

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 205**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61P 11/02	(2006.01)
A61P 11/06	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61P 37/08	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2016 PCT/JP2016/054854**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2016 WO16133197**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2016 E 16752583 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3260469**

54 Título: **Cadena alfa del receptor de IgE de alta afinidad de fusión Fc**

30 Prioridad:

20.02.2015 JP 2015032231
24.12.2015 JP 2015252231

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2021

73 Titular/es:

KISSEI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
19-48, Yoshino
Matsumoto-shi, Nagano 399-8710, JP

72 Inventor/es:

SAKAMOTO TAKASHI;
INADA YOICHI y
YOKOYAMA KAZUMASA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 806 205 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

Cadena alfa del receptor de IgE de alta afinidad de fusión Fc

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad de fusión Fc que es útil como producto farmacéutico.

10 Más específicamente, la presente invención se refiere a una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad de fusión Fc que tiene una excelente estabilidad a pH bajo, y un uso medicinal de la misma.

Técnica antecedente

15 La inmunoglobulina E (IgE) forma parte de un grupo de inmunoglobulinas, que desempeña un papel en las reacciones alérgicas. La IgE, que es secretada por las células B o se expresa en la superficie de las células B, se une a un receptor de IgE de alta afinidad (Fc ϵ RI) que se encuentra en la superficie de mastocitos, basófilos, etc. Cuando una proteína antigénica se une a la IgE en un receptor de superficie de mastocitos, la IgE se convierte en una forma en la que reticula el antígeno. Posteriormente, se liberan mediadores químicos como la histamina o la serotonina, que se almacenan en gránulos intracelulares. En consecuencia, se induce una reacción inflamatoria y se provocan síntomas de alergia tipo I, como telangiectasis o hiperpermeabilidad vascular (Literatura No Patente 1).

20 En consecuencia, dado que un compuesto o una proteína, que inhibe la unión de IgE a Fc ϵ RI, inhibe la unión de la IgE al Fc ϵ RI que se encuentra en la superficie de los mastocitos, basófilos, etc., se espera que dicho compuesto o proteína sea un agente terapéutico para enfermedades alérgicas tipo I tales como asma bronquial, rinitis alérgica y conjuntivitis alérgica (Literatura No Patente 2).

25 En los últimos años, ha sido desarrollado no solo un producto farmacéutico convencional que comprende, como ingrediente activo, un compuesto de bajo peso molecular, sino también un producto farmacéutico proteico, que se une fuertemente a un receptor específico o similar en un cuerpo vivo y exhibe excelentes efectos terapéuticos. Por ejemplo, el Etanercept ha sido conocido como un agente terapéutico para la artritis reumatoide. Dicho Etanercept es una formulación de receptor de TNF α /LT α soluble completamente humanizado, que se ha observado debido al papel de un receptor soluble de un factor de necrosis tumoral (TNF) para suprimir la acción del TNF en un cuerpo vivo, y luego se ha desarrollado.

30 Se puede esperar que el producto farmacéutico proteico tenga altos efectos terapéuticos. Por otro lado, puede surgir un problema específico para el producto farmacéutico proteico en el proceso de producción del mismo.

35 En general, cuando se produce un anticuerpo o una proteína de fusión Fc en forma de un producto farmacéutico, se aplica un método de purificación para usar la proteína A. En este método, se usa un regulador con un valor de pH bajo para eluir una proteína de interés que se une a la proteína A. Además, para inactivar el virus, la proteína de interés se trata deseablemente a pH bajo durante un cierto período de tiempo.

40 Una proteína, que es pobre en estabilidad a pH bajo, forma fácilmente agregados. Si la proporción de agregados es alta, se produce una reducción en la eficiencia de purificación o cantidad de producción en la producción de productos farmacéuticos proteicos. Además, se provoca una respuesta inmune al mezclar agregados en productos farmacéuticos y, como resultado, es probable que ocurran efectos secundarios graves, como la anafilaxia.

45 Como tal, la inestabilidad de una proteína de interés a pH bajo puede ser problemática en la producción de productos farmacéuticos proteicos.

50 en la Literatura de Patentes 1 se describe un polipéptido (inmuno adhesión) que comprende una inmunoglobulina y un dominio extracelular. La Literatura de Patentes 1 describe un receptor de IgE de alta afinidad como un ejemplo de dicha inmuno adhesión. Sin embargo, esta publicación no describe específicamente una proteína fusionada de un receptor de IgE de alta afinidad y una inmunoglobulina.

55 Una proteína fusionada (en lo sucesivo denominada "proteína de Fusión A") de una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad (cadena α de Fc ϵ RI; en lo sucesivo denominada "FCER1A") y la inmunoglobulina G1 (IgG1) se describen en la Literatura No Patente 3. Sin embargo, la proteína de fusión A descrita en la publicación mencionada anteriormente es muy diferente de la proteína de la invención de la presente solicitud, en términos del modo de unión de FCER1A a IgG1 (Fc). Es decir, la proteína de la invención de la presente solicitud tiene una secuencia de aminoácidos característica en una región de fragmento de enlace entre Fc ϵ RI y la IgG1.

