

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 109**

51 Int. Cl.:

C07K 1/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2015 PCT/US2015/036330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15200080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2015 E 15733963 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3157942**

54 Título: **Modificaciones de proteínas específicas para un sitio**

30 Prioridad:

23.06.2014 US 201462015868 P
20.11.2014 US 201462082337 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2021

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

USERA, AIMEE RICHARDSON;
YUAN, JUN y
LOU, CHANGGANG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 818 109 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

Modificaciones de proteínas específicas para un sitio

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a un nuevo método para introducir grupos modificadores en una proteína o un polipéptido. En particular, la presente invención se refiere a la derivación selectiva de la funcionalidad amino en el extremo N de la proteína o el polipéptido utilizando la presencia de un aminoácido histidina vecino para incrementar la reactividad de la funcionalidad amino N-terminal.

10

Antecedentes de la invención

Es bien sabido que las propiedades y características de las proteínas o péptidos pueden modificarse conjugando grupos a la proteína o el péptido. Por lo general, dicha conjugación requiere generalmente que algún grupo funcional en la proteína reaccione con otro grupo funcional en un grupo de conjugación. Se han utilizado grupos amino tales como el grupo amino N-terminal o el grupo ϵ -amino en residuos de lisina en combinación con reactivos de acilación adecuados para este fin. A menudo se desea o es necesario controlar la reacción de conjugación, tal como en los casos en los que los compuestos de conjugación se fijan a la proteína y controlar cuántos grupos de conjugación están fijados. Esto a menudo se denomina especificidad o selectividad.

20

La modificación específica para el sitio de proteínas o péptidos es un antiguo desafío en las técnicas farmacéutica y biotecnológica. Los métodos clásicos conducen a menudo a un marcaje no específico (p. ej., marcaje NHS) o requieren modificación (p. ej., marcaje con maleimida Cys o aminoácidos no naturales). Además, el repertorio de reacciones químicas selectivas, sin embargo, es muy limitado. Una alternativa es introducir, mediante métodos recombinantes, aminoácidos artificiales especiales que tengan una reactividad única y a continuación explotar esta reactividad en la derivación adicional. Otra alternativa es el uso de enzimas que reconocen rasgos estructurales y funcionales de la proteína a modificar.

25

30

A pesar de los métodos recombinantes, la derivatización selectiva de proteínas/péptidos sigue siendo una tarea muy difícil. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de un método general de derivatizar selectivamente residuos de aminoácidos tal como en el extremo N de una proteína o un péptido

Sumario de la invención

35

La presente invención se refiere a un método tal como se define en las reivindicaciones para modificar una proteína diana o un péptido diana en la funcionalidad amino del aminoácido N-terminal, que comprende las etapas de:

a. modificar la proteína diana o el péptido diana de modo que la proteína o el péptido resultante contenga un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal; y

40

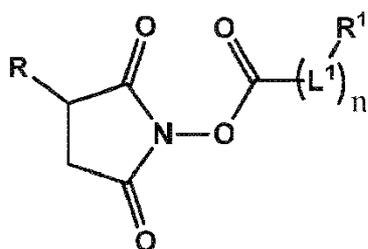
b. poner en contacto la proteína o el péptido que contiene un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal con un compuesto acilante a un pH inferior a 6, para formar una proteína o un polipéptido modificado.

45

Se describen métodos para modificar la proteína diana o el péptido diana de modo que la proteína o el péptido resultante contenga un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal. Métodos de este tipo se describirán con mayor detalle en esta memoria.

50

La invención, según se define en las reivindicaciones, pertenece al método selectivo para modificar una proteína diana o un péptido diana tal como se describe arriba utilizando un agente acilante de Fórmula:



en donde:

55

L¹ es un enlazador;

R es H o $-S(O)_2Na$;

5 R¹ es un resto que comprende un grupo reactivo que facilita la unión covalente a un agente biointeractivo o a un agente analítico o R¹ es un agente biointeractivo o un agente analítico,

n es 0 o 1.

10 La divulgación que abarca la invención pertenece al método selectivo para modificar una proteína o un péptido en el grupo amino N-terminal tal como se describe en esta memoria, en donde el agente biointeractivo o analítico se selecciona de biotina, fluoróforo, toxina, quelante, un resto que extiende la semivida (tal como, por ejemplo, resto de unión a albúmina, variante de Fc o Fc nativo), un reactivo de formación de imágenes y un péptido.

15 La invención pertenece al método selectivo para modificar una proteína o un péptido en el grupo amino N-terminal tal como se define en las reivindicaciones, en donde R¹ es un resto que comprende un grupo reactivo que facilita la unión covalente a un agente biointeractivo o analítico. En un aspecto particular, el método de la invención comprende, además, una etapa de hacer reaccionar un agente biointeractivo o un agente analítico con el grupo reactivo presente en el agente acilante.

20 En una realización, la proteína diana o el péptido diana se selecciona de una proteína del factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15), homólogos, variantes, fragmentos y otra forma modificada de los mismos, Fc nativo, Fc variante o péptido agonista de APJ.

25 Estos y otros aspectos de la invención se explicarán en la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción del dibujo

Descripción detallada

30 **Definición:**

Para los fines de interpretar esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones, a menos que se especifique lo contrario y cuando sea apropiado, los términos y las expresiones utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa.

35 La presente invención se dirige a las necesidades mencionadas anteriormente, proporcionando un método de introducir compuestos modificadores en una proteína o un péptido diana de una manera selectiva.

40 Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto dictamine claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia al "conjugado" incluye la referencia a uno o más conjugados ; la referencia al "polipéptido" incluye la referencia a uno o más polipéptidos, etcétera.

45 El término alquilo se refiere a un resto hidrocarbonado ramificado o no ramificado (o de cadena lineal o no lineal) completamente saturado, que comprende 1 a 30 átomos de carbono. Preferiblemente, el alquilo comprende 5 a 20 átomos de carbono, y más preferiblemente 10 a 15 átomos de carbono. Alquilo C₁₀₋₁₅ se refiere a una cadena de alquilo que comprende de 10 a 15 carbonos.

50 El término "alqueno" se refiere a un hidrocarburo ramificado o no ramificado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El término "alqueno C₂₋₃₀" se refiere a un hidrocarburo que tiene de dos a siete átomos de carbono y que comprende al menos un triple enlace carbono-carbono.

55 El término "alquino" se refiere a un hidrocarburo ramificado o no ramificado que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. El término "alquino C₂₋₃₀" se refiere a un hidrocarburo que tiene de dos a siete átomos de carbono y que comprende al menos un triple enlace carbono-carbono.

El término arilo se refiere a grupos hidrocarbonados aromáticos, monocíclicos o bicíclicos, que tienen 6-10 átomos de carbono en la porción del anillo. Ejemplos representativos de arilo son fenilo o naftilo.

60 El término heteroarilo incluye heteroarilo monocíclico o bicíclico, que contiene de 5-10 miembros del anillo seleccionados de átomos de carbono y de 1 a 5 heteroátomos, y cada uno de los heteroátomos se selecciona independientemente de O, N o S, en donde S y N pueden oxidarse a diversos estados de oxidación. Para el sistema heteroarilo bicíclico, el sistema es completamente aromático (es decir, todos los anillos son aromáticos).

- 5 El término cicloalquilo se refiere a grupos hidrocarbonados monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos saturados o insaturados, pero no aromáticos de 3-12 átomos de carbono, preferiblemente 3-8 o 3-7 átomos de carbono. Para el sistema cicloalquilo bicíclico y tricíclico, todos los anillos son no aromáticos. Por ejemplo, cicloalquilo abarca cicloalqueno y cicloalquino. El término "cicloalqueno" se refiere a un grupo hidrocarbonado bicíclico o tricíclico de 3-12 átomos de carbono, que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El término "cicloalquino" se refiere a un grupo hidrocarbonado bicíclico o tricíclico de 3-12 átomos de carbono, que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono.
- 10 El término heterociclilo se refiere a un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico no aromático (parcialmente insaturado pero no aromático) saturado o insaturado que contiene al menos un heteroátomo seleccionado de O, S y N, en que N y S también pueden ser opcionalmente oxidado a diversos estados de oxidación. En una realización, el resto heterociclilo representa un anillo monocíclico saturado que contiene de 5-7 átomos de anillo y que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional, seleccionado de O, S o N. El anillo heterocíclico puede estar sustituido con alquilo, halo, oxo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi. En otra realización, el heterociclilo es dicíclico o tricíclico. Para el sistema policíclico, algunos anillos pueden ser aromáticos y estar condensados a un anillo o anillos saturados o parcialmente saturados. El sistema condensado global no es completamente aromático. Por ejemplo, un sistema de anillo heterocíclico puede ser un anillo de heteroarilo aromático condensado con un sistema de anillo de cicloalquilo saturado o parcialmente saturado.
- 15 El término " conjugado " pretende referirse a la entidad formada como resultado de una unión covalente de la proteína/el péptido diana a un agente biointeractivo/analítico, opcionalmente a través de un enlazador. El término "conjugación" pretende referirse a la etapa de unir covalentemente la proteína/el péptido diana a un agente biointeractivo/analítico, opcionalmente a través de un enlazador.
- 20 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos, ya sea que se produzcan de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos se denominan comúnmente «péptidos». El término "péptido" pretende indicar una secuencia de dos o más aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos, en donde dichos aminoácidos pueden ser naturales o no naturales. El término engloba los términos polipéptidos y proteínas, que pueden estar constituidos por dos o más péptidos que se mantienen unidos mediante interacciones covalentes tales como, por ejemplo, puentes de cisteína o interacciones no covalentes. Las abreviaturas de una o tres letras reconocidas en la técnica se utilizan para representar residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando está precedido por "D", el aminoácido es un L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra se refiere al D-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minúscula, se refiere al L-aminoácido. Se utilizan grupos o cadenas o abreviaturas de aminoácidos para representar péptidos. Los péptidos se indican con el extremo N a la izquierda y la secuencia se escribe desde el extremo N al extremo C.
- 25 Los péptidos de la invención contienen aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se encuentran en la naturaleza) y se pueden emplear alternativamente otros análogos de aminoácidos conocidos en la técnica.
- 30 Ciertos aminoácidos no naturales pueden introducirse mediante la tecnología descrita en Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang y Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang et al., Science 292:498-500, 2001; Zhang et al., Science 303:371-373, 2004 o en la Patente de EE.UU. Nº 7.083.970. Brevemente, algunos de estos sistemas de expresión implican mutagénesis dirigida al sitio para introducir un codón sin sentido, tal como un TAG ámbar, en el marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención. A continuación, vectores de expresión de este tipo se introducen en un huésped que puede utilizar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido y se carga con el aminoácido no natural de elección. Aminoácidos no naturales particulares que son beneficiosos con el propósito de conjugar restos con los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con cadenas laterales de acetileno y azido.
- 35 Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos tales como grupos carbohidrato. Algunos carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a una proteína por la célula en la que la se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en esta memoria en términos de sus estructuras de la cadena principal de aminoácidos; sustituyentes tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero aún así pueden estar presentes. Una proteína o polipéptido codificado por una molécula de ADN que no es del hospedador es una proteína o polipéptido "heterólogo".
- 40 Un "polipéptido aislado o proteína aislada" es un polipéptido o una proteína (por ejemplo GDF15) que está esencialmente libre de componentes celulares, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Típicamente, una preparación de polipéptido o proteína aislado contiene el polipéptido o la proteína en una forma altamente purificada, es decir, al menos aproximadamente un 80% pura, al menos aproximadamente un 90% pura, al menos aproximadamente un 95% pura, más de 95% pura, tal como como 96%, 97% o 98% o más pura, o más del 99% pura. Una forma de demostrar que una preparación de proteína particular

contiene un polipéptido o una proteína aislada es mediante la aparición de una sola banda después de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS) de la preparación de proteína y la tinción con azul brillante de Coomassie del gel. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido o proteína en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativamente glicosiladas o derivatizadas.

5 Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido contaminante u otros contaminantes que se encuentren en su entorno natural que interfieran con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación.

Un experto ordinario en la técnica apreciará que se pueden realizar diversas sustituciones de aminoácidos, p. ej., sustituciones de aminoácidos conservativas, en la secuencia de cualquiera de los polipéptidos o proteínas descritos en esta memoria, sin disminuir necesariamente su actividad. Tal como se utiliza en esta memoria, "aminoácido comúnmente utilizado como un sustituto del mismo" incluye sustituciones conservativas (es decir, sustituciones con aminoácidos de características químicas equiparables). Para los fines de la sustitución conservadora, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, glicina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares (hidrofílicos) neutros incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (de carácter básico) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (de carácter ácido) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos incluyen sustituir un L-aminoácido por su correspondiente D-aminoácido, sustituir cisteína por homocisteína u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene tiol, sustituir una lisina por homolisina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiónico, ornitina u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene amino, o sustituyendo una alanina por norvalina o similares.

El término "aminoácido", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a aminoácidos que se producen de forma natural, aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de forma natural, todos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite formas estereoisoméricas de este tipo. A los aminoácidos se les puede aludir en esta memoria por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

La expresión "se producen de forma natural" se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por el hombre. De manera similar, "no se producen de forma natural", "no natural" y similares, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre. Cuando se utiliza en relación con los aminoácidos, la expresión "se producen de forma natural" se refiere a los 20 aminoácidos convencionales (es decir, alanina (A o Ala), cisteína (C o Cys), ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu), fenilalanina (F o Phe), glicina (G o Gly), histidina (H o His), isoleucina (I o Ile), lisina (K o Lys), leucina (L o Leu), metionina (M o Met), asparagina (N o Asn), prolina (P o Pro), glutamina (Q o Gln), arginina (R o Arg), serina (S o Ser), treonina (T o Thr), valina (V o Val), triptófano (W o Trp) y tirosina (Y o Tyr)).

Las expresiones "aminoácido no natural" y "aminoácido antinatural", tal como se utilizan en esta memoria, pretenden representar indistintamente estructuras de aminoácidos que no se pueden generar biosintéticamente en organismo alguno utilizando genes no modificados o modificados de cualquier organismo, ya sea el mismo o diferente. Las expresiones se refieren a un residuo de aminoácido que no está presente en la secuencia o de la proteína que se produce de forma natural (tipo salvaje) o en las secuencias de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a aminoácidos modificados y/o análogos de aminoácidos que no son uno de los 20 aminoácidos que se producen de forma natural, selenocisteína, pirrolisina (Pyl) o pirrolina-carboxilisina (Pcl, p. ej., tal como se describe en la publicación de patente PCT WO2010/48582). Residuos de aminoácidos no naturales pueden introducirse mediante sustitución de aminoácidos que se producen de forma natural y/o mediante inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia de proteínas que se producen de forma natural (tipo salvaje) o las secuencias de la invención. El residuo de aminoácido no natural también se puede incorporar de modo que se imparta una funcionalidad deseada a la molécula, por ejemplo, la capacidad de enlazar un resto funcional (p. ej., PEG). Cuando se utiliza en relación con los aminoácidos, el símbolo "U" se entenderá como "aminoácido no natural" y "aminoácido antinatural", tal como se utiliza en esta memoria.

El término "análogo", tal como se utiliza en esta memoria, para referirse a un polipéptido o proteína significa un péptido o proteína modificado en donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido/la proteína han sido sustituidos con otros residuos de aminoácidos y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado del péptido/la proteína y/o en donde se han añadido uno o más residuos de aminoácidos al péptido/la proteína. Una adición o eliminación de residuos de aminoácidos de este tipo puede tener lugar en el extremo N-terminal del péptido y/o en el extremo C-terminal del péptido.

El término "APJ" (al que también se alude como "receptor de apelina", "receptor de tipo 1 de angiotensina", "receptor de tipo 1 de angiotensina II" y similares) indica un dominio de transmembrana 7 de 380 residuos, receptor acoplado a *G_i*, cuyo gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 11 en seres humanos (Secuencia de Referencia NCBI: NP_005152.1, y codificado por Secuencia de Referencia NCBI: NM_005161). APJ se clonó por primera vez en 1993

a partir de ADN genómico humano utilizando cebadores oligonucleotídicos degenerados (O'Dowd et al. Gene, 136: 355-60, 1993) y comparte una homología significativa con el receptor de angiotensina II, tipo 1. Sin embargo, a pesar de esta homología, la angiotensina II no se une a APJ. Aunque ha sido huérfano durante muchos años, el ligando endógeno se ha aislado y se ha denominado apelina (Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

El término "agonista de APJ" incluye polipéptidos de apelina: Apelina indica una preproteína de 77 residuos (Secuencia de Referencia NCBI: NP_0059109.3, y codificado por Secuencia de Referencia NCBI: NM_017413.3), que se procesa en formas biológicamente activas de péptidos de apelina, tales como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12. El péptido maduro de longitud completa, al que se alude como "apelina-36", comprende 36 aminoácidos, pero la isoforma más potente es la forma piroglutamada de un 13mero de apelina (apelina-13), al que se alude como "Pyr-1-apelina-13 o Pyr¹-apelina-13". Se describen diferentes formas de apelina, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 6.492.324 B1. Agonistas de péptidos de apelina también se describen en las solicitudes de patente números WO 2013/111110, WO 2014/081702, WO 2015/013168, WO 2015/013165, WO 2015/013167 y WO 2015/013169.

Las expresiones "polipéptido GDF15" y "proteína GDF15" se utilizan indistintamente y significan un polipéptido que se produce de forma natural de tipo salvaje expresado en un mamífero, tal como un ser humano o un ratón. Para los fines de esta divulgación, la expresión "proteína GDF15" puede utilizarse indistintamente para referirse a cualquier polipéptido GDF15 de longitud completa, que consiste en 308 residuos de aminoácidos; (NCI Ref. Seq. NP_004855.2) que contiene un péptido señal de 20 aminoácidos, un prodominio de 167 aminoácidos y un dominio maduro de 112 aminoácidos que se escinde del prodominio mediante proteasas de tipo furina. A un polipéptido de 308-aminoácidos GDF15 se le alude como polipéptido GDF15 de "longitud completa"; un polipéptido GDF15 de 112 aminoácidos (p. ej., los aminoácidos 197-308) es un polipéptido GDF15 "maduro". El péptido GDF15 maduro contiene los siete residuos de cisteína conservados, requeridos para la formación del motivo del nudo de cisteína (que tiene tres enlaces disulfuro intracatenarios) y el enlace disulfuro intercatenario único que son típicos de los miembros de la superfamilia TGF. El péptido GDF15 maduro contiene dos residuos de cisteína adicionales que forman un cuarto enlace disulfuro intracatenario. Por lo tanto, GDF15 biológicamente activo es un homodímero del péptido maduro enlazado covalentemente por un enlace disulfuro intercatenario. Por lo tanto, una proteína o polipéptido GDF15 también incluye un multímero, más particularmente un dímero de la proteína.

El término "polipéptido mutante GDF15" abarca un polipéptido GDF15 en el que se ha modificado una secuencia polipeptídica GDF15 que se produce de forma natural. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, una o más sustituciones de aminoácidos, incluyendo sustituciones con aminoácidos que no se producen de forma natural, análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural y miméticos de aminoácidos.

En un aspecto, la expresión "proteína mutante GDF15" se refiere a una secuencia de la proteína GDF15 (p. ej., SEQ ID NO 1 -8) en la que al menos un residuo que normalmente se encuentra en una posición dada de un polipéptido GDF15 nativo se elimina o se sustituye con un residuo que normalmente no se encuentra en esa posición en la secuencia nativa de GDF15. En algunos casos, será deseable reemplazar un único residuo que normalmente se encuentra en una posición dada de un polipéptido GDF15 nativo con más de un residuo que normalmente no se encuentra en la posición; en aún otros casos, puede ser deseable mantener la secuencia de polipéptido GDF15 nativa e insertar uno o más residuos en una posición dada en la proteína; en aún otros casos, puede ser deseable eliminar por completo un residuo determinado ; todas estas construcciones quedan abarcadas por la expresión "proteína mutante GDF 15". La presente invención también abarca moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias polipeptídicas mutantes GDF15 de este tipo.

En diversas realizaciones, una proteína GDF15 mutante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 85 por ciento idéntica a una proteína GDF15 que se produce de forma natural. En otras realizaciones, un polipéptido GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90 por ciento, o aproximadamente 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento idéntica a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido GDF15 que se produce de forma natural. Polipéptidos GDF15 mutantes de este tipo preferiblemente, pero no necesariamente, poseen al menos una actividad de un polipéptido mutante de GDF15 de tipo salvaje, tal como la capacidad de reducir los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos o colesterol en sangre; la capacidad de reducir el peso corporal; o la capacidad de mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético o la sensibilidad a la insulina.

Aunque los polipéptidos GDF15 y los polipéptidos GDF15 mutantes, y las construcciones que comprenden este tipo de polipéptidos se describen principalmente en términos de GDF15 humana, la invención no está limitada y se extiende a los polipéptidos GDF15 y los polipéptidos GDF15 mutantes y las construcciones que comprenden este tipo de polipéptidos, en que los polipéptidos GDF15 y los polipéptidos GDF15 mutantes se derivan de otras especies (p. ej., monos cynomolgus, ratones y ratas). En algunos casos, puede utilizarse un polipéptido GDF15 o un polipéptido GDF15 mutante para tratar o mejorar un trastorno metabólico en un sujeto en una forma madura de un polipéptido GDF15 mutante que se deriva de la misma especie que el sujeto.

Un polipéptido GDF15 mutante es preferiblemente biológicamente activo. En diversas realizaciones respectivas, un polipéptido GDF15 o un polipéptido GDF15 mutante tiene una actividad biológica que es equivalente a, mayor o menor que la de la forma que se produce de forma natural de la proteína GDF15 madura. Ejemplos de actividades biológicas incluyen la capacidad de reducir los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos o colesterol en sangre; la capacidad de reducir el peso corporal; o la capacidad de mejorar la tolerancia a la glucosa, la tolerancia a los lípidos o la sensibilidad a la insulina; la capacidad de reducir la excreción de glucosa y proteínas en la orina.

Tal como se utiliza en esta memoria, en el contexto de la estructura de un polipéptido o proteína, el término "N-terminal" (o "extremo amino") y "C-terminal" (o "extremo carboxilo") se refieren a los extremos amino y carboxilo del polipéptido, respectivamente. La expresión "aminoácido N-terminal" se refiere al último aminoácido presente en el extremo N. La expresión "aminoácido adyacente al aminoácido del extremo N" se refiere al aminoácido presente en la posición adyacente al último aminoácido del extremo N (es decir, el segundo aminoácido presente en la proteína o el péptido, contando desde el extremo N).

La expresión resto que prolonga la semivida se refiere, por ejemplo, a un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), ácidos grasos, un grupo colesterol, un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína, polipéptido o péptido natural o sintético que se une a un receptor de rescate. El resto que prolonga la semivida puede unirse a las proteínas plasmáticas (p. ej., albúmina e inmunoglobulina) con semividas séricas prolongadas. Por ejemplo, el resto que prolonga la semivida es un dominio constante de IgG o un fragmento del mismo (p. ej., la región Fc), albúmina de suero humano (HSA) o polipéptidos de unión a albúmina. El resto que prolonga la semivida puede ser un residuo de unión a albúmina u otro residuo de unión a proteínas plasmáticas. Un "residuo de unión a albúmina", tal como se utiliza en esta memoria, significa un residuo que se une de forma no covalente a la seroalbúmina humana. En una divulgación, el residuo de unión a albúmina es un residuo lipofílico. En otra divulgación, el residuo de unión a albúmina se carga negativamente a pH fisiológico. Un residuo de unión comprende típicamente un ácido carboxílico que puede estar cargado negativamente. En una realización, el resto que prolonga la semivida es un ácido graso, que se puede definir como una cadena de alquilo C6-70, de alqueno C6-70 o de alquino C6-70, cada una de las cuales está sustituida con al menos un ácido carboxílico (por ejemplo 1, 2, 3 o 4 CO₂H) y opcionalmente sustituida adicionalmente con un grupo hidroxilo. Ejemplos de ácidos grasos se definen mediante las Fórmulas A1, A2 y A3. En otra divulgación, el resto que prolonga la semivida es una molécula pequeña que se une de forma no covalente a una proteína plasmática (p. ej., albúmina). Moléculas pequeñas de este tipo son, por ejemplo, warfarina, aspirina, derivados de benzodiazepina (p. ej., diazepam), indoles, cardenólidos (p. ej., digitoxina) y ácidos biliares.

Restos que prolongan la semivida incluyen albúmina, que se refiere a la proteína más abundante en el plasma sanguíneo que tiene un peso molecular de aproximadamente entre 65 y 67 kilodalton en su forma monomérica, dependiendo de la especie de origen. El término "albúmina" se utiliza indistintamente con "albúmina del suero" y no pretende definir la fuente de albúmina que forma un conjugado con los péptidos modificados de la invención. Por tanto, el término "albúmina", tal como se utiliza en esta memoria, puede referirse a albúmina purificada de una fuente natural tal como sangre o fluis serosa, o puede referirse a albúmina sintetizada químicamente o producida de manera recombinante.

Restos que prolongan la semivida incluyen "Fc nativo", que se refiere a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento que no se une al antígeno, resultante de la digestión del anticuerpo completo o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región de bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc nativo es preferiblemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Las moléculas de Fc nativas están formadas por polipéptidos monoméricos que pueden enlazarse para dar formas diméricas o multiméricas por asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (p. ej., IgG, IgA e IgE) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 e IgA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG (véase Ellison et al., 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). La expresión "Fc nativo", tal como se utiliza en esta memoria, es genérica para las formas monomérica, dimérica y multimérica.

Los restos que prolongan la semivida incluyen la "variante Fc" que se refiere a una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc nativo, pero que aún comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn (receptor Fc neonatal). Las publicaciones internacionales N°s WO 97/34631 y WO 96/32478 describen variantes de Fc a modo de ejemplo, así como la interacción con el receptor de rescate. Por lo tanto, la expresión "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que se pueden separar, porque proporcionan características estructurales o actividad biológica que no se requieren para el bioconjugado de la invención. Así, la expresión "variante Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos Fc nativos, o en la que uno o más sitios o residuos Fc han sido modificados, que afectan o están implicados en: (1) formación de enlace disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) unión a un receptor Fc que no sea un receptor de rescate o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las variantes de Fc se describen con mayor detalle más adelante en esta memoria.

Los restos que prolongan el semitiempo se refieren a "dominio Fc" que abarca Fc nativos y variantes de Fc y secuencias tal como se definió arriba. Al igual que con las variantes de Fc y las moléculas de Fc nativas, la expresión "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sea digeridas a partir del anticuerpo completo o producidas por otros medios. Un dominio Fc puede conjugarse con un polipéptido de Fórmula I' o cualquiera de las Fórmulas I-IX mediante, por ejemplo, un enlace covalente entre el dominio Fc y la secuencia peptídica. Proteínas Fc de este tipo pueden formar multímeros mediante la asociación de los dominios Fc y tanto estas proteínas Fc como sus multímeros son un aspecto de la presente invención.

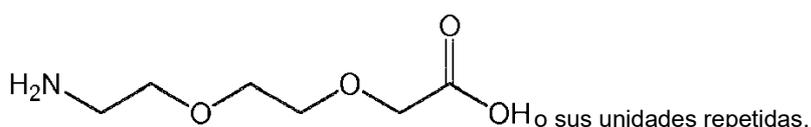
Restos que prolongan la semivida incluyen "fragmento Fc modificado", que significará un fragmento Fc de un anticuerpo que comprende una secuencia modificada. El fragmento Fc es una porción de un anticuerpo que comprende CH₂, CH₃ y parte de la región de bisagra. El fragmento Fc modificado puede derivarse de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. FcLALA es un fragmento Fc modificado con una mutación LALA (L234A, L235A), que desencadena ADCC con menor eficiencia y se une y activa el complemento humano débilmente. Hessel et al. 2007 Nature 449:101-104. Se describen modificaciones adicionales al fragmento Fc, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 7.217.798.

El enlazador separa la proteína/el péptido diana y el agente biointeractivo/analítico o cualquier resto que comprenda un grupo reactivo que facilite la unión covalente al agente biointeractivo/analítico. En esta descripción, su estructura química no es crítica, ya que sirve principalmente como un espaciador.

El enlazador es un resto químico que contiene dos grupos reactivos/grupos funcionales, uno de los cuales puede reaccionar con el péptido/la proteína diana y el otro con el agente biointeractivo/bioanalítico. Los dos grupos reactivos/funcionales del enlazador están enlazados a través de un resto enlazador o espaciador, cuya estructura no es crítica siempre que no interfiera con el acoplamiento del enlazador a la proteína/el péptido diana y con el agente biointeractivo/analítico.

El enlazador puede estar constituido por aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos. El enlazador puede estar compuesto por 1 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en donde los aminoácidos se seleccionan entre los 20 aminoácidos que se producen de forma natural. Los 1 a 20 aminoácidos pueden seleccionarse entre los aminoácidos glicina, serina, alanina, metionina, asparagina, glutamina, cisteína y lisina. Un enlazador puede estar formado por una mayoría de aminoácidos que no tienen impedimentos estéricos, tales como glicina y alanina. Los enlazadores pueden ser poliglicinas, polialaninas, combinaciones de glicina y alanina (tales como poli(Gly-Ala)) o combinaciones de glicina y serina (tales como poli(Gly-Ser)).

El enlazador puede comprender de 1 a 20 aminoácidos que se seleccionan de aminoácidos antinaturales. Mientras que un enlazador de 1 - 10 residuos de aminoácidos se prefiere para la conjugación con el agente biointeractivo o analítico, la presente divulgación contempla enlazadores de cualquier longitud o composición. Un ejemplo de enlazador de aminoácidos no natural es el ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico que tiene la siguiente fórmula:



Los enlazadores descritos en esta memoria son a modo de ejemplo, y se contemplan enlazadores que son mucho más largos y que incluyen otros residuos. También se contemplan enlazadores no peptídicos.

Alternativamente, el enlazador puede comprender uno o más grupos alquilo, grupos alquenoilo, grupos cicloalquilo, grupos arilo, grupos heteroarilo, grupos heterocíclicos, polietilenglicol y/o uno o más aminoácidos naturales o no naturales, o una combinación de los mismos, en donde cada uno de los grupos alquilo, alquenoilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclico, polietilenglicol y/o los aminoácidos naturales o antinaturales se combinan y enlazan opcionalmente entre sí, o se enlazan al agente biointeractivo/analítico y/o a la proteína/el péptido diana, mediante un grupo químico seleccionado de -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -O-, -NH-, -S-, -C(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)-O-, =NH-O-, =NH-NH- o =NH-N(alquilo)-.

Los enlazadores que contienen un espaciador de alquilo son, por ejemplo, -NH-(CH₂)_z-C(O)- o -S-(CH₂)_z-C(O)- u -O-(CH₂)_z-C(O)-, -NH-(CH₂)_z-NH-, -O-C(O)-(CH₂)_z-C(O)-O-, -C(O)-(CH₂)_z-O-, -NHC(O)-(CH₂)_z-C(O)-NH- y similares, en donde z es 2-20 se pueden utilizar. Estos enlazadores de alquilo pueden estar sustituidos, además, por cualquier grupo que no obstaculice estéricamente, incluyendo, pero no limitado a un alquilo inferior (p. ej., C₁-C₆), acilo inferior, halógeno (p. ej., Cl, Br), CN, NH₂ o fenilo.

El enlazador también puede ser de naturaleza polimérica. El enlazador puede incluir cadenas o unidades de polímero que sean bioestables o biodegradables. Los polímeros con enlaces repetidos pueden tener diversos grados de

estabilidad en condiciones fisiológicas dependiendo de la labilidad del enlace. Los polímeros pueden contener enlaces como policarbonatos (-O-C(O)-O-), poliésteres (-C(O)-O-), poliuretanos (-NH-C(O)-O-), poliamida (-C(O)-NH-). Estos enlaces se proporcionan a modo de ejemplos, y no se pretende que limiten el tipo de enlaces que se pueden emplear en las cadenas o enlazadores poliméricos. Polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), poliaminoácidos, diviniléter con anhídrido maleico, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, polipropilenglicol, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, celulosa y derivados de celulosa, almidón y derivados de almidón, polialquilenglicol y derivados del mismo, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, poliviniléter y similares y mezclas de los mismos. Un enlazador polimérico es, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). El enlazador PEG puede ser lineal o ramificado. El peso molecular del enlazador PEG no está restringido a tamaño particular alguno, pero puede tener un peso molecular entre 100 y 5000 Dalton, por ejemplo, 500 a 1500 Dalton.

El enlazador contiene grupos funcionales-reactivos apropiados en ambos terminales que forman un puente entre el grupo amino del péptido/la proteína diana y un grupo funcional/reactivo en el agente biointeractivo/bioanalítico.

