



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 539**

51 Int. Cl.:
C07K 1/113 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00978458 .8**

96 Fecha de presentación : **10.11.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1228086**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2002**

54 Título: **Procedimiento para la corrección de una falta de enlaces disulfuro en moléculas Fc.**

30 Prioridad: **12.11.1999 US 165188 P**
09.11.2000 US 709704

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **AMGEN Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es: **Treuheit, Michael, J.;**
O'Conner, Sheila, R. y
Kosky, Andrew, A.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 307 539 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

Procedimiento para la corrección de una falta de enlaces disulfuro en moléculas Fc.

5 **Fundamento de la invención**

Las proteínas recombinantes son una clase emergente de agentes terapéuticos. Tales agentes terapéuticos recombinantes han dado lugar a avances en la formulación y en la modificación química de proteínas. Tales modificaciones pueden proteger a las proteínas terapéuticas, principalmente al bloquear su exposición a las enzimas proteolíticas. Las modificaciones de las proteínas pueden aumentar también la estabilidad, el tiempo de circulación y la actividad biológica de las proteínas terapéuticas. Un artículo de revisión que describe la modificación de proteínas y proteínas de fusión, es el de Francis (1992), *Focus on Growth Factors* 3:4-10 (Mediscript, Londres).

Una modificación útil es la combinación con el dominio "Fc" de un anticuerpo. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se une al antígeno y otro dominio, conocido como "Fc", que se enlaza a funciones efectoras tales como la activación del complemento y el ataque por células fagocíticas. El fragmento Fc posee una semivida sérica larga, mientras que el Fab tiene vida corta. Capon *et al.*, (1989), *Nature* 337, 525-31. Cuando son construidos junto con una proteína terapéutica, un dominio Fc puede proporcionar una semivida más larga o incorporar funciones tales como unión al receptor de Fc, unión a proteínas A, fijación del complemento y acaso, incluso, transferencia placentaria. Id. La Tabla 1 resume el uso de fusiones de Fc conocidas en la técnica.

TABLA 1

Fusión de Fc con proteínas terapéuticas

Forma del Fc	Acompañante en la fusión	Implicaciones terapéuticas	Referencia
IgG1	Extremo N-terminal de CD30-L	Enfermedad de Hodgkin; linfoma anaplásico; leucemia de células T	Patente de EE.UU No. 5.480.981
Fc γ 2a murino	IL-10	antiinflamatorio; rechazo de trasplantes	Zheng et al., (1995), <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	Receptor de TNF	choque séptico	Fisher et al., (1996). <i>N. Eng. J. Med.</i> , 334: 1697-1702; Van Zee, K. et al, (1996), <i>J. Immunol.</i> 156: 2221-30
IgG, IgA, IgM, o IgE (con exclusión del primer dominio)	Receptor de TNF	inflamación, trastornos autoinmunitarios	Patente de EE.UU. No 5.808.029, otorgada el 15 de Septiembre de 1998
IgG1	Receptor de CD4	SIDA	Capon et al., (1989), <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	Extremo N-terminal de IL-2	anti-cáncer, anti-viral	Harvill et al., (1995), <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	Extremo C-terminal de OPG	osteoartritis; densidad ósea	documento WO 97/23614 publicado el 3 de Julio de 1997
IgG1	Extremo N-terminal de la leptina	anti-obesidad	PCT/US 97/23183, presentado el 11 de Diciembre de 1997
IgC γ 1 humana	GTLA-4	trastornos autoinmunitarios	Linsley (1991), <i>J. Exp. Med.</i> 174:561-9

ES 2 307 539 T3

A pesar de sus ventajas, el uso de moléculas de fusión con Fc puede estar limitado, por falta de enlaces, en la expresión en una línea celular deseada. Tales moléculas de fusión con Fc con falta de enlaces pueden generar una respuesta inmunitaria *in vivo* o pueden causar problemas de agregación o de estabilidad en la producción.

5 El documento US-A-4 572 798 describe un método de oxidación de una proteína recombinante totalmente reducida, seleccionada entre el grupo que consiste en interferón- β , interleuquina-2 y sus muteínas, en el que cisteínas son oxidadas preferentemente formando los puentes disulfuro que corresponden a los presente en la proteína natural.

10 El documento US-A-5 654 403 describe una composición de inmunoglobulina estabilizada que comprende al menos una inmunoglobulina junto con una cantidad estabilizante de un agente quelante de iones cobre.

El documento WO 98/48024 describe proteínas de fusión que comprenden el receptor T II del TGF-beta ligado a una parte de la cadena constante de una inmunoglobulina.

15 La publicación Protein Function, a practical approach (1997), página 77, protocolo 6, Compilador T.E. Creighton, Oxford University Press, Oxford, describe un método de desnaturalización y reducción de proteínas que contienen enlaces disulfuro.

20 El documento EP-A-0 784 093 se refiere a una proteína de fusión Fc-OPG.

El documento US-A-5 077 392 se refiere a un procedimiento para activar proteínas recombinantes.

Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere a un procedimiento, según las reivindicaciones, mediante el cual la falta de enlaces en una molécula de fusión de Fc puede ser evitada o corregida. En una descripción el procedimiento comprende:

- (a) preparar una molécula de fusión que comprende (i) un dominio farmacológicamente activo y (ii) un dominio Fc;
- 30 (b) tratar la molécula de fusión con un haluro de cobre (II); y
- (c) aislar la molécula de fusión tratada.

35 El haluro de cobre (II) preferido es el CuCl_2 . Su concentración es por lo menos, aproximadamente, 10 mM para moléculas de fusión preparadas en *E. coli* y por lo menos, aproximadamente, 30 mM para moléculas de fusión preparadas en células CHO.

40 Una realización alternativa del procedimiento no según la invención reivindicada, comprende las etapas siguientes:

- (a) preparar una molécula de fusión que comprende (i) un dominio farmacológicamente activo y (ii) un dominio Fc;
- (b) tratar la molécula de fusión con guanidina.HCl en una concentración aproximadamente 4 M, por lo menos;
- 45 (c) aumentar el pH hasta 8,5 aproximadamente; y
- (d) aislar la molécula de fusión tratada.

50 Cada uno de estos procesos puede ser empleado con muchos dominios farmacológicamente activos. Los dominios farmacológicamente activos preferidos incluyen: proteínas OPG, proteínas de leptinas, inhibidores del TNF- α (por ejemplo, en los que la molécula de fusión es "etanercept"), inhibidores de IL-1 (por ejemplo, proteínas de IL-1ra, que son preferidas), y péptidos imitativos de TPO. También dentro del procedimiento reivindicado están moléculas en las que el compuesto farmacológicamente activo es un anticuerpo. El dominio Fc, preferiblemente, posee una secuencia humana, siendo la más preferida una secuencia de Fc deriva de IgG1. Una secuencia de Fc que sirve de ejemplo se muestra en la Figura 5, más adelante en esta memoria.

60 Aun cuando en su mayor parte están contemplados como agentes terapéuticos, los compuestos preparados mediante esta invención pueden ser útiles también para seleccionar agentes tales. Por ejemplo, se podría usar un Fc-péptido (por ejemplo, un péptido del dominio Fc-SH2) en un ensayo que empleara placas revestidas anti-Fc. El vehículo, en especial Fc, puede hacer insolubles péptidos solubles y, por tanto, útiles en diversos ensayos.

65 Los compuestos preparados mediante el procedimiento de esta invención pueden ser usados con fines terapéuticos o profilácticos, formulándolos con excipientes farmacéuticos apropiados y administrando una cantidad eficaz a un paciente, tal como un ser humano (u otro mamífero) necesitado de ello.

ES 2 307 539 T3

Numerosos aspectos y ventajas adicionales de la presente invención se harán evidentes al tomar en consideración las figuras y la descripción detallada de la invención.

5 Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un compuesto farmacológicamente activo, cuyo procedimiento comprende las etapas de: (a) preparar un compuesto farmacológicamente activo; (b) reenlazar el compuesto farmacológicamente activo con haluro de cobre (II) por lo menos 10 mM; y (c) aislar el compuesto farmacológicamente activo, en cuyo procedimiento el compuesto farmacológicamente activo es una molécula de fusión que comprende un dominio farmacológicamente activo y un dominio Fc.

10 Preferiblemente, el compuesto farmacológicamente activo comprende un anticuerpo.

Ventajosamente, el compuesto farmacológicamente activo se prepara en *E. coli*.

Preferiblemente, el haluro de cobre (II) es CuCl_2 .

15 Alternativamente, el compuesto farmacológicamente activo se prepara en células CHO.

Ventajosamente, el haluro de cobre (II) es CuCl_2 .

20 Preferiblemente, el CuCl_2 se usa en una concentración de al menos 30 mM., aproximadamente.

La presente invención proporciona también un procedimiento de preparación de un compuesto farmacológicamente activo, cuyo procedimiento comprende: (a) preparar un compuesto farmacológicamente activo que comprende un dominio Fc; (b) tratar el compuesto farmacológicamente activo con guanidina.HCl en una concentración al menos 25 4 M, aproximadamente; (c) aumentar el pH hasta aproximadamente 8,5; y (d) aislar el compuesto farmacológicamente activo tratado, en cuyo procedimiento el compuesto farmacológicamente activo es una molécula de fusión que comprende un dominio farmacológicamente activo y un dominio Fc.

Preferiblemente, el compuesto farmacológicamente activo comprende un anticuerpo.

30 Ventajosamente, el compuesto farmacológicamente activo se prepara en *E. coli*.

Alternativamente, el compuesto farmacológicamente activo se prepara en células CHO.

35 Convenientemente, el pH se reduce a pH 5 en la etapa (b) del procedimiento.

Ventajosamente, el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de una proteína OPG.

Alternativamente, el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de una proteína leptina.

40 Alternativamente, el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de un inhibidor del TNF- α .

Alternativamente, el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de un inhibidor de IL-1.

45 Alternativamente, el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de una proteína de IL-1ra.

Alternativamente, el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de un péptido imitativo de TPO.

Alternativamente, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1.

50 Alternativamente, el dominio Fc comprende la secuencia de SEQ ID NO:2.

Descripción breve de las figuras

55 Figura 1. Cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de fase invertida (RP-HPLC) que muestra la construcción Fc-OPG preparada en *E. coli* con y sin tratamiento con CuCl_2 10 mM. En una concentración 10 mM el CuCl_2 ocasiona la eliminación irreversible completa del pico posterior de la RP.

60 Figura 2. Cromatograma de RP-HPLC que muestra la construcción Fc-OPG preparada en *E. coli*, tratada con CDAP. El peso molecular del pico posterior de la RP aumentó en 52 Da.

Figura 3. Cromatograma de RP-HPLC que muestra la construcción Fc-OPG preparada en *E. coli*, tratada con CDAP y sometida seguidamente a división básica. La división básica revela que las cisteínas 148 y 206 habían sido marcadas por el reactivo CDAP.

65 Figura 4. Cromatograma de RP-HPLC que muestra la construcción Fc-OPG preparada en células CHO con y sin tratamiento con CuCl_2 30 mM. En una concentración 30 mM, el CuCl_2 ocasiona la eliminación irreversible completa del pico posterior de la RP.

ES 2 307 539 T3

Figura 5. Secuencias ejemplares de ácido nucleico y de aminoácidos (SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente) de un Fc de IgG1 humano que puede usarse en esta invención.

Figura 6. Esquema de reacción que muestra la cianilación de restos de cisteína en condiciones ácidas con el reactivo CDAP.

Figura 7. Esquema de reacción que muestra la división de la cisteína cianilada, por amoníaco. En condiciones alcalinas y desnaturizantes (NH_4OH 1,5N y GdHCl 4M), la cadena principal de la proteína sufre división en la unión carbonil-amida del péptido sobre la cisteína cianilada. El resultado es un péptido con el extremo N-terminal amidado y un péptido de iminotiazolidina (ITZ) que son separados e identificados por CL-EM (cromatografía líquida-espectro de masas).

Figura 8. Cromatogramas de RP-HPLC con pesos moleculares determinados por espectrometría de masas de Fc-OPG (A), Fc-OPG hecha reaccionar con CuCl_2 (B), y Fc-OPG hecha reaccionar con CDAP seguido por CuCl_2 , (C).

Figura 9. Cromatogramas de RP-HPLC del pico principal e isoforma. purificados, después de reacción con CDAP y división.

Figura 10. Diagrama esquemático de la construcción Fc-OPG, esquema de división con CDAP y el enlace disulfuro del dominio Fc ausente que resulta en la isoforma por RP-HPLC.

Figura 11. HPLC de fase invertida de Fc-OPG sin tratar (trazo superior) y tratado con cobre (trazo inferior).

Figura 12. HPLC de exclusión por tamaños de Fc-OPG después de 2 años de incubación a 29°C; Fc-OPG tratado con cobre (trazo inferior) y FC-OPG sin tratar (trazo superior).

Descripción detallada de la invención

En General

Al producir proteínas terapéuticas mediante técnicas recombinantes la proteína terapéutica con bastante frecuencia debe ser reenlazada para llegar a una conformación activa. En la actualidad, el proceso de reenlace incluye una etapa de oxidación para formar la estructura disulfuro de la proteína recombinante producida. Los reactivos comúnmente usados para catalizar la formación de la estructura disulfuro son los aminoácidos libres cisteína/cistamina a un pH de 8-9. Además, también puede usarse sulfato de cobre en una concentración de cobre en el intervalo micromolar. Para el reenlace de moléculas de fusión de Fc, sin embargo, no puede usarse el sulfato de cobre debido a los altos niveles de arginina (0,5 M) que es un agente quelante de Cu^{++} . Los restantes enlaces que no han producido las estructuras disulfuro son separados, normalmente, durante el proceso de purificación que sigue. Después del proceso de purificación de Fc-OPG, por ejemplo, se aisló un pico posterior mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase invertida (RP). Los resultados obtenidos (precedentes principalmente de mapas de péptidos y reactivo de Ellmann) sugirieron que el pico posterior de RP no contenía grupos tiol libres.

