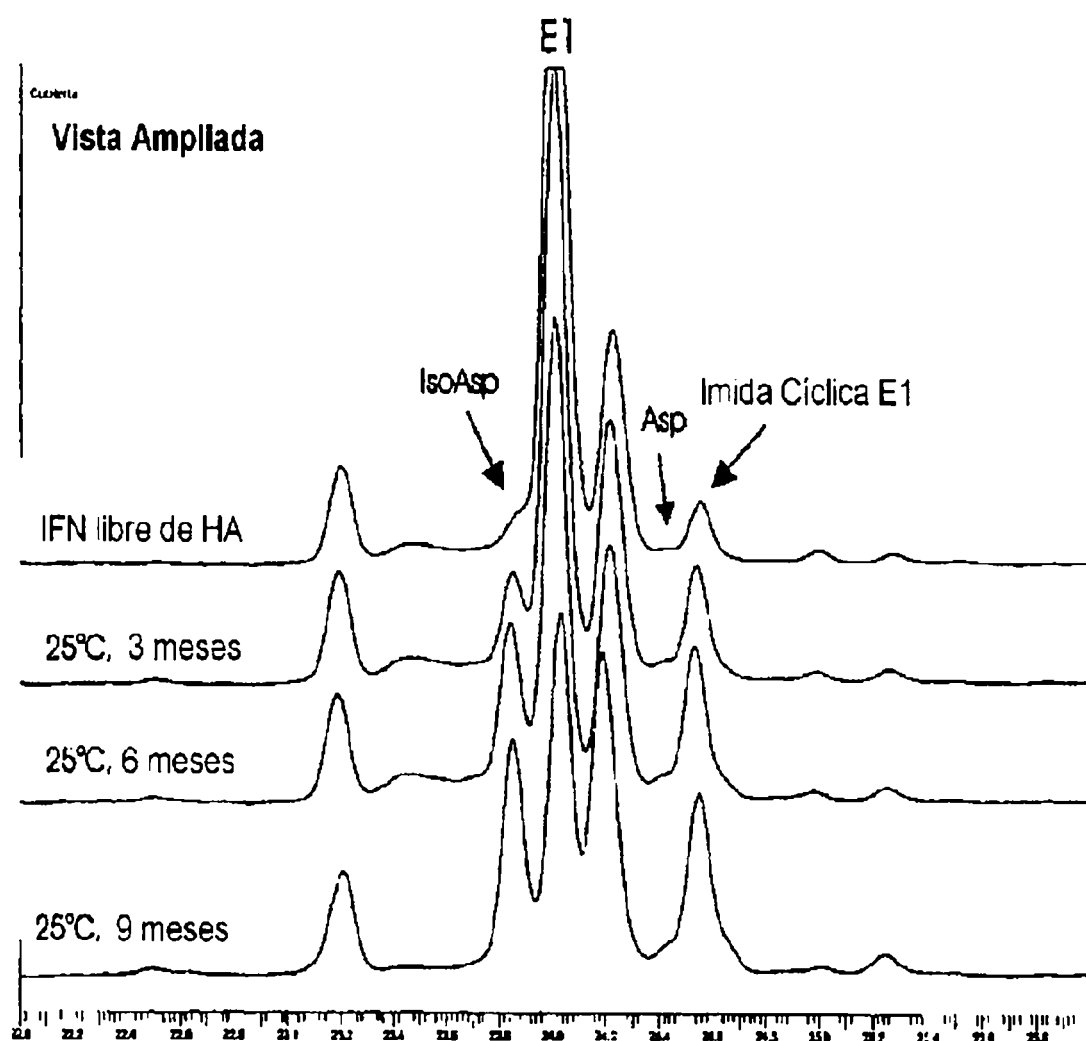


FIG. 12B