El enlazador puede comprender varios restos de enlace (o espaciador) de diferente naturaleza (por ejemplo, una combinación de aminoácidos, resto heterocíclico, PEG y/o restos alquilo). En este caso, cada uno de los restos de enlace contiene grupos reactivos funcionales apropiados en ambos terminales, con el fin de unir estos restos entre sí y para formar un puente en cada uno de los terminales con el participante respectivo.

La proteína/el péptido diana modificado o construcción de la misma (es decir, péptido/proteína unido a un enlazador parcial) incluyen grupos reactivos que pueden reaccionar con funcionalidades reactivas disponibles en el agente analítico/biointeractivo o construcción de los mismos (es decir, previamente unido un enlazador parcial) para formar un enlace covalente. Los grupos reactivos son grupos químicos capaces de formar un enlace covalente. Los grupos reactivos están ubicados en un sitio de conjugación y generalmente pueden ser grupo carboxi, fosforilo, acilo, éster o anhídrido mixto, maleimida, N-hidroxisuccinimida, tetrazina, alquino, imidato, piridin-2-il-disulfanilo, por lo que son capaces de formar un enlace covalente con funcionalidades tales como grupo amino, grupo hidroxilo, grupo alqueno, grupo carboxi, grupo hidrazina, grupo hidroxilamina, un grupo azida o un grupo tiol en el otro sitio de conjugación.

Grupos reactivos de particular interés para conjugar un péptido diana/una proteína diana con un agente biointeractivo/analítico y/o un resto enlazador y/o para conjugar diversos restos enlazadores de diferente naturaleza son N-hidroxisuccinimida, alquino (más particularmente ciclooctino).

El grupo funcional (Fg) incluye: 1. grupos tiol para reaccionar con grupos reactivos tales como maleimidias, tosil sulfona o piridin-2-ildisulfanilo; 2. grupos amino (por ejemplo, la funcionalidad amino de un aminoácido) para reaccionar con un grupo reactivo tal como ácido carboxílico o ácido carboxílico activado (p. ej., formación de enlaces amida mediante la química de N-hidroxisuccinamida), grupos fosforilo, grupo acilo o anhídrido mixto; 3. azida para someterse a una cicloadición de Huisgen con un alquino y más particularmente un grupo reactivo ciclooctina (más comúnmente conocida como química de clic); 4. grupo carbonilo para reaccionar con un grupo reactivo seleccionado de hidroxilamina o hidrazina para formar oxima o hidrazina, respectivamente; 5. alqueno reacciona con un grupo reactivo de tetrazina en una adición de aza [4 + 2]. Aunque en esta memoria se describen varios ejemplos de enlazadores y funcionalidades/grupo reactivo, la divulgación contempla enlazadores de cualquier longitud y composición.

El término "toxina" se refiere a pequeñas moléculas o péptidos que son capaces de interactuar con macromoléculas tales como enzimas, receptores celulares y células y provocar daños o enfermedades. Toxinas de este tipo pueden utilizarse en la terapia del cáncer para destruir las células cancerosas. Debido a su toxicidad, toxinas de este tipo no pueden utilizarse como fármacos por sí mismas. Típicamente, están vinculados a una proteína que los dirige a las células cancerosas. Ejemplos de toxinas son MMAF (monometil auristatina F), MMAE (monometil auristatina E), mertansina (DM-1), maitansina, criptoficina, tubulisina y dolastatina 10.

La expresión "quelante" o "agente quelante" se refieren a una molécula orgánica capaz de formar un complejo con iones metálicos (p. ej., lantánidos). Los quelantes se utilizan comúnmente para marcar proteínas o péptidos. Los productos finales de los conjugados de iones metálicos se utilizan para la radioinmunodetección, radioinmunoterapia, formación de imágenes por resonancia magnética, terapia fotodinámica u otras modalidades similares. Ejemplos no limitantes de quelantes o agentes quelantes son DTPA (anhídrido dietilentriaminopentaacético) y derivado del mismo, NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-N,N',N''-triacético) y derivados del mismo, tales como NODA-GA, DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''- tetraacético) (ion metálico radiactivo de unión) y derivado del mismo, TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazacicotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético) y su derivado, DTTA ácido N-(p-isotiocianatobencil)-dietilentriamina-N,N',N'',N'''- tetraacético. Estos y otros quelantes están fácilmente disponibles en fuentes comerciales.

La expresión "reactivo de formación de imágenes" son productos químicos diseñados para permitir a los médicos determinar si una masa es benigna o maligna y localizar sitios de cáncer metastásico en el cuerpo. Agentes de formación de imágenes fijan como objetivo un tumor particular, después de lo cual los instrumentos de formación de

imágenes se pueden ajustar para neutralizar la diana. Ejemplos de agentes de formación de imágenes son fluoróforos, vivoTags, nanopartículas fluorescentes, luciferina y xenolight.

5 El término "fluoróforo" se refiere a un compuesto químico que puede volver a emitir luz tras la excitación de la luz. Los fluoróforos contienen típicamente varios grupos aromáticos combinados, o moléculas planas o cíclicas con varios enlaces π . Los fluoróforos generalmente se unen covalentemente a una macromolécula, sirviendo como marcador (o colorante, o etiqueta, o informador) para reactivos afines o bioactivos (anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos). Los fluoróforos se utilizan principalmente para teñir tejidos, células o materiales en una diversidad de métodos analíticos, es decir, formación de imágenes fluorescentes y espectroscopía. Ejemplos incluyen fluoresceína, rodamina, tintes de Cy tales como Cy5 y Cy7, tintes Alexa tales como Alexa 750, Alexa 647 y Alexa 488, cumarinas y similares.

15 Un "agente biointeractivo", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un resto o compuesto orgánico que evoca una respuesta biológica cuando se introduce en un tejido o célula vivos. Ejemplos de agentes biointeractivos incluyen antígenos, toxinas, proteínas terapéuticas o péptidos y similares. Agentes biointeractivos pueden ser moléculas pequeñas y macromoléculas.

20 Un "agente analítico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un resto o compuesto orgánico que se puede detectar mediante métodos instrumentales para caracterizar cualitativa o cuantitativamente el material al cual el agente analítico está unido o asociado de otro modo. Ejemplos de agentes analíticos de este tipo incluyen marcas, por ejemplo, fluoróforos o radiomarcas.

Realizaciones

25 En esta memoria se describen diversas realizaciones de la invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada una de las realizaciones se pueden combinar con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales.

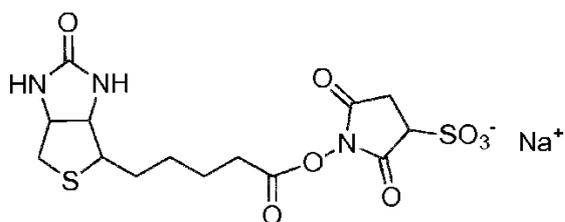
30 En la realización 1, la invención pertenece a un método para modificar una proteína diana o un péptido diana en la funcionalidad amino del aminoácido N-terminal tal como se define en la reivindicación 1.

En una realización, la invención pertenece a un método de acuerdo con la realización 1, en donde la secuencia de aminoácidos XH- es MH- y AH-.

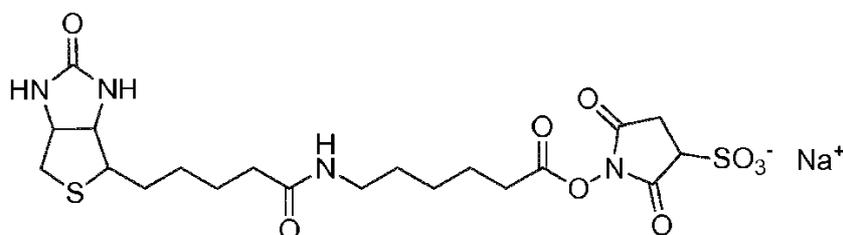
35 En una realización, la invención pertenece a un método de acuerdo con la realización 1, en donde la secuencia de aminoácidos XHX' se selecciona entre AHA- y MHA.

La invención se refiere a un método de acuerdo con la realización 1, en donde R1 es biotina. Ejemplos no limitantes de un agente acilante de este tipo para biotilación son:

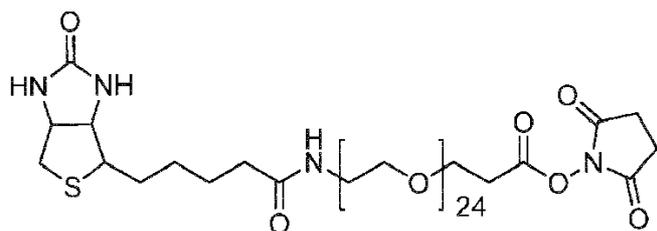
40 SO₃NHS-biotina de Fórmula:



45 SO₃NHS-LC-biotina de Fórmula:



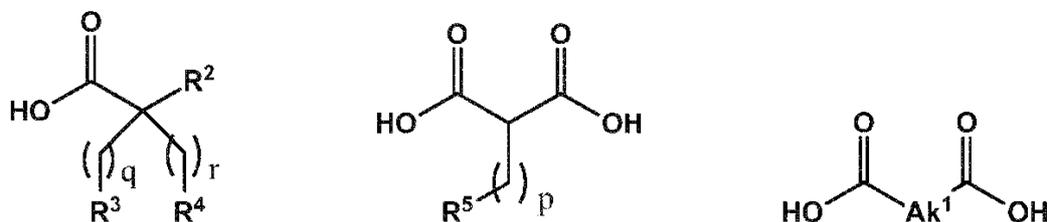
NHS-PEG24-biotina de Fórmula:



; y otras construcciones de biotina conocidas que están fácilmente disponibles, por ejemplo, de fuentes comerciales.

5 La invención pertenece también a un método de acuerdo con la realización 1, en donde R1 es un resto ácido graso (FA). Ejemplos de ácido graso son cadena de alquilo C₆₋₇₀, alqueno C₆₋₇₀, alqueno C₆₋₇₀ sustituido con al menos un ácido carboxílico (por ejemplo 1, 2, 3 o 4 CO₂H) y además, opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo. El ácido graso (FA) está preferiblemente conjugado a la proteína diana o péptido diana a través de un enlazador L¹. En una realización, la invención pertenece a un método de acuerdo con la realización 1, en el que el R1 se selecciona de los siguientes ácidos:

10



A1 A2 y A3

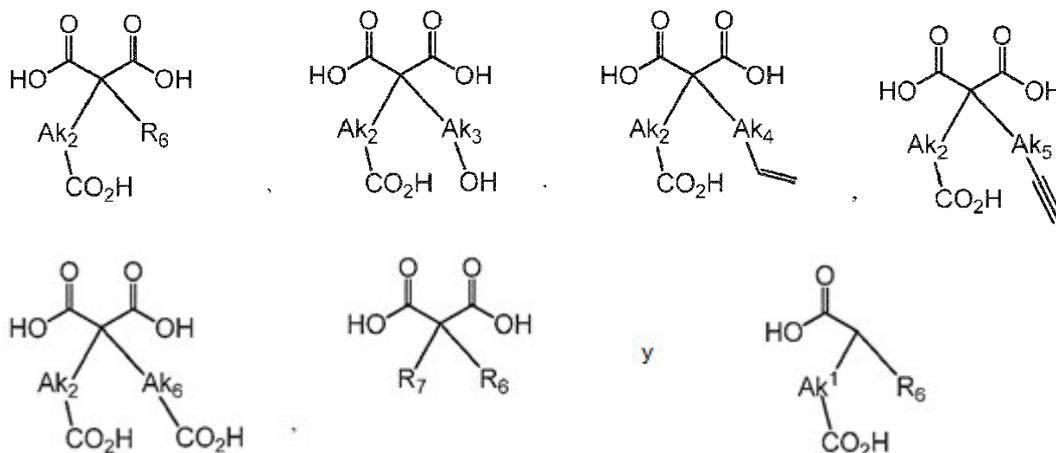
15 R² es CO₂H, H;

R³, R⁴ y R⁵ son, independientemente uno de otro, H, OH, CO₂H, -CH=CH₂ o -C≡CH;

20 Ak¹ es un alqueno C₆-C₃₀ ramificado;

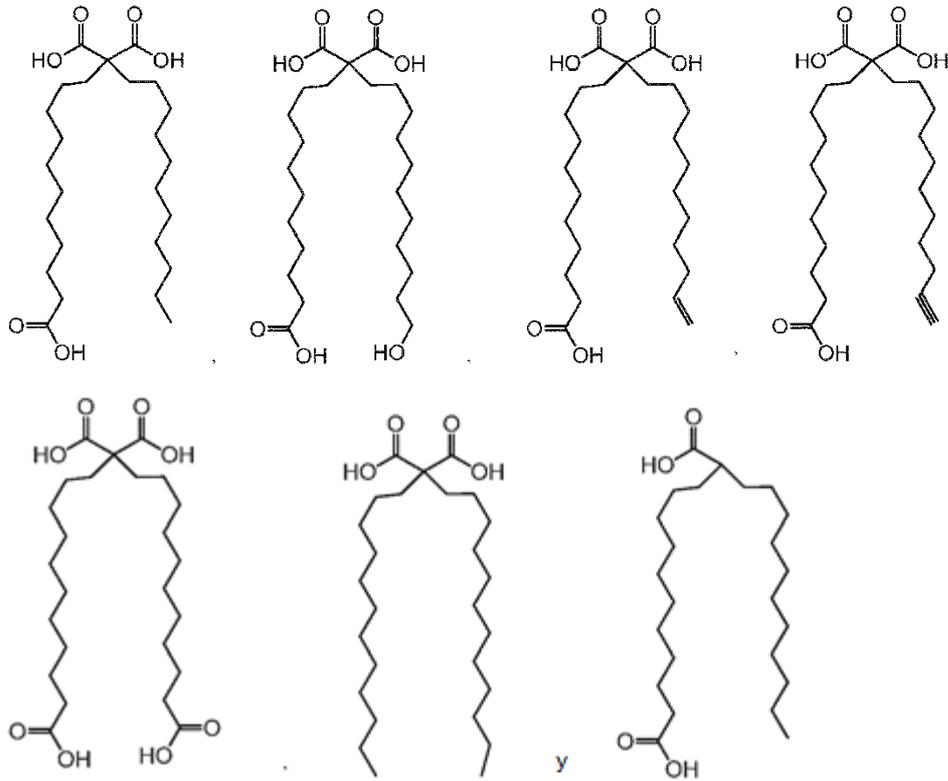
q, r y p son, independientemente entre sí, un número entero entre 6 y 30; y en donde el punto de unión es cualquiera de la funcionalidad CO₂H; o una amida, un éster o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 En una realización, R1 se selecciona de los siguientes ácidos grasos:



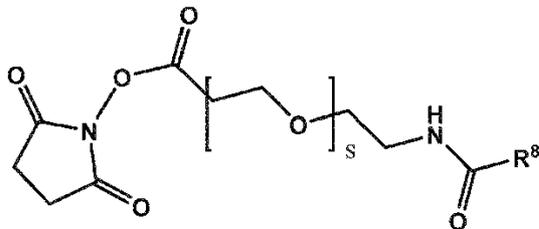
30 en donde Ak², Ak³, Ak⁴, Ak⁵ y Ak⁶ son, independientemente, un alqueno (C₈₋₂₀), R⁶ y R⁷ son, independientemente, alquilo (C₈₋₂₀).

En una realización, R1 se selecciona de los siguientes ácidos grasos:



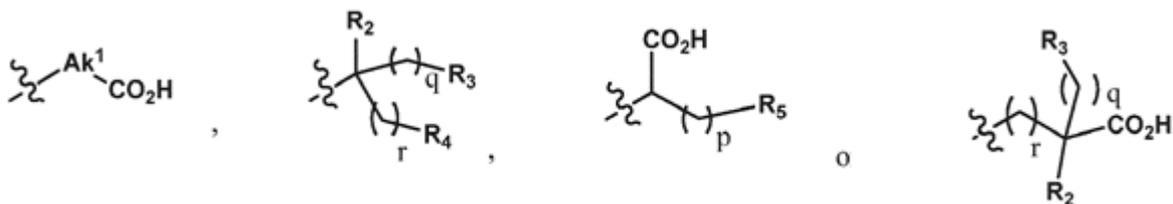
5 Estos restos de ácidos grasos se han descrito en las solicitudes de EE.UU. co-presentadas números 62/015.862 (expediente del agente número PAT056 274-US-PSP), 62/082.327 (expediente del agente número PAT056274-US-PSP02) y 62/107.016 (expediente del agente número PAT056274-US-PSP03).

10 En una realización, la invención se refiere a un método en el que el agente acilante es:



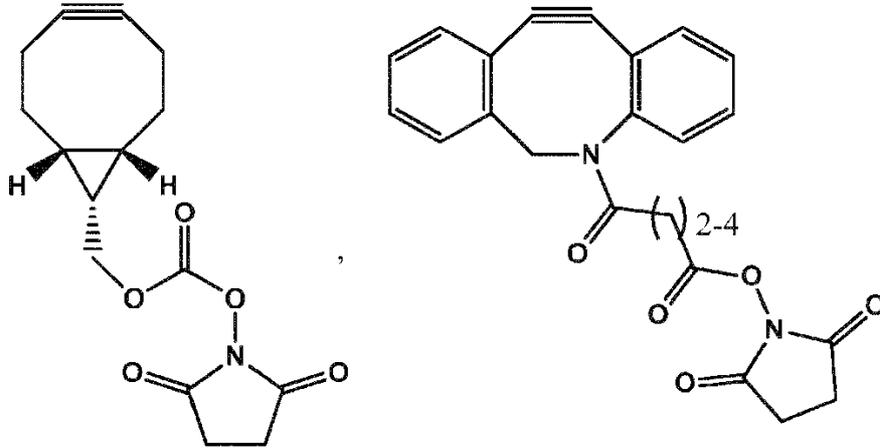
15 R8 es un alquilo C₆₋₇₀ lineal o ramificado, un alqueno C₆₋₇₀ lineal o ramificado o un alquino C₆₋₇₀ lineal o ramificado, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de carboxi e hidroxilo;

s es 1 a 34. En un aspecto particular de esta realización, R8 es

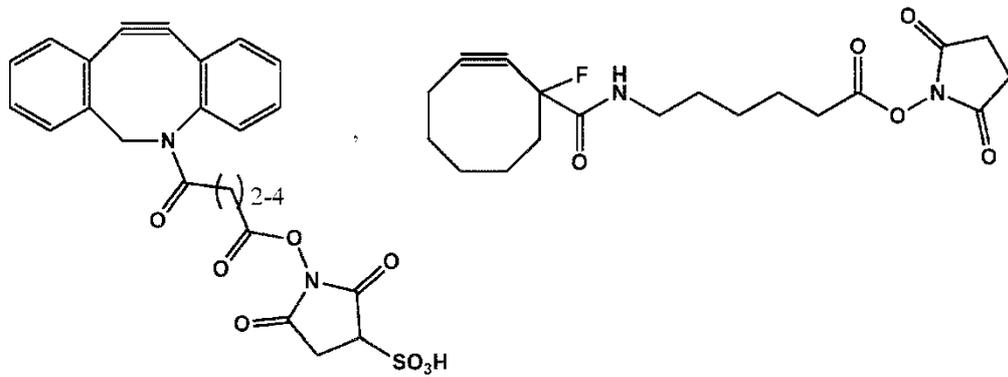


20 en donde Ak¹, R², R³, R⁴, R⁵, q, r y p se definen arriba. Se han descrito ejemplos de restos de ácido graso-PEG-NHS de este tipo en una solicitud presentada conjuntamente N° 62/015.862 (número de expediente del agente PAT056274-US-PSP) y las solicitudes de EE.UU. N° 62/082.327 (número de expediente del agente PAT056274-US-PSP02) y 62/107.016 (número de expediente del agente PAT056274-US-PSP03).

En otra realización, la invención pertenece a un método de acuerdo con la realización 1, en el que R1 es un grupo reactivo que es un resto cicloalquino y el agente acilante es de Fórmula:

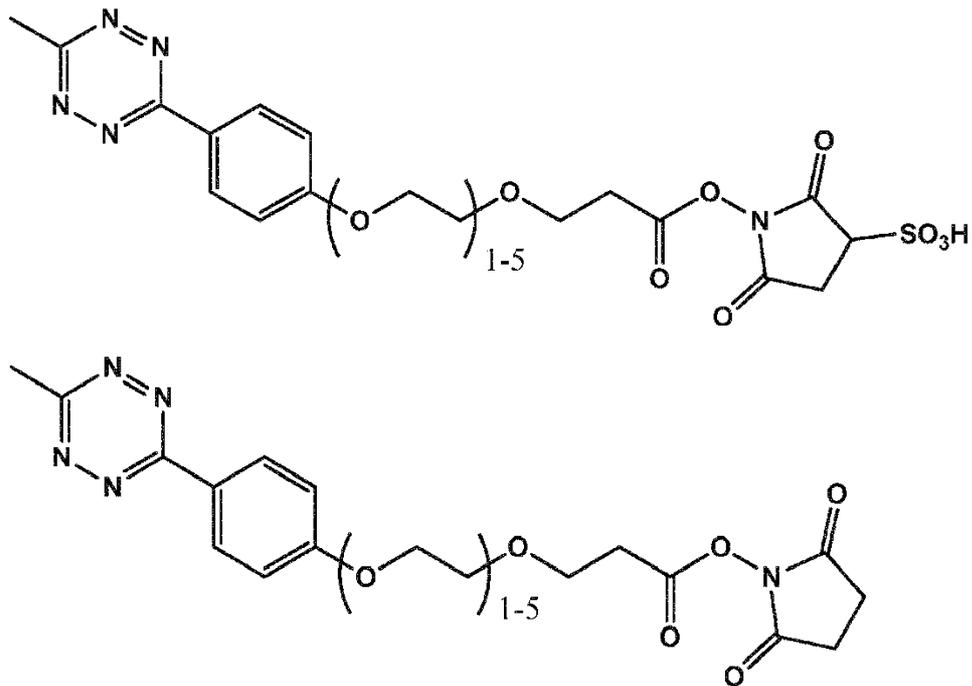


5

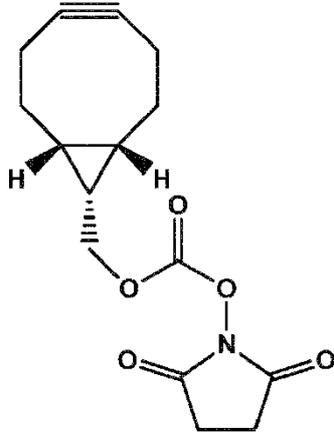


En otra realización, el grupo reactivo es tetrazina y el agente acilante es de Fórmula:

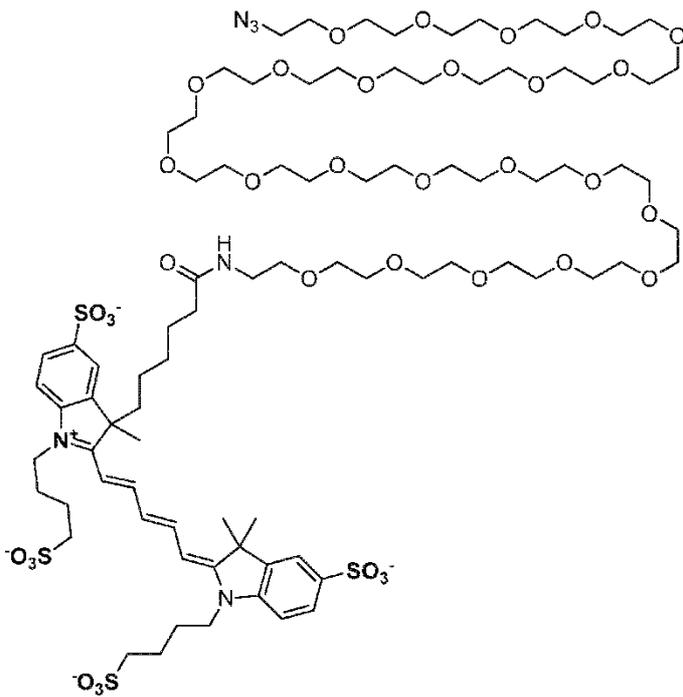
10



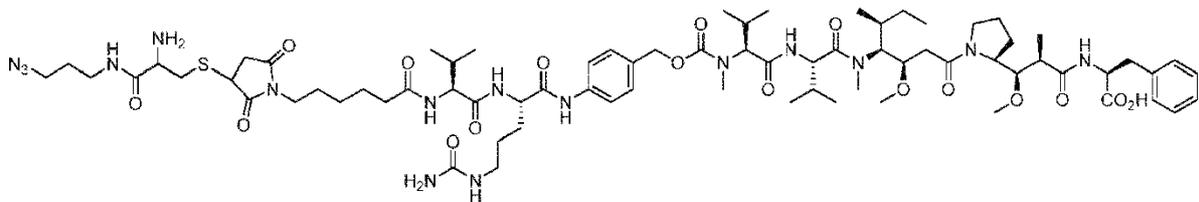
En una realización, la invención se refiere a un método en el que el agente acilante es:



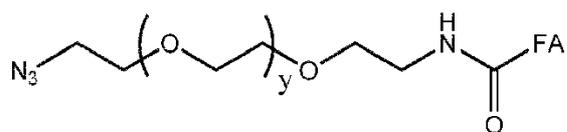
- 5 En una realización adicional, la invención pertenece a un método que comprende, además, una etapa de hacer reaccionar un agente biointeractivo o un agente analítico con el grupo reactivo presente en el agente acilante, en donde el agente biointeractivo o bioanalítico se hace reaccionar a través de un grupo funcional, en donde el grupo funcional es azida y el agente biointeractivo o un agente analítico que comprende el grupo funcional azido es:



10

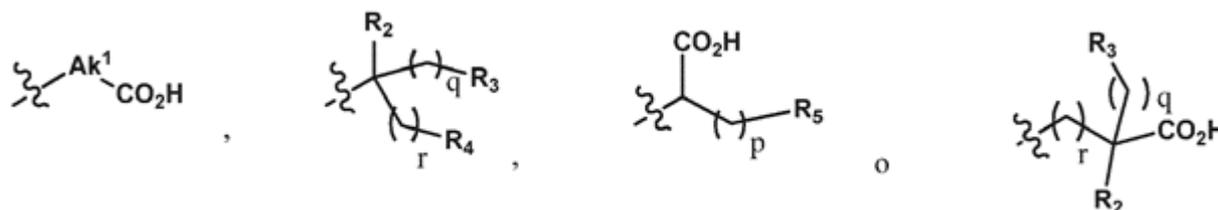


, o



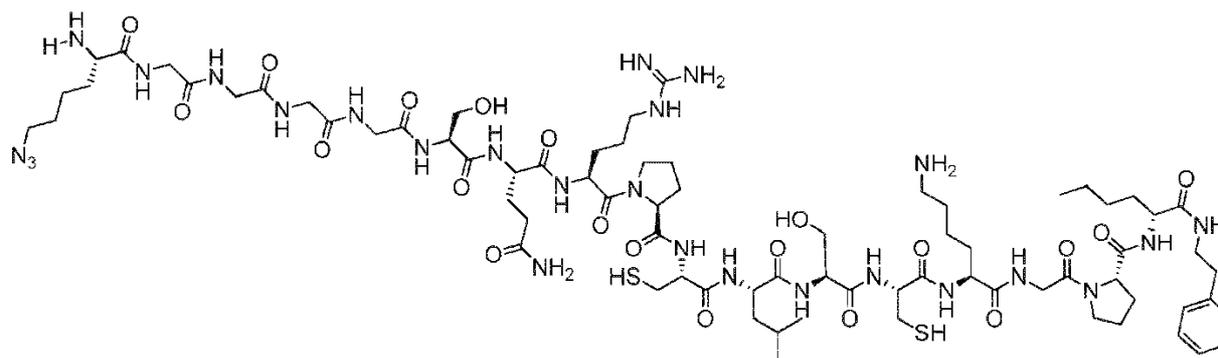
en donde y es 0 a 34 y FA es un residuo de ácido graso unido a través de una de sus funcionalidades de ácido carboxílico al enlazador PEG y FA tiene las siguientes Fórmulas:

5



Otro ejemplo de agente biointeractivo que comprende un grupo funcional azido es un péptido terapéutico, en donde una lisina azido se ha introducido (preferiblemente en el extremo N) opcionalmente a través de un enlazador (p. ej. Poliglicina). Un ejemplo de un agente biointeractivo de este tipo es:

10



15

En una realización, la invención se refiere a un método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la proteína diana o el péptido diana es un péptido agonista de APJ, una Fc nativa o una proteína GDF15 o un mutante del mismo.

20

En una realización, la invención se refiere a un método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el pH es inferior a 5.

25

En una realización, la invención se refiere a un método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el pH es aproximadamente 4,5. En una realización, el pH es de 4,5 a 4,8. En una realización, el pH es de aproximadamente 4,6. En otra realización, el pH es de aproximadamente 4,75. El pH se puede ajustar utilizando una solución tampón de acetato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio o una combinación de las mismas. Ejemplos no limitantes de tampones son NaOAc, fosfato dibásico de sodio o potasio (Na_2HPO_4 o K_2HPO_4).

30

En una realización, la invención se refiere a un método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el pH es 4.

35

Se prepara un conjugado a partir de los métodos descritos en esta memoria. En otra divulgación, se describe una vacuna que se prepara con un conjugado o una proteína/un péptido modificado descrito en esta memoria. En otra divulgación, se describe una proteína/un péptido terapéutico que tiene una proteína/un péptido modificado descrito en esta memoria. En otra divulgación, se describe un agente formador de imágenes que tiene una proteína/un péptido modificado descrito en esta memoria. En otra divulgación, se describe una herramienta de marcaje que tiene una proteína/un péptido modificado descrito en esta memoria.

Los métodos, los conjugados obtenidos de los métodos, los enlazadores y el agente biointeractivo/análítico también se definen en la sección de Ejemplos que figura a continuación.

40

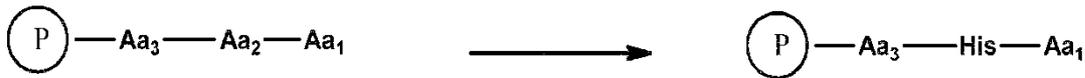
Etapa a) del método: Síntesis del péptido/la proteína diana de modo que la proteína o el péptido resultante contiene un aminoácido histidina en la posición adyacente al extremo N del aminoácido

Una proteína/un péptido diana puede ser uno que ya posea un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal. Si una proteína diana no posee un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal, es posible modificar la proteína/el péptido de acuerdo con la etapa a) de la invención. Las inserciones de residuos de aminoácidos en las proteínas se puede conseguir mediante técnicas estándar conocidas para los expertos en la técnica tales como técnicas transgénicas o de modificación química posterior a la traducción.

El presente método de esta divulgación implica la modificación del péptido o la proteína diana para activar la funcionalidad amino del aminoácido en el extremo N.

La etapa a puede representarse por los siguientes esquemas 1 a 5:

El esquema 1 describe una etapa en la que la proteína o el péptido diana se modifica reemplazando el aminoácido adyacente al aminoácido N-terminal de dicha proteína diana o péptido diana con un aminoácido histidina:



Esquema 1

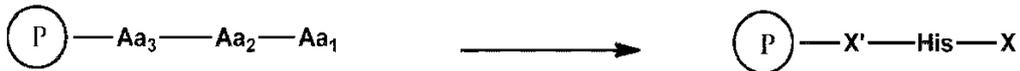
en donde P es una proteína/un péptido diana con sus últimos 3 aminoácidos en el extremo N (Aa3, Aa2, Aa1).

El esquema 2 describe una etapa en la que la proteína diana o el péptido diana se modifica reemplazando los dos aminoácidos en el extremo N (es decir, Aa1 y Aa2) de dicha proteína diana o péptido diana con una secuencia de aminoácidos XH-, en donde H es histidina y X es un aminoácido seleccionado entre M, A, Q, N y G:



Esquema 2

El esquema 3 describe una etapa en la que la proteína o el péptido diana se modifica reemplazando los tres aminoácidos en el extremo N (es decir, Aa1, Aa2 y Aa3) de dicha proteína diana o péptido diana con una secuencia de aminoácidos XHX'-, en donde H es histidina y X y X' son independientemente M, A, Q, N y G:



Esquema 3

Los esquemas 4 y 5 describe una etapa en el que la proteína o el péptido diana se modifica reemplazando una secuencia de dos aminoácidos de Fórmula XH o una secuencia de tres aminoácidos de Fórmula XHX'- en el extremo N de dicha proteína diana o péptido diana, en donde H es histidina y X y X' se seleccionan independientemente de M, A, Q, N y G;



Esquema 4



Esquema 5

Los péptidos o polipéptidos/proteína modificados tal como se describe arriba en los Esquemas 1 a 5 pueden producirse mediante procedimientos químicos sintéticos o mediante métodos recombinantes o una combinación de ambos métodos. Las construcciones de péptidos o polipéptidos/proteínas pueden prepararse como de longitud completa o

pueden sintetizarse como fragmentos de longitud no completa y unirse. Los péptidos y polipéptidos utilizados en el método de la presente invención pueden producirse mediante procedimientos conocidos per se para la síntesis de péptidos. Los métodos para la síntesis de péptidos pueden ser cualquiera de una síntesis en fase sólida y una síntesis en fase líquida. Por lo tanto, el péptido y polipéptido de interés se pueden producir condensando un péptido o aminoácido parcial capaz de constituir la proteína con la parte residual de la misma y, cuando el producto tiene un grupo protector, el grupo protector se desprende, tras lo cual se puede fabricar un péptido deseado. Los métodos conocidos para la condensación y desprotección incluyen los procedimientos descritos en la siguiente bibliografía (1) - (5).