En el curso de desarrollo de formulaciones, los efectos de cationes mono- y divalentes puede relacionarse con aumentos en diversas degradaciones químicas. Durante la selección de Fc-OPG se observó que el CuCl_2 1 mM tenía un efecto espectacular en la reducción de la cantidad del pico posterior obtenido en la RP. Experimentos subsiguientes han puesto de manifiesto que se requiere CuCl_2 10 mM para la eliminación irreversible completa del pico posterior de la RP (véase la Figura 1). Se puso de manifiesto que el pico posterior de la RP resultaba de un disulfuro desapareado mediante el uso del reactivo tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). Para cada sulfhidrilo libre, el DCDAP añade un grupo CN o aumenta el peso molecular en 26 Da. Tratando Fc-OPG con CDAP y realizando el análisis subsiguiente mediante HPLC/EM se puso de manifiesto que el peso molecular del pico posterior de la RP de la construcción Fc-OPG había aumentado en 52 Da, o sea el equivalente de dos grupos sulfhidrilo marcados. (véase la Figura 2). El peso molecular del pico principal de la RP no cambió después del tratamiento con CDAP. La división con bases subsiguiente del pico posterior de la RP cianilado indicó que solamente las cisteínas 148 y 206 (Figura 3) habían sido marcadas por el CDAP. El disulfuro, cys148-cys206, que no está formado en el pico posterior de la RP, es encontrado en la región CH3, que es el segundo lazo disulfuro de Fc y es el mismo disulfuro que era difícil de formar en la construcción Fc-Leptina. Además, el tratamiento previo con CuCl_2 seguido de marcado con CDAP, no produce cambio detectable del peso molecular, lo que apoya la conclusión de que el Cu^{++} fija el problema del disulfuro en Fc-OPG. Resultados similares utilizando CuCl_2 han sido observados para el Fc-OPG en células CHO (Figura 4) y nos permite llegar a la conclusión de que la totalidad de nuestras moléculas recombinantes de Fc tienen la misma dificultad para formar el enlace disulfuro en la región CH3 de Fc. Sorprendentemente, las células CHO tienen la misma dificultad en la formación de disulfuro de Fc, aproximadamente en el mismo grado.

Alternativamente, el proceso podría ser efectuado como un tratamiento posterior al reenlace. Varios métodos pueden ser usados para eliminar el pico posterior de la RP. Además del tratamiento con CuCl_2 , se observa una separación similar del pico posterior después de desnaturización en el seno de guanidina.HCl con una concentración mínima 4 M y aumento del pH desde 5,0 a 8,5. Ambos tratamientos apoyan fuertemente la idea de que están implicados tioles libres que pueden ser convertidos en disulfuro.

Definición de términos y expresiones

Los términos y expresiones usados en esta memoria descriptiva se definen como sigue, a menos que se limiten de otro modo en casos específicos.

5

La expresión “que comprende” significa que un compuesto puede incluir aminoácidos adicionales sobre uno de los dos o ambos extremos N-terminal o C-terminal de la secuencia dada. Como es lógico, estos aminoácidos adicionales no deben interferir significativamente con la actividad del compuesto.

10

La expresión “Fc nativo” se refiere a una molécula o una secuencia que comprende la secuencia de un fragmento de unión no antigénica resultante de la digestión de un anticuerpo total, tanto si está en forma monomérica o en forma multimérica. La fuente original de inmunoglobulina del Fc nativo es, preferiblemente, de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aun cuando son preferidas la IgG1 y la IgG2. Los Fc nativos están constituidos por polipéptidos monoméricos que pueden estar ligados en formas diméricas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativo varía desde 1 a 4, dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero enlazado por un puente disulfuro que resulta de digestión con papaína de una IgG (véase la publicación de Ellison *et al.*, (1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9). La expresión “Fc nativo” tal como se usa en esta memoria, es genérico para las formas monomérica, dimérica y multimérica.

15

20

La expresión “variante de Fc” se refiere a una molécula o una secuencia que ha sido modificada partiendo de un Fc nativo pero que todavía comprende un sitio de unión para el receptor de salvamento, FcRn. Las solicitudes de patentes internacionales WO 97/34631 (publicada el 25 de Septiembre de 1997) y WO 96/32478, describen variantes de Fc ejemplares, así como su interacción con el receptor de salvamento, y están incorporadas en esta memoria por referencia. Así pues, la expresión “variante de Fc” comprende una molécula o una secuencia que está humanizada procedente de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende sitios que pueden ser separados debido a que proporcionan características estructurales o actividad biológica que no son requeridas para las moléculas de fusión de la presente invención. Por tanto, la expresión “variante de Fc” comprende una molécula o una secuencia que carece de uno o más sitios o restos de un Fc nativo, que afectan o que están implicados en (1) formación de enlaces disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) homogeneidad del extremo N-terminal en la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con complemento, (6) unión a un receptor de Fc distinto de un receptor de salvamento, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Variantes de Fc se describen con mayor detalle más adelante en esta memoria.

25

30

35

La expresión “dominio Fc” engloba moléculas y secuencias de Fc nativo y de variantes de Fc, según se ha definido anteriormente. Como con las variantes de Fc y Fc nativos, la expresión “dominio de Fc” incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, tanto se han sido sometidas a digestión partiendo de un anticuerpo total o han sido producidas por otros medios.

40

El término “multímero” tal como se aplica a dominios Fc o a moléculas que comprenden dominios Fc, se refiere a moléculas que poseen dos o más cadenas polipeptídicas asociadas covalentemente, no covalentemente o por ambas interacciones, covalente y no covalente. Las moléculas de IgG forman, típicamente, dímeros; las de IgM, pentámeros; las de IgD, dímeros; y las de IgA, monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros. Pueden formarse multímeros por usando la secuencia y la actividad resultante de la fuente de Ig nativa del Fc o por derivatización (según se define más adelante) de un Fc nativo tal.

45

El término “dímero” tal como se aplica a dominios Fc o a moléculas que comprenden dominios Fc, se refiere a moléculas que poseen dos cadenas polipeptídicas asociadas covalentemente o no covalentemente.

50

Los términos “derivatización” y “derivado” o “derivatizado”, comprenden procesos y compuestos resultantes, respectivamente, en los que (1) el compuesto posee una parte cíclica; por ejemplo, una reticulación entre restos cisteinilo dentro del compuesto, (2) el compuesto está reticulado o tiene un sitio de reticulación; por ejemplo, el compuesto posee un resto cisteinilo y forma, por tanto, dímeros reticulados por cultivo o *in vivo*; (3) uno o más ligamientos peptídicos ha sido reemplazado por un ligamiento no peptídico; (4) el extremo N-terminal está reemplazado por $-NRR^1$, $NRC(O)R^1$, $-NRC(O)OR^1$, $-NRS(O)_2R^1$, $-NHC(O)NHR$, un grupo succinimido, o benciloxycarbonil-NH- sustituido o sin sustituir, en cuyas fórmulas R y R^1 y los sustituyentes del anillo son como se define más adelante en esta memoria; (5) el extremo C-terminal ha sido reemplazado por $-C(O)R^2$ ó $-NR^3R^4$, en cuyas fórmulas R^2 , R^3 y R^4 son como se define más adelante en esta memoria; y (6) compuestos en los que restos individuales de aminoácidos han sido modificados mediante tratamiento con agentes capaces de reaccionar con cadenas laterales o restos terminales, seleccionados. Más adelante, en esta memoria, se describen nuevos derivados.

55

60

El término “péptido” se refiere a moléculas de 3 a 40 aminoácidos, prefiriéndose moléculas de 3 a 20 aminoácidos y siendo las más preferidas, moléculas de 6 a 15 aminoácidos. Péptidos ejemplares pueden ser generados aleatoriamente mediante cualquiera de los métodos anteriormente citados, llevados en una biblioteca de exposición de fagos o derivados mediante digestión de proteínas.

65

ES 2 307 539 T3

La expresión “proteína nativa” se refiere a una molécula que posee una secuencia de aminoácidos que puede aislarse desde un organismo sin modificación mediante técnicas de DNA recombinante u otros métodos.

La expresión “fragmento de proteína” se refiere a una molécula o una secuencia que comprende solamente una parte de la secuencia de una proteína nativa pero que retiene todavía la actividad farmacológica de interés. La expresión “fragmento de proteína” comprende, por tanto, por ejemplo, el dominio soluble de un receptor celular (por ejemplo, un receptor para el factor de la necrosis tumoral).

La expresión “variante de proteína” se refiere a una molécula o una secuencia que está modificada desde una proteína nativa pero que todavía retiene la actividad farmacológica de interés. Así pues, la expresión “variante de proteína” comprende una molécula o una secuencia en la que restos no nativos sustituyen a restos nativos, se han añadido restos no nativos o se han suprimido restos nativos. Cualquier resto nativo puede ser separado debido a que proporcione características estructurales o actividad biológica que no son requeridas para la actividad farmacológica de interés de las moléculas de fusión de la presente invención. Por tanto, la expresión “variante de proteína” comprende una molécula o una secuencia que carece de uno o más sitios o restos de proteína nativas que afectan o que están implicados en (1) la señalización intracelular, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad del extremo N-terminal en la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con otras proteínas (por ejemplo, dominios de dimerización), (6) unión a un receptor u a otra proteína que no afecte a la actividad farmacológica de interés, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Variantes de Fc se describen con detalle adicional más adelante en esta memoria.

Los términos “derivatización” y “derivado” o “derivatizado” tal como se usan con respecto a proteínas, se refieren a proteínas en las que (1) la proteína ha sido modificada para incluir una parte cíclica; por ejemplo, reticulación entre restos cisteinilo dentro del compuesto; (2) el compuesto está reticulado o posee un sitio de reticulación; por ejemplo, el compuesto posee un resto cisteinilo y por tanto forma dímeros reticulados en cultivo o *in vivo*; (3) uno o más enlaces peptídico han sido reemplazados por un enlace no peptídico; (4) el extremo N-terminal está reemplazado por $-NRR^1$, $-NRC(O)R^1$, $-NRC(O)OR^1$, $-NRS(O)_2R^1$, $-NHC(O)NHR$, un grupo succinimido, o benciloxycarbonil-NH sustituido o sin sustituir, en cuyas fórmulas R y R^1 y los sustituyentes del anillo son como se define más adelante en esta memoria; (5) el extremo C-terminal está reemplazado por $-C(O)R^2$ ó $-NR^3R^4$, en cuyas fórmulas R^2 , R^3 y R^4 son como se define más adelante en esta memoria; y (6) compuestos en los que restos individuales de aminoácidos han sido modificados por tratamiento con agentes capaces de reaccionar con cadenas laterales o restos terminales, seleccionados. Más adelante se describen derivados además de los descritos.

El término “polipéptido” se refiere a proteínas nativas, variantes de proteínas, derivados de proteínas, y fragmentos de proteínas.

La expresión “farmacológicamente activo” significa que se ha determinado que una sustancia así descrita posee actividad que afecta a parámetros médicos (por ejemplo, presión sanguínea, recuento de células sanguíneas, nivel de colesterol) o a estados de enfermedad (por ejemplo, cáncer). Así, los péptidos farmacológicamente activos comprenden péptidos agonísticos o imitativos y antagonísticos, según se define más adelante.

La expresión “proteína OPG” se refiere, colectivamente, al nuevo miembro de la familia de receptores del factor de la necrosis tumoral que se describe en la solicitud de patente internacional WO 97/23614. Las proteínas OPG ejemplares son polipéptidos que comprenden las secuencias OPG de la rata, el ratón o los seres humanos, o un consenso de las secuencias de la rata, el ratón y los seres humanos.

La expresión “inhibidor del TNF- α ” incluye así receptores solubilizados del TNF, anticuerpos para el TNF, anticuerpos para el receptor del TNF, inhibidores de la enzima de conversión del TNF- α (TACE), y otras moléculas que afectan a la actividad del TNF.

Inhibidores del TNF- α de diversas clases están descritos en la técnica, incluyendo las referencias siguientes:

Solicitudes de patentes europeas 308 378; 422 339; 393 438; 398 327; 412 486; 418 014, 417 563, 433 900; 464 533; 512 528; 526 905; 568 928; 663 210; 542 795; 818 439; 664 128; 542 795; 741 707; 874 819; 882 714; 880 970; 648 783; 731 791; 895 988; 550 376; 882 714; 853 083; 550 376; 943 616.

Patentes de EE.UU. Nos. 5.136.021; 5.929.117; 5.948.638; 5.807.862; 5.695.953; 5.834.435; 5.817.822; 5.830.742; 5.834.435; 5.851.556; 5.853.977; 5.359.037; 5.512.544; 5.695.953; 5.811.261; 5.633.145; 5.863.926; 5.866.616; 5.641.673; 5.869.677; 5.869.511; 5.872.146; 5.854.003; 5.856.161; 5.877.222; 5.877.200; 5.877.151; 5.886.010; 5.869.660; 5.859.207; 5.891.883; 5.877.180; 5.955.480; 5.955.476; 5.955.435.

Solicitudes de patentes internacionales (WO) 90/13575, 91/03553, 92/01002, 92/13095, 92/16221, 93/07873, 93/21946, 93/19777, 95/34326, 96/28546, 98/27298, 98/30541, 96/38150, 97/18207, 97/15561, 97/12902, 96/25861, 96/12735, 96/11209, 98/39326, 98/39316, 98/38859, 98/39315, 98/42659, 98/39329, 98/43959, 98/45268, 98/47863, 96/33172, 96/20926, 97/37974, 97/37973, 96/35711, 98/51665, 98/43946, 95/04045, 98/56377, 97/12244, 99/00364, 99/00363, 98/57936, 99/01449, 99/01139, 98/56788, 98/56756, 98/53842, 98/52948, 98/52937, 99/02510, 97/43250, 99/06410, 99/06042, 99/09022, 99/08688, 99/07679, 99/09965, 99/07704, 99/06041, 99/37818, 99/37625, 97/11668.

ES 2 307 539 T3

Solicitudes de patentes japonesas (JP) 10147531, 10231285, 10259140 y 10130149, 10316570, 11001481 y 127.800/1991.

Solicitud de patente alemana (DE) 19731521.

Solicitudes de patentes británicas (GB) 2 218 101, 2 326 881, 2 246 569.

La expresión “inhibidor de interleuquina-1” se refiere a un polipéptido capaz de prevenir específicamente la activación de receptores celulares para la IL-1, que puede resultar de diversos mecanismos. Tales mecanismos incluyen la regulación en descenso de la producción de IL-1, la unión de IL-1 libre, la interferencia con la unión de IL-1 a su receptor, la interferencia con la formación del complejo de receptor de IL-2 (es decir, la asociación del receptor de IL-1 con la proteína accesoria del receptor de IL-1), o interferencia con la modulación de la señalización de IL-1 después de unión a su receptor. Las clases de inhibidores de interleuquina-1 incluyen:

Antagonistas del receptor de interleuquina-1 tal como IL-1ra, como se describe más adelante;

CDRs o regiones variables enteras de anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL-1 (por ejemplo, documento EP 623674);

Proteínas de unión de IL-1 tales como receptores solubles de IL-1 (por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.492.888, la patente de EE.UU. No. 5.488.032 y la patente de EE.UU. No. 5.464.937, la patente de EE.UU. No. 5.319.071 y la patente de EE.UU. No. 5.180.812);

CDRs o regiones variables enteras de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 (por ejemplo, los documentos WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, la patente de EE.UU. No. 4.935.343, los documentos EP 364778, EP 267611 y EP 220063);

Proteínas accesorias del receptor de IL-1 y anticuerpos para estas (por ejemplo el documento WO 96/23067);

Inhibidores de la enzima de conversión de interleuquina-1 beta (ICE) o caspasa I, que pueden usarse para inhibir la producción y secreción de IL-1 beta;

Inhibidores de proteasa de interleuquina.1 beta;

y otros compuestos y proteínas que bloquean *in vivo* la síntesis o la liberación extracelular de IL-1.