60 Una proteína fusionada (NPB301) formada uniendo un fragmento soluble en agua del receptor de IgE de alta afinidad (Fc ϵ RI) a una región Fc humana a través de un conector peptídico se describe en la Literatura de Patentes 2. Sin embargo, la proteína de la invención de la presente solicitud no comprende el enlazador peptídico descrito en

la Literatura de Patentes 2. Además, la Literatura de Patentes 2 no describe ni sugiere la secuencia de aminoácidos característica de la región del fragmento enlazador de la presente invención.

5 Una proteína fusionada de FCER1A e inmunoglobulina G2 (IgG2) se describen en la Literatura de Patentes 3. Sin embargo, esta proteína fusionada que comprende IgG2 es diferente de la proteína de la invención de la presente solicitud, en términos de las secuencias de aminoácidos de una región de fragmento conector y una región Fc.

10 Una proteína fusionada de primates no humanos FCER1A e IgG1 se describen en la Literatura de Patentes 4. Además, una proteína fusionada de FCER1A e IgG1 se describen en las Literatura de Patentes 5 a 7. Sin embargo, estas publicaciones no revelan ni sugieren la secuencia de aminoácidos característica de la región del fragmento conector de la presente invención.

15 La Literatura No Patente 3 y las Literaturas de Patente 1 a 7 mencionadas anteriormente no describen ni sugieren la proteína de la presente invención.

Lista de citas

Literatura de patentes

20 Literatura de Patentes 1: Patente de los Estados Unidos No. 5,565,335

Literatura de Patentes 2: Publicación Internacional WO 2012/169735

25 Literatura de Patentes 3: Publicación de Solicitud de Patente China abierta a Inspección No. 101633698

Literatura de Patentes 4: Publicación Internacional WO 2008/028068

Literatura de Patentes 5: Publicación Internacional WO 2011/056606

30 Literatura de Patentes 6: Publicación Internacional WO 2008/099178

Literatura de Patentes 7: Publicación Internacional WO 2008/099188

35 Literatura no patente

Literatura No Patente 1: Chisei Ra, "Allergy no Bunshi Saibo Kiko (Molecular and Cellular Mechanisms of Allergy)," BIO INDUSTRY, 2008, Vol. 25, No. 9, PP. 23-39

40 Literatura No Patente 2: Chisei Ra et al., "International Immunology," 1993, Vol. 5, No. 1, PP. 47-54

Literatura No Patente 3: M. Haak-Frendscho et al., "Journal of Immunology," 1993, Vol. 151, No. 1, PP. 351-358

Resumen de la invención

45 Problema técnico

Es un objeto de la presente invención proporcionar una cadena α del receptor IgE de alta afinidad de fusión Fc que tenga una excelente estabilidad a pH bajo.

50 Solución al problema

Los presentes inventores han realizado estudios intensivos con el fin de obtener una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad de fusión Fc que tenga una alta estabilidad frente a pH o calor bajos. Como resultado, los inventores han descubierto que se puede obtener una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad de fusión Fc que tiene alta estabilidad usando un fragmento conector que comprende tres residuos Cys, en una proteína fusionada que comprende una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad y Región Fc de IgG1, completando así la presente invención. Específicamente, la presente invención es como sigue.

60 La presente invención se refiere a los siguientes [1] a [5], etc.

[1] Una proteína de fusión Fc que comprende:

(i) una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad; y

65 (ii) una región Fc de IgG1, en donde

una región de fragmento de conector entre (i) y (ii) es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

5 [2] La proteína de fusión Fc de acuerdo con el apartado [1] anterior, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, o una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación de lisina (K) en el extremo C secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

[3] La proteína de fusión Fc según el [1] o [2] anterior, que es un dímero.

10 [4] La proteína de fusión Fc de acuerdo con el apartado [3] anterior, en donde los residuos de cisteína en la región del fragmento conector forman tres enlaces disulfuro.

[5] Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, la proteína de fusión Fc de acuerdo con cualquiera de los anteriores [1] a [4].

15 La presente descripción incluye los contenidos descritos en las Solicitudes de Patente Japonesa Nos. 2015-032231 y 2015-252231, que son documentos prioritarios de la presente solicitud.

20 Efectos ventajosos de la invención

La proteína de la presente invención tiene una excelente estabilidad a pH bajo. Además, la proteína de la presente invención tiene una excelente actividad neutralizante contra IgE. Por consiguiente, la proteína de la presente invención es útil como un producto farmacéutico proteico para prevenir o tratar enfermedades alérgicas de tipo I mediadas por IgE.

25 Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra la actividad de inhibición de la unión de la IgE humana. En la figura, el eje horizontal indica la concentración de cada fármaco (mol/L); y el eje longitudinal indica el valor de la cantidad de IgE unida a la proteína 1 inmovilizada en una placa, que se muestra en un porcentaje (IgE libre (porcentaje con respecto a un control)), utilizando, como referencia, la cantidad de unión obtenida cuando se agrega una cantidad predeterminada de IgE. En la figura, el círculo indica el valor de la Proteína 1, y el cuadrado indica el valor de Omalizumab, respectivamente.