5 (1) M. Bodanszky y M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, Nueva York, 1966,

(2) Schroeder y Luebke, The Peptide, Academic Press, Nueva York, 1965,

15 (3) Nobuo Izumiya et al. Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis, Maruzen, 1975,

(4) Haruaki Yajima y Shumpei Sakakibara, Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977, y

(5) Haruaki Yajima (ed.), Development of Drugs-Continued, 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten.

20 Después de la reacción, el péptido o polipéptido se puede purificar y aislar mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales, tales como extracción con disolvente, cromatografía en columna, cromatografía líquida, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y recristalización. En los casos en los que el péptido aislado como antes es un compuesto libre, puede convertirse en una sal adecuada mediante el método conocido. A la inversa, en los casos en los que el producto aislado es una sal, se puede convertir en el péptido libre mediante el método conocido.

25 La amida del polipéptido se puede obtener utilizando una resina para la síntesis de péptidos que sea adecuada para la amidación. La resina incluye resina de clorometilo, resina de hidroximetilo, resina de benzhidrilamina, resina de aminometilo, resina de alcohol 4-benciloxibencílico, resina de 4- metilbenzhidrilamina , resina PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfenilacetamidometilo, resina de poliacrilamida, 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetilo)fenoxi, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxi, resina de cloruro de 2-clorotritilo, etcétera. Utilizando una resina de este tipo, los aminoácidos cuyos grupos α -amino y grupos funcionales de la cadena lateral se han protegido adecuadamente se condensan sobre la resina de acuerdo con la secuencia del péptido objetivo mediante diversas técnicas de condensación que son conocidas per se. Al final de la serie de reacciones, el péptido o el péptido protegido se separa de la resina y los grupos protectores se separan y, si es necesario, se forman enlaces disulfuro para obtener el polipéptido objetivo.

35 Para la condensación de los aminoácidos protegidos arriba mencionados, se puede utilizar una diversidad de reactivos de activación para la síntesis de péptidos, tales como HATU, HCTU o, p. ej., una carbodiimida. La carbodiimida incluye DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Para la activación con un reactivo de este tipo, se puede utilizar un aditivo inhibidor de la racemización, p. ej., HOBt u Oxyma Pure. El aminoácido protegido se puede añadir directamente a la resina junto con los reactivos de activación y el inhibidor de la racemización o se puede preactivar como anhídrido de ácido simétrico, éster de HOBt o éster de HOOBt y luego se añade a la resina. El disolvente para la activación de aminoácidos protegidos o la condensación con la resina puede seleccionarse adecuadamente entre aquellos disolventes que se sabe que son útiles para reacciones de condensación de péptidos. Por ejemplo, pueden mencionarse N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, cloroformo, trifluoroetanol, dimetilsulfóxido, DMF, piridina, dioxano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo, acetato de etilo o mezclas adecuadas de ellos. La temperatura de reacción se puede seleccionar del intervalo conocido hasta ahora por ser útil para la formación de enlaces peptídicos y habitualmente se selecciona del intervalo de aproximadamente -20°C a 50°C. El derivado de aminoácido activado se utiliza generalmente en una proporción de 1,5 a 4 veces en exceso. Si se encuentra que la condensación es insuficiente mediante un test que utiliza la reacción de ninhidrina, la reacción de condensación se puede repetir para lograr una condensación suficiente sin separar el grupo protector. Si la condensación repetida todavía fracasa en proporcionar un grado suficiente de condensación, el grupo amino que no ha reaccionado puede acetilarse con anhídrido acético o acetilimidazol.

40 El grupo protector del grupo amino para el aminoácido material de partida incluye Z, Boc, amiloxicarbonilo terciario, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, Cl⁻Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenililsulfenilo, difenilfosfinotioilo o Fmoc. El grupo protector de carboxi que se puede utilizar incluye, pero no se limita al alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈ y aril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₂ arriba mencionados, así como 2-adamantilo, 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 4-clorobencilo, fenacilo, benciloxicarbonilhidrazido, butoxicarbonilhidrazido terciario y tritilhidrazido.

55 El grupo hidroxilo de serina y treonina puede protegerse mediante esterificación o eterificación. El grupo adecuado para dicha esterificación incluye grupos derivados de carbono, tales como grupos alcanóilo inferior, p. ej., acetilo, etc., grupos aroílo, p. ej., benzoílo, etc., benciloxicarbonilo y etoxicarbonilo. El grupo adecuado para dicha eterificación incluye bencilo, tetrahidropirranilo y butilo terciario. El grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de tirosina incluye Bzl, Cl₂-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z y butilo terciario.

El grupo protector de imidazol para histidina incluye Tos, 4-metoxi-2,3,6-trietilbencenosulfonilo, DNP, benciloximetilo, Bum, Boc, Trt y Fmoc.

5 El grupo carboxilo activado del aminoácido de partida incluye el correspondiente anhídrido de ácido, azida y ésteres activos, p. ej., ésteres con alcoholes tales como pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, HONB, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxifalimida, HOBt, etc. El grupo amino activado del aminoácido de partida incluye la correspondiente fosforamida.

10 El método para la eliminación de grupos protectores incluye la reducción catalítica utilizando hidrógeno gaseoso en presencia de un catalizador tal como negro de paladio o paladio sobre carbono, tratamiento ácido con fluoruro de hidrógeno anhidro, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético o una mezcla de dichos ácidos, tratamiento básico con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperazina, reducción con sodio metálico en amoniaco líquido. La reacción de eliminación mediante el tratamiento con ácido arriba mencionado se
15 lleva a cabo generalmente a una temperatura de -20°C - 40°C y se puede realizar de manera ventajosa con la adición de un aceptor de cationes, tal como anisol, fenol, tioanisol, m-cresol, p-cresol, sulfuro de dimetilo, 1,4-butanoditiol, 1,2-etanoditiol. El grupo 2,4-dinitrofenilo utilizado para proteger el grupo imidazol de histidina puede eliminarse mediante tratamiento con tiofenol, mientras que el grupo formilo utilizado para proteger el grupo indol del triptófano puede eliminarse mediante tratamiento alcalino con solución diluida de hidróxido de sodio o amoniaco acuoso diluido. así
20 como el tratamiento con ácido arriba mencionado, en presencia de 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol.

El método de proteger los grupos funcionales que no deben participar en la reacción del material de partida, los grupos protectores que se pueden utilizar, el método para separar los grupos protectores y el método para activar los grupos funcionales que han de participar en la reacción se puede seleccionar críticamente entre los grupos y métodos
25 conocidos.

Otro método para obtener la forma amida del polipéptido comprende amidar primero el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal, luego extender la cadena peptídica hacia el lado N hasta la longitud de cadena deseada y luego desproteger selectivamente el grupo α -amino del péptido C-terminal y el grupo α -carboxi del aminoácido o péptido que
30 va a formar el resto del polipéptido objetivo y condensar los dos fragmentos, cuyo grupo α -amino y grupos funcionales de cadena lateral han sido protegidos con grupos protectores adecuados, arriba mencionados en un disolvente mixto tal como el mencionado anteriormente en esta memoria. Los parámetros de esta reacción de condensación pueden ser los mismos que los descritos anteriormente en esta memoria. A partir del péptido protegido obtenido por condensación, todos los grupos protectores se separan mediante el método arriba descrito para proporcionar con ello
35 el péptido bruto deseado. Este péptido bruto puede purificarse mediante procedimientos de purificación conocidos y la fracción principal puede liofilizarse para proporcionar el polipéptido amidado objetivo. Para obtener un éster del polipéptido, el grupo α -carboxilo del aminoácido C-terminal se condensa con un alcohol deseado para dar un éster de aminoácido y luego se sigue el procedimiento arriba descrito para la producción de la amida.

40 Alternativamente, los métodos de expresión recombinante son particularmente útiles para la producción del péptido o la proteína modificado tal como se describe en los Esquemas 1 a 5. La expresión de proteína recombinante utilizando una célula huésped (una célula modificada artificialmente para comprender ácidos nucleicos que codifican la secuencia del péptido y que transcribirá y traducirá y, opcionalmente, secretará el péptido en el medio de crecimiento celular) se utiliza rutinariamente en la técnica. Para el procedimiento de producción recombinante, un ácido nucleico
45 que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido se sintetizaría típicamente mediante métodos convencionales y se integraría en un vector de expresión. Métodos de este tipo son particularmente preferidos para la fabricación de composiciones polipeptídicas que comprenden los péptidos condensados a secuencias peptídicas adicionales u otras proteínas o fragmentos o dominios de proteínas. La célula huésped puede ser opcionalmente al menos una seleccionada de E. coli, COS-1, COS-7, HEK293, BHT21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2 / 0, 293, heLa, mieloma, linfoma, levadura, insectos o células vegetales, o cualquier derivado, célula inmortalizada o transformada de los
50 mismos.

La divulgación también abarca polinucleótidos que codifican las variantes arriba descritas que pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, cuyo ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser de doble
55 cadena o de cadena sencilla. Las secuencias codificantes que codifican las composiciones de la presente invención pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético.

Los polinucleótidos que codifican las composiciones de la presente invención pueden incluir lo siguiente: solo la secuencia codificante de la variante, la secuencia codificante de la variante y la secuencia codificante adicional tal como un polipéptido funcional, o una secuencia conductora o secretora o una pro-secuencia de proteínas; la secuencia
60 codificante para la variante y la secuencia no codificante, tal como intrones o secuencia no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante para la variante. Por lo tanto, la expresión "polinucleótido que codifica una variante" abarca un polinucleótido que puede incluir no solo la secuencia codificante para la variante, sino también un polinucleótido, que incluye una secuencia codificante y/o no codificante adicional.

65

La divulgación se refiere, además, a variantes de los polinucleótidos descritos que codifican fragmentos, análogos y derivados del polipéptido que contienen las sustituciones indicadas. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica que se produce de forma natural de la secuencia de GDF15 humana, una variante que no se produce de forma natural o una variante truncada tal como se describió arriba. Por lo tanto, la presente divulgación también incluye polinucleótidos que codifican las variantes arriba descritas, así como variantes de aquellos polinucleótidos, cuyas variantes codifican un fragmento, derivado o análogo de la variante descrita. Variantes de nucleótidos de este tipo incluyen variantes de delección, variantes de sustitución, variantes truncadas y variantes de adición o inserción, siempre que esté presente al menos una de las sustituciones de aminoácidos indicadas de la primera realización.

Los polinucleótidos se pueden expresar en huéspedes después de que las secuencias se hayan enlazado operativamente a (es decir, se hayan colocado para asegurar el funcionamiento de) una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huéspedes tales como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del huésped. Habitualmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, p. ej., tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas. La variante de GDF15 puede expresarse en células de mamífero, insectos, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células para producir proteínas de este tipo utilizando ARNs derivados de construcciones de ADN de la presente invención.

Escherichia coli (*E. coli*) es un huésped procariótico, particularmente útil para clonar los polinucleótidos de la presente divulgación. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies de *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, aunque también se pueden emplear otros como opción. En estos huéspedes procariotas, también se pueden hacer vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (p. ej., un origen de replicación). Además, puede estar presente cualquiera de un cierto número de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (Trp), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor de fagos lambda o T7. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia de operador, y tendrán secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Un experto en la técnica de la expresión de proteínas reconocerá que la secuencia de metionina o metionina-arginina puede introducirse en el extremo N de la secuencia madura para la expresión en *E. coli* y se contemplan dentro del contexto de esta invención. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, las composiciones de la presente invención expresadas en *E. coli* tienen una secuencia de metionina introducida en el extremo N.

También pueden utilizarse para la expresión otros microbios, tales como levaduras u hongos. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia angusta* son ejemplos de huéspedes de levadura preferidos, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* y *Schizophyllum commune* son ejemplos de huéspedes fúngicos, aunque también se pueden emplear otros como opción.

También se puede utilizar el cultivo de células de tejidos de mamífero para expresar y producir los polipéptidos. En la técnica se ha desarrollado un cierto número de líneas celulares huéspedes adecuadas capaces de secretar variantes intactas, e incluyen las líneas de células CHO, diversas líneas de células COS, células NSO, líneas de células de ovario de hámster sirio, células HeLa o líneas celulares de riñón embrionario humano (es decir, HEK293, HEK293EBNA).

Vectores de expresión para células de mamíferos pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus, virus del sarcoma de Raus y similares. Sitios de poliadenilación preferidos incluyen secuencias derivadas de SV40 y hormona del crecimiento bovino.

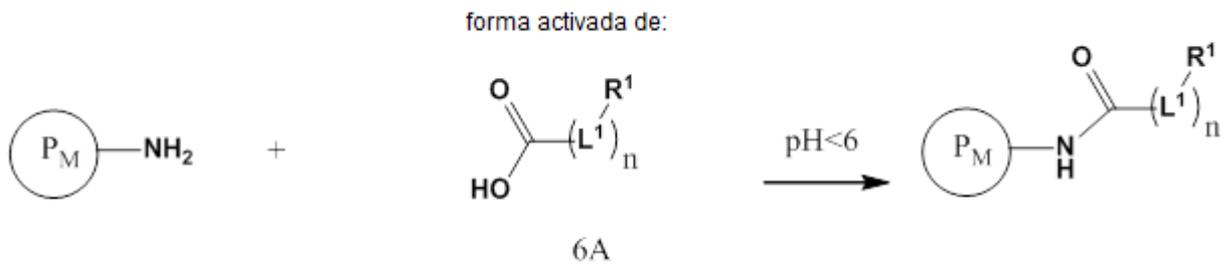
Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (p. ej., que codifican las composiciones de la presente invención y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para otros huéspedes celulares.

Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y métodos de este tipo son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990) y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). La o las etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción utilizado para las composiciones.

Los polipéptidos se pueden preparar en forma sustancialmente pura o aislada (p. ej., libres de otros polipéptidos). Los polipéptidos pueden estar presentes en una composición que está enriquecida con el polipéptido en relación con otros componentes que pueden estar presentes (p. ej., otros polipéptidos u otros componentes de la célula huésped). Por ejemplo, el polipéptido purificado puede proporcionarse de manera que el polipéptido esté presente en una composición que esté sustancialmente libre de otras proteínas expresadas, p. ej., menos del 90%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5% o menos del 1% de la composición está constituido por otras proteínas expresadas.

Etapa b) del método: Conjugación específica para el sitio con la proteína/el péptido modificado (de la etapa a) - Acetilación selectiva del grupo amino en el extremo N del péptido/la proteína modificado

La acilación del grupo amino N-terminal de una proteína o péptido diana se puede representar mediante el siguiente Esquema 6:



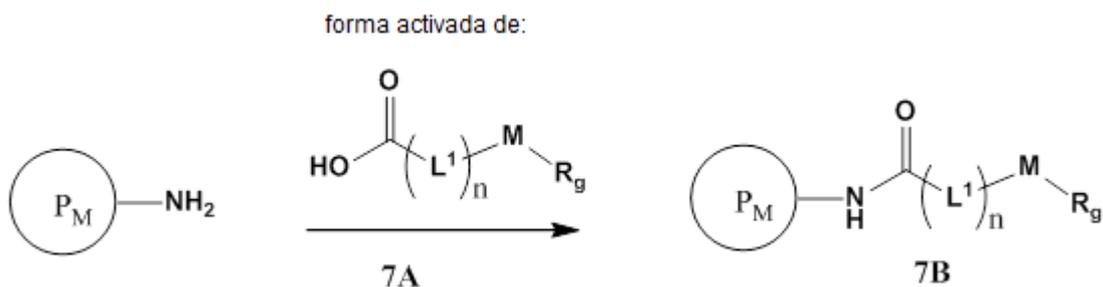
Esquema 6

en donde P_M es un péptido o una proteína modificado de acuerdo con la etapa a), R¹, L¹ y n son como se definieron arriba y la forma activada del ácido **6A** es el éster NHS. La reacción de acilación se lleva a cabo en medios acuosos a un pH de menos de 6. En otra realización, la reacción de acilación se lleva a cabo a un pH de menos de 5. En otra realización, la reacción de acilación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 4. En otra realización, la reacción de acilación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 4,5. En aún otra realización, la reacción de acilación se lleva a cabo a un pH entre 4,5 y 4,8. En aún otra realización, el pH es de aproximadamente 4,6. En aún otra realización, el pH es de aproximadamente 4,75. El pH se puede ajustar utilizando una solución tampón de acetato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio o una combinación de las mismas. Ejemplos no limitantes de tampones son NaOAc, fosfato dibásico de sodio o potasio (Na₂HPO₄ o K₂HPO₄).

R¹ puede ser un agente biointeractivo o un agente analítico.

Alternativamente, R¹ puede ser un resto que comprende un grupo reactivo que facilita la unión covalente a un agente biointeractivo o a un agente analítico,

Cuando R¹ es un resto que comprende un grupo reactivo, la etapa b) del método de la invención se puede representar mediante el siguiente esquema 7:



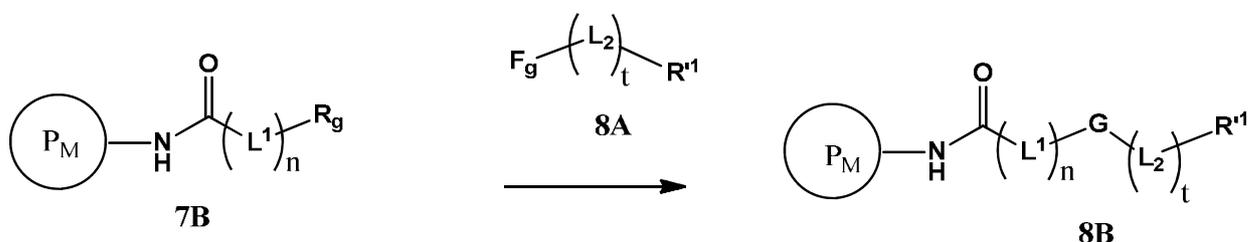
Esquema 7

en donde P_M, L¹ y n se definen arriba; M es un resto químico y R_g es un grupo reactivo. Ejemplos de R_g son acilo, éster o anhídrido mixto, alquino, tetrazina, maleimida, imidato, carboxi.

El método de la invención puede comprender, además, una etapa de hacer reaccionar un agente biointeractivo o un agente analítico con el grupo reactivo R_g del conjugado **7B**, en donde el agente biointeractivo o bioanalítico se hace reaccionar mediante un grupo funcional correspondiente y opcionalmente mediante un enlazador L_2 .

5

Esta etapa puede representarse por el siguiente Esquemas 8:



10 Esquema 8

en donde P_M es una proteína diana o un péptido diana que ha sido modificado de acuerdo con la etapa a), de modo que la proteína o el péptido resultante contiene un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal;

15

L^1 y L^2 son enlazadores;

R_g es un grupo reactivo;

20 F_g es un grupo funcional;

G es el grupo químico resultante formado como resultado de la reacción de R_g con F_g ;

25 R^1 es un agente biointeractivo o analítico;

n y t son independientemente 0 o 1.

Ejemplos de grupo funcional (F_g) son grupo amino, grupo azida, grupo alqueno, grupo tiol o hidrazina, grupos hidroxilamina.

30

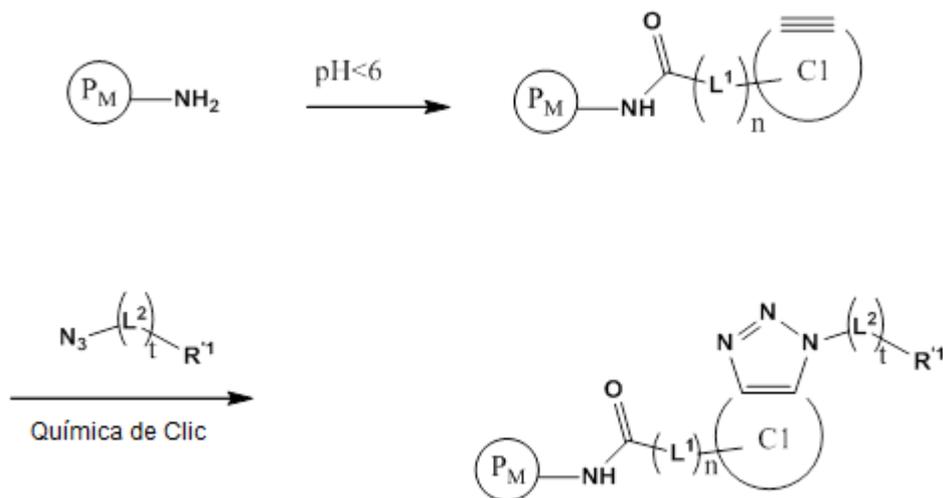
El grupo funcional (F_g) incluye: 1. grupos tiol para reaccionar con grupos reactivos tales como maleimidias, tosilsulfona o piridin-2-ildisulfanilo; 2. grupos amino (por ejemplo, la funcionalidad amino de un aminoácido) para reaccionar con un grupo reactivo tal como ácido carboxílico o ácido carboxílico activado (p. ej., formación de enlaces amida mediante la química de N-hidroxisuccinamida), grupos fosforilo, grupo acilo o anhídrido mixto; 3. azida para someterse a una cicloadición de Huisgen con un alquino y más particularmente un grupo reactivo ciclooctina (más comúnmente conocida como química de clic); 4. grupo carbonilo para reaccionar con un grupo reactivo seleccionado de hidroxilamina o hidrazina para formar oxima o hidrazina, respectivamente; 5. alqueno reacciona con un grupo reactivo de tetrazina en una adición de aza [4 + 2]. Aunque en esta memoria se describen varios ejemplos de enlazadores y funcionalidades/grupo reactivo, la invención contempla enlazadores de cualquier longitud y composición.

40

En una realización, la invención se refiere a un método, en el que R^1 es un resto que contiene un grupo reactivo de alquino (es decir, R_g es alquino o cicloalquino o bicicloalquino) que facilita la unión covalente a un agente biointeractivo que contiene una funcionalidad azida (es decir, en el compuesto **8A**, t es 0 y F_g es azido). Alternativamente, el agente biointeractivo o analítico puede unirse a un enlazador L^2 que contiene una funcionalidad azida en una posición terminal (es decir: en el compuesto **8A** t es 1 y F_g es azido). Restos que contienen un grupo reactivo con alquino están fácilmente disponibles de fuentes comerciales. Son de particular interés los restos de cicloalquino. En el documento US 2009/0068738 se han descrito ejemplos del uso de alquino cíclico en la química del clic para el marcaje de proteínas. Ejemplos específicos se han descrito arriba.

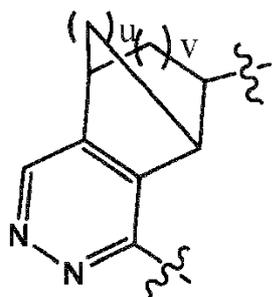
Esta química implica una cicloadición azida-alquino de Huisgen, que se conoce más comúnmente como química de clic. En esta realización particular, el grupo químico G resultante que se forma como resultado de la cicloadición azida-alquino es un triazol tal como se ilustra en el esquema 9:

50



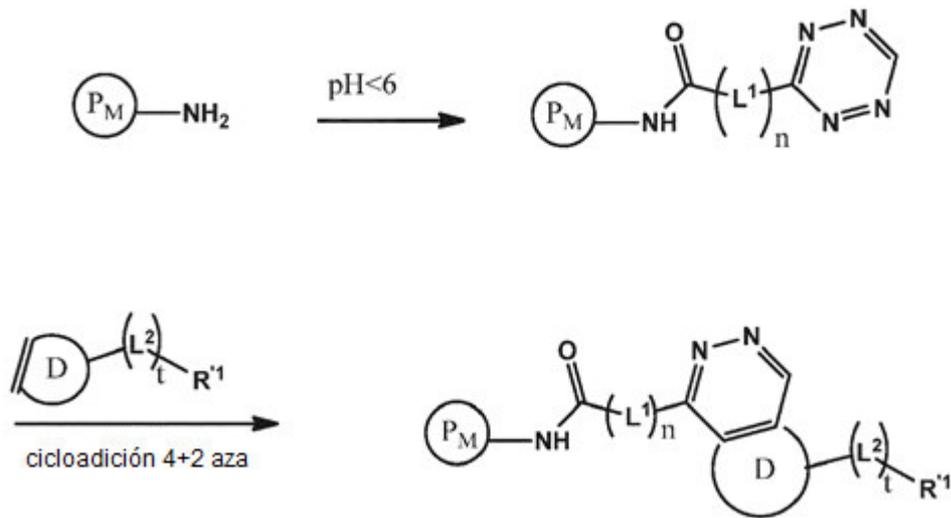
Esquema 9

- 5 en donde todas las variables se han descrito arriba y C1 es un sistema de anillo carbocíclico o heterocíclico mono-, di- o tri-cíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido con flúor. En una realización, L¹ es un enlazador de alqueno C1-C20, en donde la cadena de alqueno está opcionalmente sustituido con oxo (=O), y en donde uno o más carbonos está sustituido con O o NH.
- 10 En otra realización, la invención pertenece a un método, en donde R1 es un resto que contiene un grupo reactivo de tetrazina para facilitar la unión covalente a un agente biointeractivo/analítico que contiene una funcionalidad alqueno (preferiblemente un alqueno filtrado) (es decir: en el compuesto **8A**, s es 0 y F_g es alqueno o cicloalqueno). Alternativamente, el agente biointeractivo o analítico puede unirse a un enlazador L² que contiene una funcionalidad alqueno en una posición terminal (es decir: en el compuesto **8A** s es 1 y F_g es alqueno o cicloalqueno). Los restos de tetrazina están fácilmente disponibles de fuentes comerciales y arriba se han descrito ejemplos no limitantes. Esta química se conoce como cicloadición aza [4 + 2]. En esta realización particular, el grupo químico **G** resultante que se forma como resultado de la cicloadición tetrazina-alqueno es un grupo multicíclico de Fórmula:
- 15



- 20 en donde u es un número entero de 0 a 2 y v es un número entero de 0 a 3.

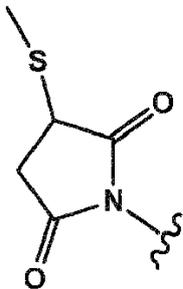
El esquema 10 ilustra la derivatización adicional utilizando cicloadición de tetrazina-alqueno.



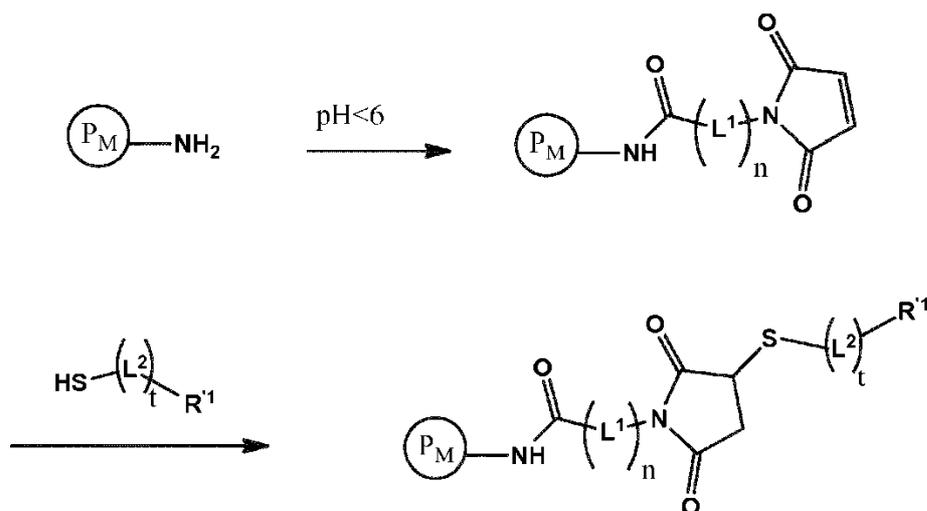
Esquema 10

- 5 en donde las variables son como se definen arriba y D es un alqueno deformado, es decir, un sistema de anillo mono- o biciclo-alquenoilo.

En otra divulgación, la divulgación pertenece a un método, en donde R¹ es un resto que contiene un grupo reactivo de maleimida para facilitar la unión covalente a un agente biointeractivo/analítico que contiene una funcionalidad tiol (es decir: en el compuesto **8A**, s es 0 y F_g es -SH). Alternativamente, el agente biointeractivo o analítico puede unirse a un enlazador L² que contiene una funcionalidad alqueno en una posición terminal (es decir: en el compuesto **8A** s es 1 y F_g es -SH). Restos que contienen maleimida están fácilmente disponibles de fuentes comerciales. En esta realización particular, el grupo químico **G** resultante que se forma como resultado de la reacción de tiol-maleimida es de Fórmula:



El esquema 11 ilustra la derivatización adicional de maleimida-tiol :



Esquema 11

- 5 La química y los reactivos descritos arriba se utilizan para generar la construcción $F_g-(L^2)_t-R^1$ y/o forma activada de $HO-C(O)-(L^1)_n-R^1$ y/o forma activada de $HO-C(O)-(L^1)_n-R_g$. Cada una de las unidades de enlace puede poseer el grupo reactivo/grupo funcional apropiado en cada uno de los extremos. Los grupos reactivos de alquino (cicloalquino), maleimida o tetrazina se hacen reaccionar con un grupo funcional (azida, tiol y alqueno, respectivamente) que está presente en el participante en la reacción.

10

Aplicaciones médicas y de diagnóstico del método de la invención

- 15 Por lo tanto, puede ser deseable modificar proteínas para alterar las propiedades físico-químicas de la proteína/el péptido tal como, por ejemplo, para aumentar (o para disminuir) la solubilidad para modificar la biodisponibilidad de proteínas terapéuticas. Puede ser deseable modificar la tasa de aclaramiento en el cuerpo mediante la conjugación de compuestos con la proteína/el péptido que se une a las proteínas plasmáticas, tales como, p. ej., albúmina, o que incrementan el tamaño de la proteína para prevenir o demorar la descarga a través de los riñones. La conjugación también puede alterar y, en particular, disminuir la susceptibilidad de una proteína/un péptido a la hidrólisis tal como, p. ej., la proteólisis in vivo.

20

En otra divulgación, puede ser deseable conjugar un marcador para facilitar el análisis de la proteína/el péptido. Ejemplos de marcadores de este tipo incluyen isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes tales como los fluoróforos ya descritos y sustratos enzimáticos.

- 25 En aún otra divulgación, un compuesto se conjuga con una proteína para facilitar el aislamiento de la proteína. Por ejemplo, se puede conjugar a la proteína un compuesto con una afinidad específica por un material de una columna particular. También puede ser deseable modificar la inmunogenicidad de una proteína, por ejemplo, conjugando una proteína para ocultar, enmascarar o eclipsar uno o más epítopos inmunogénicos en la proteína.

- 30 En una divulgación, la divulgación proporciona un método para mejorar las propiedades farmacológicas de proteínas diana. La mejora es con respecto a la proteína sin modificar correspondiente. Ejemplos de propiedades farmacológicas de este tipo incluyen semivida funcional in vivo, inmunogenicidad, filtración renal, protección con proteasa y unión a albúmina o unión a otras proteínas plasmáticas de cualquier proteína específica.