Inhibidores de IL-1 que sirven de ejemplo figuran descritos en las referencias siguientes:

Patentes de EE.UU. Nos. 5.747.444; 5.359.032; 5.608.035; 5.843.905; 5.359.032; 5.866.576; 5.869.660; 5.869.315; 5.872.095; 5.955.480.

Solicitudes de patentes internacionales (WO) 98/21957, 96/09323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 98/17661, 97/08174, 95/34326, 99/36426 y 99/36415.

Solicitudes de patentes europeas (EP) 534978 y 894795.

Solicitud de patente francesa FR 2762514.

Para los fines de la presente invención, IL-1ra y sus variantes y sus derivados según se discute más adelante, se denominan colectivamente “proteína(s) de IL-1ra”. Las moléculas descritas en las referencias anteriores y sus variantes y sus derivados discutidos más adelante, son denominadas colectivamente “inhibidores de IL-1”.

La expresión “péptido imitativo de TPO” comprende péptidos que pueden ser identificados o derivados según ha sido descrito por Cwirla *et al.*, (1997), Science 276:1696-9, Patentes de EE.UU. Nos. 5.869.451 y 5.932.946 y cualquier otra referencia de la Tabla 2, identificados como tener materia de sujeto imitativo de TPO, así como en la solicitud de patente de EE.UU. “Thrombopoietic Compounds”, presentada el 22 de Octubre de 1999. Los expertos en la técnica podrán apreciar que todas estas referencias bibliográficas permiten seleccionar diferentes péptidos que de hecho están descritos en ellas, siguiendo los procedimientos operatorios descritos con diferentes colecciones de péptidos.

La expresión “proteína leptina” se refiere a la proteína leptina nativa y partes de la proteína leptina nativa que retienen su actividad antidiabética o anti-obesidad. Una secuencia de proteína leptina que puede servir de ejemplo figura descrita en el documento PCT/US 97/23183, presentado el 11 de Diciembre de 1997.

Adicionalmente, sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de esta invención, están también englobados en esto. Por “sales fisiológicamente aceptables” se entiende cualesquiera sales que son conocidas o que se descubre más tarde que son farmacéuticamente aceptables. Algunos ejemplos específicos son: acetato, trifluoroacetato, hidroháluros tales como hidrocloreuro e hidrobromuro, sulfato, citrato, tartrato, glicolato y oxalato.

ES 2 307 539 T3

Estructura de compuestos

En general. El procedimiento de esta invención es útil para la preparación de composiciones en las que un dominio Fc puede unirse a la molécula farmacológicamente activa a través del extremo N-terminal o el extremo C-terminal de la molécula. Por tanto, las moléculas de fusión de Fc de esta invención pueden ser descritas mediante la fórmula I siguiente:



10 en la que:

F¹ es un dominio Fc;

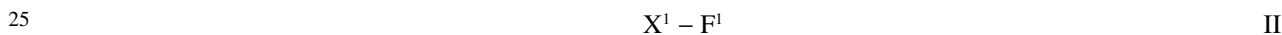
15 X¹ y X² están seleccionados, cada uno independientemente, entre -(L¹)_c-P¹ y -(L¹)_c-P¹-(L²)_d-P²;

P¹ y P² son, cada uno independientemente, secuencias de péptidos o polipéptidos farmacológicamente activos;

20 L¹ y L² son, cada uno independientemente, engarces; y

a, b, c y d son, cada uno independientemente, 0 ó 1, con tal que al menos uno de a y b sea 1.

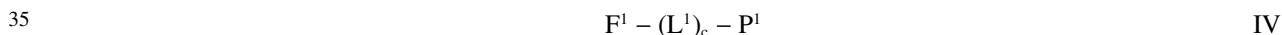
Por tanto, el compuesto I comprende compuestos preferidos de fórmulas



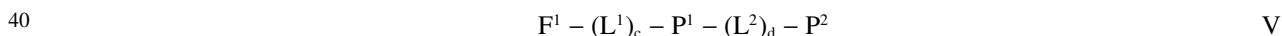
y sus multímeros, en los que F¹ está unido al extremo C-terminal de X¹;



y sus multímeros, en los que F¹ está unido al extremo N-terminal de X²;



y sus multímeros, en los que F¹ está unido al extremo N-terminal de -(L¹)_c-P₁; y



y sus multímeros, en los que F¹ está unido al extremo N-terminal de -L¹-P¹-L²-P².

45 *Péptidos.* Muchos péptidos pueden ser usados en asociación con la presente invención. De interés particular son los péptidos que imitan la actividad de EPO, TPO, hormona del crecimiento, G-CSF, GM-CSF, IL-1ra, leptina, CTLA4, TRAIL, TGF- α y TGF- β . También son de interés antagonistas de péptidos, en particular los que poseen acción antagonista respecto a la actividad de TNF, leptina, cualquiera de las interleuquinas (IL-1, 2, 3,.....), y proteínas implicadas en la activación del complemento (por ejemplo, C3b). Estos péptidos pueden ser descubiertos mediante métodos que están descritos en las referencias bibliográficas citadas en esta memoria descriptiva y en otras referencias.

55 Exposición de fagos, en particular, es útil para generar péptidos para usar en la presente invención. Se ha establecido que puede usarse la selección por afinidad a partir de colecciones de péptidos aleatorios, para identificar ligandos peptídicos para cualquier sitio de un producto génico. Dedman *et al.*, (1993), J. Biol. Chem. 268:23025-30. La exposición de fagos es especialmente bien adecuada para identificar péptidos que se unen a tales proteínas de interés como receptores de la superficie celular o cualesquiera proteínas que posean epítopos lineales. Wilson *et al.* (1998), Can. J. Microbiol. 44: 313-29; Kay *et al.* (1998), Drug Disc. Today, 3:370-8. Tales proteínas han sido revisadas extensamente por Herz *et al.* en J. Receptor and Signal Transduction Res. 17(5): 671-776. Tales proteínas de interés son preferidas para usar en esta invención. Numerosos péptidos de interés figuran descritos en la solicitud de patente de EE.UU. titulada "Modified Peptides as Therapeutic Agents", presentada el 22 de octubre de 1999.

60 *Polipéptidos.* Son conocidos en la técnica numerosos polipéptidos adecuados para usar en la presente invención. Las proteínas adecuadas incluyen hormonas (por ejemplo, la hormona del crecimiento), citoquinas (por ejemplo, IL-1ra) y receptores solubles (por ejemplo, los receptores I y II del factor de la necrosis tumoral). Son péptidos que sirven de ejemplo los indicados en la Tabla 1 (véase anteriormente).

Fusión de Fc. Un dominio Fc puede fusionarse al extremo N-terminal o C-terminal de la molécula farmacológica activa o a ambos extremos N y C terminales.

ES 2 307 539 T3

Como se ha indicado anteriormente, las variantes de Fc son vehículos adecuados dentro del alcance de esta invención. Un Fc nativo puede ser modificado extensamente para formar una variante de Fc según esta invención, con tal que se mantenga la unión al receptor de salvamento; véanse, por ejemplo los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478. En tales variantes de Fc, pueden separarse uno o más sitios de un Fc nativo que proporcionen características estructurales o actividad funcional no requeridas por las moléculas de fusión de esta invención. Pueden separarse estos sitios, por ejemplo, sustituyendo o suprimiendo restos, insertando restos en el sitio, o truncando partes que contengan el sitio. Los restos insertados o sustituidos pueden ser también aminoácidos alterados, tales como imitativos de péptidos o D-aminoácidos. Las variantes de Fc pueden ser deseables por diversas razones, varias de las cuales se describen más adelante. Las variates de Fc que sirven de ejemplo incluyen moléculas y secuencias en las que:

1. Sitios implicados en la formación de puentes disulfuro son separados. Tal separación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína, presentes en la célula huésped empleada para producir las moléculas de la invención. Para esta finalidad, el segmento que contiene cisteína situado en el extremo N-terminal puede ser truncado o pueden suprimirse los restos de cisteína o sustituirse con otros restos de otros aminoácidos (por ejemplo, alanilo, serilo). En particular, puede truncarse el segmento de 20 aminoácidos de extremo N-terminal de la SEQ ID NO:2 o suprimirse o sustituirse los restos de cisteína de las posiciones 7 y 10 de la SEQ ID NO: 2. Incluso cuando son separados restos de cisteína, los dominios Fc de una sola cadena pueden formar todavía un dominio Fc dimérico que se mantiene unido no covalentemente.
2. Un Fc nativo es modificado para hacerle más compatible con una célula huésped seleccionada. Por ejemplo, puede separarse la secuencia PA cerca del extremo N-terminal de un Fc nativo, lo que puede reconocerse mediante una enzima de digestión en *E. coli* tal como prolina iminopeptidasa. También puede añadirse un resto de metionina del extremo N-terminal en especial cuando la molécula es expresada recombinantemente en una célula bacteriana tal como *E. coli*. El dominio Fc de SEQ ID NO:2 (Figura 5) es una de tales variantes de Fc.
3. Una parte del extremo N-terminal de un Fc nativo es separado para evitar heterogeneidad del extremo N-terminal cuando es expresado en una célula huésped seleccionada. Para este fin, puede suprimirse cualquiera de los primeros 20 restos de aminoácidos situados en el extremo N-terminal, en particular los situados en las posiciones 1, 2, 3, 4 y 5.
4. Son separados uno o más sitios de glicosilación. Los restos que están, típicamente, glicosilados (por ejemplo, asparagina) pueden conferir respuesta citolítica. Tales restos pueden ser suprimidos o sustituidos con restos sin glicosilar (por ejemplo, alanina).
5. Sitios implicados en interacción con complemento, tal como el sitio de unión C1q, son separados. Por ejemplo, puede suprimirse o sustituirse la secuencia EKK de IgG1 humana. El reclutamiento de complemento puede no ser ventajoso para las moléculas de esta invención y por tanto pueden ser evitados con una variante de Fc tal.
6. Son separados sitios que afectan a la unión a receptores de Fc distintos de un receptor de salvamento. Un Fc nativo puede tener sitios de interacción con ciertos glóbulos blancos que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y por tanto pueden ser separados.
7. El sitio ADCC es separado. Los sitios ADCC son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) con respecto a sitios ADCC de IgG1. Estos sitios, asimismo, no son necesarios para las moléculas de fusión de la presente invención y por tanto pueden ser separados.
8. Cuando el Fc nativo es derivado desde un anticuerpo no humano, el Fc nativo puede ser humanizado. Típicamente, para humanizar un Fc nativo, pueden sustituirse restos seleccionados del Fc nativo no humano, por restos que son encontrados, normalmente, en el Fc nativo humano. Técnicas para la humanización de anticuerpos son conocidas en la técnica.

Engarces. Es opcional un grupo de “engarce”. Cuando se encuentra presente, la estructura química no es crítica, dado que sirve, principalmente, como espaciador. El engarce está formado, preferiblemente, por aminoácidos enlazados por uniones peptídicas. Por tanto, en realizaciones preferidas, el engarce está constituido por 1 a 20 aminoácidos enlazados por uniones peptídicas, en las que los aminoácidos están seleccionados entre los 20 aminoácidos naturales. Algunos de estos aminoácidos pueden estar glicosilados, como es bien sabido por los expertos en la técnica. En una realización más preferida, los 1 a 20 aminoácidos están seleccionados entre glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. Aún más preferiblemente, un engarce está formado por una mayoría de aminoácidos que está sin impedir estéricamente, tales como glicina y alanina. Así pues, los engarces preferidos son poliglicinas, poli(Gly-Ala), y polialaninas. Otros ejemplos específicos de engarces son:

(Gly)₃Lys(Gly)₄;

(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂;

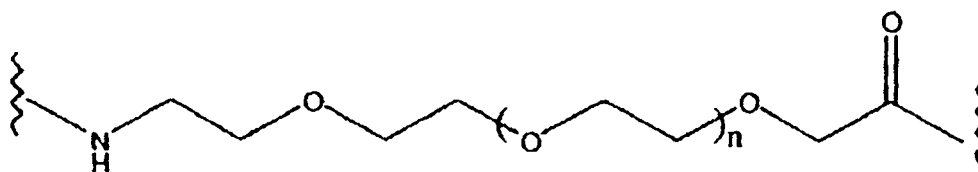
(Gly)₃Cys(Gly)₄; y

GlyProAsnGlyGly.

5 Para explicar la nomenclatura anterior, por ejemplo, (Gly)₃Lys(Gly)₄ significa Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly. Son preferidas también las combinaciones de Gly y Ala. Los engarces indicados en esta memoria son ejemplares; los engarces dentro del alcance de esta invención pueden ser mucho más largos y pueden incluir otros restos.