35 [Figura 2] La Figura 2 muestra una transición de un cambio en la tasa de contenido (%) de agregados a pH bajo. En la figura, el eje horizontal indica el número de días (Día) y el eje longitudinal indica un cambio en la tasa de contenido (%) de los agregados. En la figura, el círculo indica el valor de la Proteína 1, y el cuadrado indica el valor de la Proteína de fusión A, respectivamente.

40 [Figura 3] La Figura 3 muestra una transición de un cambio en la tasa de contenido (%) de los agregados por un tratamiento térmico. En la figura, el eje horizontal indica el número de días (Día) y el eje longitudinal indica un cambio en la tasa de contenido (%) de los agregados. En la figura, el círculo indica el valor de la Proteína 1, y el cuadrado indica el valor de la proteína de Fusión A, respectivamente.

45 Descripción de las realizaciones

Las realizaciones de la presente invención se describirán en detalle a continuación.

50 En la presente invención, los términos individuales tienen los siguientes significados, a menos que se especifique lo contrario.

En la presente invención, la "cadena α del receptor de IgE de alta afinidad (FCER1A)" significa una proteína que comprende una porción de la cadena α que es un dominio extracelular de un receptor de IgE de alta afinidad. La cadena α del receptor de IgE de alta afinidad es, por ejemplo, una proteína que se muestra en la siguiente SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1:

VPQKPKVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNFFFEVSSTKWFHNGSLSEETNSSLNIVN
AKFEDSGEYKQCQHQQVNESEPVYLEVFSDWLLLQASAEVVMEGQPLFLRCHGWR
NWDVYKVIYYKDGEALKYWYENHNISITNATVEDSGTYYCTGKVVWQLDYESEPL
NITVIKAPREKYWL

5 La cadena α del receptor de IgE de alta afinidad descrita anteriormente incluye, por ejemplo, una proteína que tiene una identidad de 90% o más, 95% o más, 97% o más, o 99% o más de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1, cuando la identidad se calcula utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool en el National Center for Biological Information) o similar (por ejemplo, utilizando parámetros predeterminados), y con capacidad de unión a IgE. Además, la cadena α del receptor de IgE de alta afinidad también incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, eliminación y/o adición de uno o más, o varios aminoácidos (1 a 10, preferiblemente 1 a 5, y más preferiblemente 1 o 2 aminoácidos) con respecto a la
10 secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, y que tiene capacidad de unión a IgE.

En la presente invención, la "región Fc de IgG1" significa el fragmento Fc de la inmunoglobulina G1, a saber, los dominios constantes CH2 y CH3 de la inmunoglobulina G1 nativa. La región Fc de IgG1 incluye todo un mutante natural, un mutante artificial y una forma truncada.

En la presente invención, la "región de fragmento de enlace entre la cadena α del receptor de IgE de alta afinidad y la región Fc de IgG1" significa una región que consta de 14 residuos de aminoácidos que van desde el punto de unión entre la cadena α del receptor de IgE de alta afinidad descrita anteriormente y la región Fc de IgG1 descrita anteriormente hacia la dirección de la región Fc.

En la presente invención, la "proteína de fusión Fc" significa una proteína recombinante que comprende la cadena α del receptor de IgE de alta afinidad y el fragmento Fc de una inmunoglobulina.

La proteína de la presente invención se caracteriza porque la región del fragmento conector entre la cadena α del receptor de IgE de alta afinidad y la región Fc de IgG1 es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la siguiente SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2:

30 EPKSCDKTHTCPPC

La proteína de la presente invención es preferiblemente una proteína de fusión Fc que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la siguiente SEQ ID NO: 3 (en lo sucesivo denominada "Proteína 1").

SEQ ID NO: 3:

VPQKPKVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNFFFEVSSTKWFHNGSLSEETNSSLNIVN
AKFEDSGEYKQCQHQQVNESEPVYLEVFSDWLLLQASAEVVMEGQPLFLRCHGWR
NWDVYKVIYYKDGEALKYWYENHNISITNATVEDSGTYYCTGKVVWQLDYESEPL
NITVIKAPREKYWLEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
35 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

La secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 tiene una secuencia formada fusionando la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 (desde Val en la posición 1 a Leu en la posición 179 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos que se muestra en

5 SEQ ID NO: 2 (Glu en la posición 180 a Cys en la posición 193 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3), y la secuencia de aminoácidos del fragmento Fc de una inmunoglobulina (Pro en la posición 194 a Lys 411 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3) en este orden. Esta proteína de fusión Fc incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de 90% o más, 95% o más, 97% o más, o 99% o más de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3, que es aparte de la porción de secuencia de aminoácidos de Glu en la posición 180 a Cys en la posición 193 que corresponde a la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, cuando la identidad se calcula utilizando, por ejemplo, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool en el National Center for Biological Information) o similares (por ejemplo, utilizando parámetros predeterminados), y con capacidad de unión a IgE. Además, esta proteína de fusión Fc incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, eliminación y/o adición de uno o más, o varios aminoácidos (1 a 10, preferiblemente 1 a 5, y más preferiblemente 1 o 2 aminoácidos) con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3, que es diferente a la porción de la secuencia de aminoácidos de Glu en la posición 180 a Cys en la posición 193 que corresponde a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, y que tiene capacidad de unión a IgE.