35 Usos Terapéuticos de las Proteínas Modificadas

- En la medida en que la proteína/el péptido no modificado sea una proteína terapéutica, la invención también se refiere a las proteínas modificadas para uso en terapia y, en particular, a composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas modificadas. Por tanto, tal como se utiliza en esta memoria, el término "tratamiento" y la expresión "que trata" se refieren al control y al cuidado de un paciente con la finalidad de combatir una afección tal como una enfermedad o un trastorno. Se pretende que el término o la expresión incluya el espectro completo de tratamientos para una afección dada que el paciente padece tal como la administración del compuesto activo con el fin de aliviar los síntomas o complicaciones, con el fin de retrasar la progresión de la enfermedad, del trastorno o de la afección, con el fin de aliviar o calmar los síntomas y complicaciones y/o con el fin de curar o eliminar la enfermedad, el trastorno o la afección, así como para prevenir la afección, en donde la prevención se debe entender como el control y el cuidado de un paciente con el fin de combatir la enfermedad, afección o el trastorno e incluye la administración de los

45

compuestos activos para evitar la aparición de los síntomas o complicaciones. El paciente a tratar es preferentemente un mamífero, en particular, un ser humano, pero también puede incluir animales, tales como perros, gatos, vacas, ovejas y cerdos. No obstante, se debería reconocer que los regímenes terapéuticos y regímenes profilácticos (preventivos) representan aspectos separados para los usos divulgados en la presente y contemplados por el facultativo o veterinario a cargo del tratamiento.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína modificada tal como se utiliza en esta memoria se refiere a una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad determinada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Cantidades terapéuticamente eficaces para cada finalidad dependerán, p. ej., de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso, sexo, edad y estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosis apropiada se puede conseguir utilizando experimentación rutinaria, construyendo una matriz de valores y evaluando puntos diferentes en la matriz, todo lo cual se encuentra dentro de las capacidades normales de un facultativo o veterinario formado.

Los métodos y composiciones descritos en esta memoria proporcionan proteínas modificadas para uso en terapia. Como tal, una dosis parenteral típica está en el intervalo de 10 ~ 9 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por administración. Las dosis de administración habituales son de aproximadamente 0,0000001 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por administración. La dosis exacta dependerá, por ejemplo, de la indicación, el medicamento, la frecuencia y el modo de administración, el sexo, la edad y el estado físico general del sujeto a tratar, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o afección a tratar, el efecto deseado del tratamiento y otros factores evidentes para el experto en la técnica. Frecuencias de dosificación típicas son dos veces al día, una vez al día, bi -diariamente, dos veces por semana, una vez por semana o con intervalos de dosificación incluso más largos. Debido a las semividas prolongadas de los compuestos activos en comparación con la proteína no conjugada correspondiente, el régimen de dosificación con intervalos de dosificación largos, tales como dos veces por semana, una vez por semana o incluso con intervalos de dosificación más largos, es una realización particular. Muchas enfermedades se tratan utilizando más de un medicamento en el tratamiento, ya sea administrado concomitantemente o administrado secuencialmente. Por lo tanto, se contempla que las proteínas modificadas en los métodos terapéuticos para el tratamiento de una de las enfermedades se puedan utilizar combinadas con uno o más compuestos terapéuticamente activos diferentes utilizados normalmente en el tratamiento de una enfermedad. También se contempla que el uso de la proteína modificada combinada con otros compuestos terapéuticamente activos utilizados normalmente en el tratamiento de una enfermedad en la fabricación de un medicamento para esa enfermedad.

Composición farmacéutica

El conjugado preparado utilizando el método de la presente invención puede administrarse en cualquiera de una diversidad de maneras, incluyendo por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, por inhalación, intranasal, oral etc. de manera particularmente preferidos se emplea la administración continua intravenosa de los conjugados, o una amida, éster o sal del mismo. Los conjugados pueden administrarse como un bolo o como una infusión continua a lo largo de un período de tiempo. Se puede utilizar una bomba implantable. La administración de conjugados intermitente o continua puede continuarse durante uno a varios días (p. ej., 2-3 o más días), o durante períodos de tiempo más prolongados, p. ej., semanas, meses o años. La administración de conjugados intermitente o continua se puede proporcionar durante al menos aproximadamente 3 días, preferiblemente al menos aproximadamente 6 días. Se puede proporcionar una administración de conjugado intermitente o continua durante al menos aproximadamente una semana. Puede proporcionarse una administración de conjugado intermitente o continua durante al menos aproximadamente dos semanas. Puede ser deseable mantener una concentración de conjugado en plasma media por encima de un valor umbral particular durante la administración o entre la administración de múltiples dosis. Una concentración deseable puede determinarse, por ejemplo, basándose en la condición fisiológica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, etc. Valor o valores deseables de este tipo pueden identificarse mediante la realización de ensayos clínicos estándar. Alternativamente, los péptidos y conjugados de los mismos podrían administrarse por vía oral a través del mecanismo FcRn. (Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat Commun. 3;3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262-G270, 2013).

Se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende un conjugado preparado utilizando el método de la presente invención o una amida, un éster o una sal de los de los mismos y uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede formularse para rutas particulares de administración, tales como administración oral, administración subcutánea, administración parenteral y la administración rectal, etc. Además, las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en forma sólida (incluyendo, sin limitación, cápsulas, comprimidos, píldoras, gránulos, liofilizados, polvos o supositorios) o en forma líquida (incluyendo, sin limitación, soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como fabricación aséptica, esterilización y/o pueden contener diluyentes inertes convencionales, agentes formadores de torta, agentes de tonicidad, agentes lubricantes o agentes tampón, así como adyuvantes, tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes y tampones, etc.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen típicamente soluciones acuosas estériles (en los casos en los que sean hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles.

5 Para la administración intravenosa, soportes adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de ser incorporada en una jeringa. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. En general, el soporte relevante puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, aminoácidos, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Se puede incorporar un excipiente multifuncional, tal como albúmina recombinante en el proceso de formulación para facilitar la estabilización del producto conjugado frente a la degradación y ayudar en la administración y liberación del componente activo. (BioPharm International, 2012, Vol 23, Número 3, págs. 40-44).

25 Determinadas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias valiosas desde el punto de vista terapéutico. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con métodos convencionales de mezclado, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen aproximadamente 0,1-75%, o contienen aproximadamente 1-50% del ingrediente activo.

30 Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión de carácter básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo.

40 Las composiciones orales en general incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, grageas o cápsulas, p. ej., cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un soporte fluido para uso como un colutorio. Pueden incluirse agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja. Formulaciones para administración oral pueden incorporar de forma ventajosa agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o potenciar la absorción.

55 Para la administración por inhalación, los agentes terapéuticos se administran preferiblemente en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador. Cabe señalar que los pulmones proporcionan una gran área de superficie para la administración sistémica de agentes terapéuticos.

60 Los agentes pueden estar encapsulados, p. ej., en micropartículas poliméricas tales como las descritas en la publicación de EE.UU. 20040096403, o en asociación con cualquiera de una amplia diversidad de otros vehículos de administración de fármacos que se conocen en la técnica. Los agentes pueden administrarse en asociación con un lípido cargado tal como se describe, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. 20040062718. Cabe señalar que el último sistema se ha utilizado para la administración de un polipéptido terapéutico, insulina, demostrando la utilidad de este sistema para la administración de agentes peptídicos.

65 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos.

Composiciones adecuadas para la aplicación transdérmica incluyen una cantidad eficaz de un conjugado con un soporte adecuado. Soportes adecuados para la administración transdérmica incluyen disolventes absorbibles farmacológicamente aceptables para ayudar al paso a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos tienen la forma de un vendaje que comprende un miembro de respaldo, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con soportes, opcionalmente una barrera de control de la velocidad para administrar el compuesto de la piel del huésped a una velocidad controlada y predeterminada a lo largo de un período de tiempo prolongado y medios para asegurar el dispositivo a la piel.

Composiciones adecuadas para aplicación tópica, *p. ej.*, a la piel y los ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, pomadas, cremas, geles o formulaciones pulverizables, *p. ej.*, para la administración por aerosol o similares. Sistemas de administración tópica de este tipo serán en particular apropiados para la aplicación dérmica. Por lo tanto, son particularmente adecuados para su uso en formulaciones tópicas, incluyendo cosméticas, bien conocidas en la técnica. Éstas pueden contener solubilizantes, estabilizantes, agentes potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

La composición farmacéutica puede ser para administración subcutánea. Se conocen en la técnica componentes y métodos de formulación adecuados para la administración subcutánea de agentes terapéuticos polipeptídicos (*p. ej.*, anticuerpos, proteínas de fusión y similares). Véanse, *p. ej.*, la solicitud de patente estadounidense publicada N° 2011/0044977 y la patente de EE.UU. N° 8.465.739 y la patente de EE.UU. N° 8.476.239. Típicamente, las composiciones farmacéuticas para la administración subcutánea contienen estabilizadores adecuados (*p. ej.*, aminoácidos, tales como metionina, y sacáridos, tales como sacarosa), agentes tampón y agentes tonificantes.

Tal como se utiliza en esta memoria, una aplicación tópica también puede pertenecer a una inhalación o a una aplicación intranasal. Se pueden administrar convenientemente en forma de un polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, por ejemplo, una mezcla seca con lactosa, o una partícula de componente mixto, por ejemplo con fosfolípidos) desde un inhalador de polvo seco o una presentación en aerosol de un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado.

Pueden proporcionarse composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprendan uno o más agentes que reduzcan la velocidad a la que se descompondrá el compuesto preparado por el método de la presente invención como ingrediente activo. Agentes de este tipo, a los que se alude en esta memoria como "estabilizadores", incluyen, pero no se limitan a antioxidantes, tales como ácido ascórbico, tampones de pH o tampones de sal, albúmina recombinante.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los conjugados y que típicamente no son biológicamente o de otra manera indeseables. En muchos casos, los conjugados son capaces de formar sales con ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

Sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden formar con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, *p. ej.*, sales acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canforsulfonato, cloruro/hidrocloreuro, cloroteofilonato, citrato, etandisulfonato, fumarato, gluceptato, glucuronato, glucuronato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, pamoato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

Ácidos inorgánicos de los que se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares.

Ácidos orgánicos a partir de los cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido sulfosalicílico y similares. Se pueden formar sales por adición de bases farmacéuticamente aceptables con bases orgánicas e inorgánicas.

Bases inorgánicas a partir de las cuales se pueden obtener sales incluyen, por ejemplo, sales de amonio y metales de las columnas I a XII de la Tabla Periódica. En determinadas realizaciones, las sales se obtienen a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc y cobre; algunas sales particularmente adecuadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Bases orgánicas a partir de las cuales se pueden obtener sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, resinas de intercambio iónico básicas y similares. Determinadas aminas orgánicas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden sintetizar a partir de un compuesto precursor, un resto de carácter básico o ácido, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, las sales de este tipo se pueden preparar haciendo reaccionar formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg o K, o similares), o haciendo reaccionar formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Las reacciones de este tipo normalmente se llevan a cabo en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, cuando sea posible, es deseable el uso de medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Pueden encontrarse listas de sales adecuadas adicionales, p. ej., en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa, (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection, and Use" de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "soporte farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (*p. ej.*, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, excipientes multifuncionales tales como albúmina recombinante y similares y combinaciones de los mismos, tales como conocerán los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Salvo en lo que concierne a cualquier portador convencional que sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Ejemplo de la invención

25 **Método Experimental**

Abreviaturas

ACN	acetonitrilo
BOC	<i>tert.</i> -butiloxicarbonilo
DIEA	diisopropiletilamina
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DTT	Ditiotreitól
Fmoc	cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo
HATU	hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-óxido
HCTU	hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio
HOBt	hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPF6	ácido hexafluorofosfórico
LC	cromatografía líquida
MALDI	desorción/ionización por láser asistida por matriz
MS	Espectrometría de masas
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMP	N-metilpirrolidona
RMN	resonancia magnética nuclear
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PEG	polietilenglicol
PS	síntesis de péptidos
PG	grupo protector
RP-HPLC	HPLC de fase inversa
SM	material de partida
SCF	fluido supercrítico
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida
TIC	total en corriente
TIPS	triisopropilsilano
TFA	ácido trifluoroacético
Trt	tritol
UPLC	Cromatografía líquida de ultra rendimiento

30 Métodos de LCMS

ES 2 818 109 T3

Método A	Columna	Acquity BEH 1,7 μ m 2,1 x 50 mm
	Temperatura de la columna	50 C
	Eluyentes	A: Agua (ácido fórmico al 0,1%); B: ACN (ácido fórmico al 0,1%);
	Caudal	1 mL/min
	Gradiente	0 min 40% de B; 40% a 98% de B en 1,40 min; 2,05 min 98% de B; 2,1 min 40% de B
	Espectrómetro de masas	Cuadripolo Sencillo ESI intervalo de escaneo 120-1600
	UPLC	Waters Acquity
Método B	Columna	Proswift Monolith 4,6 x 50 mm
	Temperatura de la columna	50 C
	Eluyentes	A: Agua (ácido fórmico al 0,1%); B: ACN (ácido fórmico al 0,1%);
	Caudal	1 mL/min
	Gradiente	0,7 min 2% de B; 2% a 60% de B en 12,8 min; 14 min 60% de B; 14,2 min 2% de B
	Espectrómetro de masas	Qtof intervalo de escaneo ESI 600-3500; desconvolucionado por Max Ent 1 en el paquete de software Mass Lynx
	UPLC	Waters Acquity
Método C	Columna	Hilic 2,1 x 100 mm
	Temperatura de la columna	55 C
	Eluyentes	A: CO ₂ B: MeOH
	Caudal	2 mL/min
	Gradiente	0,15 min 2% de B; 2% a 50% de B en 1,5 min; 2,1 min 50% de B; 2,25 min 2% de B; 2,5 min 2% de B
	Espectrómetro de masas	Cuadripolo Simple ESI
	SCF	Waters Acquity
Método D	Columna	Proswift Monolith 4,6 x 50 mm
	Temperatura de la columna	50 C
	Eluyentes	A: Agua (ácido fórmico al 0,1%) B: ACN (ácido fórmico al 0,1%);
	Caudal	1 mL/min
	Gradiente	0 min 3% de B; 3% a 90% de B en 7 min; 7,1 min 15% de B; 7,70 min 95% de B; 7,8 min 3% de B
	Espectrómetro de masas	Qtof intervalo de escaneo ESI 100-1900; desconvolucionado por Max Ent 1 en el paquete de software Mass Lynx
	UPLC	Waters Acquity
Método E	Columna	XBridge Columna C18, 3,5 μ m, 2,1 x 50 mm
	Temperatura de la columna	50 C
	Eluyentes	A: Agua (ácido fórmico al 0,1%) B: ACN
	Caudal	1mL/min 0,0 min a 1,21 min; 1 mL/min a 2 mL/min en 0,49 min; 1,5 mL/min a 1,0 mL/min en 0,29 min
	Gradiente	0 min 1% de B; 1% a 30% de B en 1,2 min; 1,21 min 95% de B; 1,71 min 1% de B
	Espectrómetro de masas	Cuadripolo Sencillo ESI intervalo de escaneo 150-1600
	HPLC	Agilent 1100

Método F de UPLC HRMS:

Columna: Acquity BEH300 C4 1,7 μ m, 2,1 x 50 mm

Eluyente A: Agua (TFA al 0,1%)

Eluyente B: ACN (TFA al 0,1%)

Caudal: 0,5 mL/min

Temperatura: 40 °C

Gradiente: 20% mantener 0,5 min, rampa a ACN al 80% en 10 min

Síntesis general de péptidos (etapa a del método de la invención: modificar el péptido de modo que el péptido resultante contenga una histidina en la posición adyacente al aminoácido del extremo N)

Los péptidos se sintetizaron mediante química Fmoc en fase sólida estándar. Los péptidos se ensamblaron en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty (CEM Corporation, Carolina del Norte, EE. UU.). Los péptidos con una carboxamida no sustituida en el extremo C se sintetizaron a partir de resina Rink-Amida-AM protegida con Fmoc (Novabiochem, EE.UU.).

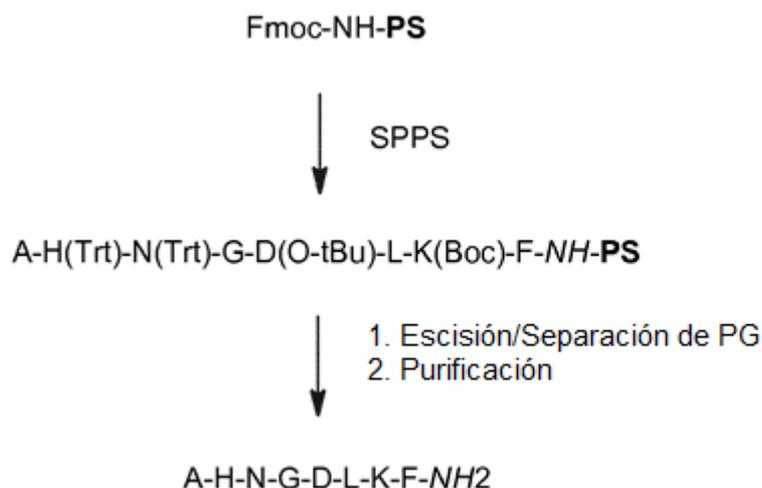
Ciclo de Síntesis: La resina se lavó con DMF y DCM. Fmoc se separó mediante tratamiento con piperidina al 20%/DMF (típicamente 7 mL por 0,1 mmol dos veces). La resina se lavó con DMF y el acoplamiento se realizó mediante la adición del aminoácido Fmoc (5 eq.; solución 0,2 M en DMF), HCTU (5 eq.; solución 0,5 M en DMF) y DIPEA (10 eq.; solución 2 M en NMP), seguido de mezcla de la suspensión con nitrógeno a 75 °C durante típicamente 5 a 50 min con una potencia de microondas de 0 a 20 vatios, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMF, la etapa de acoplamiento podría repetirse una vez dependiendo de los requisitos específicos. La resina se lavó con DMF.

Los péptidos se purificaron mediante HPLC preparativa de fase inversa. Se utilizó la siguiente columna: columna Waters XBridge 30 x 50 mm 5 um. Las fases móviles consistieron en el eluyente A (NH₄OH 5 mM en H₂O) y eluyente B (ACN). Los gradientes se diseñaron en función de los requisitos específicos del problema de separación. Los productos puros se liofilizaron a partir de ACN/H₂O.

En lo que sigue se describe la síntesis de un ejemplo representativo.

Péptido 1: AHNGDLKF-NH₂

Síntesis de AHNGDLKF-NH₂



Preparación de A-H(Trt)-N(Trt)-G-D(O-tBu)-L-K(Boc)-F-NH-PS

La resina Rink-Amida-AM protegida con Fmoc (316 mg, 0,25 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty.

El acoplamiento se realizó de la siguiente manera:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Temperatura °C	Potencia del microondas
1	H	1 x 7,5 min	75	20
2	K(Boc)	1 x 7,5 min	75	20
3	L	1 x 7,5 min	75	25
4	D(O-tBu)	1 x 7,5 min	75	20
5	G	1 x 7,5 min	75	20
6	N(Trt)	1 x 7,5 min	75	20
7	H(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1 x 4 min	50	25

8	A	1 x 7,5 min	75	20
---	---	-------------	----	----

Preparación de Péptido 1

(Escisión de la resina con separación concomitante del grupo protector y luego purificación)

5 Se añadió una mezcla de TFA/H₂O/TIPS (95:2,5:2,5) (3 mL, que contenía 0,2 g de DTT) al compuesto Intermedio (0,25 mmol) y la suspensión se agitó a ta durante 3 h. Se separó por filtración la solución de escisión y se lavó la resina con TFA ac. al 95% (1 mL). Las soluciones combinadas de escisión y lavado se vertieron sobre una mezcla de dietil éter frío (30 mL), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Se añadió dietil éter (30 mL) al residuo, la suspensión se agitó con vórtex durante 3 min y se centrifugó, y el sobrenadante se vertió. El proceso de lavado se repitió dos veces. El sólido se secó en vacío. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa (gradiente: 5-20% de B a lo largo de 3,2 min) y se liofilizó en ACN/H₂O para proporcionar Ejemplo 1 (49 mg, 0,054 mmol). LCMS (Waters Acquity UPLC XBridge C18 3,5 µm 3,0 x 30 mm, 40 °C, Eluyente A: Agua + NH₄OH 5 mM, Eluyente B: ACN, gradiente de 5% a 95% de B/A a lo largo de 2 min): Tiempo de retención: 0,70 min ; medido: [M + H]⁺ = 900,8; calculado: [M + H]⁺ = 901,0).

Los péptidos 2 y 3 se sintetizaron por analogía:

Péptido 2 ALNGDLKF-NH₂

20 LCMS Tiempo de retención: 0,81 min; medido: [M + H]⁺ = 876,8; calculado: [M + H]⁺ = 877,0).

Péptido 3 (ejemplo de referencia). MHNGDHLF-NH₂

25 LCMS Tiempo de retención: 0,68 min; medido: [M + H]⁺ = 969,8; calculado: [M + H]⁺ = 970,1).

Ensayo de reactividad general del NHS: (Etapa b de la invención)

30 Sulfo-NHS-LC biotina (5 eq) se añade al péptido (0,2 mg/ml) en tampón NaOAc 30 mM pH 4 y la reacción se mantiene a temp. ambiente. Después de una hora, la reacción se enfría bruscamente con 200 eq de hidrato de hidrazina y la conversión se controla mediante LCMS y se mapea mediante MALDI o RMN. La relación de compuestos se estimó en base a la absorción UV a 214 nm.

35 SM = material de partida

+ 1 = reactividad en el extremo N

+ 1' = reactividad en lisina

40 + 2 = reactividad tanto en el extremo N como en lisina

Resultados de secuencia por LC-MS (SM: +1:+1':+2)*

45 AHNGDLKL0:9:1:0

ALNGDLKF7:1:0:0

50 MHNGDHLF0:10:n/d:0

Ejemplo 1: Etapa b de la invención utilizando AHNGDLKF-NH₂ y Sulfo-NHS-LC biotina como agente activante

55 LCMS Tiempo de Retención del Producto: 1,81 min; medido: [M + H]⁺ = 1239,63; calculado: [M + H]⁺ = 1239,6200).

Datos de mapeo (utilizando el método MALDI LIFT): Biotina + Alanina: medido [M + H]⁺ = ~ 411; calculado: [M + H]⁺ = 411,21). Biotina +AH: medido [M + H]⁺ = 548,27; calculado: [M + H]⁺ = 548,27). No se detectó masa de alanina sola.

Ejemplo 2: Etapa b de la invención utilizando ALNGDLKF-NH₂ y Sulfo-NHS-LC biotina como agente activante

60 LCMS Tiempo de Retención del Producto: 1,29 min; medido: [M + H]⁺ = 876,50; calculado: [M + H]⁺ = 877,0). Muy poca adición (principalmente material de partida)

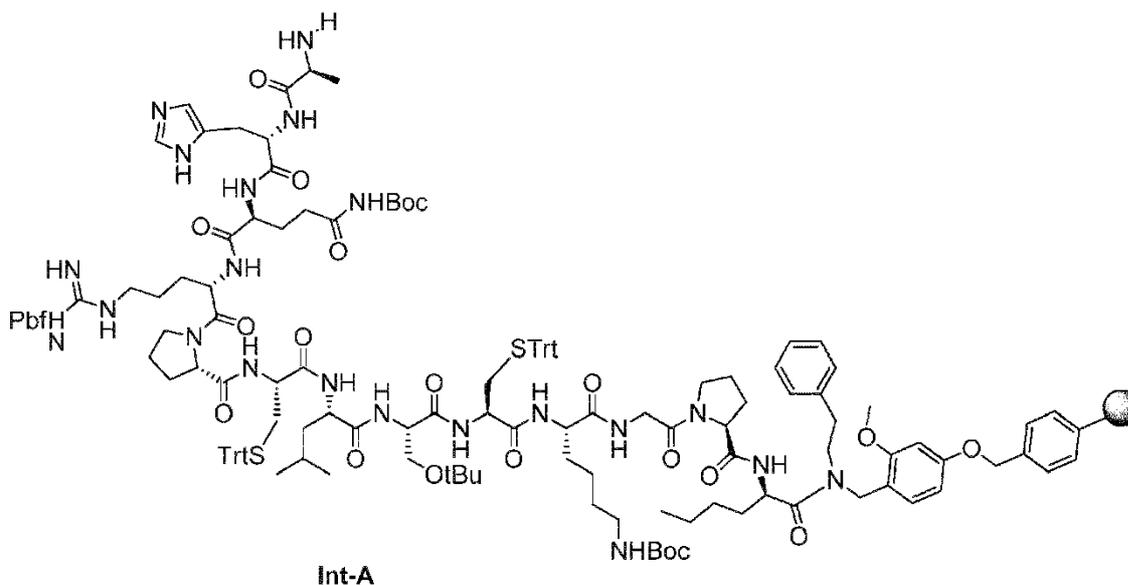
Ejemplo 3: Etapa b utilizando MHNGDHLF -NH₂ y Sulfo-NHS-LC biotina como un agente activante

LCMS Tiempo de Retención del Producto: 2,05 min; medido: [M + H]⁺ = 1308,5972; calculado: [M + H]⁺ = 1308,59).

Datos de mapeo (utilizando el método MALDI LIFT): Datos de mapeo (utilizando el método MALDI LIFT): Biotina + Metionina: medido [M - H] = 470,64; calculado: [M - H] = 470,66). No se detectó masa de metionina sola.

Ejemplo 4: Conjugación específica para el sitio de biotina Sulfo-NHS-LC con un péptido agonista de APJ (compuesto Intermedio c):

Etapa 1: Síntesis de A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-fenetil amina **compuesto Intermedio a**



Se sometió resina de fenetilamina-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,1 mmol, 1,0 mmol/g) a síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático (CEM Liberty Blue Microwave) con doble Arg estándar para los residuos de Arg y doble tiempo acoplado con D-Nle. Los aminoácidos se prepararon como soluciones 0,2 M en DMF. Un ciclo de acoplamiento estándar se definió de la siguiente manera:

•Acoplamiento de aminoácido: AA (5 eq.), HATU (5 eq.), DIEA (25 eq.)

•Lavado: DMF (3 X 7 mL)

•Desprotección de Fmoc: 20% Piperidina/HOBt 0,1 M (2 x 7 mL)

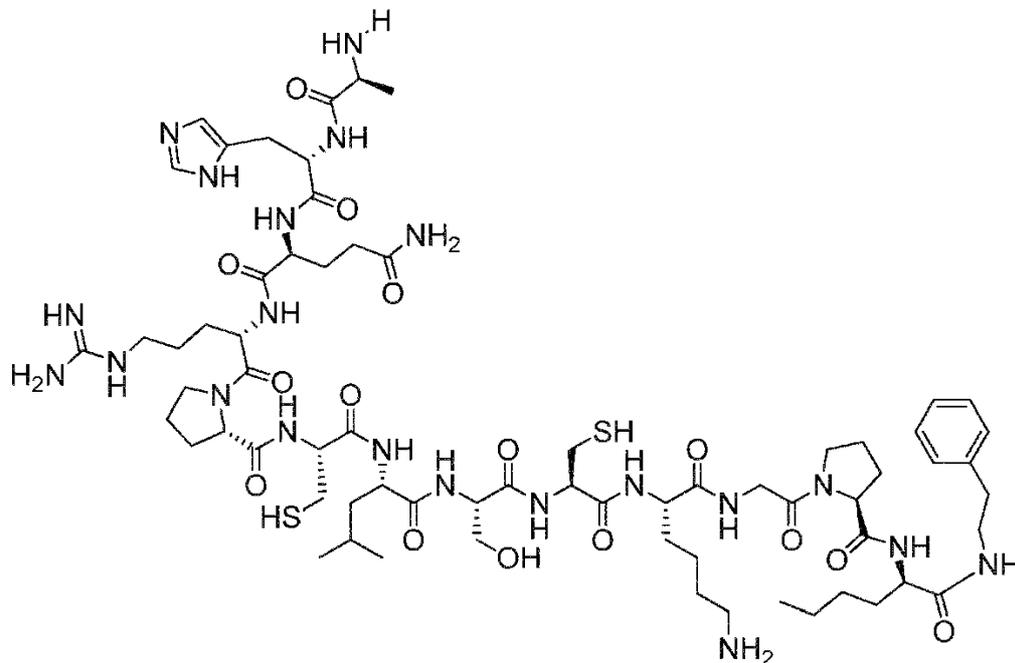
•Lavado: DMF (4 x 7 mL, luego 1 x 5 mL)

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción (Temp)	Método de Acoplamiento
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (2 x 50 mL) y DCM (2 x 50 mL) y luego se secó en vacío para dar el **compuesto Intermedio a** (276 mg, 0,1 mmol).

Etapa 2: Preparación del **compuesto Intermedio b** (*Escisión de péptido de resina*)

5



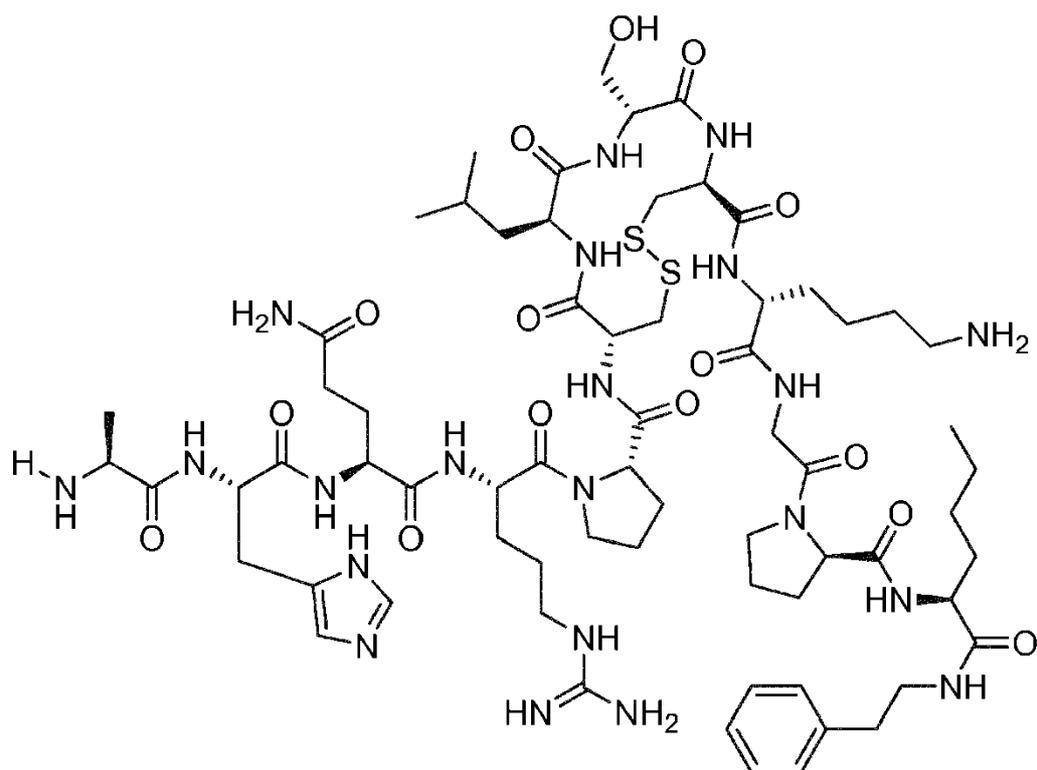
Int-b

Compuesto Intermedio a (276 mg, 0,1 mmol) se combinó con 4 mL de solución de TFA (37 mL de TFA, 1 mL de H₂O, 1 mL de TIPS, 3,06 g de DTT) y se agitó a t.a. durante 3 horas. La solución se separó de la resina y se precipitó en 40 mL de Et₂O frío. La solución se agitó con vórtex y se dejó reposar sobre hielo durante 10 minutos antes de centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se separó y el sólido blanco se lavó dos veces más con Et₂O frío (40 mL cada vez), se centrifugó (5 minutos cada vez) y se decantó. El sólido se secó en vacío durante la noche, produciendo **compuesto Intermedio b-lote 1** (17,4 mg, 0,012 mmol). LCMS (SQ2 Análisis del Producto-Ácido-Péptido-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 1,83 minutos, MS [M+H] 1513,5.