10 También son posibles engarces de tipo no peptídico. Por ejemplo, podrían usarse engarces de alquilo tales como -NH-(CH₂)_s-C(O)-, en los que s=2-20. Estos engarces de alquilo pueden estar sustituidos, además, por cualquier grupo no impedido estéricamente tal como un grupo acilo inferior (por ejemplo, C₁-C₆)alquilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH₂, fenilo, etc. Un engarce de tipo no peptídico que sirve de ejemplo es un engarce PEG

15 VI

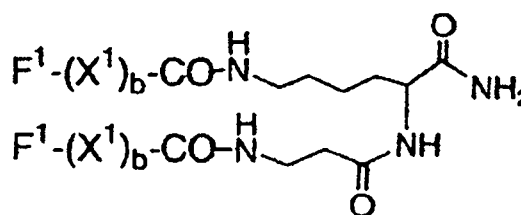


20 en el que n es tal que el engarce posee un peso molecular de 100 a 5000 kD, preferiblemente 100 a 500 kD. Los engarces de tipo peptídico pueden ser alterados para formar derivados del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

25 *Derivados.* Los inventores contemplan asimismo derivatizar el péptido, polipéptido y/o la parte FC de los compuestos. Tales derivados pueden mejorar las características de solubilidad, absorción, semivida biológica y semejantes, de los compuestos. Los restos pueden, alternativamente, eliminar o atenuar efectos secundarios indeseables de los compuestos, y semejantes. Los derivados que sirven de ejemplo, incluyen compuestos en los que:

- 30 1. El compuesto o alguna parte del mismo es cíclica. Por ejemplo, puede modificarse la parte farmacológicamente activa (es decir, péptido o polipéptido) para que contenga dos o más restos Cys (por ejemplo, en el engarce), que pudieran ciclarse mediante la formación de puentes disulfuro. Para citas a referencias bibliográficas sobre la preparación de derivados ciclados, véase la Tabla 2.
- 35 2. El compuesto está reticulado o es hecho capaz de reticulación entre moléculas. Por ejemplo, puede modificarse la parte farmacológicamente activa para que contenga un resto Cys y ser capaz por ello de formar un puente disulfuro intermolecular con una molécula semejante. El compuesto ser reticulado también a través de su extremo C-terminal, como en la molécula que se indica a continuación:

40 VII



- 45 3. Uno o más engarces (uniones) [-C(O)NR-] es reemplazado por un engarce no peptídico. Son engarces no peptídicos que pueden servir de ejemplo -CH₂-carbamato[-CH₂-OC(O)NR-], fosfonato, -CH₂-sulfonamida[CH₂-S(O)₂NR-], urea[-NHC(O)NH-], -CH₂-amina secundaria, y péptido alquilado[-C(O)NR⁶-] en cuya fórmula R⁶ es alquilo inferior.
- 50 4. El extremo N-terminal está derivatizado. Típicamente, el extremo N-terminal puede acilarse o modificarse a una amina sustituida. Los grupos derivados del extremo N-terminal que sirven de ejemplo incluyen -NRR¹ (distinto de -NH₂), -NRC(O)R¹, -NRC(O)OR¹, -NRS(O)₂R¹, -NHC(O)NHR¹, succinimida, o benciloxicarbonil-NH-(CBZ-NH-), en cuyas fórmulas R y R¹ son, cada uno independientemente, hidrógeno o alquilo inferior, y en las que el anillo fenilo puede estar sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo de C₁-C₄, alcoxi de C₁-C₄, cloro y bromo.
- 55 5. El extremo C-terminal libre es derivatizado. Típicamente, el extremo C-terminal es esterificado o amidado. Grupos derivados del extremo C-terminal que sirven de ejemplo incluyen, por ejemplo, -C(O)R², en cuya fórmula R² es alcoxi inferior o -NR³R⁴ en cuya fórmula R³ y R⁴ son, independientemente, hidrógeno o alquilo de C₁-C₈ (preferiblemente alquilo de C₁-C₄).
- 60 65

ES 2 307 539 T3

6. Un puente disulfuro está reemplazado con otro resto de reticulación, preferiblemente más estable, (por ejemplo, un grupo alquileo).véanse, por ejemplo, las publicaciones de Bhatnagar *et al.*, (1996), J. Med. Chem. 39:3814-9; Alberts *et al.*, (1993) Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9.

7. Uno o más restos individuales de aminoácidos han sido modificados. Se conocen diversos agentes de derivatización que reaccionan específicamente con cadenas laterales o restos terminales seleccionados, según se describe con detalle más adelante.

Restos lisinilo o restos del extremo amino terminal pueden hacerse reaccionar con anhídrido succínico u otros anhídridos de otros ácidos carboxílicos, que inviertan la carga de los restos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen grupo amino en posición alfa incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruo, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacción con glioxilato catalizada con transaminasa.

Los restos arginilo pueden ser modificados por reacción con uno cualquiera o con una combinación de varios reactivos convencionales, que incluyen fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de restos arginilo requiere que la reacción sea llevada en cabo en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional de la guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo amino en posición épsilon de la arginina.

La modificación específica de restos tirosilo ha sido estudiada extensamente, con interés particular en la introducción de marcas espectrales en los restos tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Lo más común es usar N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de tirosila O-acetiladas y derivados nitrados en posición 3, respectivamente.

Los grupos carboxilo de las cadenas laterales (aspartilo o glutamilo) pueden ser modificados selectivamente por reacción con carbodiimidas ($R'-N=C=N-R'$) tales como la 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o la 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los restos aspartilo y glutamilo pueden ser convertidos en restos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

Los restos glutaminilo y asparaginilo pueden ser desamidados dando lugar a los restos glutamilo y aspartilo correspondientes. Alternativamente, estos restos son desamidados en condiciones ligeramente ácidas. Cualquiera de las dos formas de estos restos caen dentro del alcance de esta invención.

Los restos cisteinilo pueden ser reemplazados por restos de aminoácidos u otros restos o bien para eliminar la unión disulfuro o, al revés, estabilizar la reticulación. Véase la publicación de Bhatnagar *et al.*, (1996), J. Med. Chem. 39:3814-9.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular los péptidos o sus derivados funcionales dando lugar a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo, el 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, el glutaraldehído, ésteres de la N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con el ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, con inclusión de ésteres disuccinimidílicos tales como el 3,3'-ditiobis(propionato de succinimilo), y maleimidas bifuncionales tales como la bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivatización tales como el metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato proporcionan intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de la luz. Alternativamente, se emplean para la inmovilización de proteínas, matrices reactivas insolubles en agua tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 y 4.330.440.

Los grupos carbohidrato (oligosacáridos) pueden ser unidos convenientemente a sitios que se sabe que son sitios de glicosilación existentes en proteínas. En general, los oligosacáridos enlazados a O son unidos a restos de serina (Ser) o treonina (Thr) mientras que los oligosacáridos enlazados a N se unen a restos de asparagina (Asn) cuando estos restos forman parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido con excepción de prolina. X es, preferiblemente, uno de los 19 aminoácidos naturales distintos de prolina. Las estructuras de los oligosacáridos enlazados a N o enlazados a O y los restos de azúcares encontrados en cada uno de los tipos, son diferentes. Un tipo de azúcar que es encontrado comúnmente en ambos es el ácido N-acetilneuramínico (al que se hace referencia como ácido siálico). El ácido siálico es, habitualmente, el resto terminal de ambos oligosacáridos, enlazados a N y enlazados a O, y en virtud de su carga negativa pueden comunicar propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Tal sitio o sitios pueden incorporarse en el engarce de los compuestos de esta invención y son, preferiblemente, glicosilados por una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamífero tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, tales sitios pueden ser glicosilados, además, mediante procedimientos sintéticos o semi-sintéticos conocidos en la técnica.

Otras posibles modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, la oxidación del átomo de azufre de la Cisteína, la metilación de los grupos amino en posición alfa de las cadenas laterales de la lisina, arginina e histidina. Creighton, Proteins; Structure and Molecule Properties (W.H. Freeman and Co., San Francisco). páginas 79-86 (1983).

Los compuestos preparados por el procedimiento de la presente invención pueden ser cambiados también al nivel del DNA. La secuencia de DNA de cualquier parte del compuesto puede ser cambiada para dar lugar a codones más compatibles con la célula huésped escogida. Para el *E. coli*, que es la célula huésped preferida, son conocidos en la técnica codones optimizados. Pueden sustituirse codones para eliminar sitios de restricción o incluir sitios de restricción silenciosos, que pueden ayudar en el procesamiento del DNA en la célula huésped seleccionada. Las secuencias de DNA del vehículo, el engarce y los péptidos, pueden modificarse para incluir cualquiera de los cambios de secuencia anteriores.

Métodos de preparación

Los compuestos preparados por el procedimiento de esta invención, pueden prepararse en gran medida en células huésped transformadas usando técnicas de DNA recombinante. Para hacer esto, se prepara una molécula de DNA recombinante que codifica el péptido. Son bien conocidos en la técnica métodos de preparación de tales moléculas de DNA. Por ejemplo, secuencias que codifican los péptidos podrían escindirse desde DNA usando enzimas de restricción adecuadas. Alternativamente, la molécula de DNA podría ser sintetizada usando técnicas de síntesis química, tales como el método del fosforamido. Asimismo, podría utilizarse una combinación de estas técnicas.

Esta invención contempla también que un vector sea capaz de expresar las moléculas en un hospedante adecuado. El vector comprende la molécula de DNA que codifica la molécula ligada operativamente a secuencias apropiadas de control de la expresión. Métodos para efectuar este ligamiento operativo, o bien antes o bien después de insertar la molécula de DNA en el vector, son bien conocidos en la técnica. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, intensificadores, operadores, sitios de unión ribosómicos, señales de iniciación, señales de detención, señales de terminación, señales de poliadenilación y otras señales implicadas en el control de la transcripción o de la traducción.

El vector que resulta, que tiene comprendida en él la molécula de DNA, se usa para transformar un hospedante apropiado. Esta transformación puede llevarse a cabo usando métodos conocidos en la técnica.

Puede usarse en la práctica de esta invención cualquiera de un gran número de células huésped bien conocidas y que se encuentran disponibles. La selección de un hospedante particular depende de diversos factores reconocidos por la técnica. Estos factores incluyen, por ejemplo, compatibilidad con el vector de expresión escogido, toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de DNA, velocidad de transformación, facilidad de recuperación de los péptidos, características de la expresión, bio-seguridad y costos. Debe alcanzarse un equilibrio entre estos factores con el entendimiento de que no todos los hospedantes pueden ser igualmente eficaces para la expresión de una secuencia particular de DNA. Dentro de estas pautas generales, los hospedantes de tipo microbiano útiles incluyen bacterias (tales como *E. coli* so.), levaduras (tales como *Saccharomyces* sp.) y otras células de hongos, insectos, plantas, mamíferos (con inclusión del hombre), en cultivo, u otros hospedantes conocidos en la técnica.

Seguidamente, la célula transformada es cultivada y purificada. Las células huésped pueden ser cultivadas en condiciones convencionales de fermentación para que los compuestos deseados sean expresados. Tales condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica. Finalmente, los péptidos son purificados partiendo del cultivo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Los compuestos pueden prepararse también mediante métodos sintéticos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de síntesis en fase sólida. Son bien conocidos en la técnica métodos adecuados, e incluyen los descritos por Merrifield (1973), en Chem. Polypeptides, páginas 335-61 (Katsoyannis y Panayotis compiladores); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Davis *et al.*, (1985), Biochem. Intl. 10:394-414; Stewart y Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; patente de EE.UU. No. 3.941.763; Finn *et al.*, (1976), The Proteins (3ª edición) 2: 105-253; y Erickson *et al.* (1976), The Proteins (3ª Edición) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es la técnica preferida de preparación de péptidos individuales dado que es el método más eficaz de preparación de péptidos pequeños desde el punto de vista del costo.

Los compuestos que contienen péptidos derivatizados o que contienen grupos no peptídicos, pueden ser sintetizados mediante técnicas de la química orgánica bien conocidas.

Usos de los compuestos

En general. Los compuestos producidos mediante el procedimiento de esta invención poseen actividad farmacológica que resulta desde las moléculas farmacológicamente activas a las que está unido el Fc. La actividad de estos compuestos puede medirse mediante ensayos conocidos en la técnica.

Además de los usos terapéuticos, los compuestos producidos mediante el procedimiento de la presente invención, pueden ser útiles también para diagnosticar enfermedades caracterizadas por la disfunción de una proteína de interés asociada. En una realización, un método de detección en una muestra biológica de una proteína de interés (por ejemplo, un receptor) capaz de ser activada, comprende las etapas de (a) poner en contacto la muestra con un compuesto producido mediante el procedimiento de esta invención, y (b) detectar la activación de la proteína de interés por el compuesto. Las muestras biológicas incluyen muestras de tejidos, células intactas o sus extractos. Los compuestos producidos mediante el procedimiento de esta invención pueden ser usados como parte de un kit de diagnóstico para

detectar la presencia de sus proteína de interés asociadas, de una muestra biológica. Tales kits emplean los compuestos producidos mediante el procedimiento de la presente invención que poseen una marca unida para permitir la detección. Los compuestos son útiles para identificar proteínas de interés, normales o anormales. Para los compuestos imitativos de EPO, por ejemplo, la presencia de una proteína anormal de interés existente en una muestra biológica, puede ser
5 indicativa de trastornos tales como la anemia de Diamond Blackfan, en la que se cree que el receptor de EPO es disfuncional.

Composiciones farmacéuticas

10 *En general.* La presente invención proporciona asimismo métodos de uso de composiciones farmacéuticas de los compuestos. Tales composiciones farmacéuticas pueden ser para administrar por inyección, o para administrar por vía oral, pulmonar, nasal, transdérmica u otras formas de administración. En general, la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de un compuesto producido mediante el procedimiento de la invención, junto con diluyentes, agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes emulsionantes, coadyuvantes
15 y/o excipientes, farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de diversos contenidos de agentes tamponantes (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (por ejemplo, timerosol, alcohol bencílico) y sustancias de voluminosidad (por ejemplo, lactosa, manitol); incorporación del material en preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como
20 poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc., o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico, y esto puede ocasionar el efecto de favorecer la duración sostenida en la circulación. Tales composiciones pueden tener influencia sobre el estado físico, la solubilidad, la velocidad de liberación *in vivo*, y la velocidad de aclaramiento de las proteínas y derivados presentes. Véase, por ejemplo la publicación Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18042) páginas 1435-1712. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida o pueden estar en forma de un polvo seco, tal como en forma liofilizada. También se contemplan formulaciones
25 implantables de cesión prolongada, como las formulaciones transdérmicas.

Formas de administración a los pulmones. También se contempla aquí la administración a los pulmones de las moléculas de fusión de Fc (o sus derivados). La proteína (o su derivado) se suministra a los pulmones de un mamífero al
30 tiempo que se produce la inhalación, y atraviesa el revestimiento epitelial del pulmón pasando a la corriente sanguínea. (Otros informes de esto incluyen las publicaciones de Adjei *et al.*, *Pharma. Res.* (1990) 7:565-9; de Adjei *et al.*, (1990), *Internatl. J. Pharmaceutics* 63:135-44 (acetato de leuprolida); de Braquet *et al.*, (1989), *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13 (suplemento 5):s.143-146 (endotelina-1); de Hubbard *et al.* (1989), *Annals Int. Med.* 3:206-12 (antitripsina- α 1); de Smith *et al.*, (1989), *J. Clin. Invest.* 84:1145-6 (proteínasa- α 1); de Oswein *et al.*, (Marzo, 1990), "Aerosolization of
35 Proteins", *Proc. Symp. Resp. Drug. Delivery II*, Keystone, Colorado (hormona del crecimiento humano, recombinante); de Debs *et al.*, (1988), *J. Immunol.* 140: 3482-8 (Interferón- γ y factor α de la necrosis tumoral) y de Platz *et al.*, patente de EE.UU. No. 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos).

Está contemplado para usar en la práctica de esta invención, una amplia variedad de dispositivos mecánicos diseñados para administración al pulmón de productos terapéuticos, que incluyen, aun cuando no se limita a ellos, nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvos, todos los cuales son familiares a los expertos en la técnica. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de que se dispone en el comercio, adecuados para la práctica de esta invención, son: el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medidas Ventolin,
45 fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; y el inhalador de polvos Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la distribución del compuesto. Típicamente, cada una de las formulaciones es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede llevar consigo el uso de un material propulsor apropiado, además de diluyentes, adyuvantes y/o excipientes, útiles en terapia.