15 Tras la producción de un anticuerpo recombinante, hay un caso en el que la lisina en el extremo C se elimina por modificación postraduccion. Por consiguiente, la proteína de la presente invención puede ser una proteína de fusión Fc que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una eliminación de la lisina (K) en el extremo C de la Proteína 1 descrita anteriormente. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una eliminación de la lisina (K) en el extremo C de la Proteína 1 que se muestra en la SEQ ID NO: 3 consiste en una porción de secuencia de aminoácidos desde la posición 1 a la posición 410 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

25 La proteína de la presente invención incluye tanto un monómero como un dímero de una proteína de fusión Fc formada uniendo una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad a la región Fc de IgG1 a través de un fragmento conector que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2. Tres residuos de Cys están presentes en la región del fragmento de enlace descrito anteriormente (los residuos de Cys en las posiciones 184, 190 y 193 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3), y un dímero puede formarse por enlaces disulfuro. En general, dos monómeros de proteína de fusión Fc forman un dímero como resultado de la formación de tres enlaces disulfuro entre los residuos Cys en las mismas posiciones que las de los tres residuos Cys descritos anteriormente, y los tres residuos Cys descritos anteriormente. Debido a los tres enlaces disulfuro descritos anteriormente, un dímero se estabiliza y tiene una alta estabilidad frente a pH y calor bajos. La frase "que tiene alta estabilidad frente a pH y calor bajos" significa, por ejemplo, que solo se forman unos pocos agregados en condiciones de pH bajo y bajo calentamiento. Tal alta estabilidad frente a pH bajo o calor puede confirmarse, por ejemplo, realizando un tratamiento de pH bajo o un tratamiento térmico sobre una proteína, y luego midiendo el contenido de agregados en la proteína mediante cromatografía de filtración en gel. Por ejemplo, incluso si la proteína de fusión Fc de la presente invención se conserva a una temperatura baja de 2°C a 8°C, y preferiblemente 4°C, a un pH de 1 a 5, y preferiblemente a un pH de 2 a 4, durante 1 día a 1 mes, preferiblemente durante 1 día a 14 días, y más preferiblemente durante 5 a 12 días, o incluso si la presente proteína de fusión Fc se conserva a una temperatura de 25°C a 45°C, y preferiblemente 30°C a 40°C, durante 1 día a 1 mes, preferiblemente 1 día a 14 días, y más preferiblemente 1 día a 7 días, un cambio en la tasa de contenido de los agregados es pequeño. Por ejemplo, cuando se calcula un cambio en la tasa de contenido de agregados en la proteína de la presente invención con base en el área de pico de la cromatografía de filtración en gel, es del 10% o menos, y preferiblemente del 8% o menos. Además, cuando se compara con una proteína de fusión Fc que tiene dos o menos residuos Cys como un fragmento conector, un cambio en la tasa de contenido de agregados en la proteína de la presente invención es pequeño.

La proteína de la presente invención se puede producir, por ejemplo, mediante el siguiente método o un método equivalente al mismo, o mediante los métodos descritos en publicaciones o métodos equivalentes al mismo.

50 La proteína de la presente invención puede producirse usando una técnica de recombinación genética que es bien conocida por una persona experta en el presente campo técnico. Por ejemplo, se prepara el ADN que codifica la proteína de la presente invención, y luego se construye un vector de expresión que comprende este ADN. Posteriormente, las células procariontas o eucariotas se transforman o transfectan con el vector descrito anteriormente, y una proteína de interés puede aislarse y purificarse a partir de un sobrenadante de cultivo de las células obtenidas.

60 La proteína de la presente invención también se puede producir usando células que expresan proteínas que son bien conocidas por una persona experta en el presente campo técnico. Por ejemplo, el ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 se incorpora en un vector de plásmido de expresión de mamífero para preparar un plásmido de expresión de proteína, y el plásmido preparado se introduce luego en células animales tales como células de ovario de hámster Chino (OHC), para establecer una línea celular de expresión estable. Las células obtenidas se cultivan, y luego, la proteína de la presente invención se puede obtener de un sobrenadante de cultivo.

65 La proteína de la presente invención se puede aislar y purificar, según sea necesario, por medios de aislamiento y purificación que son bien conocidos por una persona experta en el presente campo técnico. Ejemplos del método de

aislamiento y purificación incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía hidrofóbica, cromatografía en modo mixto, diálisis, un método de precipitación fraccionada y electroforesis. La proteína de la presente invención también se puede aislar y purificar combinando estos métodos entre sí, según sea apropiado.

5 La proteína de la presente invención también puede sufrir una modificación química que es bien conocida por una persona experta en el presente campo técnico. Ejemplos de la modificación química incluyen glicosilación, polietilenglicolación (PEG), acetilación y amidación.

10 Dado que la proteína de la presente invención tiene actividad neutralizante contra IgE, puede usarse como agente preventivo o terapéutico para diversas enfermedades mediadas por IgE. Por ejemplo, la proteína de la invención de la presente solicitud es útil como agente preventivo o terapéutico para enfermedades asociadas con la alergia tipo I, y similares, tales como asma bronquial, otitis media eosinofílica, sinusitis eosinofílica, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, polinosis, alergia alimentaria, enfermedad alérgica a los ácaros, urticaria y choque anafiláctico.