10

15

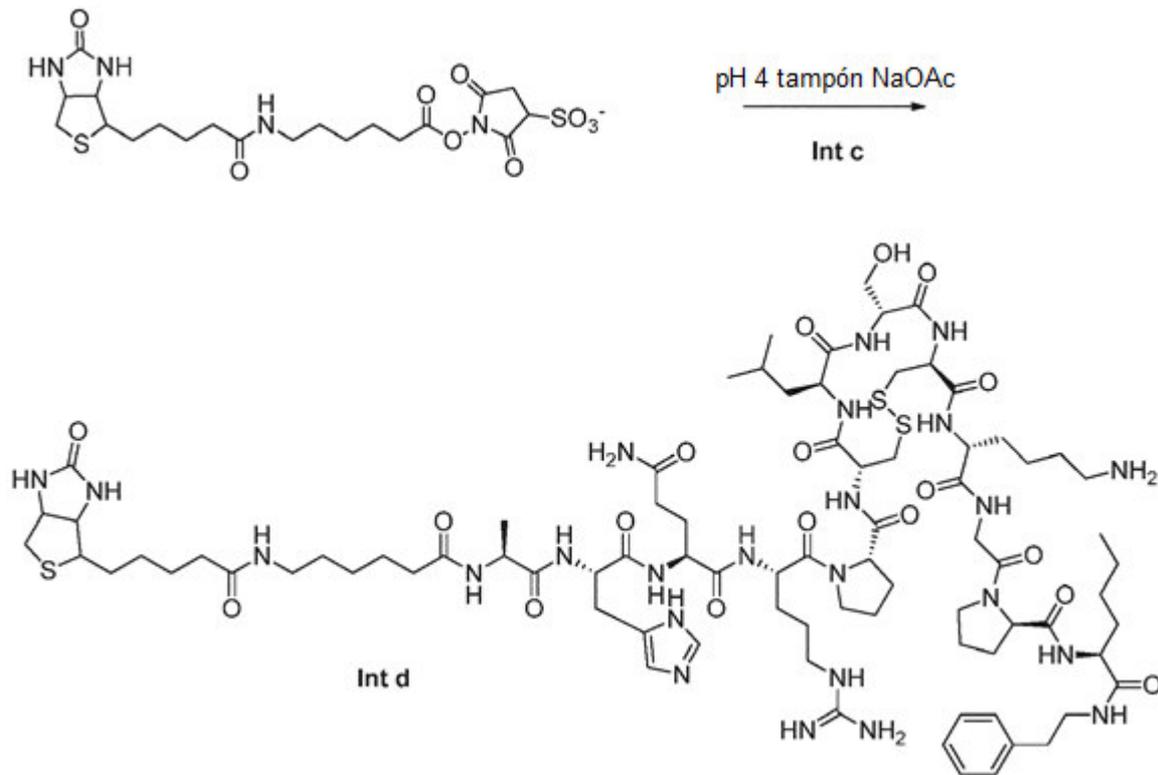
Etapa 3: Preparación del **compuesto Intermedio c** (*Ciclación de residuos cisteína*)



5 **Compuesto Intermedio b-lotes 1 y 2** (29,6 mg, 0,020 mmol) en agua (3 mL) y 10 gotas de DMSO para dar una solución ligeramente turbia. Se añadió gota a gota lentamente yodo (50 mM en HOAc, 0,783 mL, 0,039 mmol) y la reacción se mezcló a t.a. durante la noche. El análisis LCMS de la reacción bruta mostró una conversión completa del material de partida. Se añadió gota a gota ácido ascórbico 0,5 M hasta que se disipó el color. El material se purificó mediante HPLC activada por MS. La liofilización de las fracciones reunidas dio 7 mg del producto deseado en forma de un polvo blanco (4,63 μ mol, 24%). LCMS (SQ2 Análisis del Producto-Ácido-Péptido, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 μ m, 2,1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 0,90 minutos, MS [M+H] 1511,8.

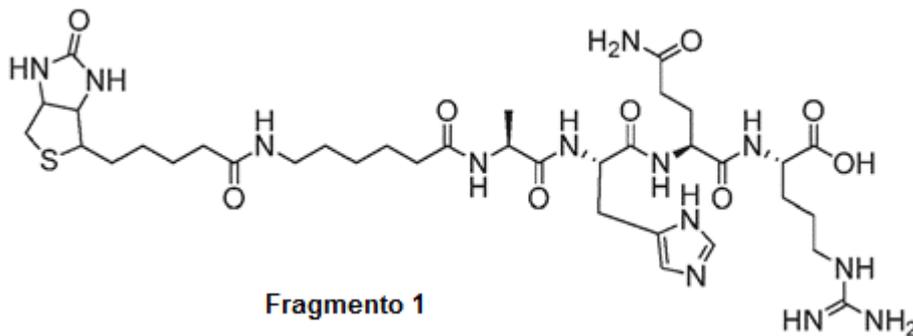
10

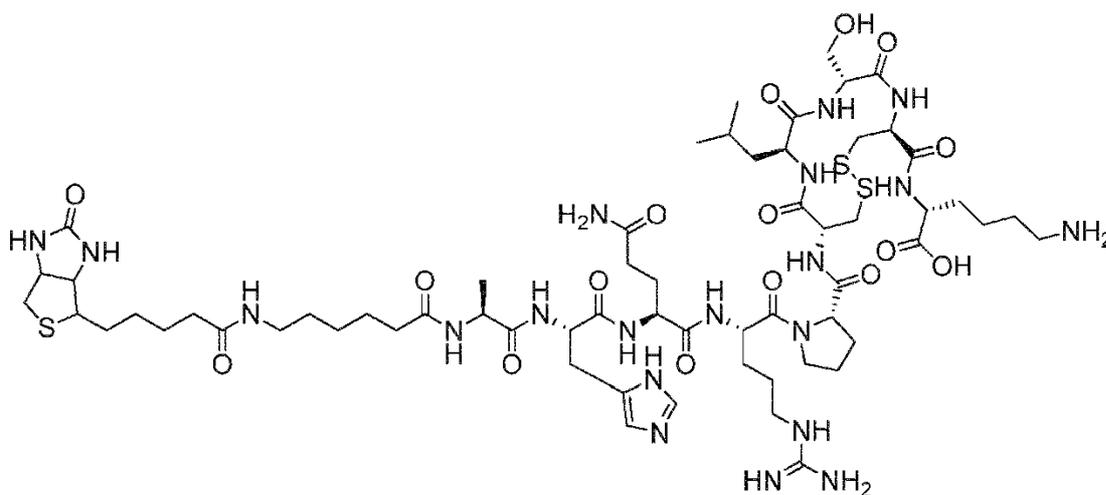
Etapa 4: Preparación del **compuesto Intermedio d** (*Reactividad NHS/Péptido*)



5 Sulfo-NHS-LC-Biotina (Sigma Aldrich, 0,737 mg, 1,324 μmol , 5 eq.) se disolvió en tampón NaOAc 30 mM pH 4 (266 μL) y se añadió al **compuesto Intermedio c** (0,4 mg, 0,265 mmol). La reacción se mezcló a t.a. durante 16 horas. 33 μL de la mezcla de reacción se separaron y se enfriaron bruscamente inactivó con hidrazina monohidrato (0,6 μl , 200 eq.). La conversión completa del material de partida en producto +1 se observó mediante LCMS. El marcaje en el residuo de Ala N-terminal se confirmó digiriendo la mezcla de reacción con Tripsina Gold (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante y análisis LCMS. LCMS (SQ2 Análisis del Producto-Ácido-Péptido, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 μm , 2,1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 2,29 minutos, MS $[M+2/2]$ 925,8.

10 Etapa 5: Digestión de **compuesto Intermedio d** con Trypsin Gold (Marcaje N-terminal)





Se preparó una solución de Trypsin Gold (Promega Parte nº TB309) en ácido acético 50 mM (1 µg/µL). La mezcla bruta de **compuesto Intermedio d** (100 µL, 0,081 µmol) se diluyó con 50 mM de Tris-HCl, CaCl₂ 1 mM pH 7,4 (200 µL) para dar una solución de 0,5 mg/mL. Se añadió Trypsin Gold (3 µL) y la reacción se mezcló a 37°C durante 16 horas. El análisis LCMS indicó que la escisión se había producido en las posiciones R y K C-terminales del **compuesto Intermedio d** con una adición de biotina en cada uno de los fragmentos. LCMS (SQ4 Análisis del Producto-20 min-Ácido-XXPolar, Acquity CSH 1,7 µm 2,1 x 100 mm, 50°C): **Fragmento 1** AHQR +1 biotina R_t = 5,92 minutos, MS [M+2/2] calculado: 425,715, observado: 426,1; **Fragmento 2**: AHQRPCLSCK +1 biotina R_t = 11,40 minutos, MS [M+2/2] calculado: 740,345, observado: 740,9, MS [M+3/3] calculado: 493,896, observado: 494,4.

Ejemplo de Proteína Terapéutica (GDF15): Etapa a del método de la invención: modificando el péptido de modo que el péptido resultante contenga una histidina en la posición adyacente al aminoácido del extremo N

15 **Expresión de proteínas GDF-15 humanas en células de *E. coli***

Cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Gold (Stratagene) y células Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) se transformaron con construcciones de Secuencia ID N° s 1 a 7 y construcción MAHA-(200-308) -hGDF15, respectivamente, clonadas en vectores pET26b. Las células transformadas se cultivaron bajo selección de antibióticos primero en 3 ml y luego en 50 ml de caldo Luria (Bacto-Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5/L, glucosa 6 g/L) hasta que se alcanzó una DO600 de 1,5. Los precultivos se utilizaron para inocular dos fermentadores de 1 L llenos de medio Terrific Broth (NH₄SO₄ 1,2 g/L, H₂PO₄ 0,041 g/L, K₂HPO₄ 0,052 g/L, Bacto-Triptona 12 g/L, Extracto de levadura 24 g/L). Los cultivos se indujeron mediante la adición automática de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM cuando el pH aumentó por encima de 7,1. Otros parámetros de fermentación fueron: temp = 37°C; pH 7,0 +/- 0,2 ajustado mediante la adición de NaOH/H₂SO₄ 2 N; pO₂ > 30% con cascadas de velocidad del agitador, flujo de aire y adición de oxígeno. Cinco horas después de la inducción, los cultivos se enfriaron a 10°C y las células se recogieron por centrifugación.

30 **Purificación y replegamiento de variantes de GDF15**

a) cuerpos de inclusión

Sedimentos de *E. coli* recombinante que expresan la proteína de interés se resuspendieron (5% p/v) en NaH₂PO₄ 50 mM/NaCl 150 mM/benzamidina.HCl 5 mM/ DTT 5 mM, pH 8,0 a 4°C, se homogeneizaron y lisaron por 2 pasajes por prensa French (800 y 80 bares). Los cuerpos de inclusión (IBs) se aislaron mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 60 min a 4°C.

b) Purificación de proteína bruta no plegada

Los IBs se solubilizaron (5% p/v) en guanidina 6 M/NaH₂PO₄ 100 mM/Tris 10 mM/beta-mercaptoetanol 20 mM, pH 8,0 y se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los desechos se separaron mediante centrifugación a 12,000 rpm. Los IBs solubilizados se purificaron adicionalmente en Ni-NTA-Superflow (la construcción sin la etiqueta His se une también a esta resina debido al alto contenido de histidina). Después de lavar la línea de base con guanidina 6 M/ NaH₂PO₄ 100 mM /Tris 10 mM/beta-mercaptoetanol 5 mM, pH 8,0, el material unido se eluyó con el mismo tampón ajustado a pH 4,5. El material eluido se ajustó a pH 8,0, se añadió DTT 100 mM y la solución se agitó durante la noche a 4°C. A continuación, se ajustó el pH a 2 mediante la adición de ácido trifluoroacético (TFA, solución madre al 10% en agua) y la solución se diluyó adicionalmente 1:1 con TFA al 0,1% en agua. La solución de proteína

bruta se purificó adicionalmente utilizando RP-HPLC (Poros) utilizando un gradiente de acetonitrilo al 0-50% en 50 min. Las fracciones que contenían GDF-15 se combinaron y liofilizaron.

c) Plegamiento de proteínas

5 Método 1: Material liofilizado se disolvió a razón de 2 mg/ml en ácido acético 100 mM, se diluyó 15-20 veces en tampón de plegamiento (CHES 100 mM/NaCl 1 M/CHAPS 30 mM/GSH 5 mM /GSSG 0,5 mM/DMSO al 20%, pH 9,5, 4°C) y la solución se agitó suavemente durante 3 días a 4°C. Después de 3 días, se añadieron 3 volúmenes de ácido acético 100 mM y la solución se concentró por ultrafiltración (corte de 5 kDa) hasta aproximadamente 100-200 ml, se diluyó 10 veces con ácido acético 100 mM y se volvió a concentrar. El material replegado se purificó adicionalmente mediante RP-HPLC preparativa en una columna Vydac C4 a 50°C (tampón A: TFA al 0,1% en agua; tampón B: TFA al 0,05% en acetonitrilo). Después de cargar la columna, se lavó con tampón B al 15% y se eluyó con un gradiente de 15% de B a 65% de B en 50 min. Las fracciones recogidas que contienen la proteína de interés se diluyeron con un volumen igual de tampón A y se liofilizaron. Los rendimientos del replegamiento fueron de aproximadamente el 25% para ambas proteínas.

Método 2: Protocolo seguido como en el método 1 con tampón de plegamiento: CHES 100 mM, pH 9,4, arginina 0,9 M, NaCl 0,5 M, EDTA 1 mM, GSH 2,5 mM, GSSG 1 mM (concentración final).

20 Los siguientes mutantes de GDF15 se prepararon de acuerdo con el procedimiento anterior:

M-(His)₆-hGDF15 (ejemplo de referencia)

MHHHH HHAR NGDHC PLGPG RCCRL HTVRA SLEDL GWADW VLSPR EVQVT MCIGA
CPSQF RAANM HAQIK TSLHR LKPDT VPAPC CVPAS YNPMV LIQKT DTGVS LQTYD
DLLAK DCHCI (SEQ ID No 1).

LCMS: Masa calculada: 26462 Masa Observada: 26464

25 **MH-(199-308)-hGDF15 (ejemplo de referencia)**
MHNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI
KTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID No 2)
LCMS: Masa calculada: 24636 Masa Observada: 24638

30 **M-(His)₆-M-hGDF15 (ejemplo de referencia)**
MHHHHHHMARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQF
RAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI (SEQ
ID No 3).
LCMS: Masa calculada: 26724 Masa Observada: 26725

M-(His)₆-cynoGDF15 (ejemplo de referencia)
MHHHHHHARNGDRCPGPGRCCRLHTVHASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRE
ANMHAQIKMNLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCV (SEQ
ID No 4).
LCMS: Masa calculada (dímero): 26664 Masa Observada: 26665

His-dGDF15 (ejemplo de referencia):
MHHHHHHAHARDGCPLGEGRCCRLQSLRASLQDLGWANWVVPRELDVRMCVGACPSQFR
SANTHAQMQRHLHGLNPDAAPAPCCVPASYEPVLMHQDSGRVSLTPFDDLVAKDCHCV
(SEQ ID NO 5).
LCMS: Masa calculada (dímero): 26368 Masa Observada: 26363

AH-(199-308)-hGDF15
AHNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI
KTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID No 5)

Etapa 1: preparación de la construcción M-His₆-TEV(ENLYFQ/A)-H-hsGDF15 aa199-308

La construcción M-His₆-TEV(ENLYFQ /A) -H-hsGDF15 aa199-308 se preparó de acuerdo con el procedimiento anterior (etapas a, b y c).

Etapa 2: Escisión por TEV de la proteína de la etapa 1

La proteína liofilizada se solubilizó en agua hasta una concentración final de 1,75 mg/ml. La proteína se desplegó de nuevo diluyendo 1:1 en Guan 6 M/Tris 50 mM, pH 8,0 + DTT 50 mM, y se agitó a TA durante 1 h. El material se volvió a purificar mediante RP-HPLC preparativa en una columna Vydac C4 y se liofilizó. Se solubilizaron 26 mg de liofilizado en 26 ml de Tris 50 mM/UREA 3 M, pH 7,5 + 3000 Unidades de Proteasa AcTEV (Invitrogen, 12575-023) y se incubaron durante 4 días. Después, el pH se ajustó a pH 2,0 mediante la adición de ácido trifluoroacético (TFA, solución madre al 10% en agua) y la solución se diluyó adicionalmente a 150 ml con TFA al 0,1% en agua. Después de filtrar a través de una membrana de 0,22 um, el material se purificó de nuevo mediante RP-HPLC preparativa en una columna Vydac C4 para aislar la proteína escindida con éxito. Las fracciones se recogieron manualmente; las fracciones que contienen proteína diana se aislaron y liofilizaron. A continuación, la proteína GDF15 escindida se replegó y la proteína replegada se purificó como se describió arriba.

LCMS: Masa calculada (dímero): 24516 Masa Observada: 24518

Los siguientes mutantes de GDF15 se preparan de acuerdo con el procedimiento anterior:

MHA-(200-308)-hGDF15 (ejemplo de referencia)

MHAGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI

KTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID No. 7)

LCMS: Masa calculada (dímero): 24752

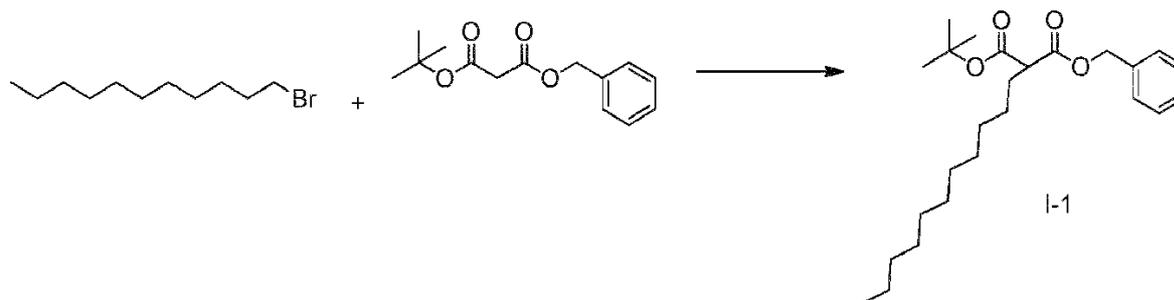
Los siguientes mutantes de GDF15 se preparan de acuerdo con el procedimiento anterior:

AHA-(200-308)-hGDF15

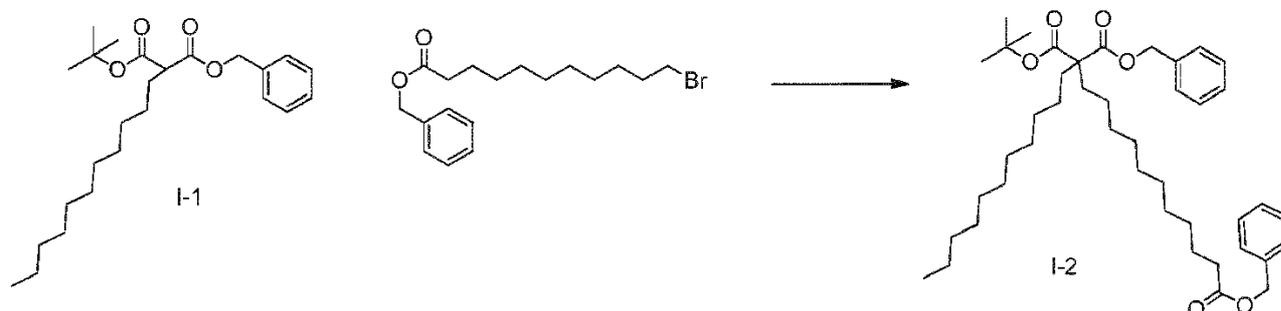
AHAGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI

KTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID No. 8)

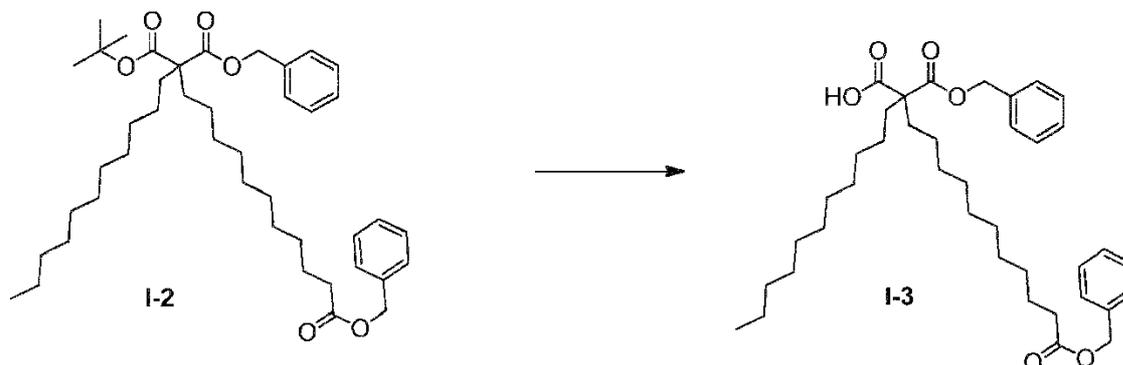
LCMS: Masa calculada (dímero): 24430 Masa Observada (dímero): 24432

Conjugación específica para el sitio de MH-(199-308)GDF15 (ejemplo de referencia) con un agente acilante de ácidos grasos**Etapa 1:** preparación del agente acilante enlazador de ácidos grasos:**Etapa 1a:** 3-terc-butil-2-undecilmalonato de 1-bencilo

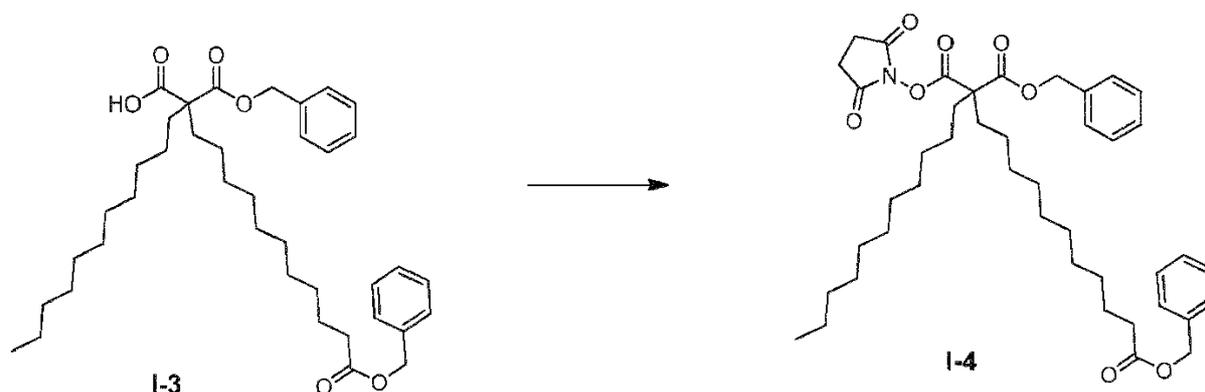
A una suspensión de NaH (160 mg, 4,0 mmol) en DMF (8 mL) a 0°C bajo N₂, se añadió terc-butil malonato de bencilo (1,0 g, 4,0 mmol) en DMF (2 mL). La mezcla se agitó durante 50 min, tras de lo cual se añadió 1-bromoundecano en DMF (2 mL). Después de una hora adicional de agitación, se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo durante la noche. Se añadieron Et₂O (100 mL) y agua (20 mL) para repartir la reacción. La fase acuosa se extrajo con Et₂O (100 mL) y los componentes orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante columna de resolución instantánea (C18 12 g, ACN al 40-100%/ agua + TFA al 0,1%) para producir el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (1,14 g, 2,82 mmol, 71%): LCMS Método A Rt = 1,58min, M+Na 427,4; ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,84 - 0,96 (m, 3 H) 1,28 (s a, 12 H) 1,31 (m, J=3,90 Hz, 6 H) 1,41 (s, 9 H) 1,88 (c, J=7,38 Hz, 2 H) 3,29 (t, J=7,58 Hz, 1 H) 5,19 (c, J=12,27 Hz, 2 H) 7,30 - 7,42 (m, 5 H).

Etapa 1b: 11-terc.-butil docosano-1,11,11-tricarboxilato de 1,11-dibencilo

5 Una solución de **I-1** (650 mg, 1,61 mmol) en DMF (1 mL) se añadió lentamente a una suspensión de NaH (70,7mg, 1,77 mmol) en DMF (6 mL) a 0°C bajo N₂. La mezcla se agitó durante 40 min antes de la adición de 11-bromoundecanoato de bencilo (571 mg, 1,61 mmol) en DMF (1 mL). Tras la adición, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se diluyó con Et₂O (100 mL) y se extrajo con agua (20 mL). La fase acuosa se extrajo con Et₂O (100 mL) y los componentes orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó. El residuo se purificó por columna de resolución instantánea (sílice 80 g, 0-10% EtOAc/HEP) para producir **I-2** en forma de un aceite incoloro (823 mg, 1,21 mmol, 75%): ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,84 - 0,94 (m, 3 H) 1,12 (m, *J*=6,60 Hz, 4 H) 1,19 - 1,33 (m, 28 H) 1,35 (s, 9 H) 1,66 (quin, *J*=7,40 Hz, 2 H) 1,85 (t, *J*=8,44 Hz, 4 H) 2,37 (t, *J*=7,52 Hz, 2 H) 5,14 (s, 2 H) 5,16 (s, 2 H) 7,30 - 7,42 (m, 10 H).

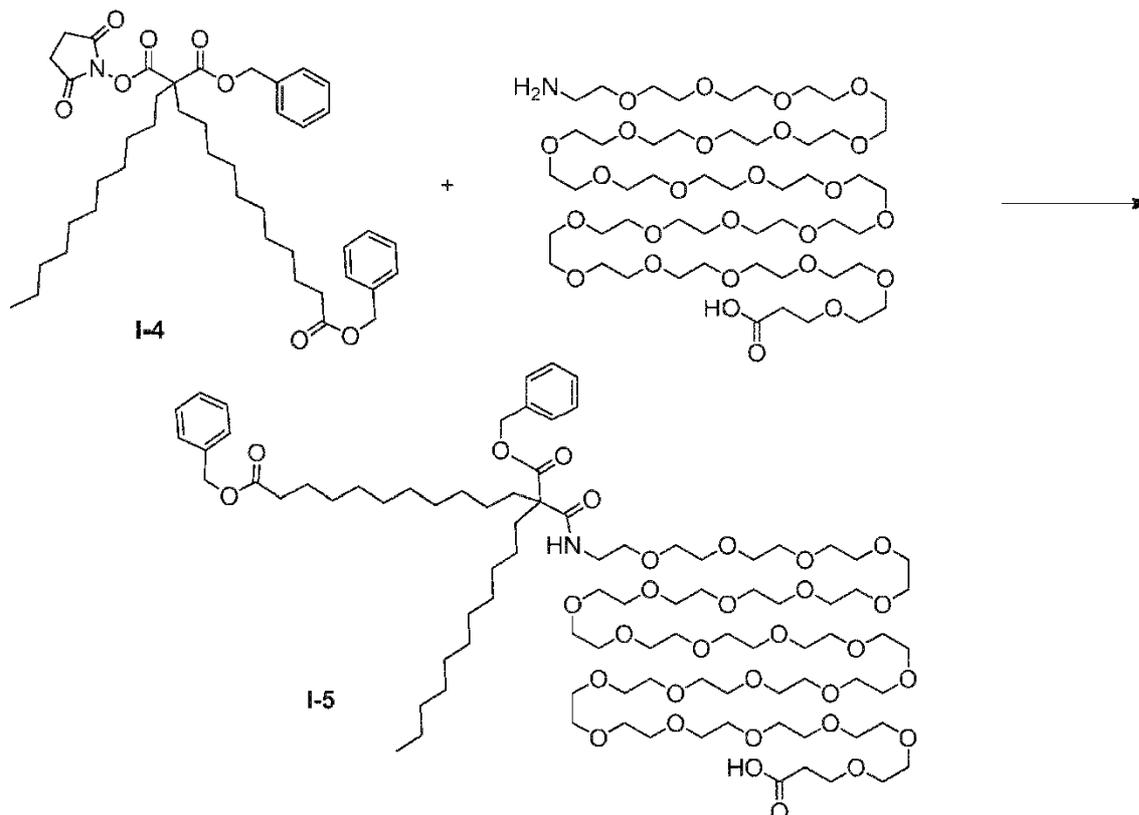
Etapa 1c: Ácido 13-(benciloxi)-2-((benciloxi)carbonil)-13-oxo-2-undeciltridecanoico

20 A una solución del compuesto intermedio **I-2** (200 mg, 0,295 mmol) en DCM (3 mL) se añadió TFA (0,6 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante columna de resolución instantánea (sílice 12 g, EtOAc al 0-15% / HEP) para producir el compuesto del título (177mg, 0,284 mmol, 96%): ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,87 - 0,94 (m, 3 H) 0,94 - 1,05 (m, 2 H) 1,19 (s a., 14 H) 1,23 - 1,37 (m, 16 H) 1,65 (quin, *J*=7,40 Hz, 2 H) 1,78 - 1,91 (m, 2 H) 1,93 - 2,05 (m, 2 H) 2,37 (t, *J*=7,52 Hz, 2 H) 5,14 (s, 2 H) 5,27 (s, 2 H) 7,31 - 7,44 (m, 10 H).

Etapa 1d: 11-(2,5-dioxociclopentil)docosano-1,11,11-tricarboxilato de 1,11-dibencilo

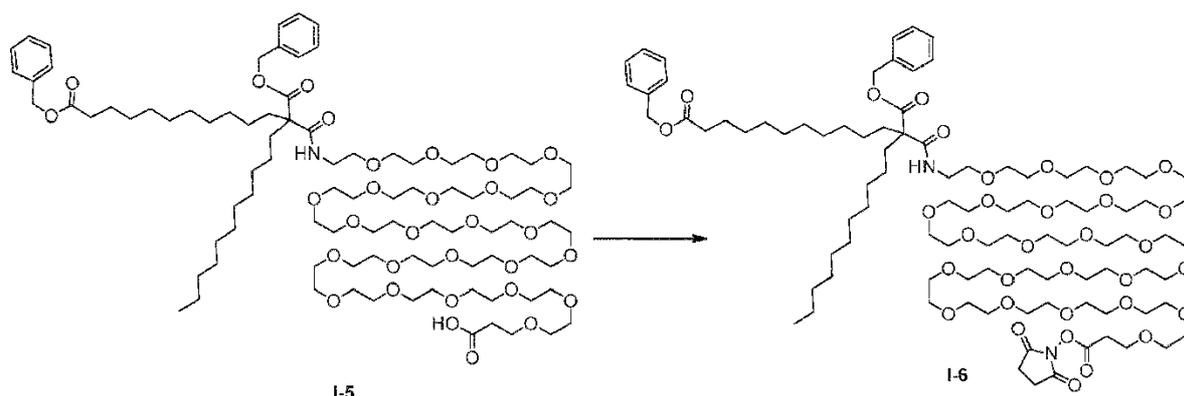
5 Se añadió una solución de DCC (58,6 mg, 0,284 mmol) en DCM (1 mL) a una solución de **I-3** (177 mg, 0,284 mmol) y N-hidroxisuccinimida (32,7 mg, 0,284 mmol) en DCM (2 mL) y THF (0,3 mL) bajo N₂. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante columna de resolución instantánea (sílice 12 g, EtOAc al 0-35% / HEP) para producir **I-4** en forma de un aceite incoloro (153 mg, 0,213 mmol, 75%): ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,86 - 0,93 (m, 3 H) 1,12 - 1,21 (m, 2 H) 1,21 - 1,37 (m, 30 H) 1,66 (quin, *J*=7,40 Hz, 2 H) 1,89 - 2,07 (m, 4 H) 2,37 (t, *J*=7,58 Hz, 2 H) 2,84 (s a., 4 H) 5,13 (s, 2 H) 5,25 (s, 2 H) 7,30 - 7,47 (m, 10 H).

10 Etapa 1e: Construcción de enlazador de ácido graso (compuesto Intermedio 5)



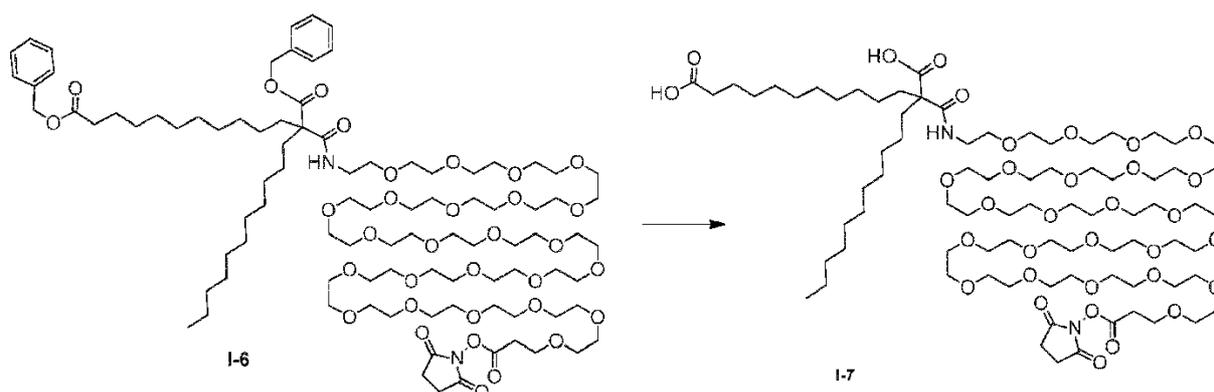
15 Se añadió una solución de compuesto intermedio **I-4** (145 mg, 0,201 mmol) en THF (1,5 mL) y DCM (1,5 mL) a un vial cargado con aminoácido-PEG24. Se añadió DIPEA (88 μL, 0,504 mmol) y la reacción se agitó en una placa de agitación durante 15 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de fluidos supercríticos (Waters HILIC 20 x 150 mm; 15-25% MeOH / CO₂) para producir el compuesto intermedio **I-5** (151 mg, 0,086 mmol, 43%): Método LCMS C Rt = 1,30 min, [M+2H]⁺+2 876,4; ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,86 - 0,93 (m, 3 H) 0,93 - 1,04 (m, 2 H) 1,19 (s a., 15 H) 1,23 - 1,37 (m, 15 H) 1,61 - 1,68 (m, 2 H) 1,78 (td, *J*=12,44, 4,34 Hz, 2 H) 1,92 - 2,05 (m, 2 H) 2,37 (t, *J*=7,58 Hz, 2 H) 2,62 (t, *J*=6,05 Hz, 2 H) 3,49 (dd, *J*=6,72, 2,32 Hz, 2 H) 3,52 - 3,59 (m, 2 H) 3,59 - 3,73 (m, 92 H) 3,80 (t, *J*=6,05 Hz, 2 H) 5,13 (s, 2 H) 5,18 (s, 2 H) 7,31 - 7,42 (m, 10 H) 8,09 (t, *J*=5,26 Hz, 1 H).