El compuesto debe prepararse del modo más ventajoso en forma de partículas con un tamaño medio de partícula menor que 10 micrómetros, lo más preferible 0,5 a 5 micrómetros, para la administración más eficaz a la parte distal del pulmón.
55

Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen hidratos de carbono tales como trehalosa, manitol, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros ingredientes para usar en las formulaciones incluyen DPPC, DOPE, DSPC y DOPC. Pueden usarse tensioactivos naturales o sintéticos. Puede usarse PEG (incluso aparte de su uso en la derivatización de la proteína o análogo). Pueden usarse dextranos tal como el ciclodextrano. Pueden usarse sales biliares y otros intensificadores afines. Pueden usarse celulosa y derivados de celulosa. Pueden usarse aminoácidos, tales como los usados en la formulación de una solución amortiguadora.

Asimismo está contemplado el uso de liposomas, microcápsulas o microsferas, de complejos de inclusión u otros tipos de excipientes o vehículos.
65

Las formulaciones adecuadas para usar con un nebulizador, o bien a chorro o ultrasónico, comprenderán, típicamente, el compuesto disuelto en agua en una concentración de, aproximadamente, 0,1 a 25 mg de proteína biológicamente activa por ml de solución. La formulación puede incluir también un tampón y un azúcar simple (por ejemplo,

ES 2 307 539 T3

para estabilizar las proteínas y regular la presión osmótica). La formulación de un nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o evitar la formación de agregados de la proteína inducida en la superficie, causada por la atomización de la solución al formarse el aerosol.

5 Las formulaciones para usar con un dispositivo inhalador de dosis medidas comprenderá, en general, un polvo finamente dividido que contiene el compuesto, suspendido en un agente propulsor con ayuda de un tensioactivo. El agente propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para esta finalidad, tal como un clorofluorcarbono, un hidroclorofluorcarbono, un hidrofluorcarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o sus combinaciones. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitan y lecitina de soja. También puede ser útil como tensioactivo el ácido oleico.

15 Las formulaciones para su distribución desde un dispositivo inhalador de polvo, comprenderán un polvo seco, finamente dividido, que contiene el compuesto de la invención y puede incluir también un agente de voluminosidad, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa o xilitol, en cantidades que facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, 50 a 90% del peso de la formulación.

20 *Formas de distribución nasal.* También se contempla la distribución nasal de la molécula de fusión de Fc. La distribución nasal permite el paso de la proteína a la corriente sanguínea directamente, después de administrar el producto terapéutico a la nariz, sin necesidad de depositar el producto en el pulmón. Las formulaciones para distribución nasal incluyen las preparadas con dextrano o ciclodextrano. También está contemplada la distribución mediante transporte a través de otras membranas mucosas.

25 *Dosificación.* El régimen de dosificación implicado en un método de tratamiento de las condiciones anteriormente descritas, será determinado por el facultativo que las atienda, tomando en consideración los diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad, el estado, el peso, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de una infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. En general, el régimen diario debe estar en el intervalo de 0,1-1000 microgramos del compuesto de la invención por kilo de peso, de preferencia 0,1-150 microgramos por kilogramo.

30 *Realizaciones específicas preferidas*

Ejemplos de trabajo

35 Las descripciones que siguen son ilustrativas en vez de limitativas.

Ejemplo 1

40 Identificación de cisteínas en una construcción de Fc-Osteoprotegerina por marcado con CDAP y división inducida en medio alcalino, con análisis por CL-EM. (Cromatografía líquida-Espectro de masas).

Resumen

45 *Finalidad.* Ensayar cisteínas en una construcción de Fc-Osteoprotegerina mantenida en medio ácido y determinar su localización.

50 *Métodos.* Se empleó el reactivo tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP) para cianilar selectivamente grupos sulfhidrilo libres, estables, a pH 4. Las reacciones de cianilación fueron analizadas mediante HPLC asociada con análisis de espectro de masas (CL-EM). Se usó HPLC de fase invertida para separar los picos de componentes desde las muestras nativas y hechas reaccionar con CDAP. Las muestras de la fase invertida fueron recogidas, introducidas en una solución acuosa de hidróxido amónico mas hidrocloreuro de guanidina y analizadas seguidamente mediante CL-EM.

55 *Resultados:* El análisis de Fc-Osteoprotegerina mediante HPLC de fase invertida dio dos picos. La CL-EM de la reacción primaria con CDAP reveló cianilación selectiva de dos grupos sulfhidrilo en un pico que representa, aproximadamente, el 10% del material proteínico; el pico que representa aproximadamente el 90% del material no había sido cianilado después de reacción con CDAP. El análisis por CL-EM de las isoformas tratadas con hidróxido amónico/guanidina, detalló la localización de dos grupos sulfhidrilo de cisteína libres.

60 *Conclusiones.* Una forma de Fc-Osteoprotegerina separable por HPLC de fase invertida contiene dos grupos sulfhidrilo libres. El CDAP es un reactivo eficaz para caracterizar los grupos sulfhidrilo libres de proteínas, en condiciones ácidas.

Introducción

65 Fc-OPG, una construcción de la citoquina natural Osteoprotegerina (OPG), se encuentra bajo investigación clínica para determinar su utilidad en el tratamiento de la osteoporosis. La Fc-OPG es una proteína homodimérica, de peso molecular alto(91 kD), que contiene 24 cisteínas en cada secuencia del monómero. Todas las cisteínas existentes en el dímero están asociadas covalentemente por medio de 24 enlaces disulfuro (o cistina). Estos enlaces covalentes desem-

peñan un papel crucial en el mantenimiento de la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína. Por consiguiente, las cisteínas desapareadas pueden dar por resultado una disminución de la actividad biológica, tener efectos inmunógenos o ser un precursor de inestabilidad adicional física y química (oxidación y agregación).

5 La monitorización del estado de las cadenas laterales de cisteína - en la forma disulfuro, de cistina, o sulfhidrilo, de cisteína. se lleva a cabo, comúnmente, marcando los grupos sulfhidrilo libres con un fluoróforo o un marcador de peso molecular, específicos de tioles, en condiciones alcalinas. Dada la naturaleza lábil de los grupos sulfhidrilo de la cisteína y de los grupos disulfuro de la cistina en medio acuoso alcalino ($pK_a \sim 8$), la detección cuantitativa de sulfhidrilo de cisteína libre esta sujeta a inexactitud que resulta de la reducción de cistina a pH alto y la formación de disulfuro relacionada con la cisteína. Los métodos de marcado en condiciones alcalinas pueden no ser adecuados para
10 estimar los grupos sulfhidrilo de cisteína libres, presentes en formulaciones ácidas de proteínas.

Se observó que una isoforma de Fc-OPG, separable por HPLC de fase invertida, era reactiva al añadir una solución acuosa de $CuCl_2$. Después de la reacción con $CuCl_2$ la isoforma eluyó con el mismo tiempo de retención que el pico principal del cromatograma de fase invertida. La naturaleza de esta reactividad llevó a la especulación de que la isoforma era representativa de grupos sulfhidrilo libres existentes en la proteína, que se habían convertido en cistina por medio de un compuesto de cobre como oxidante. Numerosas técnicas fueron empleadas para comparar el número de grupos sulfhidrilo de cisteína libres, presentes en el pico principal frente a la isoforma. No se encontraron diferencias. Una característica común a todas las técnicas, fue el uso de condiciones de reacción de neutra a alcalina.
20

Este ejemplo presenta la caracterización de la isoforma usando el reactivo tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). La detección e identificación de restos de cisteína desapareados presentes en medio ácido, se hace posible mediante la cianilación de grupos sulfhidrilo de cisteína libres por el reactivo CDAP (Figura 6) y subsiguiente escisión de la unión peptídica en los restos de cisteína cianilados (Figura 7).
25

Materiales

La construcción de Fc-OPG puede prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica. El CDAP puede adquirirse de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).
30

Métodos

RP-HPLC: Las muestras fueron inyectadas en una columna Zorbax 300SB C8 de 4,6 mm x 25 cm, y eluidas con un gradiente de TFA al 0,1% y TFA al 0,1% en ACN al 90%, a 60°C, en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 ó 1090, a 215 nm.
35

Espectrometría de masas de electropulverización: Toda la espectrometría de masas se llevó a cabo en un espectrómetro AP 100 de Perkin-Elmer/Sciex usando condiciones consistentes con la ionización de péptidos y proteínas.

Tratamiento con cobre: Diez mg/ml de proteína en acetato sódico 10 mM y sorbitol al 5%, se trataron con $CuCl_2$ 50 mM (pH final ~ 4).
40

Condiciones de cianilación: Se preparó una solución de 50 mg/ml de CDAP en el seno de HCl 0,5 M. Se añadió 50 μl de la solución de CDAP a 500 μl de una solución de 10 mg/ml de proteína, en el seno de acetato (10 mM) de pH 5 y sorbitol al 5%. Se añadió 5 μl de NaOH 0,1 N a la mezcla de proteína-CDAP y se agitó con formación de vórtice.
45

Condiciones de división: La proteína cianilada se separó del material nativo mediante HPLC de fase invertida y se recogieron ambos picos. Las fracciones fueron reducidas en volumen, en vacío, en aproximadamente dos tercios y luego se trataron con una solución de NH_4OH 1,5 M, $GdHCl$ 4 M, y se calentó a 37°C durante 90 minutos.
50

Discusión

La cianilación de dos grupos sulfhidrilo de la cisteína en la construcción Fc-OPG pudo dar un aumento de masa de 50 daltons, resultante de la adición de dos grupos cianuro de 26 daltons. y la pérdida supuesta de dos protones desde las cadenas laterales de la cisteína. La cianilación selectiva de la isoforma de la RP-HPLC es evidente en el aumento de masa de ~ 50 daltons detectado para tal pico; la masa del pico principal no se modificó. La naturaleza de la isoforma fue indicada posteriormente por la observación de que la isoforma no respondía más a la adición de $CuCl_2$. Una pareja de cisteínas cianiladas no podía ser competente para la formación de puentes disulfuro por oxidación con $CuCl_2$ (Figura 8).
55

El esquema de división observado para la isoforma hecha reaccionar con CDAP y tratada con hidróxido amónico se diferenciaba grandemente del del pico principal. La reacción de división de la isoforma produjo tres picos diferentes y la reacción del pico principal dio por resultado un pico (Figura 9) La espectrometría de masas de los productos de división de la isoforma estableció su identidad (Tabla 1). El pico de masa 22.720 unidades de masa atómica (uma) estaba relacionado con un fragmento de la molécula que consistía en la secuencia completa de aminoácidos del extremo C terminal de la última cisteína de la secuencia de Fc (Figura 9, pico 2). La masa encontrada para el pico 3 de la Figura 4, 6.616,8 uma, es equivalente a la masa de un lazo de disulfuro del dominio Fc correspondiente a la secuencia de Fc encontrada en el extremo N-terminal para el fragmento determinado para el pico 2. El pico 4 (Figura 9) está
60

ES 2 307 539 T3

relacionado con el fragmento restante de la construcción Fc-OPG. Estos resultados revelan dos grupos sulfhidrilo de cisteína libres en el dominio Fc de uno de los dos monómeros (Figura 10).

5 En experimentos subsiguientes, la isoforma de la RP-HPLC se convirtió en el pico principal en condiciones alcalinas desnaturalizantes (resultados no indicados). Aparentemente, la formación de cistina en la isoforma era lo bastante rápida en estas condiciones alcalinas para quedar sin detectar mediante otras técnicas (reacción de Ellman y mapeo de péptidos) La especificidad del sitio y la compatibilidad del CDAP en condiciones ácidas para marcar restos de cisteína, hizo posible la caracterización de esta isoforma de proteína.

10 Conclusiones

Una isoforma de Fc-OP separable mediante HPLC de fase invertida, contiene dos grupos sulfhidrilo libres. La detección de grupos sulfhidrilo libres de cisteína de una proteína, puede complicarse por su naturaleza transitoria en las condiciones alcalinas usadas típicamente para el análisis. El CDAP es un reactivo eficaz para caracterizar los 15 grupos sulfhidrilo libres de proteínas, en condiciones ácidas.

Ejemplo 2

20 *Finalidad.* Se observaron diferencias importantes en la estabilidad de Fc-OPG en función del tratamiento con cobre de proteína en masa, en que la construcción Fc-OPG tratada con cobre era significativamente más estable que la construcción Fc-OPG que no lo había sido. Específicamente, la construcción Fc-OPG que no había sido tratada con cobre era más propensa a agregación que la Fc-OPG tratada con iones cobre. Se cree que la estabilidad mejorada de la construcción Fc-OPG es debida a la conversión de una fracción inestable de la Fc-OPG con estructura incompleta de disulfuro, en una forma con unión disulfuro intacta, por tratamiento con iones cobre.

25 *Métodos.* Cromatografía de fase invertida: La cromatografía de fase invertida se llevó a cabo en un sistema de HPLC 1100 ó 1090 de Hewlett-Packard, equipado con un detector de una disposición de diodos y regulado por el soporte lógico Chemstation Software. Las muestras de Fc-OPG fueron analizadas sobre una columna 300SB Zorbax, de 4,6 mm x 25 cm). La columna se equilibra inicialmente con tampón A al 90% (agua de calidad para HPLC 30 conteniendo TFA al 0,1%). Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal de tampón B al 4,2%/min (acetonitrilo, 90%, agua de calidad para HPLC, 10% y TFA al 0,1%) durante 6 minutos y luego tampón B al 0,11%/min durante 37 minutos. La columna se calentó a 60°C y la elución se monitorizó a 215 nm, con un caudal de 0,5 ml/min. Ambas construcciones de Fc-OPG, tratada con cobre y sin tratar con cobre (10 mg/ml) fueron formuladas en el seno de acetato sódico 10 mM, pH 5,0, que contenía sorbitol al 5%, Las muestras fueron incubadas a 29°C y analizadas transcurrido 35 el tiempo.

40 *Conclusiones.* Como se ha indicado anteriormente, el CuCl_2 cataliza la formación de cistina a partir de dos cisteínas desapareadas de la construcción Fc-OPG. Los perfiles en la cromatografía de fase invertida de una preparación de Fc-OPG después de tratamiento con cobre frente a una que no había sido tratada, están comparados en la Figura 11. El pico posterior prominente en el cromatograma de la muestra sin tratar es debido a la población de moléculas de Fc-OPG con cisteínas desapareadas. La estabilidad de estas preparaciones de Fc-OPG fue examinada en función del tratamiento con cobre, mediante HPLC de exclusión por tamaños. Los cromatogramas de muestras de Fc-OPG sin tratar con cobre y tratadas con cobre, incubadas a 29°C durante 2 años, se muestran en la Figura 12; un aumento de 45 agregados de alto peso molecular y picos de dímero, son evidentes en la muestra sin tratar.

Abreviaturas

Las abreviaturas empleadas en esta memoria descriptiva se definen como sigue, a menos que se defina de otro modo en casos específicos.