15 La proteína de la presente invención tiene una excelente afinidad por la IgE. Por lo tanto, la proteína de la presente invención también puede usarse como un "conjugado proteína-fármaco" que utiliza dicha afinidad, tal como un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF). Ejemplos de tal "conjugado proteína-fármaco" incluyen los modos de uso, tales como "Proteína 1-fármaco" y "Proteína 1-enlazador-fármaco". Como medicamento, se puede usar un agente antialérgico o similar. Tal conjugado se puede producir mediante un método bien conocido por una persona experta en el campo técnico actual.

20 Con respecto a la composición farmacéutica de la presente invención, se usan diversas formas de dosificación dependiendo del uso. Ejemplos de un agente oral incluyen una tableta, un agente en polvo, un gránulo, un gránulo fino y una cápsula. Ejemplos de un agente parenteral incluyen una inyección, polvos para inhalación, un líquido para inhalación, gotas para los ojos, un agente líquido, un agente de loción, un agente de pulverización, gotas nasales, un goteo, una pomada, un supositorio y un parche.

25 La composición farmacéutica de la presente invención se administra mediante diversos métodos de administración, dependiendo del uso. Ejemplos del método de administración incluyen administración oral, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración subcutánea, administración tópica y administración intramuscular.

30 La composición farmacéutica de la presente invención se prepara usando la proteína de la presente invención y al menos un aditivo de producto farmacéutico. La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse mediante un método farmacéutico conocido, dependiendo de su forma de dosificación. Ejemplos de dicho aditivo de productos farmacéuticos incluyen un excipiente, un desintegrador, un aglutinante, un lubricante, un diluyente, un regulador, un agente de tonicidad, un conservante, un estabilizador y un solubilizante. El aditivo de producto farmacéutico descrito anteriormente también incluye una solución salina fisiológica y agua para inyección. La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse mezclándose con, diluyéndose con o disolviéndose en los aditivos de productos farmacéuticos descritos anteriormente.

35 Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se usa para prevención o tratamiento, la dosis de la proteína de la presente invención, que está comprendida en la misma como ingrediente activo, se determina, según sea apropiado, dependiendo de la edad, el sexo y el peso corporal de un paciente, el grado de enfermedad, una forma de dosificación, una ruta de administración, etc. Con respecto a la dosis aplicada a un adulto mediante administración oral, la dosis aplicada se puede determinar, por ejemplo, en el rango de 0.1 µg/kg a 1000 mg/kg/día. La dosis diaria en el caso de administración oral está preferiblemente en el intervalo de 0.1 mg/kg a 10 mg/kg/día, dependiendo de la forma de dosificación. Dicha dosis diaria se puede administrar de una vez, o dividida en dos o tres administraciones. Además, la dosis aplicada a un adulto por administración parenteral se puede determinar en el rango de 0.01 µg/kg a 1000 mg/kg/día. La dosis diaria en el caso de administración parenteral está en el rango de preferiblemente 0.1 µg/kg a 10 µg/kg/día, 1 µg/kg a 100 µg/kg/día, o 10 µg/kg a 1000 µg/kg/día, dependiendo de la forma de dosificación.

55 **Ejemplos**

El contenido de la presente invención se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos y ejemplos de prueba. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

60 **Ejemplo 1**

Expresión y preparación de Proteína 1

(1) Preparación del vector de expresión de Proteína 1

65

El ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 se incorporó en un vector de plásmido de expresión de mamífero para preparar un plásmido de expresión de Proteína 1.

(2) Preparación de células que expresan la Proteína 1

5 El plásmido de expresión de Proteína 1 se introdujo en células de ovario de hámster Chino (OHC) para establecer una línea celular de expresión estable de Proteína 1. La secreción de Proteína 1 en un sobrenadante de cultivo fue confirmada por SDS-PAGE.

10 Ejemplo de Prueba 1

Actividad inhibidora de unión a IgE (actividad neutralizante de IgE)

(1) Preparación de la placa de ensayo.

15 La Proteína 1 se disolvió en un regulador de recubrimiento y se añadió una alícuota de la solución obtenida a una microplaca. La microplaca se dejó a 4°C durante 18 horas o más, y luego se lavó con un regulador de lavado (PBS-Tween 20). Posteriormente, se añadió una solución de bloqueo (Diluyente de Ensayo) (BD Biosciencias). La microplaca se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se eliminó la solución de bloqueo. La placa se lavó con un regulador de lavado y luego se usó en la medición de la actividad inhibidora de la unión.

(2) Método para medir la actividad inhibidora de la unión

25 Usando omalizumab (anticuerpo IgE anti-humano) como control positivo, la actividad inhibidora de unión a IgE de la Proteína 1 se midió mediante el siguiente método.