25 Etapa 1f: Compuesto intermedio 6



5 Se añadió DCC (22 mg, 0,103 mmol) en DCM (0,265 mL) a una solución de compuesto intermedio **I-5** (150 mg, 0,086 mmol) y N-hidroxisuccinimida en DCM (1,5 mL). La reacción se agitó durante 1,5 h. Se añadió N-hidroxisuccinimida adicional (10 mg) en THF (0,5 mL) y DCC (22 mg) en DCM (0,265 mL) y la reacción se agitó durante la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante columna de resolución instantánea (sílice 12, MeOH al 0-5% / DCM) para producir el compuesto intermedio **I-6** (159 mg, cuantitativo) en forma de un sólido blanco: LCMS Método A Rt = 1,55 min, $[M+H_3O+H]^+2$ 933,9.

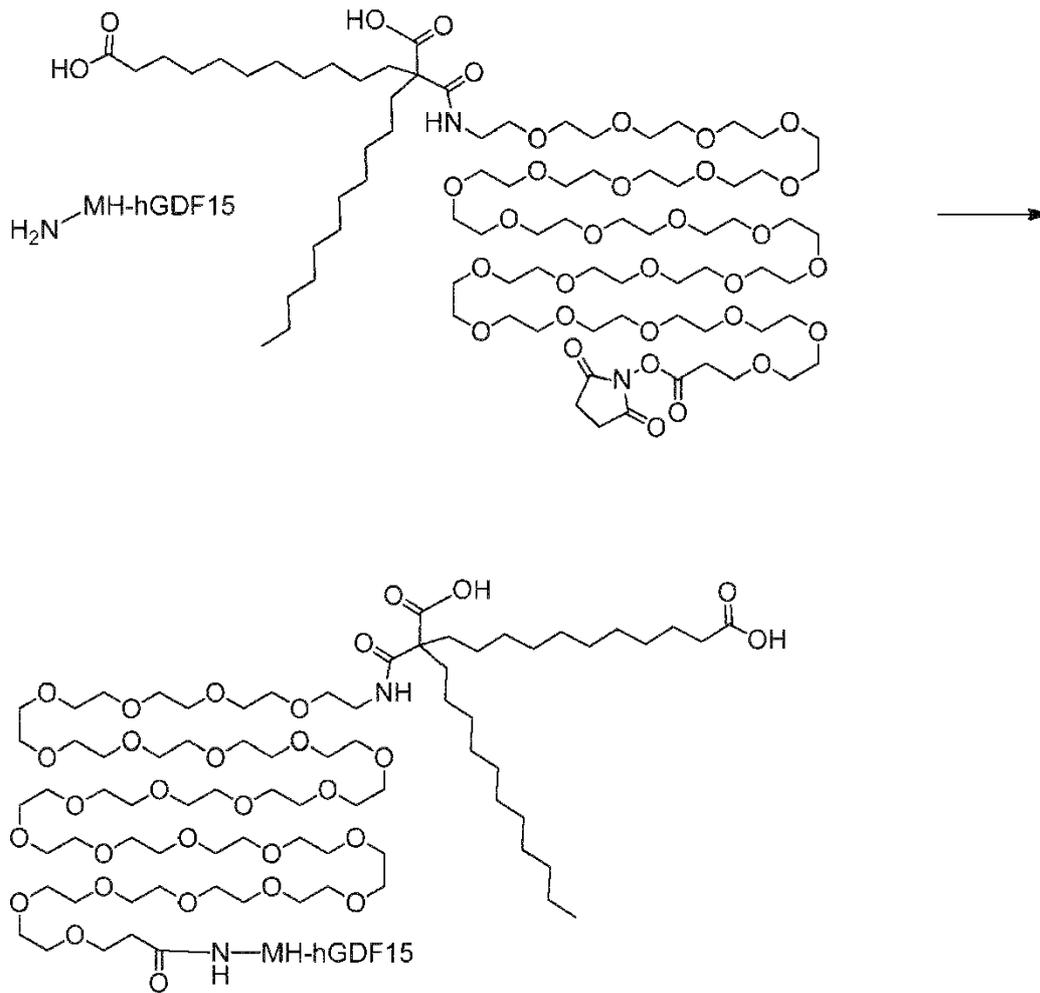
10 Etapa 1g: agente acilante enlazador de ácidos grasos (Compuesto intermedio 7)



15 A una solución de compuesto intermedio **I-6** (159 mg, 0,086 mmol) en THF (5 mL) se añadió una suspensión de Pd al 10% sobre carbono (4,6 mg, 4,3 μ mol) en THF (1 mL). La reacción se colocó bajo hidrógeno y se agitó durante 40 min. Se añadió más Pd sobre carbono (7 mg, 6,5 μ mol) y luego se agitó otra 1 h bajo hidrógeno. La reacción se hizo pasar a través de un filtro de membrana y el filtrado se evaporó. El residuo se purificó por HPLC (Sunfire C18 30 x 50 mm, ACN al 45-70% / agua + TFA al 0,1%) para producir el agente de acilación del enlazador de ácidos grasos del título (83 mg, 0,047 mmol, 54%): LCMS Método A Rt = 1,03min, $[M+2H]^+2$ 835,2; 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,84 - 0,94 (m, 3 H) 1,17 (s a., 2 H) 1,21 - 1,39 (m, 30 H) 1,57 - 1,68 (m, 2 H) 1,69 - 1,80 (m, 2 H) 1,97 - 2,10 (m, 2 H) 2,34 (t, $J=7,21$ Hz, 2 H) 2,86 (s, 4 H) 2,92 (t, $J=6,48$ Hz, 2 H) 3,51 - 3,73 (m, 96 H) 3,87 (t, $J=6,48$ Hz, 2 H) 7,45 (t, $J=4,46$ Hz, 1 H)

20

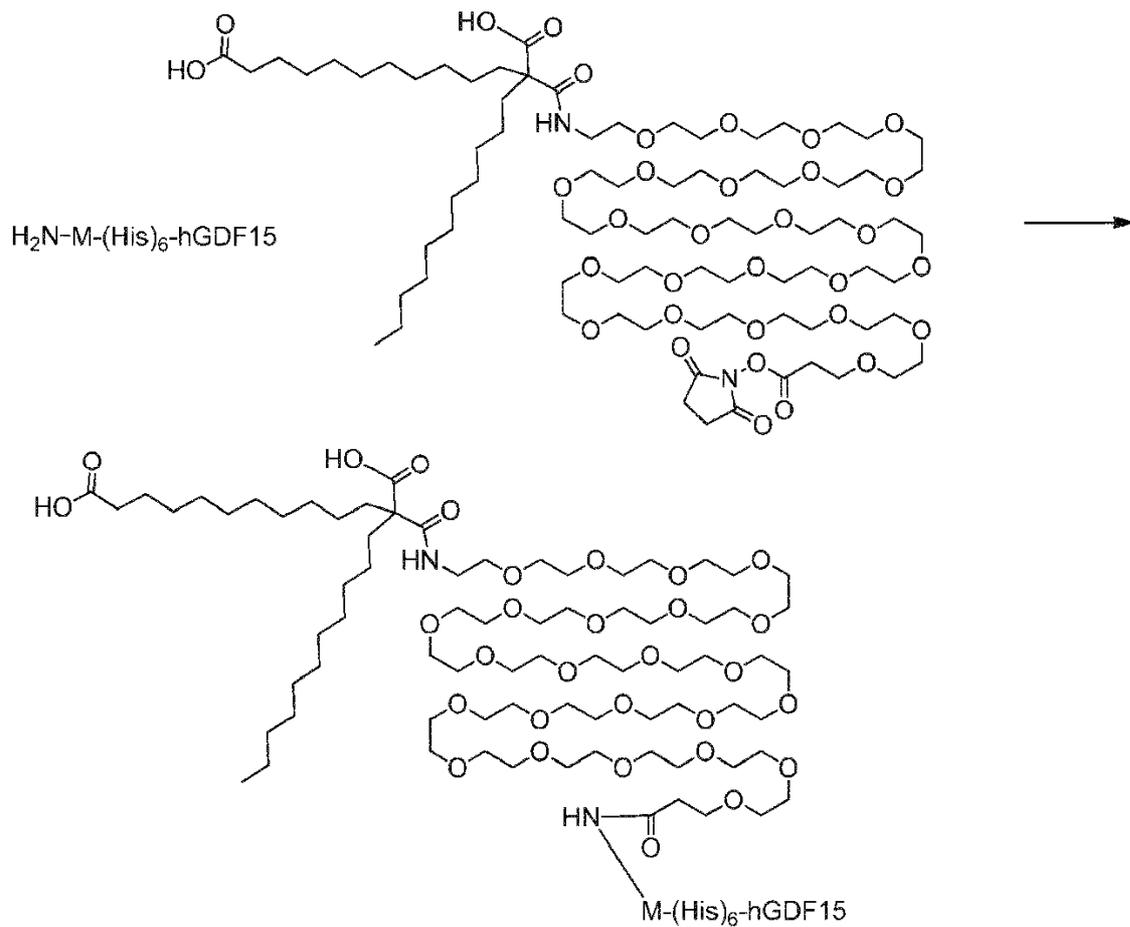
25 Ejemplo 5: Etapa 2: Conjugación selectiva de MH-(199-308)-hGDF15 con agente de acilación enlazador de ácidos grasos



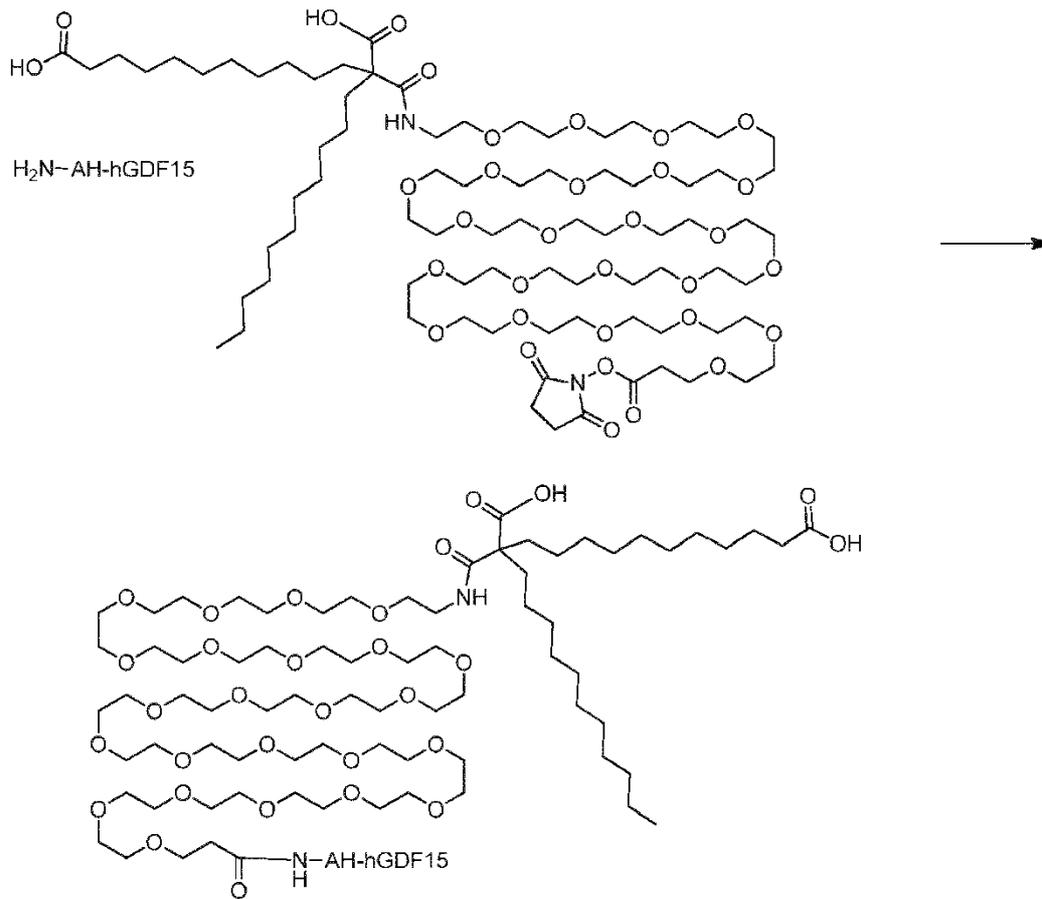
5 MH-(199-308)-hGDF15 (0,393 mL, 0,028 μ mol, 1,78 mg/mL) se añadió a 1,5 ml de tampón acetato de sodio 30 mM, pH 4, ácido graso NHS (I-7: 474 μ g, 0,284 μ mol, 10 mg/ml) se añadió a la solución. Después de 5 horas, la reacción se completó de acuerdo con MALDI. Los productos se purificaron lavando 5 veces utilizando ultrafiltración de amicon 10 kD para dar 575 μ g de conjugado con un rendimiento del 73%. MALDI: sm (18%), masa esperada: 24638 masa observada: 24735; +1 ácido graso (38%) masa esperada: 26192 masa observada: 26268; +2 ácido graso (40%) masa esperada: 27746 masa observada: 27798; +3 ácido graso (4%) masa esperada: 29300 masa observada: 29333.

10

Ejemplo 6: Etapa 2: Conjugación específica para el sitio de M-(His)6-hGDF15-(199-308) con agente de acilación de enlazador de ácidos grasos



5 M-(His)₆-hGDF15 (0,493 ml, 0,026 μmol, 1,42 mg/ml) se añadió a 1,5 ml de tampón acetato de sodio 30 mM NHS
 ácido graso (I-7; 0,221 mg, 0,132 umol, 10 mg/mL) se añadió a la solución. Durante la noche la reacción no se
 completó, por lo que se añadieron 2,5 equivalentes más de ácido graso NHS (0,110 mg, 0,066 umol, 10 mg/mL) y
 después de 5 h, Maldi mostró conjugado +2 como el producto principal. El producto se purificó lavando 5 veces
 utilizando ultrafiltración de amicon 10 kD para dar 565 ug de conjugado con un rendimiento del 76%. MALDI: sm
 (18%), masa esperada: 26468 masa observada: 26553; +1 ácido graso (38%) masa esperada: 28022 masa
 observada: 28099; +2 ácido graso (40%) masa esperada: 29576 masa observada: 29649; +3 ácido graso (4%) masa
 10 esperada: 31130 masa observada: 31201.



AH-GDF15 + I-7:

Grado de Marcaje	Calculado	Observado	%
AH-GDF15 (dímero)	24518	24559	3
AH-GDF15 +1 FA	26072	26091	44
AH-GDF15 +2 FA	27626	27615	42
AH-GDF15 +3 FA	29180	29164	11

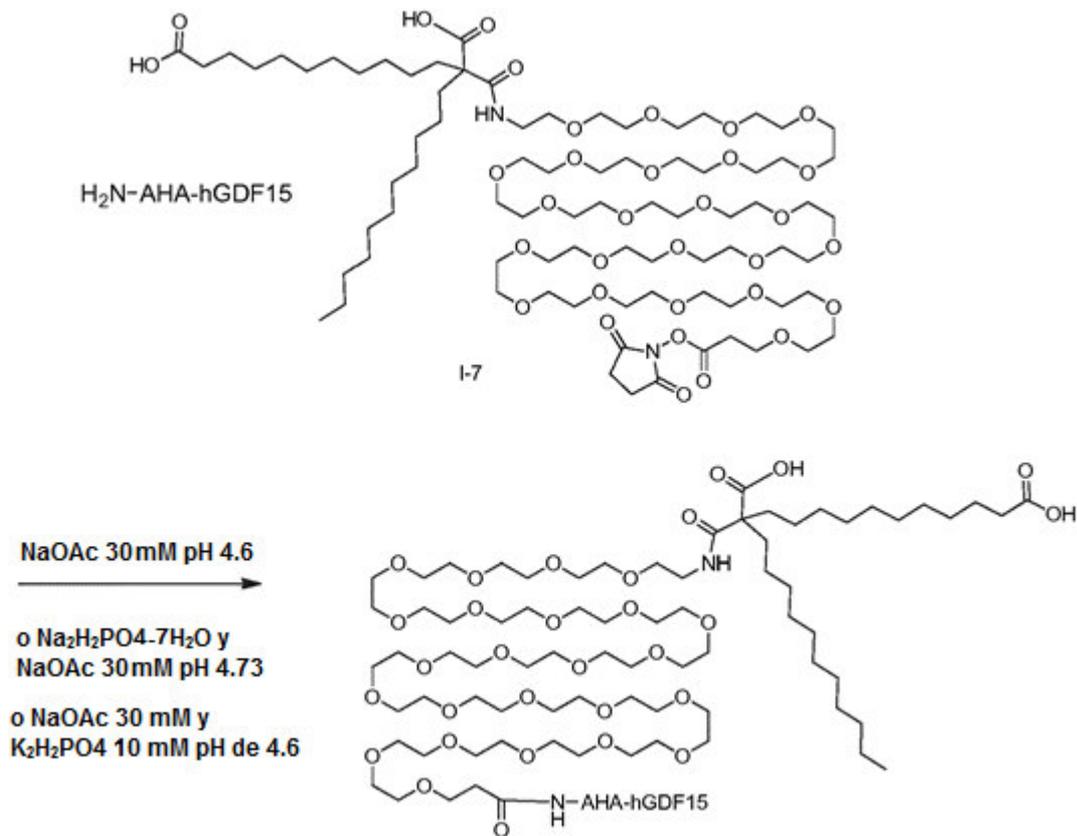
5 +1FA y +2FA se refieren a la adición de un ácido graso en el extremo N de la unidad monomérica y la unidad dimérica, respectivamente. +3FA se refiere a acilación no selectiva.

Secuencia (monómero):
 10 ahngdhcplgpgrrclhtvrasledlgwadwvlsprevqvtmcigacpsqfraanmhaqiktslhrkpdtpapccvpasynpmvliqktdtgvslqtyddllakd
 chci

15 Una solución de 10 mg/mL de ácido graso I-7 se preparó en H₂O. AH-hGDF15 (1,12 mg/mL, 175 µL, 0,0080 µmol) se combinó con 202 µL de tampón NaOAc 30 mM pH 4,0 y se añadió una parte alícuota de I-7 (13,33 µL). La reacción se mezcló a t.a. durante 16 horas, momento en el que el análisis MALDI mostró una conversión del 30% del material de partida. Se añadió una parte alícuota adicional de 6,67 µL de I-7 y la reacción se mezcló durante 16 horas y se añadió una parte alícuota de 13,33 µL de I-7. Después de 16 horas de mezcladura a t.a. se añadió I-7 (13,33 µL) y la reacción se mezcló a t.a. durante 3 días. Se añadió una parte alícuota de 13,33 µL de I-7 y la reacción se mezcló a t.a. durante 16 horas, momento en el que el análisis MALDI indicó una conversión > 95%. La solución se intercambió en tampón NaOAc 30 mM pH 4,0 utilizando un filtro centrífugo Amicon MWCO de 10 kDa diluyendo y concentrando la reacción 5 veces hasta un volumen de 0,2 mL. La concentración se midió mediante A₂₈₀ (30040 M⁻¹ cm⁻¹; 26072 g/mol) para ser 0,31 mg/mL, 30%.

Ejemplo 6A: Conjugación específica para el sitio de AHA-hGDF15-(200-308) con agente de acilación de enlazador de ácidos grasos

25



Se preparó una solución de 10 mg/mL de ácido graso (Compuesto intermedio 7) en agua de calidad de biología molecular. A AHA-hGDF15 (6,67 mg/mL en NaOAc 30 mM pH 4,0, 5,247 mL, 1,433 μmol) se añadió NaOAc 30 mM pH 4,6 (intervalo aceptable 4,5-5,0) para dar una concentración de proteína final de 0,88 mg/mL. Se añadió compuesto intermedio 7 (10 eq., 2,39 mL, 0,014 mmol) y la reacción se mezcló a t.a. durante 18 horas. Se había formado un precipitado en el vial de reacción. La mezcla de reacción se dividió entre 4 x 15 mL de filtros centrifugos Amicon de 10 kDa y cada uno se diluyó a 15 mL con NaOAc 30 mM pH 4,0. El material se intercambiò con tampón 4 veces en NaOAc 30 mM pH 4,0 y las muestras se combinaron hasta un volumen de 25,6 mL, agitando el precipitado en el filtro con una punta de pipeta entre lavados. El precipitado permaneció en solución, por lo que la mezcla se dejó reposar a 4 °C durante la noche. La concentración se midió mediante A280 (30040 cm⁻¹M⁻¹, 27538 g/mol) para ser 1,62 mg/mL (100%). El análisis de UPLC mostró una recuperación del 60% de los productos +1 y +2 (Método F).

Especie	% observado
AHA-GDF15	29
AHA-GDF15 +1 FA	27
AHA-GDF15 +2 FA	33
AHA-GDF15 +3 FA	11

Purificación

El producto bruto se purificó mediante cromatografía de fase inversa (Tampón A TFA al 0,1% en agua; Tampón B TFA 0,1 M en gradiente de ACN; 99% -80% de Tampón A) en un Waters BEH300 130 Å, 3,5 μm, 4,6 mm x 100 mm caudal 2,5 ml/min.

- Fracción 1: AHA-hGDF15 que no ha reaccionado: Rt=17,33 min
- Fracción 2: AHA-GDF15 + 1FA: Rt=20,20 min (aproximadamente 15% de rendimiento)
- Fracción 3: AHA-GDF15 + 2FA: Rt=21,60 min (aproximadamente 15% de rendimiento)
- Fracción 4: AHA-GDF15 + 3FA: Rt=23,0 min (aproximadamente 5% de rendimiento)

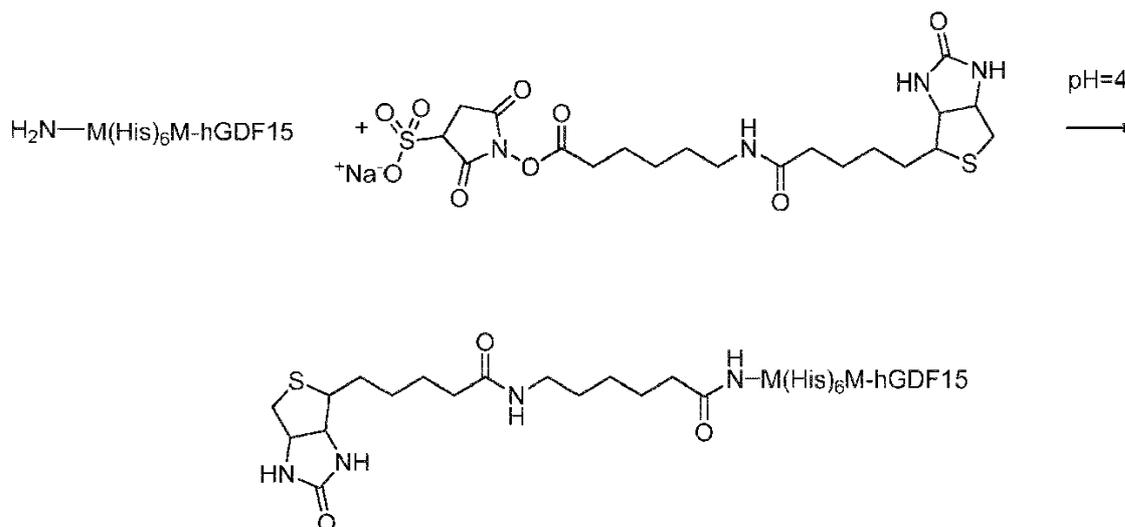
Alternativamente, la reacción se puede llevar a cabo en Na₂HPO₄·7H₂O 10 mM y NaOAc 30 mM a un pH de 4,73: Se preparó una solución de 10 mg/mL de Compuesto intermedio 7 en agua de calidad de biología molecular. A AHA-hGDF15 (12,04 mg/mL en NaOAc 30 mM pH 4,0, 4,15 μL, 0,002 μmol) se añadió NaOAc 30 mM Na₂HPO₄ - 7H₂O 10 mM pH 4,73 para dar una concentración de proteína final de 0,88 mg/mL. Se añadió compuesto intermedio 7 (20 eq., 6,83 μL, 0,041 μmol) y la reacción se mezcló a t.a. durante 18 horas. La mezcla de reacción se había vuelto turbia con un precipitado. El análisis de UPLC mostró 58% de los productos +1 y +2 (Método F).

Especie	% observado
AHA-GDF15	0
AHA-GDF15 +1 FA	11
AHA-GDF15 +2 FA	47
AHA-GDF15 +3 FA	34
AHA-GDF15 +4 FA	7

Alternativamente, la reacción también se puede llevar a cabo en NaOAc 30 mM y K₂HPO₄ 10 mM a un pH de 4,6: Se preparó una solución de 10 mg/mL de Compuesto intermedio 7 en agua de calidad de biología molecular. A AHA-hGDF15 (6,21 mg/mL en NaOAc 30 mM pH 4,0, 5,261 mL, 1,337 μ mol) se añadió NaOAc 30 mM, K₂HPO₄ 10 mM pH 4,6 (intervalo aceptable 4,5-5,0) para dar una concentración de proteína final de 0,88 mg/mL. Se añadió Compuesto intermedio 7 (10 eq., 68,3 μ L, 0,409 μ mol) y la reacción se mezcló a t.a. durante 7 horas. La mezcla de reacción se había vuelto turbia con un precipitado. La mezcla de reacción se dividió en 4 porciones de 9 mL en 15 mL de filtros centrífugos Amicon de 10 kDa y se diluyó a 15 mL con NaOAc 30 mM pH 4,0. El material se intercambi4 veces en NaOAc 30 mM pH 4,0, agitando el precipitado entre cada uno de los lavados con una punta de pipeta. La mezcla de reacción se concentró hasta un volumen de 75 mL. El precipitado permaneció, por lo que el material se almacenó a 4 °C durante dos días. La concentración se midió mediante A280 (30040 cm⁻¹M⁻¹, 27538 g/mol) para ser 0,4 mg/mL (97%). El análisis de UPLC mostró una recuperación del 61% de los productos +1 y +2 (Método F).

Especie	% observado
AHA-GDF15	34
AHA-GDF15 +1 FA	34
AHA-GDF15 +2 FA	27
AHA-GDF15 +3 FA	5

Ejemplo 7: Biotinilación de M(His)₆M-GDF15 (ejemplo de referencia) con mapeo para confirmar el marcaje N-terminal



A una solución de MHHHHHM-hGDF15 (0,53 mg/mL, 8 mL) en tampón acetato de sodio de pH 4 de NaOAc 30 mM se añadió una solución de éster de NHS (1,5 mg/mL en tampón de NaOAc 30 mM de pH 4) en la siguiente cantidad secuencialmente cada dos horas, 118 μ L, 177 μ L. La mezcla se concentró/lavó utilizando un concentrador de amicon (3 veces) con tampón NaOAc a pH 4, y el cartucho se lavó repetidamente para lograr una alta recuperación de proteína. Se obtuvieron 5,8 mL 0,64 mg/mL de producto. LCMS: Esperado (+1): 27066, Observado (+1): 27066; Esperado (+2): 27406, Observado (+2): 27405.

La biotinylación confirmó el 90% en el extremo N mediante digestión con Glu-C y mapeo.

El objetivo de este protocolo es reducir, alquilar y digerir proteínas con Glu-C (*S. aureus* V8) para su posterior análisis mediante HPLC-MS/MS (cromatografía líquida de alto rendimiento - espectrometría de masas en tándem) o MALDI MS (espectrometría de masas de desorción/ionización con láser asistido por matriz). Brevemente, las proteínas puras se reconstituyen en caótipos, se reducen con ditiotretitol, se alquilan con yodoacetamida y luego se digieren con Glu-C. Glu-C tiene especificidad para los residuos de glutamato cuando se tampona en tampones bicarbonato de amonio o acetato de amonio. Glu-C escindir4 aspartato o glutamato en presencia de tampón fosfato.

35 1. Método Experimental

1.1.Reconstitución/desnaturalización (GnHCl 4 M en 25 uL)

- 1.1.1. Añadir 25 uL de hidrocloreuro de guanidina (GnHCl) 4 M a una parte alícuota de proteína seca.
 1.1.2. Agitar, sacudir o golpear suavemente durante aproximadamente 2 minutos para reconstituir y desnaturalizar la proteína.

1.2.Reducción (GnHCl 2 M, ABC 100 mM, DTT 10 mM en 50 uL)

- 1.2.1. Añadir 20 uL de tampón bicarbonato de amonio 250 mM recién preparado (ABC).
 1.2.2. Añadir 5 uL de ditioneitol (DTT) 100 mM recién preparado en agua.
 1.2.3. Incubar durante 1 hora a 37°C con agitación suave.

1.3. Alquilación (GnHCl 1,6 M, ABC 83,3 mM, DTT 8,3 mM, IAA 25 mM en 60 uL)

- 1.3.1. Añadir 4,75 uL de agua.
 1.3.2. Añadir 5,25 uL de yodoacetamida (IAA) 400 mM recién preparada en agua.
 1.3.3. Agitar o sacudir breve y suavemente para mezclar la muestra.
 1.3.4. Incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

1.4. Limpieza

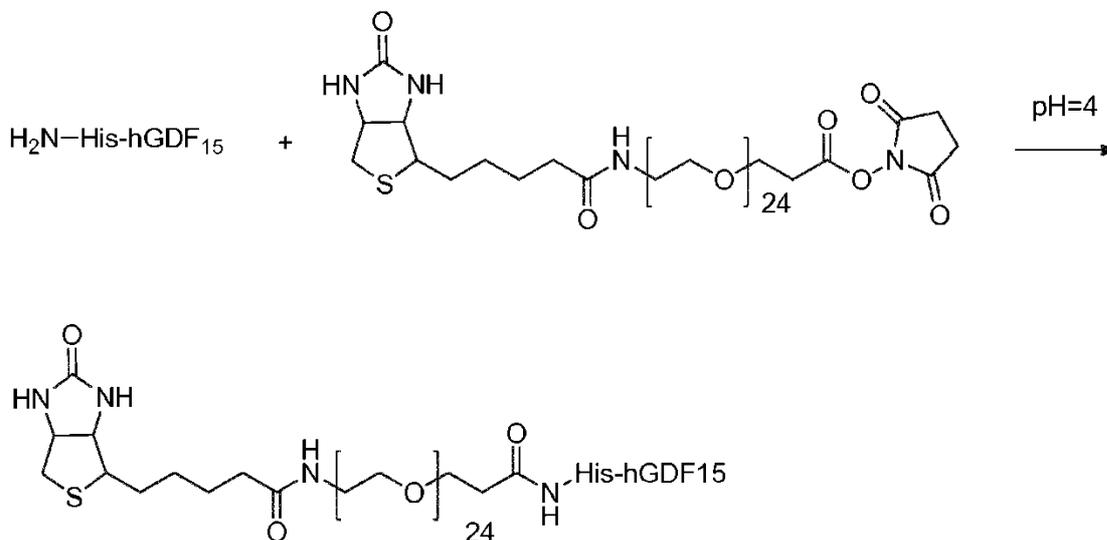
- 1.4.1. Añadir al menos 1000 uL de etanol helado.
 1.4.2. Agitar o sacudir suavemente para mezclar.
 1.4.3. Incubar a - 20°C durante 2 horas para precipitar la proteína.
 1.4.4. Centrifugar durante 10 minutos a 10.000 RPM a 4°C.
 1.4.5. Separa la mayor parte del sobrenadante.
 1.4.6. Secar hasta completar en un Speedvac.