50	CDAP	tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio
	HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
55	ITZ	iminotiazolidina
	OPG	osteoprotegerina
	RP	fase invertida
60	TNF	factor de la necrosis tumoral
	TPO	trombopoyetina

65 Habiendo sido totalmente descrita la invención, será evidente para una persona de experiencia ordinaria en la técnica que pueden llevarse a cabo muchos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse de la invención tal como se expone en esta memoria.

ES 2 307 539 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de preparación de un compuesto farmacológicamente activo, en el que una falta de enlaces en una molécula de fusión de Fc puede evitarse o corregirse, cuyo procedimiento comprende las etapas de
- (a) preparar un compuesto farmacológicamente activo;
 - (b) tratar el compuesto farmacológicamente activo con un haluro de cobre (II) 10 mM, por lo menos; y
 - 10 (c) aislar el compuesto farmacológicamente activo,
- en el que el compuesto farmacológicamente activo es una molécula de fusión que comprende un dominio farmacológicamente activo y un dominio Fc.
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto farmacológicamente activo comprende un anticuerpo.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto farmacológicamente activo se prepara en *E. coli*.
- 20 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el haluro de cobre (II) es CuCl₂.
5. El procedimiento según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que el compuesto farmacológicamente activo se prepara en células CHO.
- 25 6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que el haluro de cobre (II) es CuCl₂.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el CuCl₂ se usa en una concentración 30 mM, por lo menos.
- 30 8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de una proteína OPG.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de una proteína leptina.
- 35 10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de un inhibidor del TNF- α .
- 40 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de un inhibidor de IL-1.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de una proteína de IL-1ra.
- 45 13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio farmacológicamente activo comprende la secuencia de un péptido imitativo de TPO.
14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio Fc es el dominio Fc de IgG1.
- 50 15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio Fc comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.
- 55
- 60
- 65

FIG. 1

Fc-OPG en E-coli, estándar, Vs Fc-OPG en E.coli+Cu 10mM

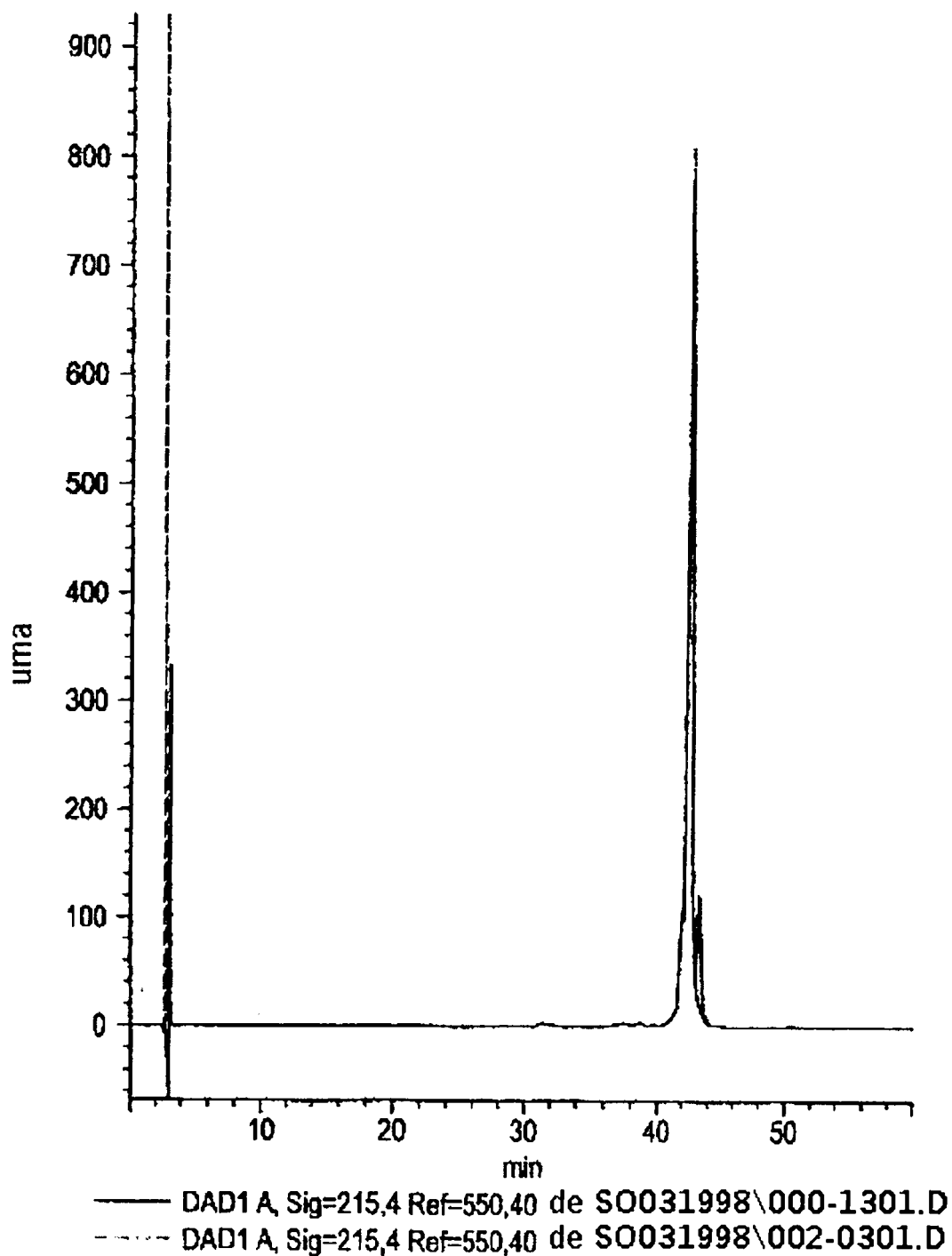
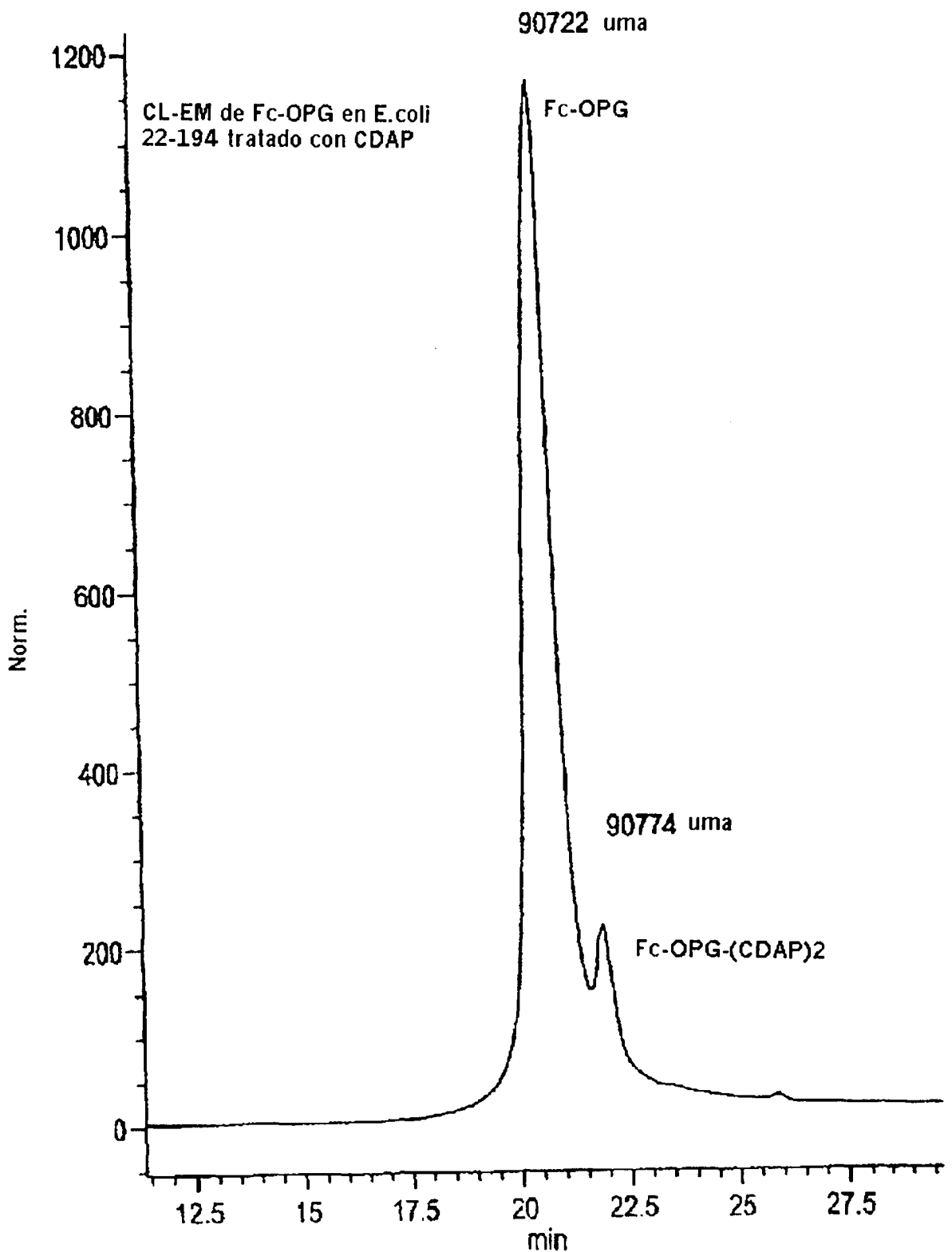


FIG. 2

Fc-OPG después de marcar con CDAP



DAD1 A, Sig=215,50 Ref=360,100 (AKD81598\FCOPG001.D)

FIG. 3

Fc-OPG después de marcar con CDAP, NH₄OH
 División subsiguiente con base y análisis mediante CL/EM.

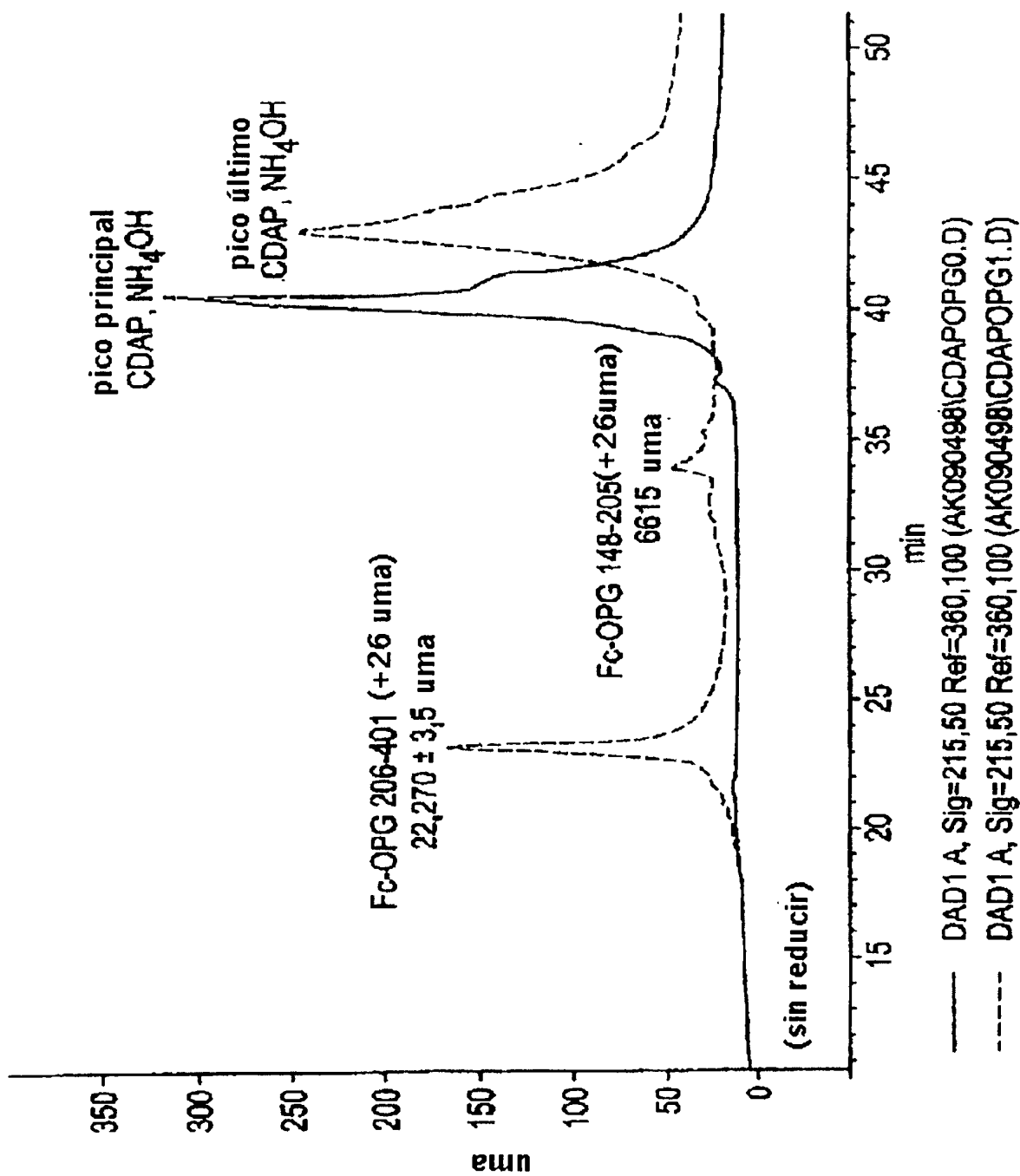
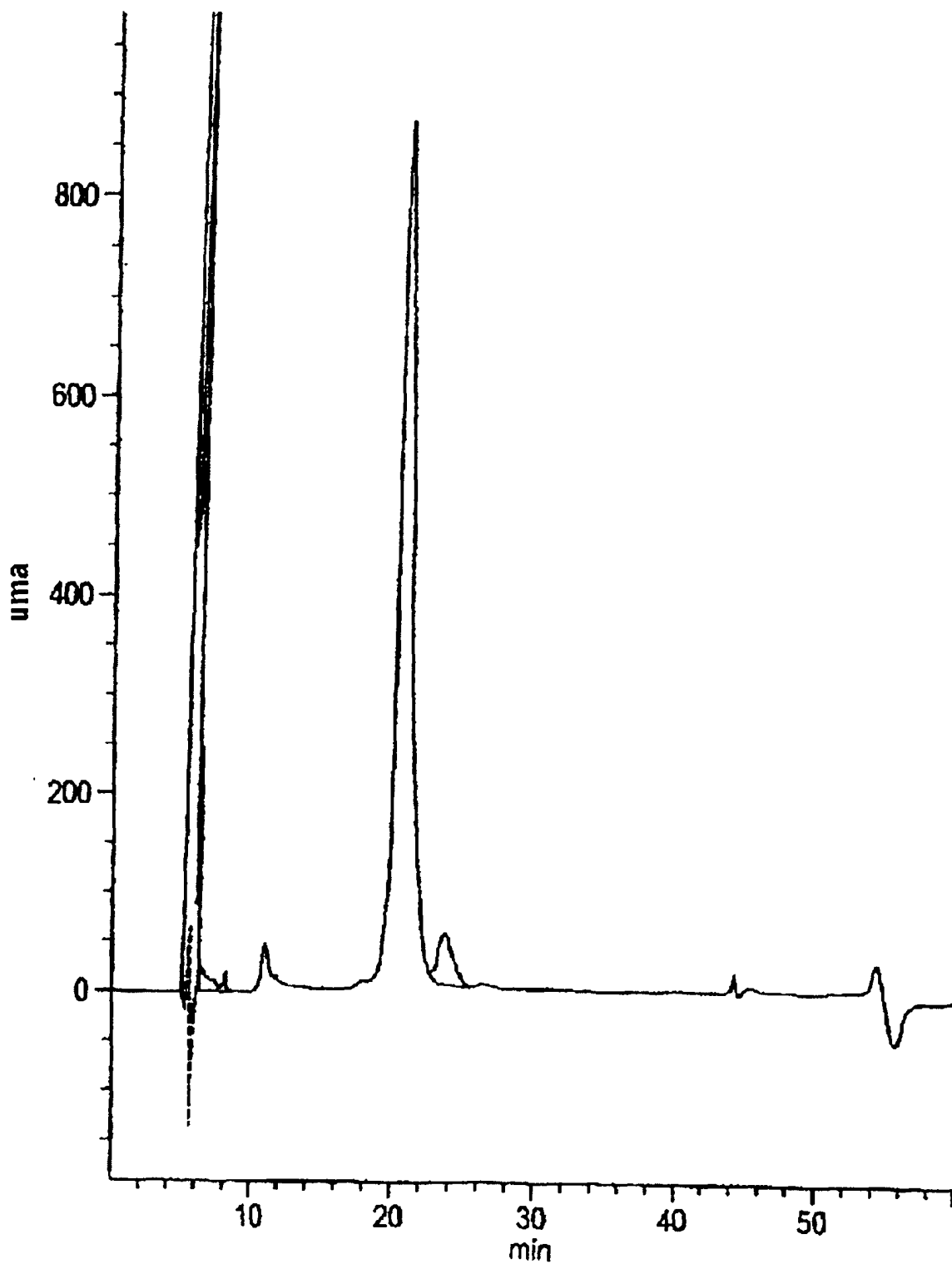