Se mezcló una cierta cantidad de IgE humana (ANTIBODYSHOP) con Proteína 1 u omalizumab (Novartis) que tiene cualquier concentración dada. La mezcla obtenida se añadió a la placa preparada en el apartado (1) anterior, y luego se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Después de desechar la solución mixta, la placa se lavó con un regulador de lavado. Se añadió un anticuerpo IgE anti-humano marcado con HRP (BD Biosciences) a la placa resultante, y luego se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Después de desechar la solución de anticuerpo, la placa se lavó con un regulador de lavado. Se añadió una solución de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a la placa. Después de un cierto periodo de tiempo, se añadió ácido fosfórico a la placa para terminar una reacción de coloración. Posteriormente, usando un lector de placas, se midió la absorbancia (OD450). En función de la cantidad de IgE unida a la Proteína 1 inmovilizada en la placa, la Proteína 1 y el omalizumab se evaluaron en términos de actividad inhibidora de unión a IgE (actividad neutralizante de IgE) (Figura 1).

(3) Resultados

40 La Proteína 1 de la presente invención inhibió la unión de IgE a FCER1A de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo de Prueba 2

45 Prueba de estabilidad a pH bajo

(1) Preparación de muestra

50 Se realizó una operación de purificación utilizando AKTA Explorer 10 S (GE Healthcare). Se permitió que la Proteína 1 se expresara por el mismo método que el descrito en el Ejemplo 1, y luego, un sobrenadante de cultivo de la misma se diluyó 2 veces con STF-D(-) (Solución Salina Regulada con Fosfato de Dulbecco). La solución diluida se cargó en HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare, 17-5079-01). La columna descrita anteriormente se lavó con STF-D(-), y luego se eluyó con un regulador de glicina-HCl 100 mM (pH 2.2). Se fraccionó una fracción de adsorción de proteína A a 1.0 mL/tubo. Las fracciones pico se mezclaron entre sí para obtener una muestra tratada con pH bajo (pH 2.9). La muestra tratada con pH bajo que se había conservado a 4°C se utilizó como muestra de evaluación. Se tomaron muestras de 0.25 mL de una alícuota de la muestra de evaluación en un momento predeterminado (5 a 12 días después de la conservación a 4°C), y se agregaron 0.05 mL de un regulador Tris-HCl 1 M (pH 9.0) a la alícuota para neutralizarla, obteniendo así una muestra neutralizada.

60 Como control, se usó la proteína de fusión A descrita en la Literatura No Patente 3. Se permitió que la Proteína de Fusión A se expresara por el mismo método que el descrito en el Ejemplo 1, y luego, se obtuvo una muestra neutralizada por el mismo método que el método mencionado anteriormente. Cabe señalar que la proteína de fusión A utilizada en la presente prueba es una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la siguiente SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4 comprende un fragmento conector que consiste de Asp en la posición 180 a Cys en la posición 188, y el número de residuos de Cys contenidos en este fragmento de enlace es 2.

SEQ ID NO: 4:

VPQKPKVSLNPPWNRIFKGENVTLTCNGNFFFEVSSTKWFHNGSLSEETNSSLNIVN
 AKFEDSGEYKQCQHQVNESEPVYLEVFSDWLLLQASAEVVMEGQPLFLRCHGWR
 NWDVYKVIYYKDGEALKYWYENHNISITNATVEDSGTYCTGKVVQLDYESEPL
 NITVIKAPREKYWLDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVNV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

(2) Método de análisis de contenido de agregados

5 Con respecto a la operación de análisis de agregados, el contenido de los agregados se confirmó realizando una cromatografía de filtración en gel usando Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare, 17-5175-01), empleando AKTA Explorer 10 S (GE Healthcare), y también utilizando STF-D(-) como fase móvil. Se calcularon las áreas de un pico cuya posición eluida era un monómero y un pico agregado eluido en una región de alto peso molecular, y se evaluó una transición de un cambio en la tasa de contenido de agregados (%) en la Proteína 1 y la proteína de Fusión A, que fue causada mediante un tratamiento de pH bajo, (Figura 2).

(3) Resultados

15 En la proteína de la presente invención, el mayor nivel de formación de agregados asociado con un tiempo de tratamiento de pH bajo fue significativamente menor que en el caso de la proteína de Fusión A, y por lo tanto, la proteína de la presente invención exhibió una alta estabilidad frente a la exposición a pH bajo. Por lo tanto, la proteína de la presente invención es excelente en términos de estabilidad a pH bajo y, por lo tanto, se espera la mejora de la eficiencia de purificación y la productividad en el proceso de producción.

20 Ejemplo de Prueba 3

Prueba respecto a la estabilidad frente al calor.

25 (1) Preparación de muestra

Se realizó una operación de purificación utilizando AKTA Explorer 10 S (GE Healthcare). Se permitió que la proteína 1 se expresara por el mismo método que el descrito en el Ejemplo 1, y se cargó un sobrenadante de cultivo de la misma en HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare, 17-0034-94). La columna descrita anteriormente se lavó con STF-D(-) y un regulador de citrato 100 mM (pH 4,0), y luego se eluyó un adsorbato de proteína A con un regulador de glicina-HCl 100 mM (pH 3.3). Se añadió un regulador Tris-HCl 1 M (pH 9.0) a un volumen de 1/10 a la fracción recuperada para neutralizarla, a fin de obtener una proteína purificada con proteína A. El pH de esta proteína purificada con proteína A se ajustó a pH 4.0 mediante la adición de HCl 1 N, y luego se cargó en una columna llena con una resina de modo mixto de interacción hidrófoba e intercambio catiónico. Una proteína no adsorbida se lavó con un regulador de acetato 50 mM (pH 4.0), y la elución de gradiente lineal al 100% se llevó a cabo con un regulador Tris-Hcl 50 mM (pH 9.0). Se recuperó una fracción máxima para obtener una proteína purificada. La proteína obtenida se sometió a fraccionamiento por filtración en gel, utilizando STF-D(-) como fase móvil, y empleando HiLoad 16/60 Superdex 200 grado preparativo (GE Healthcare, 17-1069-01). Se recuperó una fracción pico correspondiente a un monómero para obtener una muestra purificada por filtración en gel. Esta muestra purificada por filtración en gel se ajustó nuevamente con STF-D(-), y luego se vertió en un microtubo, seguido de incubación a 37°C, para obtener una muestra de evaluación. Se tomó una muestra alícuota de esta muestra de evaluación en un momento predeterminado (1 día a 7 días después de la conservación a 37°C), para obtener una muestra de tratamiento térmico.

