



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 273 373**

(51) Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97936407 .2**

(86) Fecha de presentación : **01.08.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0964702**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.1999**

(54) Título: **Polipéptidos que tienen unido a su extremo N un único polímero soluble al agua.**

(30) Prioridad: **02.08.1996 US 23050 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

(73) Titular/es: **Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.**
U.S. Route nº 202
Raritan, New Jersey 08869-0606, US

(72) Inventor/es: **Wei, Ziping;**
Menon-Rudolph, Sunitha y
Ghosh-Dastidar, Pradip

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 273 373 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

Polipéptidos que tienen unido a su extremo N un único polímero soluble al agua.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polipéptidos que tienen unido en su extremo N un único polímero soluble en agua. Estos polipéptidos tienen propiedades que hacen que sean ventajosos para ser utilizados como agentes farmacéuticos y de diagnóstico. La invención se refiere también a métodos para producir estos polipéptidos y a composiciones farmacéuticas y kits relacionados.

Antecedentes de la invención

A lo largo de esta solicitud, se citan varias publicaciones. La descripción de estas publicaciones se incorpora de este modo a esta solicitud por referencia con el fin de describir más a fondo el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

En los años recientes, polímeros no antigénicos solubles en agua, tales como polietilén glicol ("PEG"), han sido utilizados para la modificación covalente de polipéptidos con importancia terapéutica y diagnóstica. Por ejemplo, se ha descrito que la unión covalente de PEG a polipéptidos terapéuticos tales como interleuquinas (Knauf, M.J. y col., *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 15.064; Tsutsumi, Y. y col., *J. Controlled Release* 1995, 33, 447), interferones (Kita, Y. y col., *Drug Des. Delivery* 1990, 6, 157), catalasa (Abuchowski, A. y col., *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 3.582), superóxido dismutasa (Beauchamp, C.O. y col., *Anal. Biochem.* 1983, 131, 25) y adenosina desaminasa (Chen, R. y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 660, 293) prolonga su semivida *in vivo* y/o reduce su inmunogenicidad y antigenicidad.

Sin embargo, tales métodos tienen serios inconvenientes. Específicamente, en la mayoría de los casos, las moléculas de PEG son unidas a través de los grupos amino de los polipéptidos utilizando PEG metoxilado ("mPEG") que tiene diferentes restos reactivos. Tales polímeros incluyen mPEG-succinimidil succinato, mPEG-succinimidil carbonato, mPEG-imidato y mPEG-cloruro cianúrico. La unión utilizando estos polímeros era normalmente no específica, esto es, tenía lugar en varios grupos amino de los polipéptidos de manera aleatoria y no exclusivamente en un grupo amino particular. Tal unión no específica puede modificar los residuos de aminoácido en sitios activos, de tal manera que elimina la actividad biológica de los polipéptidos. Además, los conjugados resultantes pueden contener una mezcla heterogénea de polipéptido modificado, lo cual es indeseable para uso farmacéutico.

Para resolver estos problemas, era deseable unir un polímero a un polipéptido específicamente en un sitio. Para el polipéptido, el hacer esto conservaría la actividad biológica, prolongaría el tiempo de circulación en la sangre, reduciría la inmunogenicidad, incrementaría la solubilidad acuosa y aumentaría la resistencia a la digestión por proteasas. Se ha llevado a cabo pegilación específica de sitio en el extremo N, en la cadena lateral y en el extremo C de un análogo potente del factor liberador de la hormona de crecimiento mediante síntesis en fase sólida (Felix, A.M. y col., *Int. J. Peptide Protein Res.* 1995, 46, 253). Como la pegilación específica se llevó a cabo durante el ensamblaje del péptido en una resina, el método no puede ser aplicado a un péptido existente.

Un método adicional utilizado implicaba la unión de un péptido a los extremos de cadenas de PEG injertadas en la superficie de liposomas de una manera específica de sitio a través de un grupo aldehído reactivo en el extremo N generado por la oxidación con peryodato de sodio de la treonina N-terminal (Zalipsky, S. y col., *Bioconj. Chem.* 1995, 6, 705). Sin embargo, este método está limitado a polipéptidos con residuos de serina o treonina N-terminales.