FIG. 4

CHO-OPG-Fc Vs CHO-OPG-Fc + CuCl₂ 30 mM



— DAD1 A, sig=215,4 Ref=550,40 de CHOOPCU3\002-0401.D
- - - DAD1 A, sig=215,4 Ref=550,40 de CHOOPCU3\000-0201.D

FIG. 5A

ATGGACAAAACCTCACACATOTCCACCTTGTCCAGCTCCGGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TACCTGTTTTGAGTGTGTACAGGTGGAACAGGTGCGAGGCCTTGAGGACCCCCCTGGCAGT

a M D K T H T C P P C P A P E L L G G P S -
 GTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 CAGAAGGAGAAGGGGGGTTTTGGGTTCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAG

b V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V -
 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
 121 -----+-----+-----+-----+ 180
 TGTACGCACCACCACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCAC

c T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V -
 GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 181 -----+-----+-----+-----+ 240
 CTCCCACCTCCACGTATTACGGTTCTGTTTCGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGTCTGTGC

d D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T -
 TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGAGTAC
 241 -----+-----+-----+-----+ 300
 ATGGCACACCAGTCCGAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTGACCGACTTACCGTTCCTCATG

e Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y -
 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
 301 -----+-----+-----+-----+ 360
 TTCAGTTCAGAGGTTGTTTCGGGAGGGTCCGGGGTAGCTCTTTGGTAGAGGTTTCGG

f K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A -
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
 361 -----+-----+-----+-----+ 420
 TTCCCCTCGGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGG

g K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T -
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
 421 -----+-----+-----+-----+ 480
 TTCTTGGTCCAGTEGGACTGGACGGACCAGTTCCGAAATAGGGTCCGCTGTAGCGGCAC

h K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V -
 GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGAC
 481 -----+-----+-----+-----+ 540
 CTCACCCTCTCGTTACCCGTGGCCCTCTTGTGATGTTCTGGTGCGGAGGGCACCAGCTG

i E W E S N G Q P E N N Y K T I P P V L D -
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAO
 541 -----+-----+-----+-----+ 600
 AGGCTGCCGAGGAAAGAAGGAGATGTGTTCCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCTGT

FIG. 5B

a S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q -

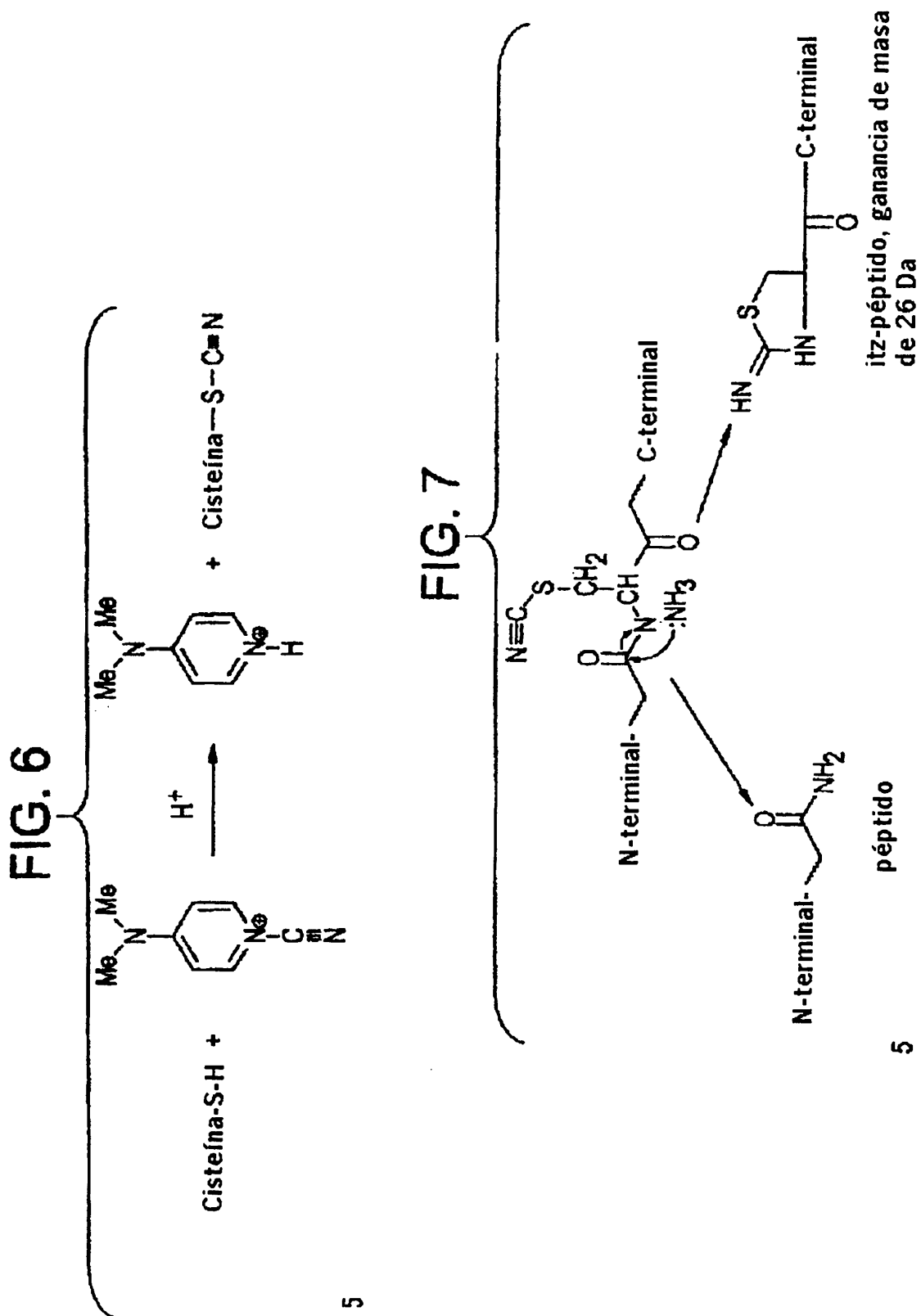
GGGAACGTCCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660

CCCTTGCAGAAGAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGATGTCCGTCTTC

a G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K -

AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
661 -----+-----+-----+ 684
TCGGAGAGGGACAGAGGCCCATTT

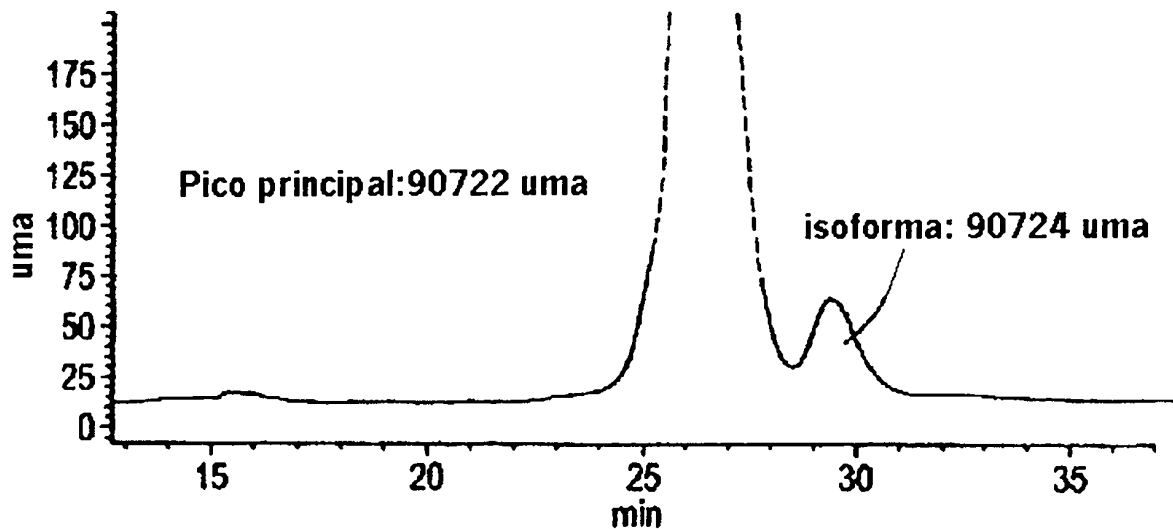
a S L S L S P Q K



5

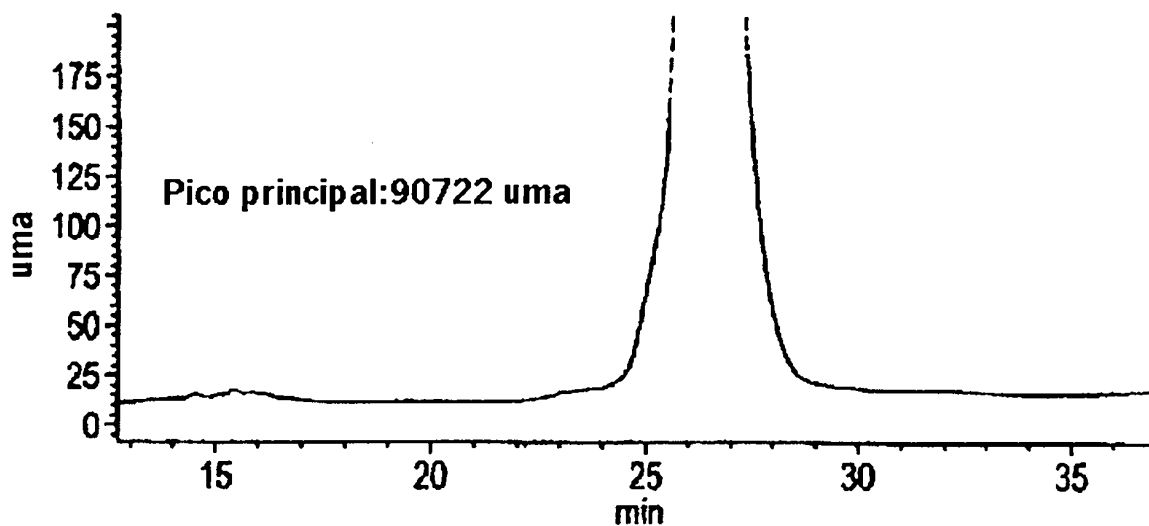
5

FIG. 8A



DAD1 A, Sig=215,4 Ref=550,40 (CO012199\047-0101.D)

FIG. 8B



DAD1 A, Sig=215,4 Ref=550,40 (CO012199\048-0201.D)