1.5. Digestion de Glu-C (GnHCl 0,25 M, Am Ac 25 mM ~pH 6,5, 20:1 proteína:Glu-C en 100 uL)

- 1.5.1. Reconstituir la proteína seca en 10 uL de GnHCl 2,5 M.
 1.5.2. Agitar, sacudir o golpear suavemente durante aproximadamente 1 minuto para reconstituir la proteína.
 1.5.3. Añadir 10 uL de tampón acetato de amonio 250 mM recién preparado.
 1.5.4. Reconstituir 10 ug de Glu-C en 100 uL de agua milliQ.
 1.5.5. Añadir una cantidad adecuada de 0,1 ug/uL de Glu-C para lograr una relación de (1 ug de Glu-C: 20 ug de proteína). Por ejemplo, añadir 10 uL por 20 ug de proteína.
 1.5.6. Añadir agua para lograr un volumen de reacción final de 100 uL.
 1.5.7. Incubar durante 4 horas a 37°C con agitación suave.
 1.5.8. Glu-C tiene una actividad enzimática a partir de pH 4,0 - 9,0, por lo que no es posible extinguir la actividad con la adición de ácido o base. Se recomienda analizar de inmediato.

La muestra de GDF15 biotinilada debería producir un péptido GluC desplazado en masa de 339 da.
 Producto de digestión de GluC N-terminal de GDF15 biotinilado químicamente. Secuencia: LC-biotina-M(His)₆MARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLE. Masa monoisotópica calculada con 3 alquilaciones de cisteína = 4311,9755 Da M 3+ carga +1 calc. = 1438,3325 Masa observada = 1438,3331.

Ejemplo 8: Biotinilación específica para el sitio de M(His)₆-hGDF15 (ejemplo de referencia)



His-hGDF15 + Biotina-PEG₂₄-éster de NHS:

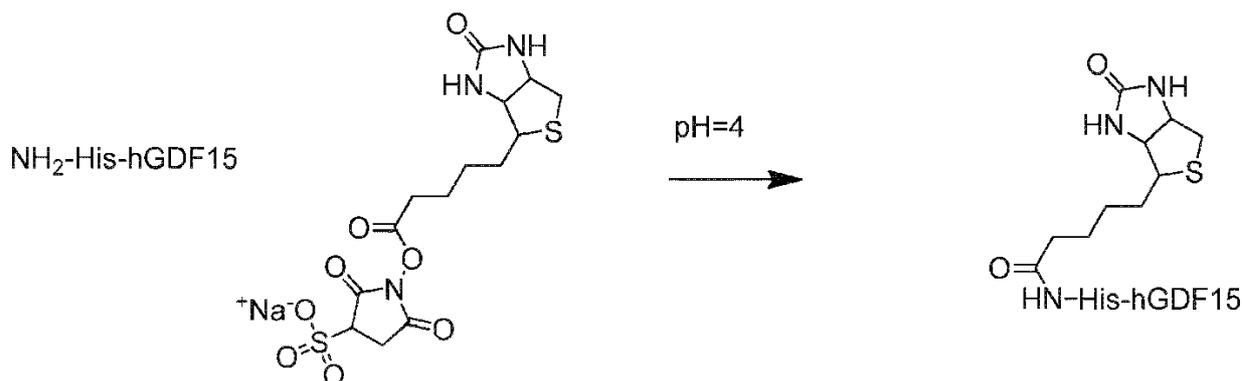
Grado de Marcaje	Calculado	Observado	%	R _t (min)
His-hGDF15 (dímero)	26468	26464	18	2,35
His-hGDF15 +1 biotina	27823	27818	61	2,48
His-hGDF15 +2 biotina	29179	29174	21	2,75

5 +1 biotina y +2 biotina se refieren a la acilación del extremo N-terminal de los restos monomérico y dimérico, respectivamente.

10 Se preparó una solución de 10 mg/mL de biotina-PEG₂₄-NHS (Biomatrik, Inc.) en NaOAc a pH 4 30 mM. Se combinó MHHHHHH-hGDF15 (1,007 mL 0,054 μmol) con NaOAc 30 mM, pH 4 (1,5 mL y biotina-PEG₂₄-NHS (Biomatrik, Inc., 397 μL, 2,70 μmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 16 horas, momento en el que se añadieron 10 equivalentes adicionales (79,4 μL) de solución de NHS y la reacción se mezcló a t.a. durante 16 horas. Se añadieron 10 equivalentes adicionales (79,4 μL) de solución de NHS y la reacción se mezcló a t.a. durante 16 horas. La reacción se calentó a 37°C y se agitó durante 10 horas, momento en el que la mezcla se cambió por NaOAc 30 mM pH 4 utilizando un filtro centrífugo Amicon MWCO de 10 kDa diluyendo y concentrando la muestra 5 veces hasta un volumen de 2 mL. El análisis LCMS indicó la presencia de material de partida, productos +1 y +2. La concentración se midió mediante A₂₈₀ (29090 M⁻¹cm⁻¹, 27818 g/mol) para ser 1,20 mg/mL (100%). LCMS **Método D** R_t = 2.48 min; MS [M+1+1 biotina], [M+1+2 biotina]: observado: 27818.0000, 29174.0000, calculado: 27823,7, 29179,4.

Ejemplo 8A: Biotinilación específica para el sitio de M(His)6-hGDF15 (ejemplo de referencia)

20

**His-hGDF15 + Sulfo-NHS-Biotina:**

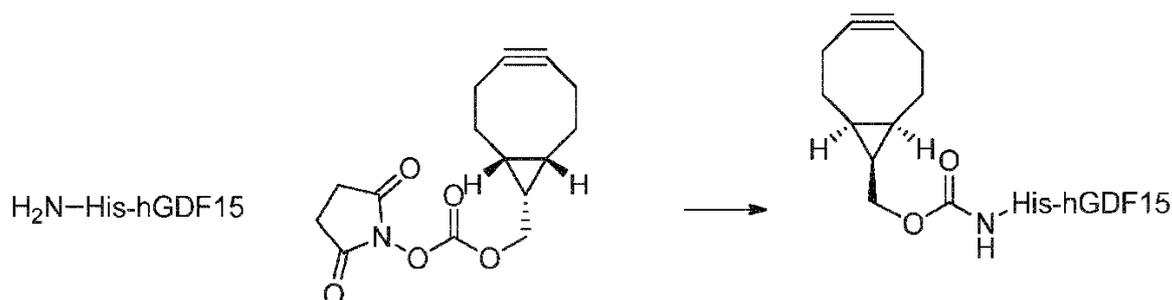
25

Grado de Marcaje	Calculado	Observado	%	R _t (min)
His-hGDF15 B8	26468	n/d	0	n/d
His- hGDF15 B8 +1 biotina	26692	26690	7	5,05
His- hGDF15 B8 +2 biotina	26920	26918	71	5,05
His- hGDF15 B8 +3 biotina	27148	27143	21	5,05

30 Se preparó una solución de 10 mg/mL de sulfo-NHS-biotina (ThermoFisher) en NaOAc 30 mM, pH 4. Se combinó His-hGDF15 B8 (100 μL, 0,0076 μmol) con NaOAc 30 mM pH 4 (293,3 μL) y sulfo-NHS-biotina (ThermoFisher, 6,70 μL, 0,151 μmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 16 horas. La mezcla se intercambió en NaOAc 30 mM pH 4 utilizando un filtro centrífugo Amicon MWCO de 10 kDa diluyendo y concentrando la muestra 5 veces hasta un volumen de 150 μL. El análisis LCMS indicó la presencia de material de partida, productos +1 y +2. La concentración se midió mediante A₂₈₀ (29090 M⁻¹cm⁻¹, 26917 g/mol) para ser 1,08 mg/mL (80%). LCMS **Método E**: R_t = 5.05 min; MS [M+1+1 biotina] observado: 26690; calculado: 26692, [M+1+2 biotina] observado: 26918; calculado: 26920, [M+1+3 biotina] observado: 27143; calculado: 27148.

35

Ejemplo 9: Conjugación específica para el sitio del agente acilante de BCN con M(His)6M-hGDF15 (ejemplo de referencia)



His-hGDF15

Seq: MHHHHH MARNGDHCPLGPGRCRRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACP
 5 SQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI

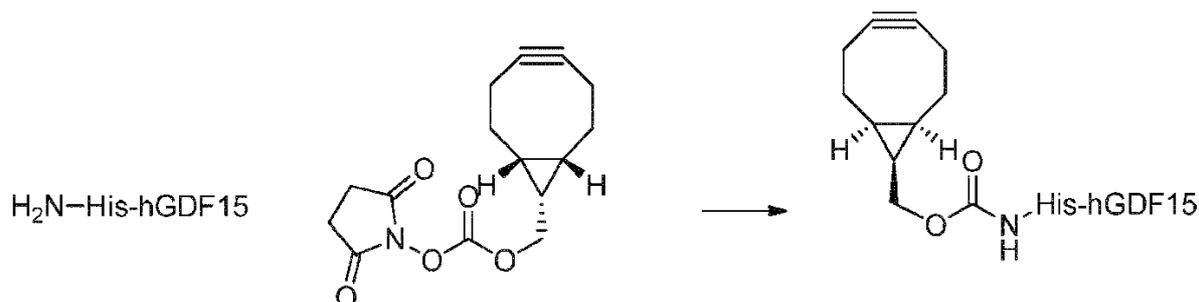
Se diluyó una solución madre de His-hGDF15 (0,6 mL, 4,8 mg/mL) a 0,5 mg/mL con tampón NaOAc 30 mM pH 4,5 (5,2 mL). Una solución madre de 10 mg/mL de (2,5-dioxopirrolidin-1-il)carbonato de (1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0] non-4-in-9-ilmetilo (NHS-BCN) en DMSO (251 µL se añadió lentamente) y la reacción se colocó en un plato agitador a 24°C durante 21 h. La reacción se diluyó hasta 30 mL con tampón NaOAc 30 mM pH 4,5 y se concentró hasta 2 mL utilizando un cartucho de ultrafiltración MWCO de 10 kDa (repetición 4 veces) para producir 2,5 mL de concentrado. Basado en A₂₈₀ (ε = 29090M⁻¹ cm⁻¹, 26730g/mol) el concentrado fue 0,93mg/mL (2,33 mg, 80%): LCMS QT2_15-60kDa 15min polar

Grado de Marcaje	Calculado	Observado	% intensidad TIC (MS+)
GDF15	26726	26726	26
GDF15 +1BCN	26903	26904	43
GDF15 +2BCN	27080	27080	23
GDF15 +3BCN	27257	27256	9

BCN Biciclononinilo

15 +1BCN y +2 BCN se refieren a la acilación del extremo N del grupo amino de los restos monomérico y dimérico. +3 BCN se refiere a acilación no selectiva.

20 **Ejemplo 10:** Conjugación específica para el sitio del agente acilante de BCN con M(His)₆-hGDF15 (ejemplo de referencia)



His-hGDF15 Seq:

25 MHHHH HHAR NGDHC PLGPG RCCRL HTVRA SLEDL GWADW VLSPR EVQVT MCIGA
 CPSQF RAANM HAQIK TSLHR LKPDT VPAPC CVPAS YNPMV LIQKT DTGVS LQTYD
 DLLAK DCHCI

30 Se diluyó una solución madre de His-hGDF1 (7,04 mL, 1,42 mg/mL) a 0,5 mg/mL con tampón NaOAc 30 mM pH 4,5 (12,95 mL). Una solución madre de 10 mg/mL de (2,5-dioxopirrolidin-1-il)carbonato de (1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0] non-4-in-9-ilmetilo (NHS-BCN) en DMSO (0,88 mL) se añadió lentamente y la reacción se colocó en un plato agitador a 24°C durante 24 h. Se añadió una porción adicional de la solución madre de NHS-BCN (176 µL) se añadió, y la reacción se mantuvo a 24°C durante 24 h. La reacción se diluyó hasta 60 mL con tampón NaOAc 30 mM pH 4,5 y se concentró hasta 4 mL utilizando un cartucho de ultrafiltración MWCO de 10 kDa (repetición 4 veces) para producir 4,1

mL de concentrado. Basado en A_{280} ($\epsilon = 29090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 26700 g/mol) el concentrado fue $2,19 \text{ mg/mL}$ ($8,98 \text{ mg}$, 89%):
LCMS QT2_15-60kDa_15min_polar

Grado de Marcaje	Calculado	Observado	% intensidad TIC (MS+)
GDF15	26468	26464	33
GDF15 +1BCN	26645	26640	34
GDF15 +2BCN	26822	26817	21
GDF15 +3BCN	26999	26993	3

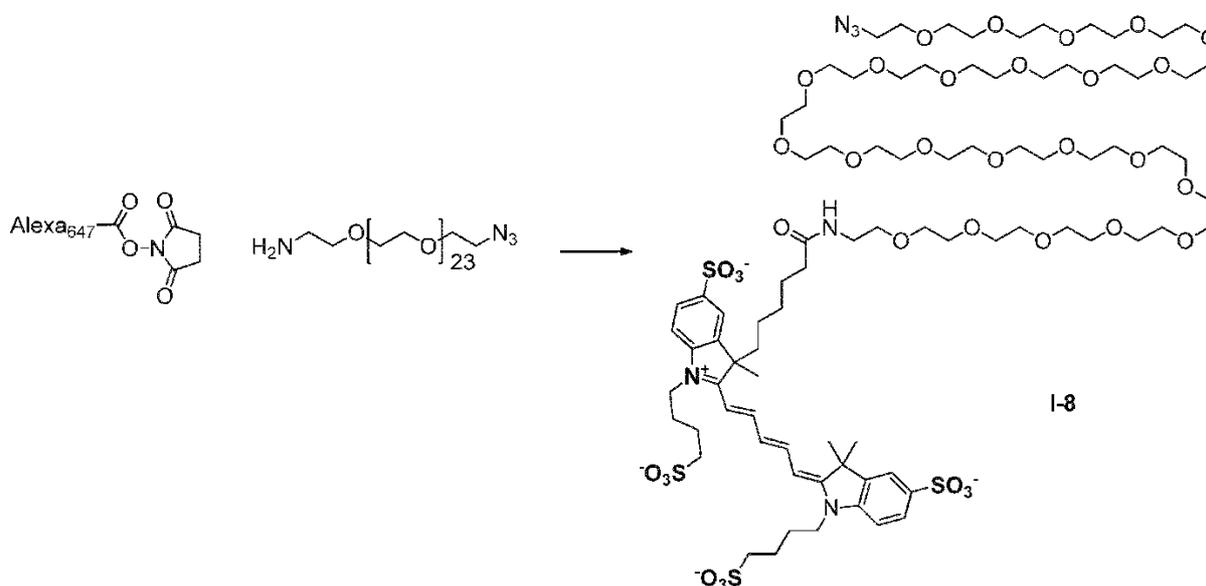
BCN Biciclononinilo

5 +1BCN y +2 BCN se refieren a la acilación del extremo N del grupo amino de los restos monomérico y dimérico. +3 BCN se refiere a acilación no selectiva.

Ejemplo 11: Marcaje con fluoróforo de His-hGDF15 (ejemplo de referencia)

10

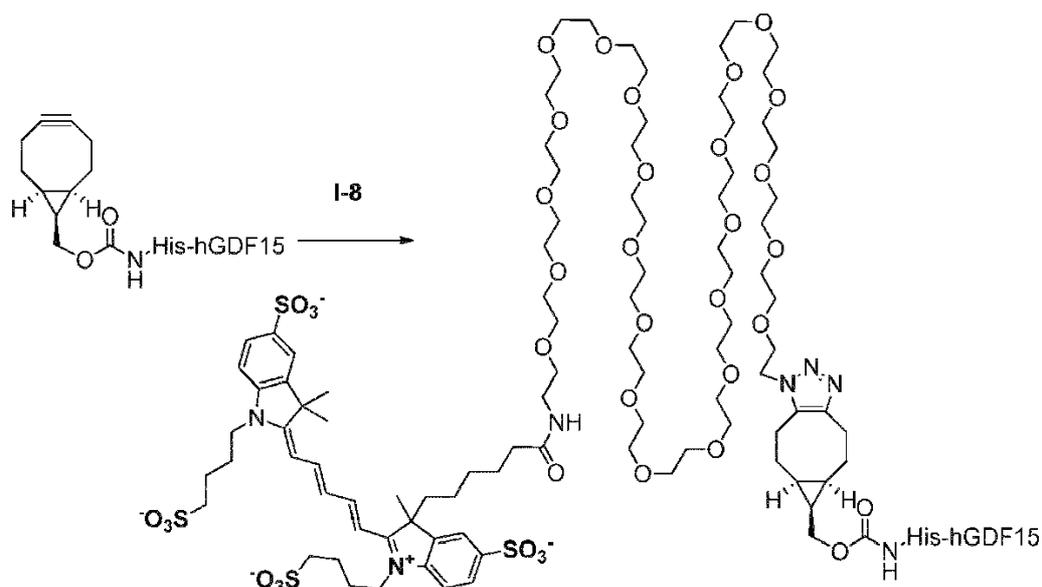
Etapa 1: Preparación del agente acilante enlazador de Fluoróforo (I-8)



15 A una solución de éster de Alexafluor647-NHS (Life Technologies, 5 mg , $4,00 \mu\text{mol}$) en PBS (1 mL) se añadió azido-dPEG₂₃-amina (Quanta Biodesign n° de cat. 10525, $4,84 \text{ mg}$, $4,4 \mu\text{mol}$). La reacción se mezcló a t.a. durante $6,5$ horas, momento en el cual se añadieron $0,25$ equivalentes adicionales de azido-dPEG₂₃-amina (1 mg) con dos gotas de DIPEA. La reacción se mezcló a t.a. durante 16 horas. La conversión completa se observó mediante análisis LCMS. La mezcla se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional. LCMS **Método E**: $R_t = 1,73 \text{ min}$; MS $[M+H/3]$ observado: $646,1$; calculado: $655,3$.

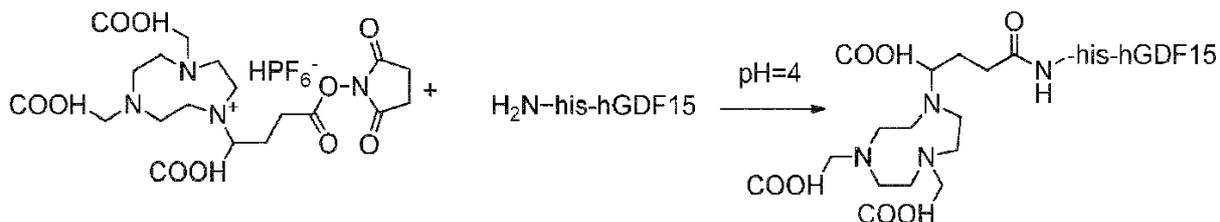
20

Etapa 2: Derivatización adicional de la construcción his-hGDF15-BCN (ejemplo 10) con un agente fluoróforo (I-8)

**His-hGDF15 AF647:**

Grado de Marcaje	Calculado	Observado	%	R _t (min)
His-hGDF15	26468	26465	27	6,19
His-hGDF15-BCN	26644	N/D	0	6,19
His-hGDF15 +1AF647	28609	28580	42	6,19
His-hGDF15+2AF647	30574	30714	21	6,19
His-hGDF15+3AF647	32539	32830	10	6,19

5 A una solución de His-hGDF15-BCN (500 μ l, 2,19 mg/mL, 0,041 μ mol) se añadió una solución de **1** (20,55 μ l, 7,86 mg/mL 0,082 μ mol). La reacción se mezcló a t.a.durante 2 días, momento en el que se observó una conversión del 75% mediante análisis LCMS. La mezcla se intercambiò en PBS utilizando un filtro centrífugo Amicon MWCO de 10 kDa diluyendo y concentrando la muestra 8 veces hasta un volumen de 2,25 mL. La concentración se midió mediante A_{280} (29090 M⁻¹ cm⁻¹; 28600 g/mol) para ser 0,32 mg/mL (60%). LCMS **Método B**: R_t = 6,19 min; MS [M+H+1AF647]: observado 28580,0000, calculado: 28609,336.

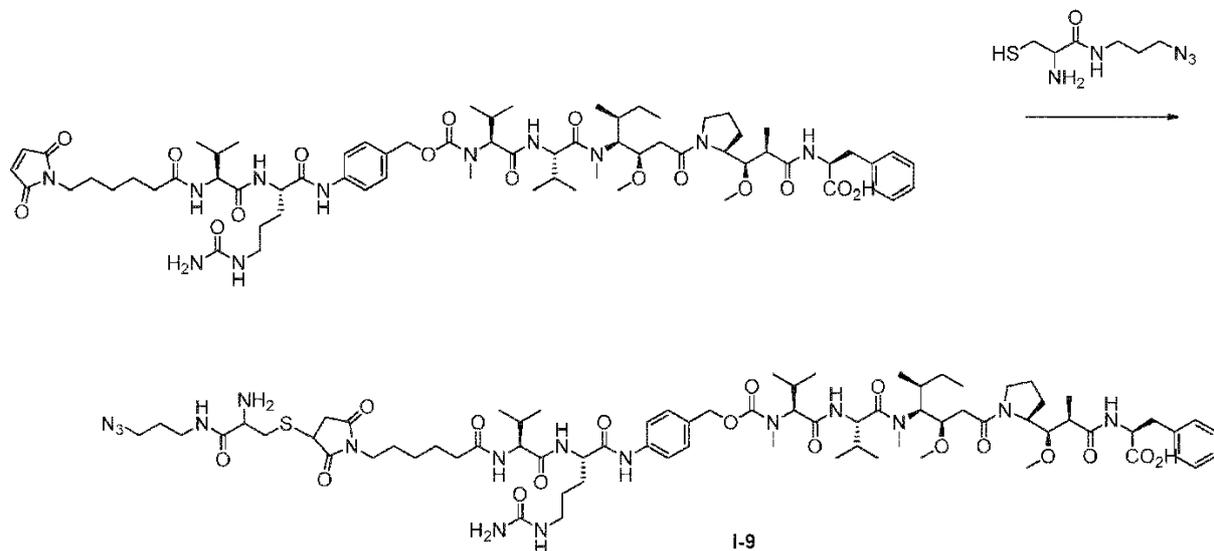
Ejemplo 12: Conjugación específica para el sitio del quelante del isótopo Cu⁶⁴ con GDF15 (ejemplo de referencia)

15 A una solución de His-hGDF15 (1,12 mg/mL, 200 μ l) se añadió una solución de NODA-GA-NHS, HPF6, sal de TFA (CheMatech Cat n° C098) (20 μ l, 10 mg/mL), y la mezcla se agitó a t.a. durante 2 días. Se observó una conversión parcial (50% de +1) mediante análisis LC-MS. Se añadieron 200 μ l de tampón NaOAc pH 4 y 20 μ l de solución de NODA-GA-NHS y la mezcla se agitó a t.a. durante 2 días más. Aproximadamente el 70% de conversión a +1 y +2 se observó mediante análisis LC-MS. Se añadió más solución de NODA-GA-NHS (20 μ l) y la mezcla se agitó a t.a. durante la noche. Aproximadamente el 80% de conversión a +1 y +2 se observó mediante análisis LC-MS. La mezcla se lavó con Amicon 10k 4 veces para dar 150 μ l de solución de 0,40 mg/mL.

Grado de Marcaje	Calculado	Observado	%
His-hGDF15	26726	26726	20
His-hGDF15 +1AF647	27084	27086	50
His-hGDF15+2AF647	27442	27442	30

Ejemplo 13: Conjugación específica para el sitio de Toxina con GDF15 (ejemplo de referencia)Etapa 1: preparación de la construcción de Toxina

5



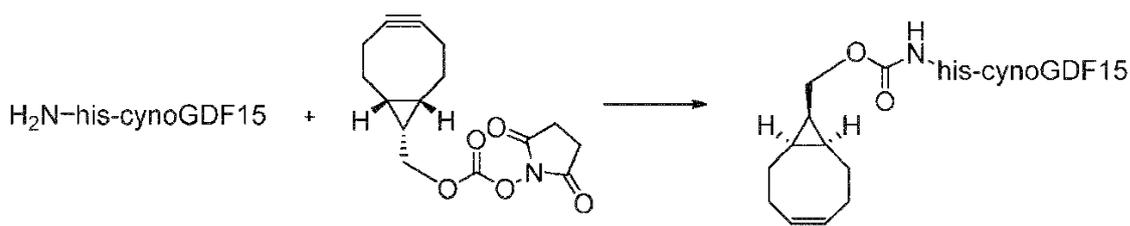
10 A una solución de maleimida MMAF (Concortis) (1,57 mg, 1,2 eq) en DMSO (130 μ L) se añadió una solución de 2-AMINO-N-(3-AZIDOPROPYL)-3-MERCAPTOPROPIONAMIDE (0,2 mg, 1 eq) en 72,7 μ L de DMSO, y DIPEA (1 μ L, 6 eq), y la mezcla se agita a t.a. durante 1 h. La conversión parcial se observa mediante análisis LC-MS. Se añadió más azida cisteína (100 μ L). La reacción se agitó durante tres días.

15 Aumento de escala: se añadieron 1,7 mg de maleimida MMAF (Concortis) (en 200 μ L de DMSO) a cys-N3 (130 μ L + 100 μ L) y DIPEA (2 μ L) y la reacción se agitó durante tres días.

20 Ambas mezclas se combinaron y purificaron mediante Sunfire C18 eluyendo con ACN al 10-90%/agua (TFA al 0,1%) (rt = 1,15 min) para dar 2,9 mg de producto limpio con un rendimiento del 92%.

Etapa 2: Conjugación específica para el sitio de BCN a His-cynoGDF15 (correspondiente a la etapa b de la presente invención)

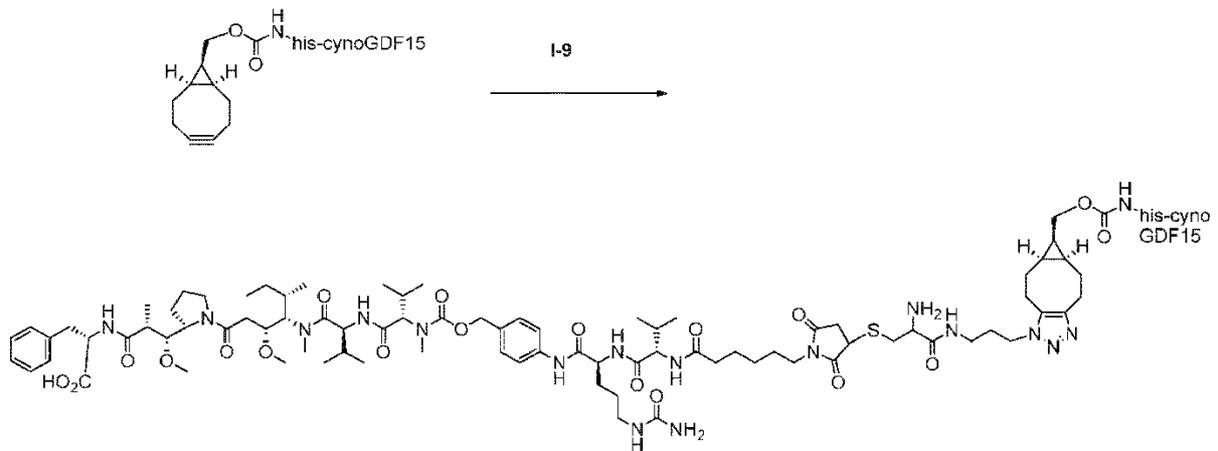
20



25 A his-cynoGDF15 (B1, 150 μ L, 0,87 mg/mL) se añadió tampón pH 4 (450 μ L) y NHS-BCN (Berry and associates cat n° LK4320) en DMSO (10 mg/mL, 4,12 μ L) y la mezcla se agitó a 4C a lo largo del fin de semana. La conversión del 60% fue evidente después de 1 día a 4C, momento en el cual se añadieron 7 eq de NHS-BCN en DMSO (10 mg/ml, 4,12 μ L). Después de otras 24 h a 4C, se añadieron 13 eq de NHS-BCN (10 mg/mL en DMSO, 8 μ L) y la reacción se incubó a t.a. durante 4 h. Se observó una conversión parcial. La mezcla se incubó a t.a. durante otras 4 h. Se observó una conversión completa y la mezcla se diluyó a 15 mL y se lavó/concentró a través de un cartucho Amicon 10K 4 veces para dar 7 mL de una solución de 0,60 mg/mL (4,2 mg) con un rendimiento del 88%. LCMS: +1 masa esperada: 26844, masa observada: 26842; +2 masa esperada: 27024 masa observada: 27020.

30

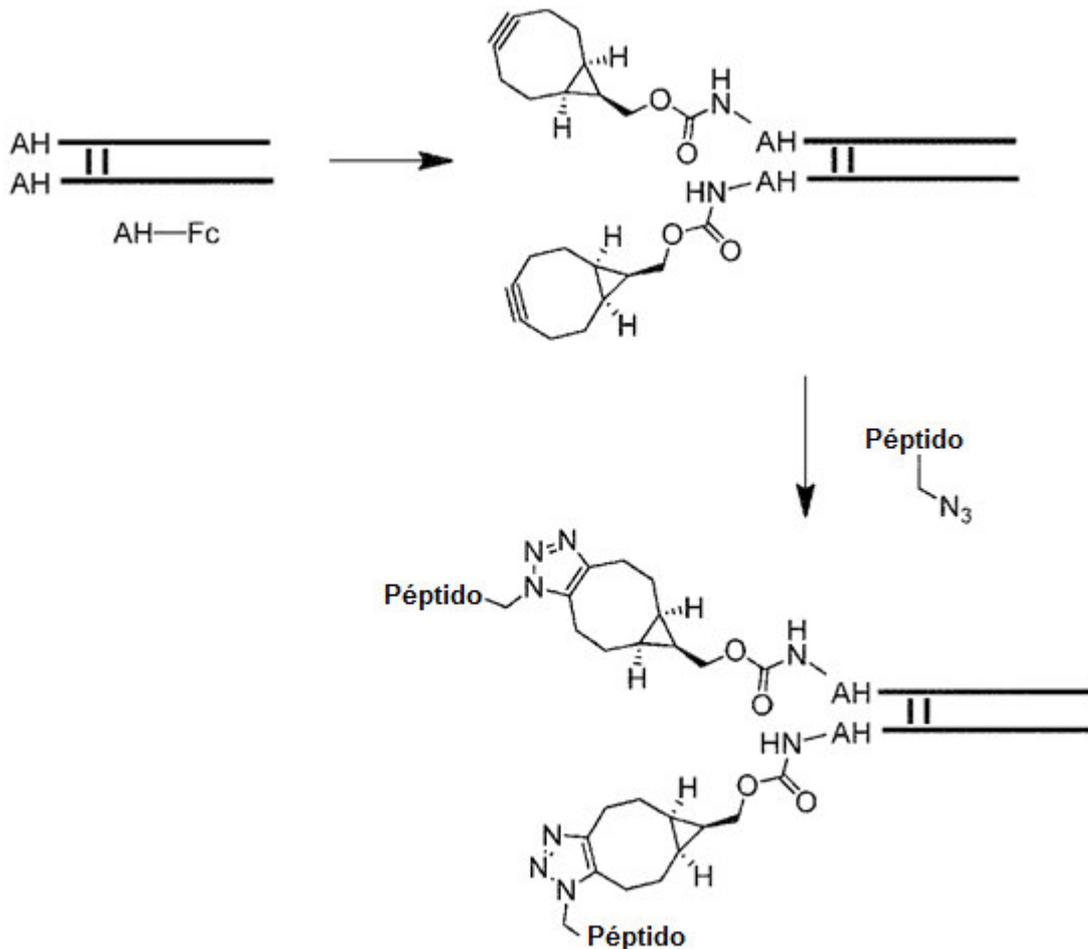
Etapa 3: Modificación adicional de la construcción conjugada



A BCN-GDF15 (7 mL, 0,6 mg/mL) se añadió Azido-MMAF (200 uL, 7,25 mg/mL en DMSO) y la mezcla se agitó a t.a. durante tres días, seguido de 30°C durante 2 días. Se obtuvo aproximadamente un 70% de conversión en un producto mono- y bis-modificado. El producto se lavó con Amicon 10k para dar 4,7 mL de 1 mg/mL de producto en acetato de sodio 30 mM a pH 4 con rendimiento cuantitativo. Maldi: sm (25%), masa calculada: (+1) 26844 (+2) 27024 masa observada: +1; 26699; +1 toxina (50%) masa calculada: 28377 masa observada: (+1); 28525; + 2 toxina (25%) masa calculada: 30088 masa observada: 29910.