Se han descrito también métodos asistidos por enzimas para introducir grupos activados específicamente en el extremo C de un polipéptido (Schwarz, A. y col., *Methods Enzymol.* 1990, 184, 160; Rose, K. y col., *Bioconjugate Chem.* 1991, 2, 154; Gaertner, H.F. y col., *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 7224). Típicamente, estos grupos activos pueden ser hidrazida, aldehído y grupos amino aromáticos para la unión posterior de sondas funcionales a polipéptidos. Sin embargo, como estos métodos están basados en la especificidad de proteasas, requieren una precaución extrema y el alcance de su aplicación es limitado.

La mutagénesis específica de sitio es un abordaje más que ha sido utilizado con el fin de preparar polipéptidos para la unión específica de sitio de un polímero. WO 90/12874 describe la pegilación dirigida a un sitio de proteínas modificadas por la inserción de residuos de cisteína o por la sustitución de residuos de cisteína por otros residuos. Esta publicación describe también la preparación de mPEG-eritropoyetina ("mPEG-EPO") mediante la reacción de un derivado de mPEG específico para cisteína con un residuo de cisteína introducido recombinantemente en la EPO. De manera similar, la interleuquina-2 fue pegilada en su sitio de glicosilación después de mutagénesis dirigida a un sitio (Goodson, R.J. y col., *Bio/Technology* 1990, 8, 343).

Las glicoproteínas proporcionan carbohidratos como sitios diana adicionales para modificación. El enzima peroxidasa ha sido modificado con PEG-diamina a través de su resto carbohidrato (Urrutiagoity, M. y col., *Biocatalysis* 1989, 2, 145). WO 94/28024 describe los métodos para preparar mPEG-EPO a través de carbohidrato oxidado con peryodato. La química implicada era la formación de hidrazona mediante la reacción de mPEG-hidrazida con grupos aldehído del resto carbohidrato de la EPO. Este tipo de modificación produce grupos aldehído reactivos mediante una etapa de oxidación, que potencialmente puede oxidar varios tipos de residuos de azúcar del resto carbohidrato y

algunos residuos de aminoácido del polipéptido, tales como metionina. Otra desventaja de este método deriva de la heterogeneidad de los restos carbohidrato de la PEG. La EPO expresada por células de ovario de hámster chino tiene cuatro cadenas de carbohidratos, que incluyen tres cadenas ligadas a N en las asparraginas 24, 38 y 83 y una cadena ligada a O en la serina 126. Se han identificado un total de 52 estructuras oligosacáridicas diferentes unidas a N y al menos 6 unidas a O (Rush, R.S. y col., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1442; Linsley, K.B. y col., *Anal. Biochem.* 1994, 219, 207). Por consiguiente, es difícil controlar el número de, o los sitios de fijación de, moléculas poliméricas cuando se modifica la EPO u otra proteína a través de sus cadenas carbohidratadas.

En resumen, los métodos de la técnica para unir un polímero soluble en agua a un polipéptido padecen serios inconvenientes. Estos inconvenientes incluyen los siguientes: (a) una falta de precisión, estequiométricamente y con respecto al lugar de unión; (b) la necesidad de llevar a cabo técnicas difíciles y de intenso trabajo tales como la mutagénesis específica de un sitio; (c) la necesidad de utilizar síntesis peptídica en fase sólida simultáneamente con la unión del polímero, en lugar de unir un polímero a un polipéptido preexistente; y (d) el requisito rígido de que la identidad del residuo de aminoácido N-terminal sea treonina o serina.

Durante algún tiempo, ha existido la necesidad de un método general para unir de manera específica de sitio un polímero soluble en agua al residuo de aminoácido N-terminal de un polipéptido, método que no padezca los inconvenientes anteriormente identificados. Sin embargo, tal método no existe.

Resumen de la invención

Esta invención proporciona dos composiciones de materia. La primera composición de materia consta esencialmente de un polipéptido y de un polímero soluble en agua unido covalente al mismo en el átomo de carbono α N-terminal del polipéptido a través de un enlace hidrazona o de un enlace hidrazona reducida, con la condición de que (a) el polímero tenga un peso molecular de 700 a 20.000 daltons, (b) la función natural del polipéptido no sea eliminada después de la eliminación de su grupo α -amino N-terminal y (c) el residuo de aminoácido N-terminal del polipéptido no sea serina o treonina.