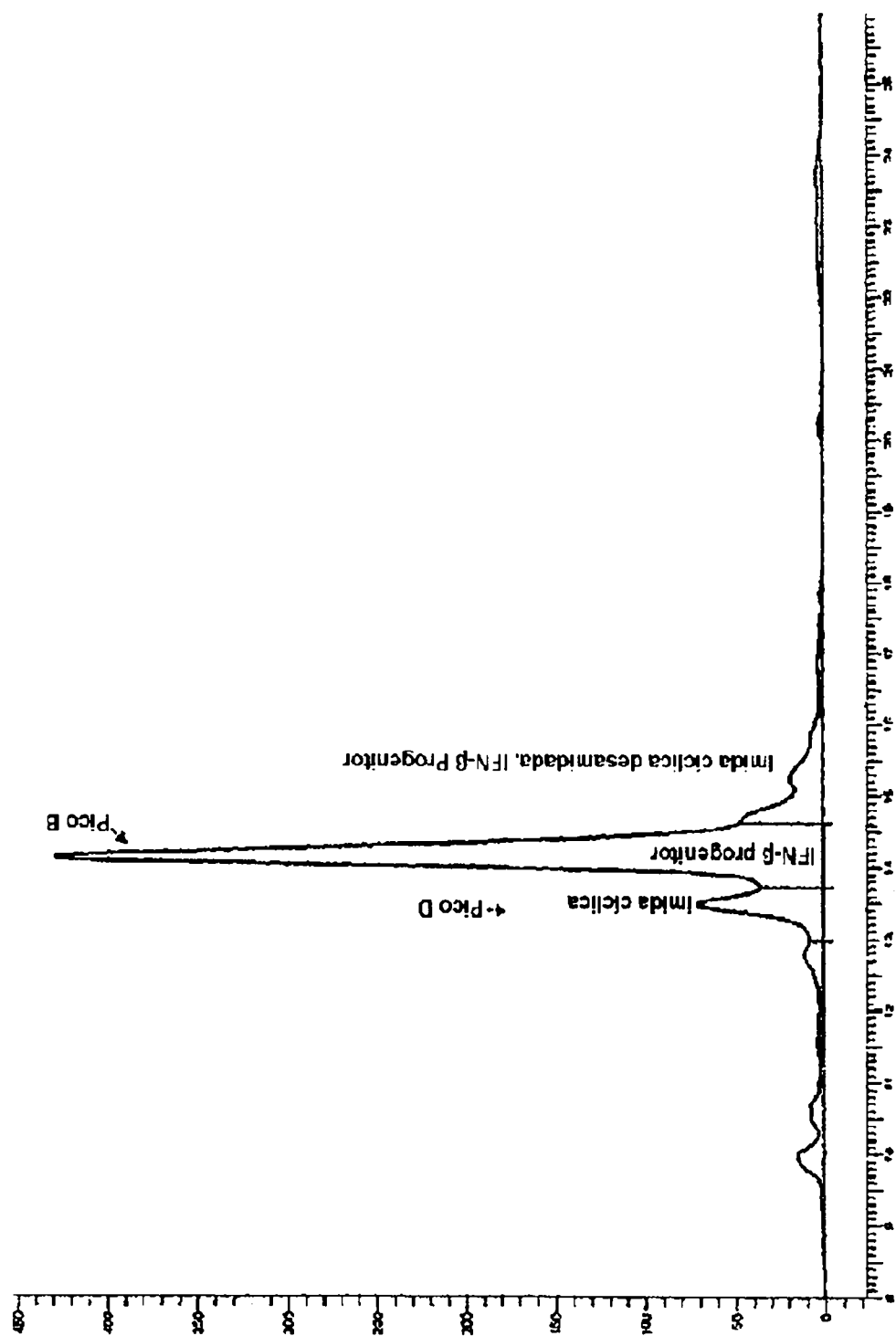


FIG. 13