FIG. 8C

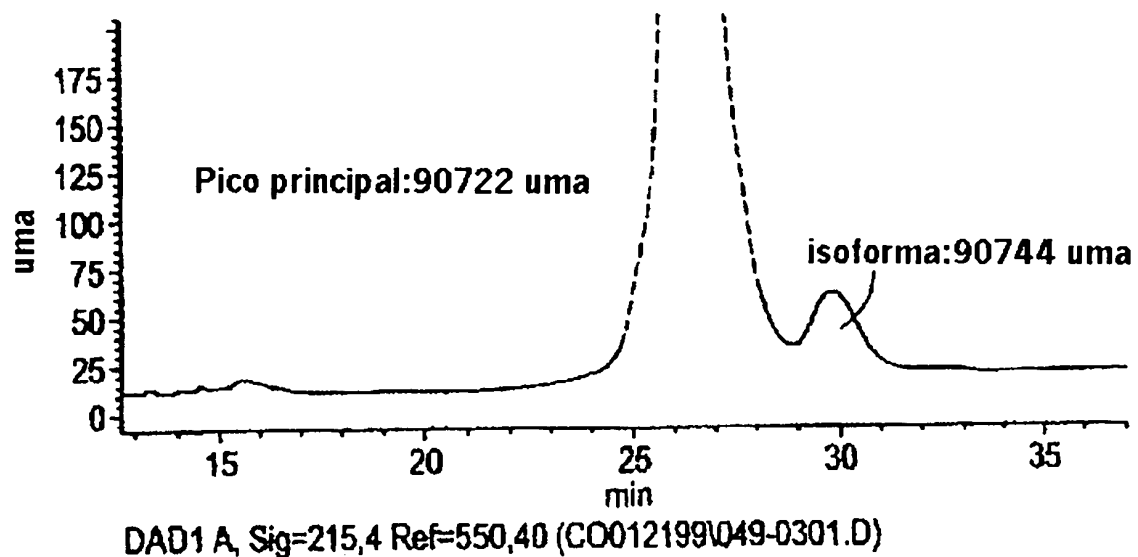


FIG. 9

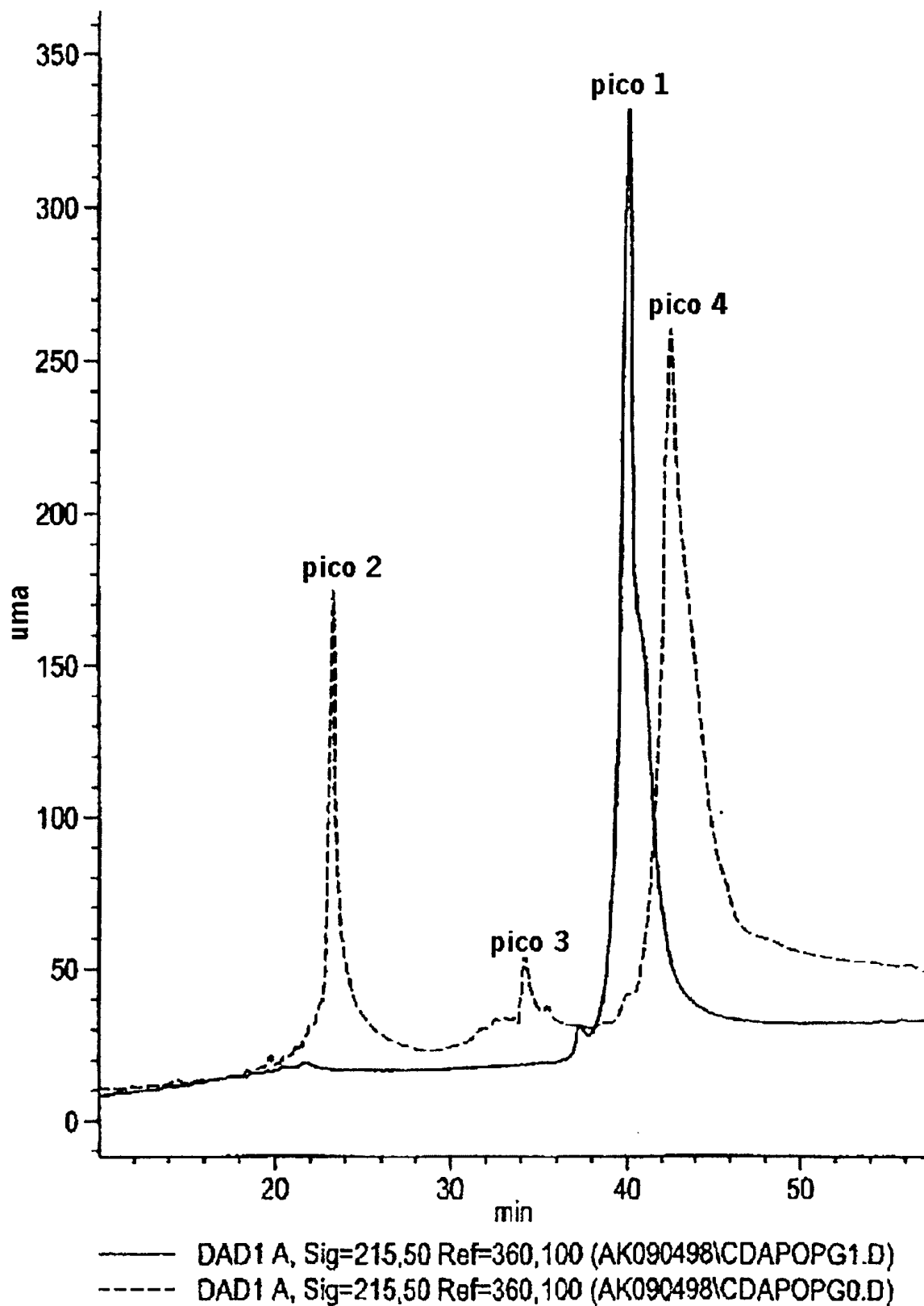


FIG. 10A
isoforma de la fase invertida

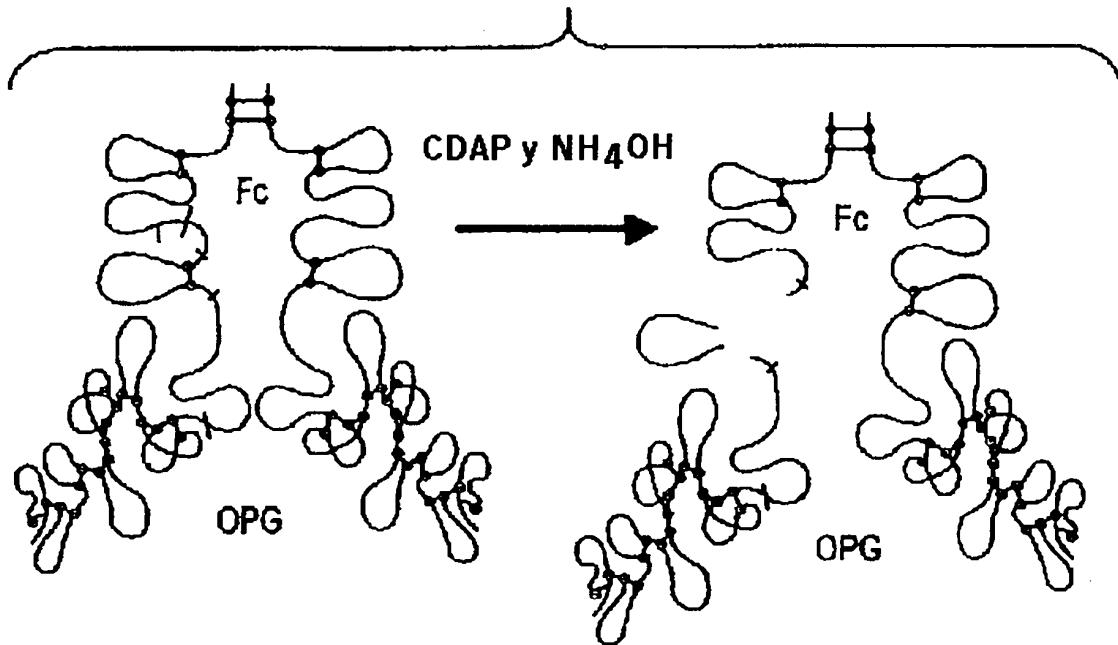


FIG. 10B

Pico principal de la fase invertida

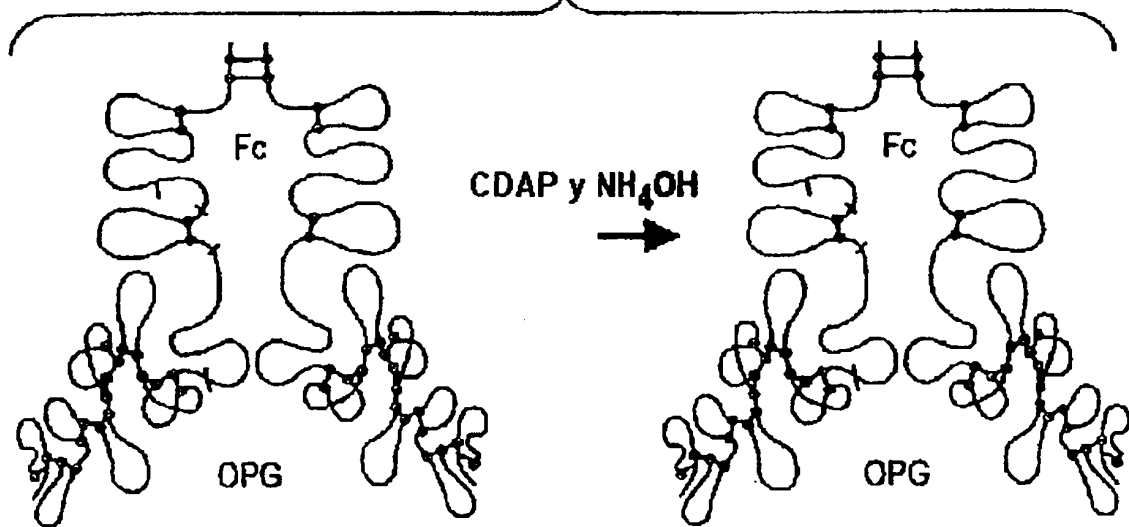


FIG. 11

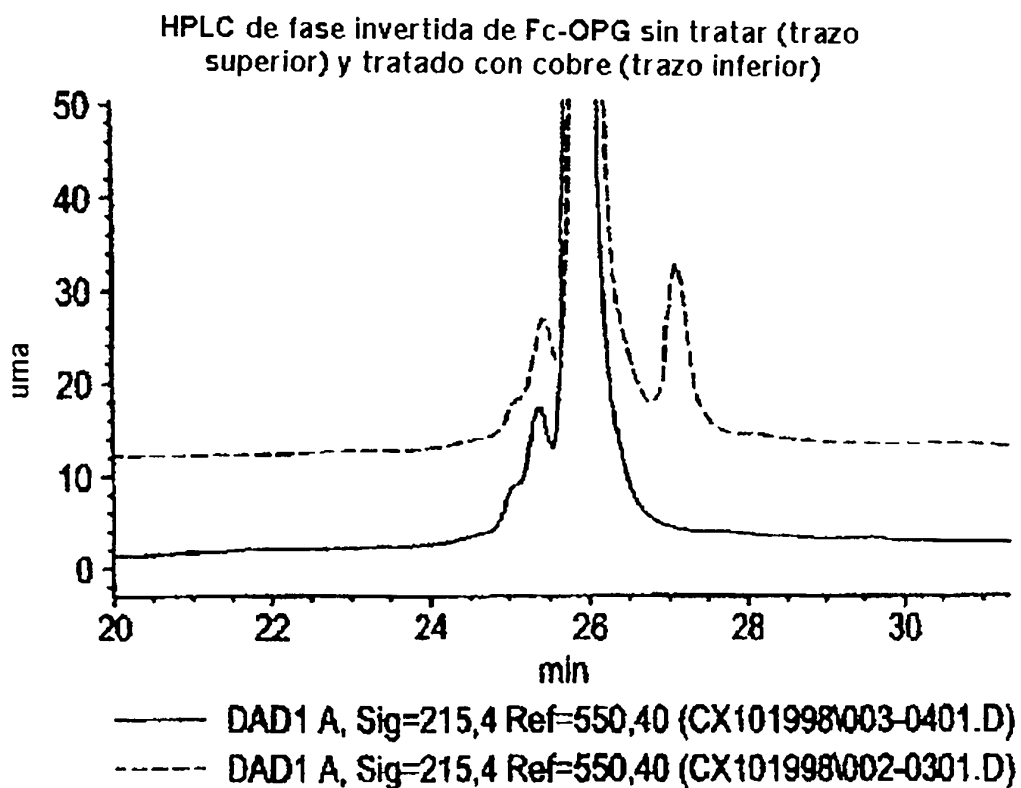
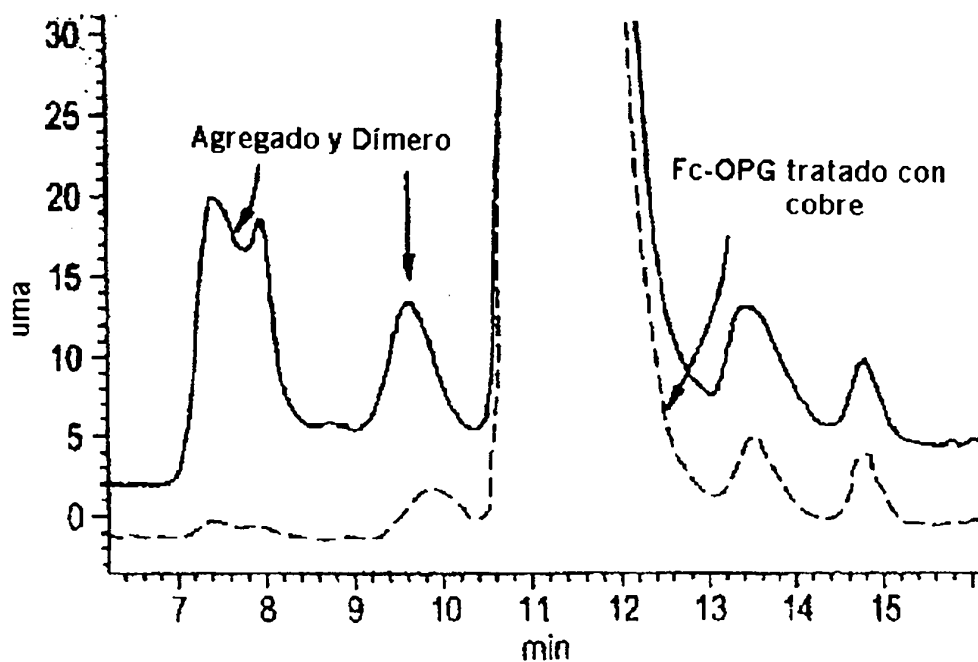


FIG. 12

HPLC de exclusión por tamaños, de Fc-OPG después de 2 años de incubar a 29°C; Fc-OPG tratado con cobre (trazo inferior) y Fc-OPG sin tratar (trazo superior).



ES 2 307 539 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.

5 <120> PROCEDIMIENTO PARA CORREGIR FALTAS DE ENLACES DISULFURO EN MOLÉCULAS DE Fc

<130> A-584

10 <140> A ser cedida

<141> 2000-11-12

15 <150> 60/165,188

<151> 1999-11-12

<160> 2

20 <170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 684

25 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (684)

35 <400> 1

	atg	gac	aaa	act	cac	aca	tgt	cca	cct	tgt	cca	gct	ccg	gaa	ctc	ctg	48
	Met	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
	1			5						10					15		
40	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	96
	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
			20					25						30			
45	atg	atc	tcc	egg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	144
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
			35				40					45					
50	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	192
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
		50				55					60						
55	gtg	cat	aac	gac	aag	aca	aag	ccg	egg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	240
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
	65				70					75					80		
55	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aal	288
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
				85						90					95		
60	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	336
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
			100					105						110			
65	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	ccg	ccc	cga	gaa	cca	cag	384
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
			115				120						125				
65	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	egg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	432
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
		130					135					140					

ES 2 307 539 T3

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg 480
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160

5 gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct 528
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175

10 ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc etc tac agc aag etc acc 576
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190

15 gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg 624
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205

20 atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc etc tcc ctg 672
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220

25 tct ccg ggt aaa 684
 Ser Pro Gly Lys
 225

25 <210> 2
 <211> 228
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

35 Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1 5 10 15

40 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30

45 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45

50 His Glu Asp Pro Gln Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60

55 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 65 70 75 80

60 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95

65 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125

ES 2 307 539 T3

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140
 5 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160
 10 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175
 15 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190
 20 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 25 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220
 30 Ser Pro Gly Lys
 225
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65