45 Como control, se usó la proteína de Fusión A descrita en la Literatura No Patente 3. Se permitió que la proteína de Fusión A se expresara por el mismo método que en el Ejemplo 1, y luego, se obtuvo una muestra de tratamiento térmico por el mismo método que el método mencionado anteriormente. Debe observarse que la proteína de Fusión

A usada en la presente prueba es una proteína que consiste en la misma secuencia de aminoácidos que la de la proteína usada en el Ejemplo de Prueba 2.

(2) Método de análisis de contenido de agregados

5 Con respecto a la operación de análisis de agregados, el contenido de los agregados se confirmó realizando una cromatografía de filtración en gel usando Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare, 17-5175-01), empleando AKTA Explorer 10 S (GE Healthcare), y también utilizando STF-D(-) como fase móvil. Se calcularon las áreas de un pico cuya posición eluida era un monómero y un pico agregado eluido en una región de alto peso molecular, y se evaluó una transición de un cambio en la tasa de contenido de agregados (%) en la Proteína 1 y la proteína de Fusión A, que fue causada mediante un tratamiento térmico, (Figura 3).

(3) Resultados

15 En la proteína de la presente invención, el nivel aumentado del contenido de agregados después de la conservación a 37°C fue menor que en el caso de la proteína de Fusión A, y por lo tanto, la proteína de la presente invención mostró más estabilidad frente a la exposición a 37°C. Por lo tanto, la proteína de la presente invención es excelente en términos de estabilidad frente al calor, así como estabilidad a pH bajo, y por lo tanto, se espera la mejora de la eficiencia de purificación y productividad en el proceso de producción.

20 Aplicabilidad Industrial

Dado que la proteína de la presente invención tiene una excelente actividad neutralizante contra IgE, puede usarse como un producto farmacéutico proteico para prevenir o tratar diversas enfermedades mediadas por la IgE.

25 Texto libre de secuenciación

SEQ ID NO: 2 Sintetizada

30 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente descripción se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Kissei Farmacéutica Co., Ltd.

<120> Un receptor de IgE de alta afinidad fusionado con Fc γ 2 cadena

<130> PH-6451-PCT

40 <150> JP 2015-032231

<151> 2015-02-20

45 <150> JP 2015-252231

<151> 2015-12-24

<160> 4

50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

55 <211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

60 <400> 1

ES 2 806 205 T3

Val Pro Gln Lys Pro Lys Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Asn Asn Phe Phe
20 25 30

Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu
35 40 45

Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly
50 55 60

Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val
85 90 95

Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn
100 105 110

Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys
115 120 125

Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu
130 135 140

Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys Thr Gly Lys Val Trp Gln Leu Asp Tyr
145 150 155 160
Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys
165 170 175

Tyr Trp Leu

<210> 2

5

<211> 14

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

15

ES 2 806 205 T3

Val Pro Gln Lys Pro Lys Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile
 1 5 10 15

Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Asn Asn Phe Phe
 20 25 30

Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu
 35 40 45

Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly
 50 55 60

Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val
 85 90 95

Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn
 100 105 110

Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys
 115 120 125

ES 2 806 205 T3

Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu
 130 135 140

Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys Thr Gly Lys Val Trp Gln Leu Asp Tyr
 145 150 155 160

Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys
 165 170 175

Tyr Trp Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 180 185 190

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 195 200 205

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 210 215 220

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 225 230 235 240

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 245 250 255

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 260 265 270

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 275 280 285

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 290 295 300

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 305 310 315 320

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 325 330 335

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 340 345 350

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 355 360 365

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 370 375 380

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 385 390 395 400

ES 2 806 205 T3

<210> 4

<211> 406

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

ES 2 806 205 T3

Val Pro Gln Lys Pro Lys Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Asn Asn Phe Phe
20 25 30

Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu
35 40 45

Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly
50 55 60

Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val
85 90 95

Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn
100 105 110

Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys
115 120 125

Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu
130 135 140

Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys Thr Gly Lys Val Trp Gln Leu Asp Tyr
145 150 155 160

Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys
165 170 175

Tyr Trp Leu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
180 185 190

ES 2 806 205 T3

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 195 200 205

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 210 215 220

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 225 230 235 240

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 245 250 255

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 260 265 270

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 275 280 285

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 290 295 300

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 305 310 315 320

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 325 330 335

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 340 345 350

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 355 360 365

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 370 375 380

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 385 390 395 400

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 405

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión Fc que comprende:
- 5 (i) una cadena α del receptor de IgE de alta afinidad; y
- (ii) la región Fc de IgG1, en donde
- 10 la región del fragmento conector entre (i) y (ii) es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.
2. La proteína de fusión Fc de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3, o una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación de lisina (K) en el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3.
- 15 3. La proteína de fusión Fc según la reivindicación 1 o 2, que es un dímero.
4. La proteína de fusión Fc según la reivindicación 3, en la que los residuos de cisteína en la región del fragmento conector forman tres enlaces disulfuro.
- 20 5. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, la proteína de fusión Fc de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

Fig.1

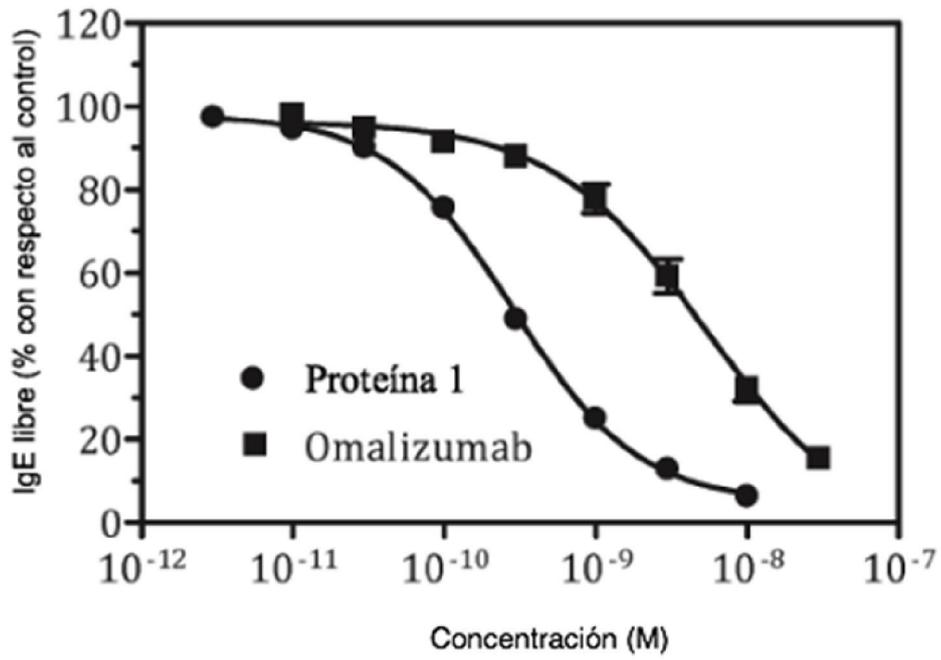


Fig.2

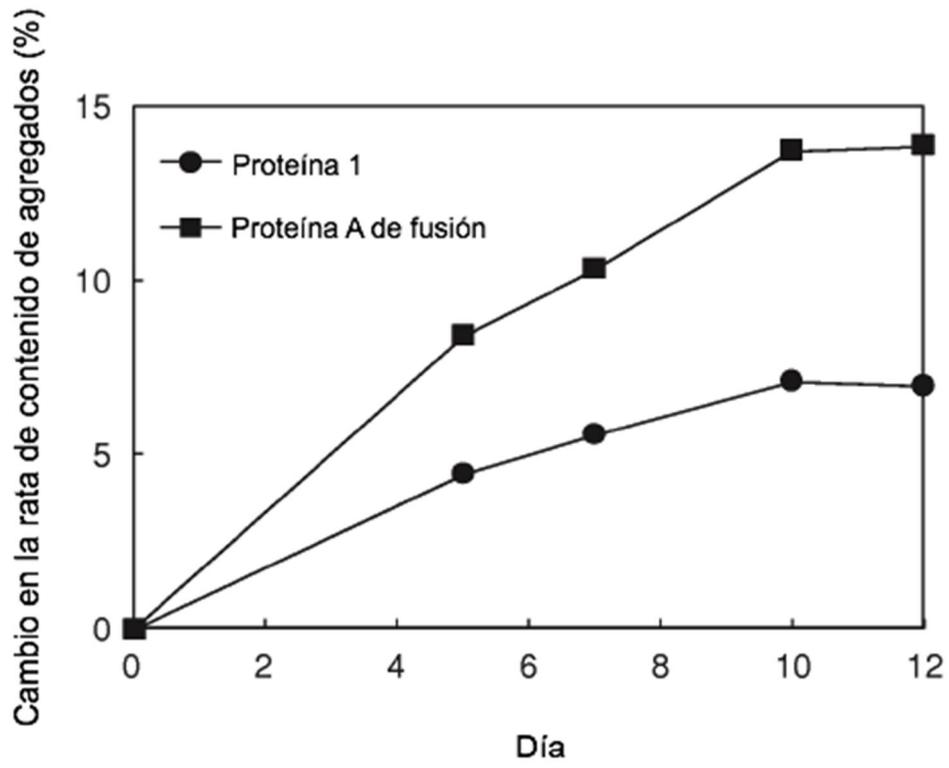


Fig.3