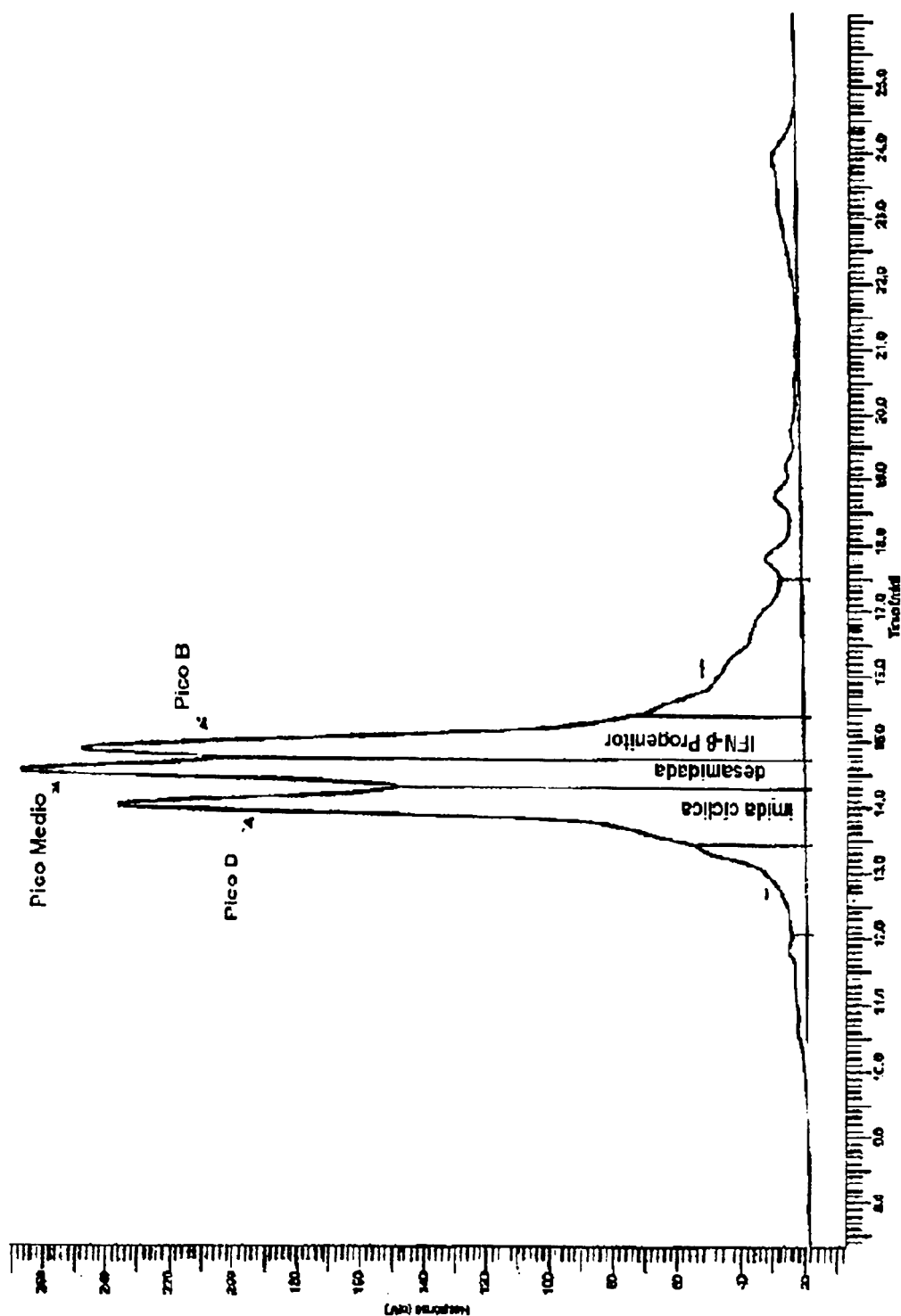


FIG. 14

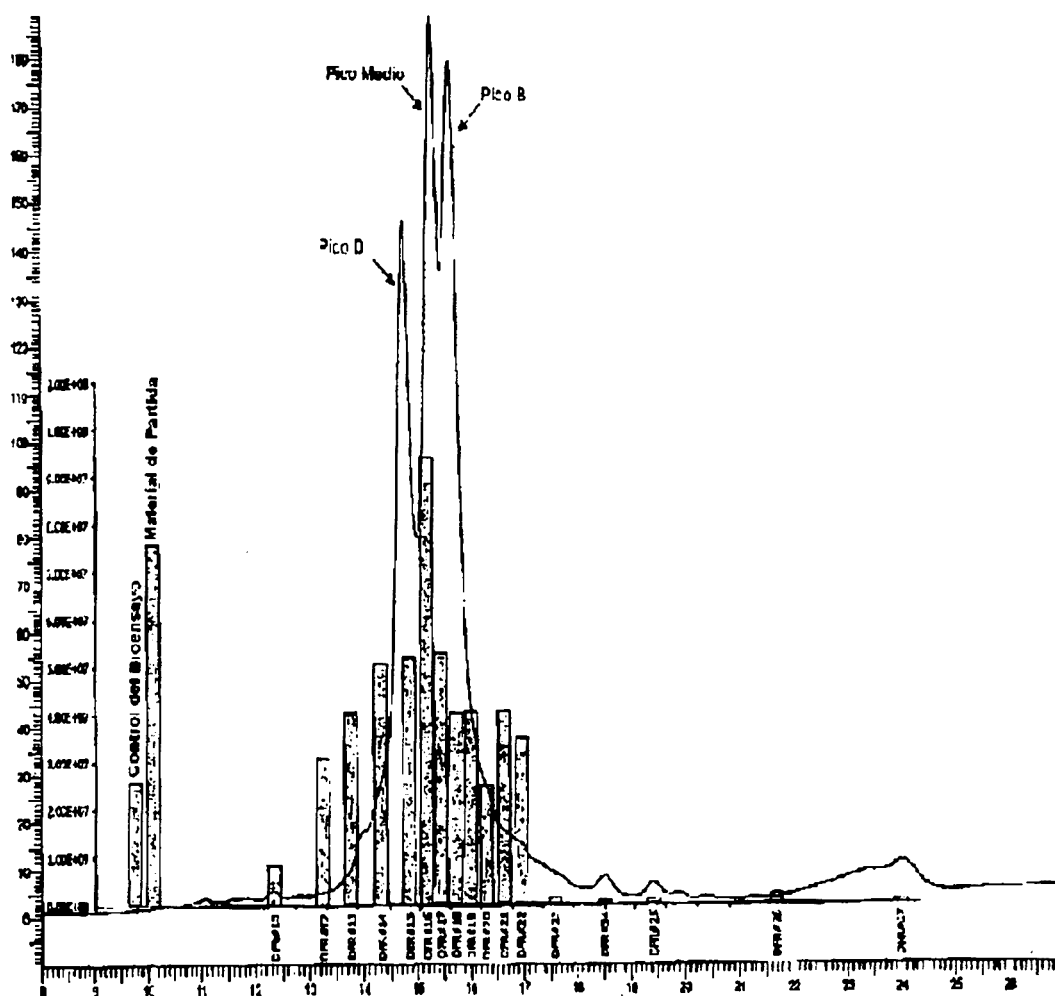