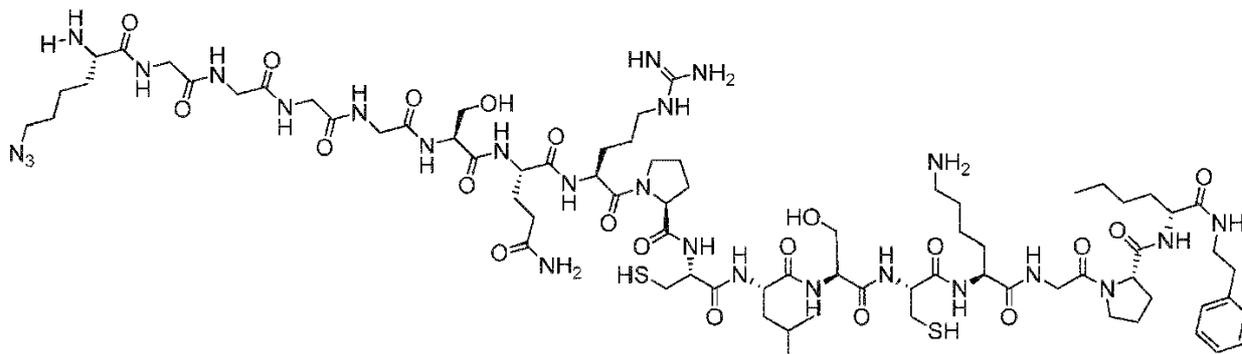
10 **Ejemplo 14:** Conjugación específica para el sitio de Fc con un agonista peptídico de APJ

Esquema general:



15

Etapas 1: Síntesis de NH₂-azidoLys-GGGGS-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-fenetilamina **Compuesto intermedio 14**



5 Resina de fenetilamina-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,25 mmol, 1,0 mmol/g) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador automático de péptidos (CEM Liberty Blue Microwave) con doble Arg estándar para los residuos de Arg y Dnle y azidolisina acoplados a doble tiempo. Los aminoácidos se prepararon como soluciones 0,2 M en DMF. Un ciclo de acoplamiento estándar se definió de la siguiente manera:

- 10
- Acoplamiento de aminoácido: AA (5 eq.), HATU (5 eq.), DIEA (25 eq.)
 - Lavado: DMF (3 X 7 mL)
 - Desprotección de Fmoc: 20% Piperidina/HOBt 0,1 M (2 x 7 mL)
 - Lavado: DMF (4 x 7 mL, luego 1 x 5 mL)

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción (Temp)	Método de Acoplamiento
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
14	Fmoc-L-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
15	Fmoc-L-azidoLys-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU

15 Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (2 x 50 mL) y DCM (2 x 50 mL) y luego se secó en vacío para dar el **Compuesto Intermedio 14a** (770 mg, 0,250 mmol).

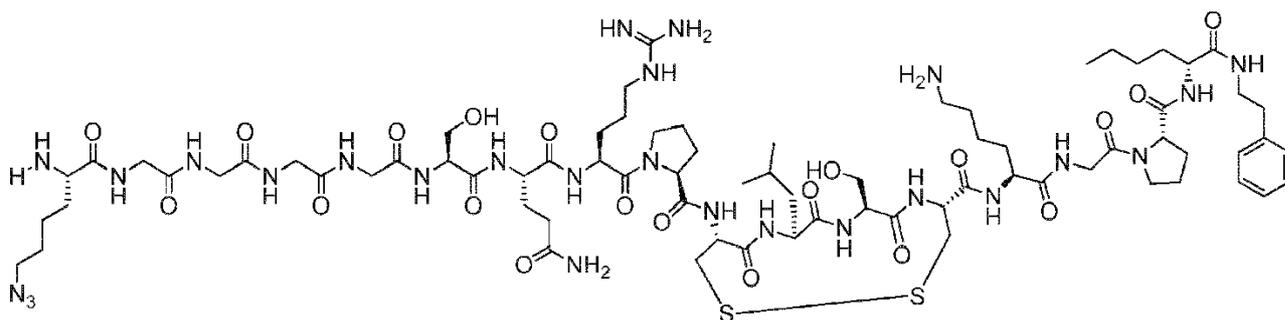
Etapa 2: Preparación del **Compuesto intermedio 14b**(Escisión de péptido de resina)

20 **Compuesto intermedio 14a** (770 mg, 0,250 mmol) se dividió por la mitad y cada muestra se combinó con 6 mL de solución de TFA (37 mL de TFA, 1 mL de H₂O, 1 mL de TIPS, 2,569 g (20 eq.) DTT) y se agitó a t.a. durante 3 horas. La solución se separó de la resina y se precipitó en 40 mL de Et₂O frío. La solución se agitó con vórtex y se dejó reposar sobre hielo durante 10 minutos antes de centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se separó y el sólido blanco se lavó dos veces más con Et₂O frío (40 mL cada vez), se centrifugó (5 minutos cada vez) y se decantó. El sólido se secó en vacío durante la noche y se purificó mediante HPLC activada por M, produciendo

25 **Compuesto intermedio 14b** en forma de un polvo blanco (80 mg, 0,045 mmol, 80%). LCMS (SQ2 Análisis del Producto-Ácido-Péptido-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 2,32 minutos, MS [M+H+2/2] 888,0.

Etapa 3: Preparación de **Compuesto Intermedio 14c** (Ciclación de residuos cisteína)

30



Compuesto intermedio 14b (80 mg, 0,045 mmol) se disolvió en agua (1,25 mL) y se añadió lentamente gota a gota yodo (50 mM en HOAc, 1,804 mL, 0,090 mmol) y la reacción se mezcló a t.a. durante 3 horas. El análisis LCMS de la reacción bruta mostró una conversión completa del material de partida. Se añadió gota a gota ácido ascórbico 0,5 M hasta que se disipó el color. El material se purificó mediante HPLC activada por MS. La liofilización de las fracciones reunidas dio 20,1 mg del producto deseado en forma de un polvo blanco (0,045 mmol, 25%). LCMS (SQ2 Análisis del Producto-Ácido-Péptido-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, 50°C): $R_t = 2,17$ minutos, MS $[M+H+2/2]$ 886,8.

Etapa 4: Preparación de la construcción Fc-AH

Clonación de la construcción AH-Fc:

El fragmento de ADN que se muestra a continuación se generó mediante técnicas de PCR estándar utilizando el vector pPL1146 que contiene la secuencia señal de Ig Kappa de ratón seguida de la Fc humana aguas abajo de un promotor de CMV, como molde. Se diseñó un cebador directo (5'-GCT TGC TAG CCA CCA TGG AAA CTG-3') que contiene un sitio NheI seguido de secuencias correspondientes al extremo 5' de la secuencia señal contenida en el vector pPL1146. Un cebador inverso (5'-GTT GAT TGA ATT CTT AGA AGC ACA TGG GGC CCT TGT GGC ACA GCC GGG GCC GCT GGC TTC CGC CAC CTC CGC TGC CTC CAC CGC CGC TGC CTC CGC CAC CTG CGC CTG GAC TCA GAG ACA GGG-3') se diseñó para que contuviera un sitio EcoRI, una secuencia de Apelina, un enlazador de glicina serina y una secuencia complementaria al extremo 3' del Fc humano contenido en pPL1146. Después de la amplificación, el fragmento se digirió por restricción tanto con NheI como con EcoRI, se aisló y se purificó a partir de un gel de agarosa y se ligó en el vector pPL1146 digerido y purificado de la misma manera. Los ligamientos se transformaron en células E coli DH5α y las colonias que contenían los plásmidos correctos se identificaron mediante secuenciación de ADN. Las secuencias mostradas son para la cadena sentido y se ejecutan en la dirección de 5' a 3'.

Secuencia de nucleótidos

```
GCTAGCCACCATGGAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCTGG
CAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGGCAGC
TGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGG
ACCCAGAAAGTCACATGCGTGGTTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACAG
TACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAAC
GGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAA
TTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAACCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGG
AGGAAATGACAAAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGA
CATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGACCACACCCCC
TGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAAAAGTCGG
TGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTAC
ACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGAATTC
```

Expresión y Purificación de Proteínas AH-Fc :

5 ADN de plásmido de expresión de AH-Fc se transfectó en células HEK293T a una densidad de 1×10^6 células por ml utilizando métodos de polietilenimina estándar. Luego se cultivaron cultivos de 500 mL en medio FreeStyle 293 (Life Technologies) en matraces de 3 L durante 4 días a 37 ° C.

10 La proteína AH-Fc se purificó a partir de medio acondicionado clarificado. Brevemente, se hicieron fluir 500 ml de medio acondicionado sobre una columna HiTrap MabSelect SuRe de 5 ml (GE Life Sciences) a 4 ml/min. La columna se lavó con 20 volúmenes de columna de PBS que contenía Triton X-114 al 0,1% y luego la proteína Fc-A H se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,7, se neutralizó con Tris-HCl 1 M, pH 9 y se dializó frente a PBS. Los rendimientos de proteína fueron de 10 a 20 mg por 500 ml de medio acondicionado y los niveles de endotoxina fueron < 1 UE/mg según lo medido por el test de Charles River ENDOSAFE PTS.

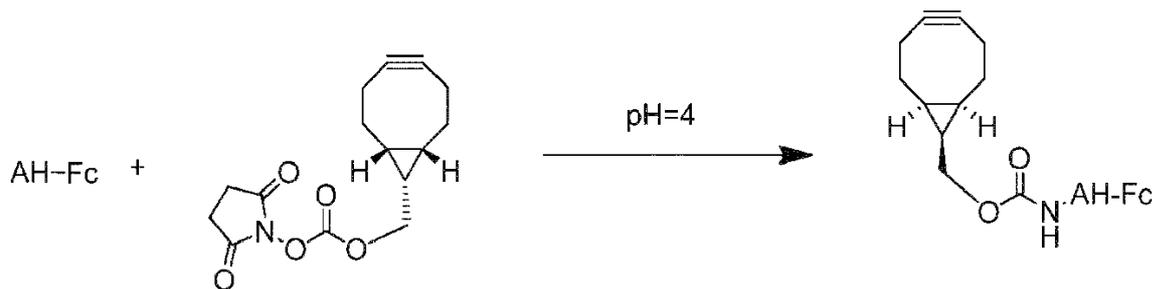
15 La proteína se caracterizó por LC/MS de las proteínas AH-Fc N-desglicosiladas reducidas. El peso molecular de Fc-AH fue el esperado.

20 **LC/MS de proteína AH-Fc nativa** Los picos eran heterogéneos y aproximadamente 3 kDa más grandes de lo esperado para los dímeros. Esto es característico de la glicosilación ligada a N esperada para Fc que tiene un sitio de glicosilación ligada a N consenso.

Exclusión por tamaño analítico en Superdex 200 la proteína AH-Fc tiene entre 89 y 100% de dímero, 0 a 10% de tetrámero y 0 a 1% de agregado.

25 **Reducción de SDS/PAGE** la proteína migró predominantemente como monómeros del tamaño esperado.

Etapa 5: Preparación de **AH-Fc BCN** (*Instalación de mango clic en el extremo N de Fc-HA*)

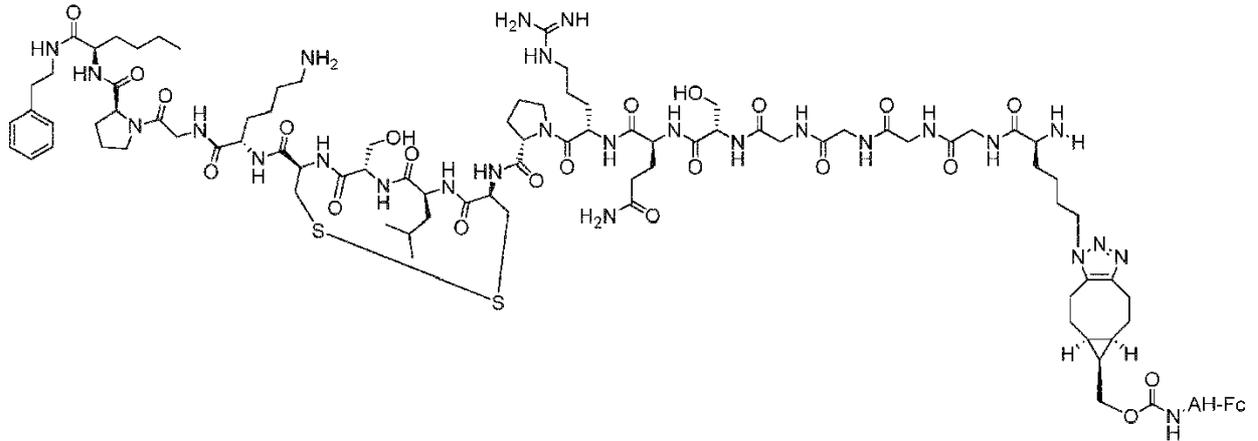


30 Secuencia AH-Fc

AHDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
 35 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40 AH-Fc (de la etapa 4: 1 mL, 3 mg/mL, 0,117 μmol) se disolvió en NaOAc 30 mM pH 4,0 (4,3 mL) y una solución madre de 10 mg/mL de (2,5-dioxopirrolidin-1-il)carbonato de (1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetilo (BCN) in DMSO (0,70 mL) se añadió lentamente y la reacción se colocó en una placa agitadora a t.a. durante 3 días. Se añadió BCN (0,25 mL) y la reacción se mezcló a t.a. durante 3 días. Se añadió BCN (0,70 mL) y la reacción se mezcló a t.a. durante 16 horas. La solución se cambió a NaOAc 30 mM pH 4,0 utilizando un filtro centrifugo Amicon MWCO de 10 kDa diluyendo y concentrando la reacción 5 veces hasta un volumen de 900 μL. La solución se centrifugó y se separó el sobrenadante. La concentración se midió mediante A280 y fue 1,73 mg/mL (1,56 mg, 26%). LCMS (QT2, Proteína_20-70 kDa_3min, Proswift Monolith 4,6 x 50 mm, 50°C, Eluyente A: Agua + Ácido Fórmico al 0,1%; Eluyente B: CAN + Ácido Fórmico al 0,1%, 2-98% a lo largo de 2 min) R_t = 1,58 min.

Grado de Marcaje	Calculado	Observado	% intensidad TIC (MS+)
Fc-AH	51141	51141,5	18
Fc-AH +1BCN	51318	51317	31
Fc-AH +2BCN	51495	51496	31
Fc-AH +3BCN	51672	51671	20

Etapa 6: **Fc-HA-BCN** + **Compuesto intermedio 14c** (Conjugación de péptido CNM a Fc)

- 5 Se preparó una solución madre de 50 mg/mL de **compuesto intermedio 14c** en H₂O. **Compuesto intermedio 14c** (53,7 μ L, 1,515 μ mol) se añadió a una solución madre de **Fc-HA-BCN** en 30 mM de NaOAc pH 4,0 (1,73 mg/mL, 1,56 mg, 0,030 μ mol) y la reacción se mezcló a t.a. durante 16 horas. La solución se cambió a NaOAc 30 mM pH 4,0 utilizando un filtro centrífugo Amicon MWCO de 50 kDa diluyendo y concentrando la reacción 5 veces hasta un volumen de 250 μ L. La concentración se midió mediante A280 y fue 3,32 mg/mL (830 μ g, 50%).
- 10 LCMS (QT2, Proteína_35-70 kDa_3 min, Proswift Monolith 4,6 x 50 mm, 50°C, Eluyente A: Agua + Ácido Fórmico al 0,1%; Eluyente B: CAN + Ácido Fórmico al 0,1%, 10-80% de B a lo largo de 2 min) R_t = 1,43 min. MS [M(glicosilado)+H] 54524,5.

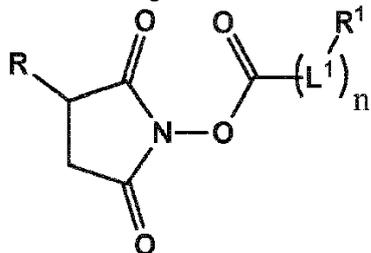
REIVINDICACIONES

1. Un método para modificar una proteína diana o un péptido diana en la funcionalidad amino del aminoácido N-terminal, que comprende las etapas de:

5 a. modificar la proteína diana o el péptido diana de modo que la proteína o el péptido resultante contenga un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal;

10 b. poner en contacto la proteína o el péptido que contiene un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal con un compuesto acilante a un pH inferior a 6, para formar una proteína o un péptido modificado;

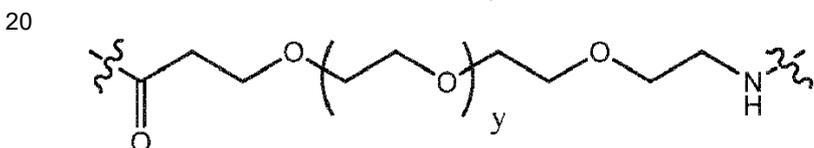
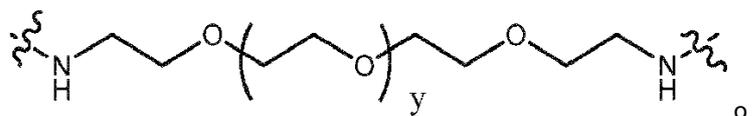
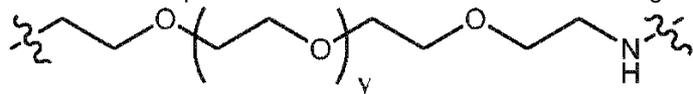
en donde el agente acilante es de la siguiente Fórmula:



en donde:

15 R es H o SO₃Na;

L¹ es un resto alquilo C₁-C₃₀ lineal o ramificado o un resto oligoetilenglicol no ramificado de Fórmula:

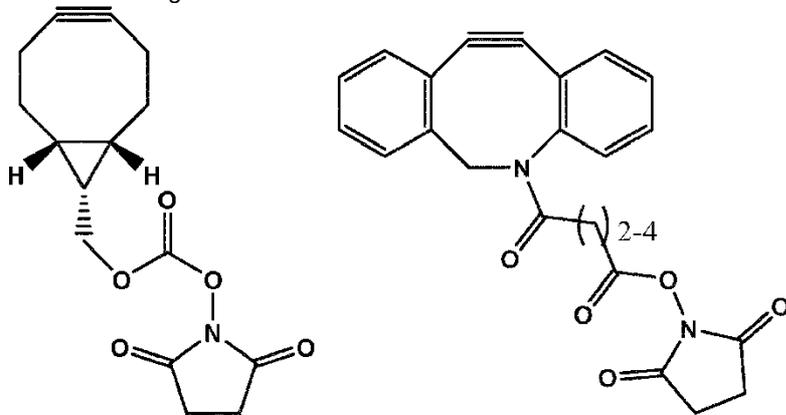


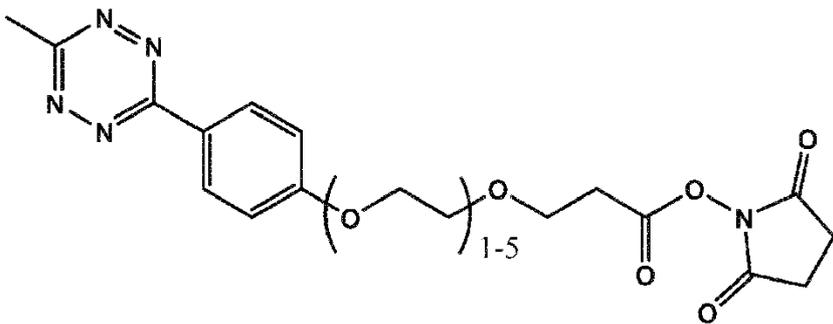
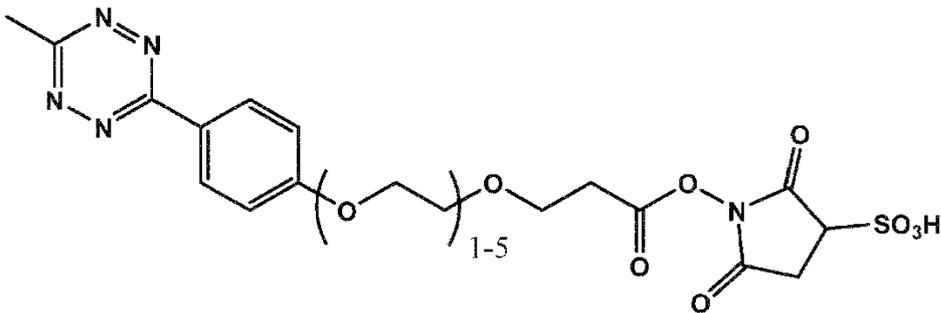
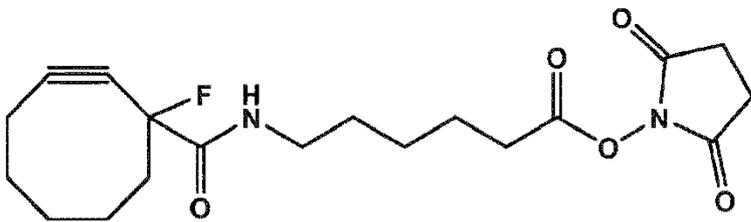
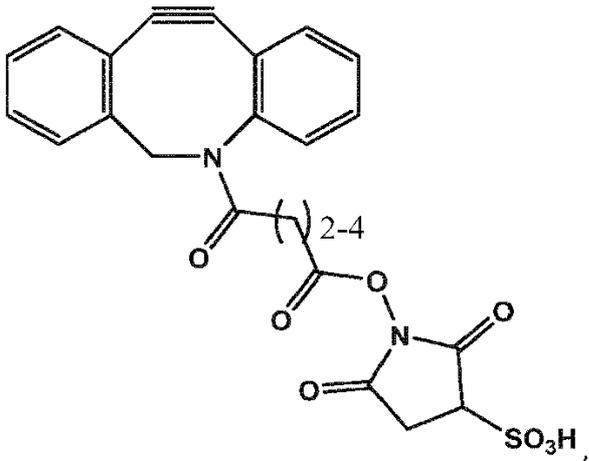
en donde y es 0 a 34;

R¹ es biotina o un resto de ácido graso; y

n es 0 o 1;

25 o en donde el agente acilante es de la fórmula:



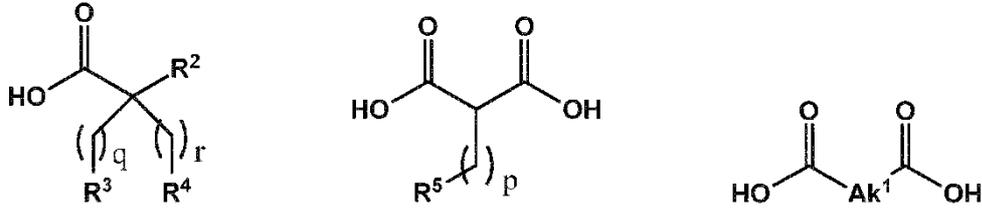


y en donde

- 10 la proteína o el péptido que contiene un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal se prepara reemplazando los dos aminoácidos en el extremo N de dicha proteína diana o péptido diana con una secuencia de aminoácidos XH-, en donde H es histidina y X es el aminoácido A; o
- 15 la proteína o el péptido que contiene un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal se prepara reemplazando los tres aminoácidos en el extremo N de dicha proteína diana o dicho péptido diana con una secuencia de aminoácidos XHX '-, en donde H es histidina y X y X' son el aminoácido A; o

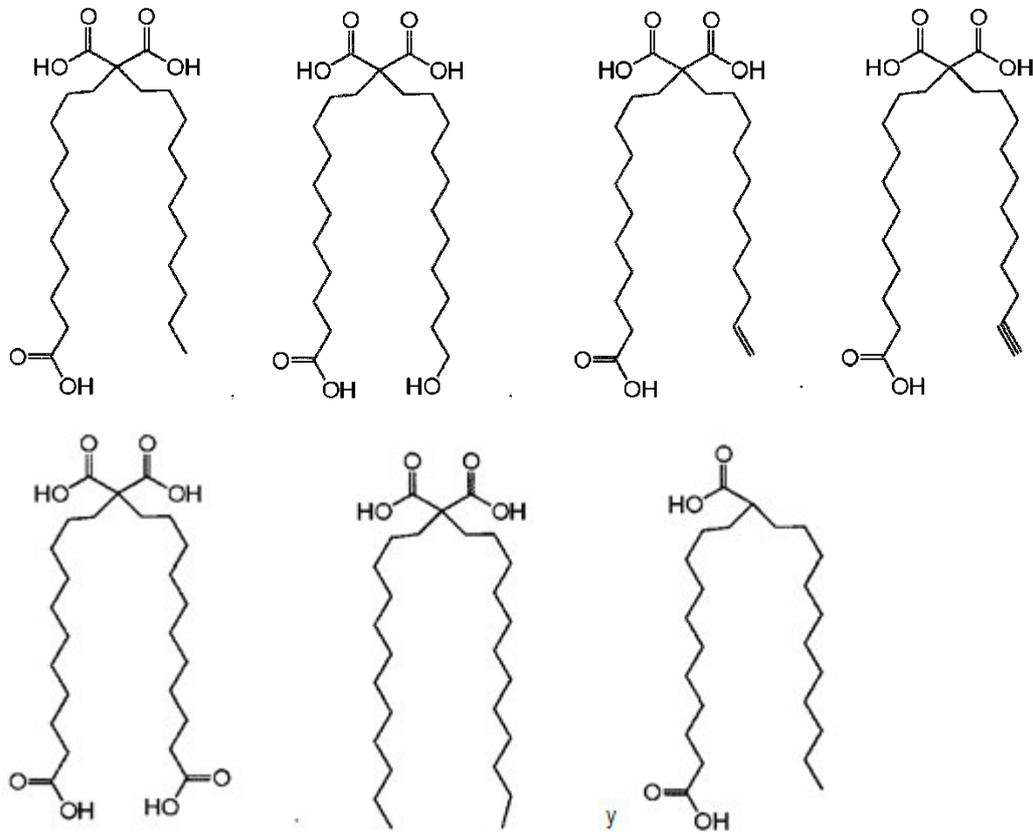
- 20 la proteína o el péptido que contiene un aminoácido histidina en la posición adyacente al aminoácido N-terminal se prepara añadiendo una secuencia de dos aminoácidos de Fórmula XH o una secuencia de tres aminoácidos de Fórmula XHX '- en el extremo N de dicho proteína diana o dicho péptido diana, en donde H es histidina y X y X' son A.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R¹ se selecciona de los siguientes ácidos:

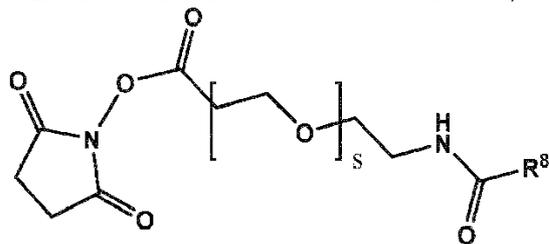


- 5 A1 A2 y A3
 R² es CO₂H, H;
 R³, R⁴ y R⁵ son, independientemente uno de otro, H, OH, CO₂H, -CH=CH₂ o -C≡CH;
 Ak¹ es un alquileo C₆-C₃₀ ramificado;
 q, r y p son, independientemente entre sí, un número entero entre 6 y 30; y en donde el punto de unión es cualquiera de la funcionalidad CO₂H; o una amida, un éster o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R¹ se selecciona de los siguientes ácidos grasos:



4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente acilante es:

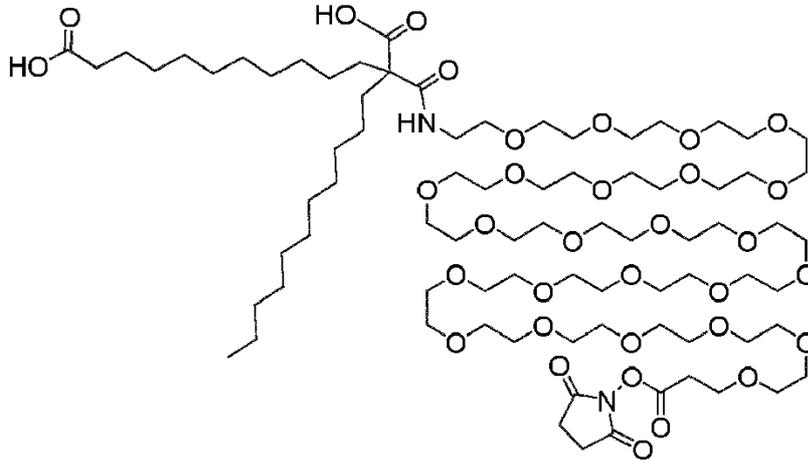


20 en donde:

R8 es un alquilo C6-70 lineal o ramificado, un alqueno C6-70 lineal o ramificado o un alquino C6-70 lineal o ramificado, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de carboxi e hidroxilo; y
 s es 1 a 34.

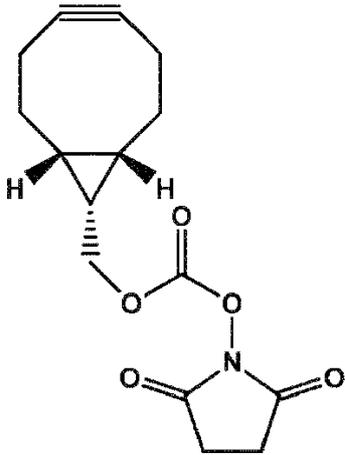
5

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente acilante es:



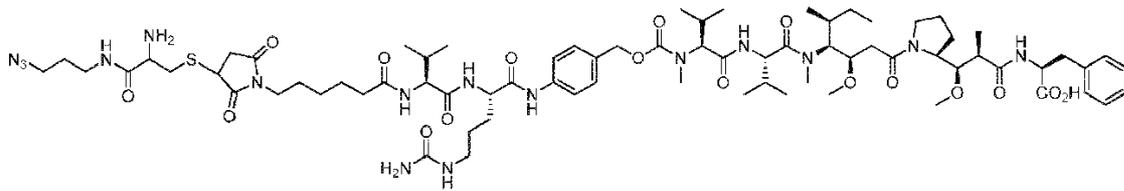
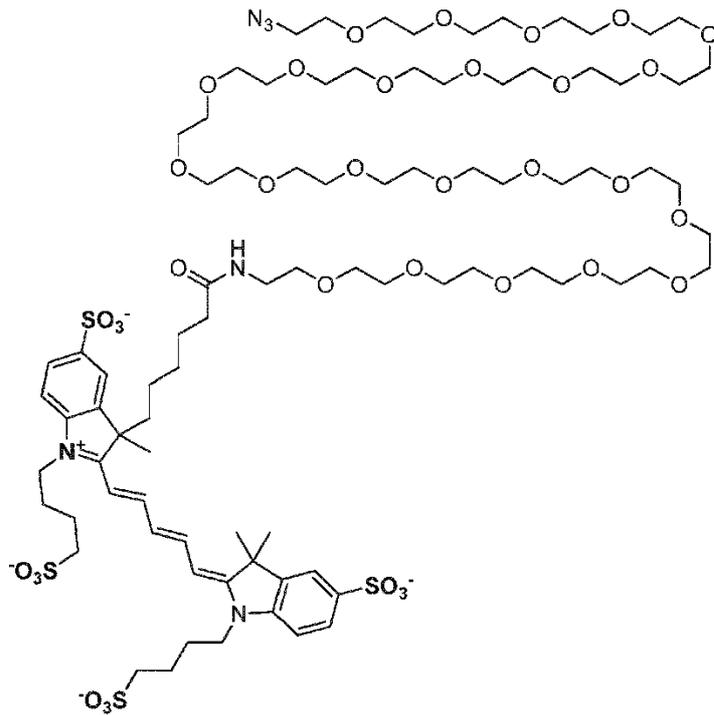
10

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente acilante es:

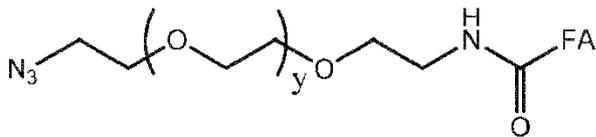


15

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende, además, una etapa de hacer reaccionar un agente biointeractivo o un agente analítico de la siguiente fórmula:

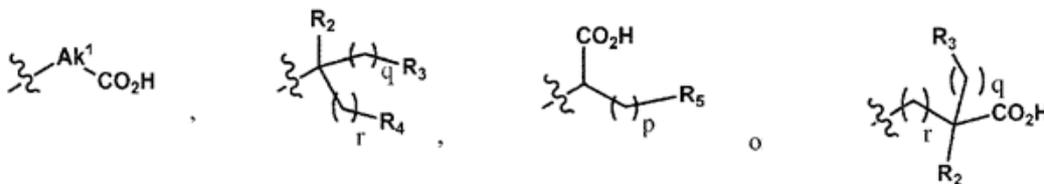


5 o



en donde y es de 0 a 34 y FA tiene las siguientes Fórmulas:

10



en donde Ak¹ es un alqueno C₆-C₃₀ ramificado;

R² es CO₂H o H;

15 R³, R⁴ y R⁵ son, independientemente uno de otro, H, OH, CO₂H, -CH=CH₂ o -C≡CH;

q, r y p son independientemente entre sí un número entero entre 6 y 30;

con el grupo reactivo presente en el agente acilante.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína diana o el péptido diana es un péptido agonista de APJ, una Fc nativa o una proteína GDF15.

20

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pH es 4.