FIG. 15

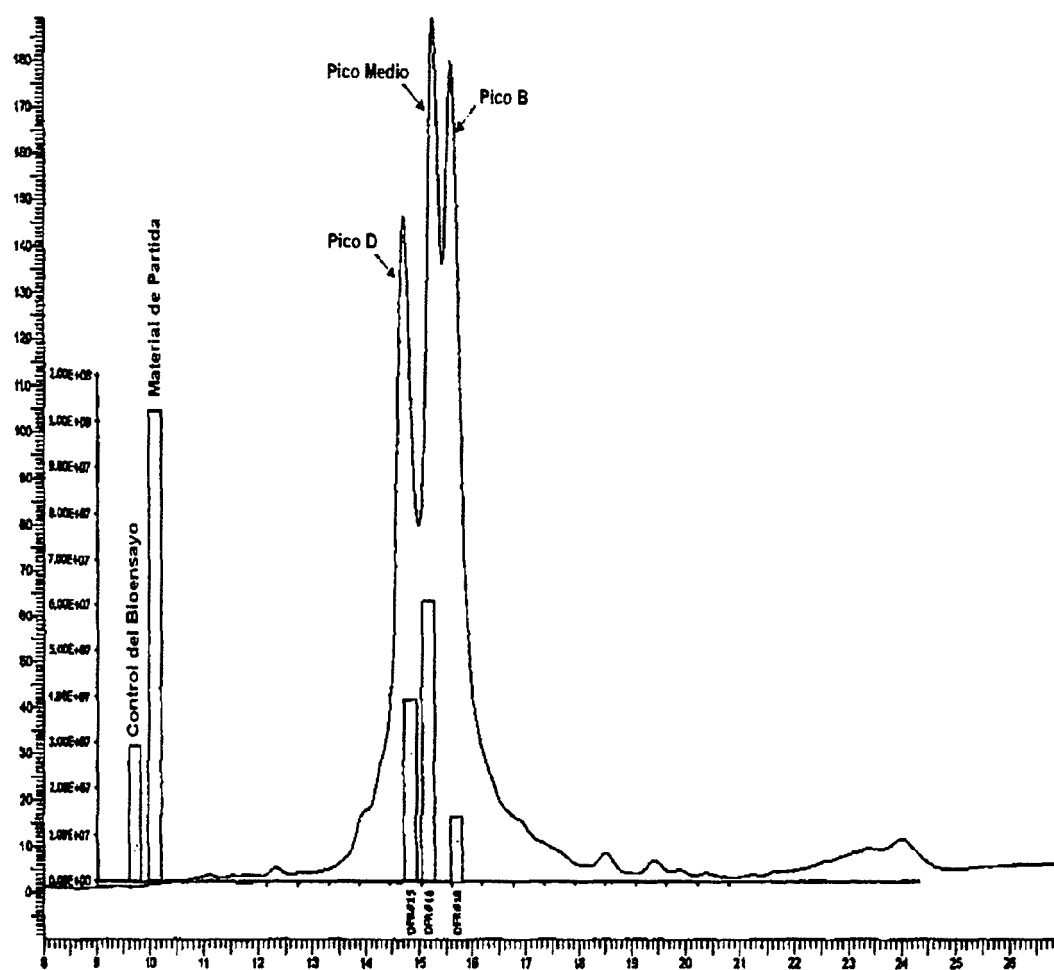


FIG. 16A

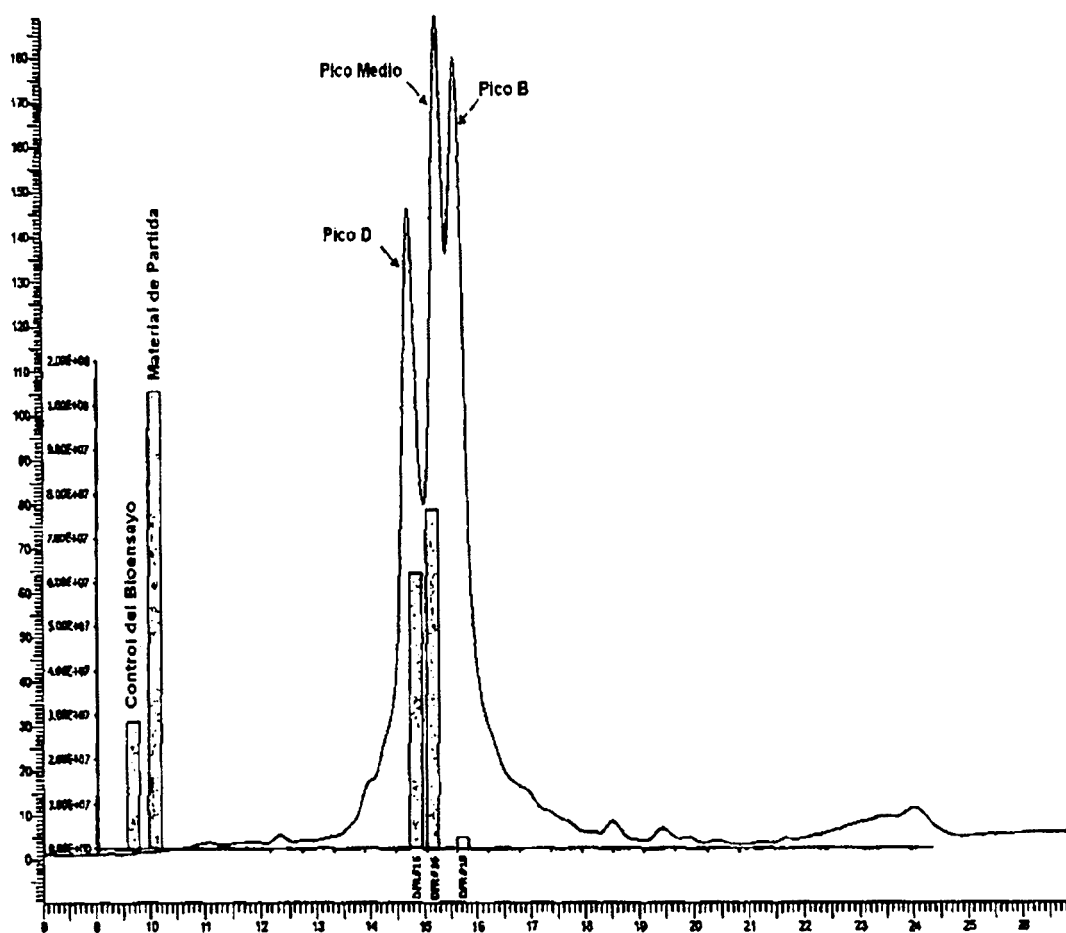


FIG. 16B