Esta invención proporciona también cuatro métodos para unir covalentemente un polímero soluble en agua al átomo de carbono α N-terminal de un polipéptido. El primer método, que une el polímero al átomo de carbono a través de un enlace hidrazona, comprende las etapas de

(a) la puesta en contacto del polipéptido con (i) un ión glioxilato o un derivado del mismo a una concentración de 0,1 M a 2,0 M, (ii) un ión de un metal de transición a una concentración de 10 μ M a 1 M, y (iii) una base de Lewis a una concentración de 10 mM a 10 M, a un pH de 5,0 a 7,0 y a una temperatura de 0°C a 100°C, para formar un polipéptido transaminado que tiene un grupo α -carbonilo N-terminal; y

(b) la puesta en contacto del polipéptido transaminado, a un pH de 3,0 a 5,0, con un polímero soluble en agua que tiene unido a él covalentemente un resto que reacciona con el grupo α -carbonilo N-terminal del polipéptido transaminado para formar un enlace hidrazona, uniendo de este modo covalentemente el polímero al átomo de carbono α N-terminal del polipéptido a través de un enlace hidrazona, con la condición de que el polímero tenga un peso molecular de 700 a 20.000 daltons y que la función natural del polipéptido no sea eliminada después de la eliminación de su grupo α -amino N-terminal.

Esta invención proporciona también una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de la presente primera composición y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Finalmente, esta invención proporciona kits para ser utilizados en la preparación de las presentes composiciones. El primer kit, para preparar la presente primera composición, contiene lo siguiente:

(a) un ión glioxilato o un derivado del mismo;

(b) un ión de un metal de transición;

(c) una base de Lewis y

(d) un polímero soluble en agua con un peso molecular de 700 a 20.000 daltons, y que tiene unido covalentemente al mismo un resto que reacciona con el grupo α -carbonilo N-terminal de un polipéptido transaminado para formar un enlace hidrazona, uniendo de este modo covalentemente el polímero al átomo de carbono α N-terminal del polipéptido.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra un esquema para preparar EPO modificada N-terminalmente. Ésta es una reacción de dos etapas: transaminación y pegilación. Se utilizaron cuatro derivados de mPEG5000 (esto es, mPEG con un peso molecular de 5000 daltons) con los grupos funcionales carboxilato de hidrazina (HZC), hidrazida (HZ), semicarbazida (SCZ) y oxilamina.

Figura 2 muestra el cromatograma de filtración en gel de mPEG-EPO con un enlace hidrazona formado utilizando un resto carboxilato de hidrazina (HZC), EPO nativa y mPEG5000 carboxilato de hidrazina en una columna TSK G3000SW_{XL} (7,5 x 30 mm). La fase móvil es citrato de sodio 20 mM (pH 7,0) conteniendo NaCl 100 mM.

Figura 3 muestra un espectro de masas con tiempo de vuelo por desorción con láser asistido por una matriz de mPEG5000 carboxilato de hidrazina, EPO nativa y mPEG-EPO con un enlace hidrazona formado mediante la utilización de un resto carboxilato de hidrazina (HZC).

Figura 4 muestra la caracterización de mPEG-EPO mediante métodos electroforéticos: (1) SDS 4-15%-PAGE, tinción de Coomassie; (2) Transferencia Western; (3) 4-15% SDS-PAGE, tinción con yodo y (4) enfoque isoeléctrico (IEF, pH 3-7). Calle 1, marcadores de peso molecular o de pI; Calle 2, EPO nativa; Calle 3, EPO transaminada; y Calles 4 y 5, mPEG-EPO con enlaces hidrazona formados utilizando restos carboxilato de hidrazina (HZC) e hidrazida (HZ), respectivamente.

Figura 5 muestra una gráfica de los resultados de un ensayo de ELISA para mPEG-EPO con enlaces hidrazona formados utilizando restos carboxilato de hidrazina (HZC) e hidrazida (HZ).

Figura 6 muestra una gráfica de los resultados de un ensayo de proliferación celular de EPO nativa, EPO transaminada y mPEG-EPO con enlaces hidrazona formados utilizando restos carboxilato de hidrazina (HZC) e hidrazida (HZ).

Figura 7 muestra una gráfica de los resultados de un bioensayo en ratón exhipóxico para mPEG-EPO con enlaces hidrazona formados utilizando restos carboxilato de hidrazina (HZC), hidrazida (HZ) y semicarbazida (SCZ).

25 Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona dos composiciones de materia. La primera composición de materia consta esencialmente de un polipéptido y un polímero soluble en agua unido covalentemente al mismo en el átomo de carbono α N-terminal del polipéptido a través de un enlace hidrazona o de un enlace hidrazona reducida, con la condición de que (a) el polímero tenga un peso molecular de 700 a 20.000 daltons, (b) la función natural del polipéptido no sea eliminada tras la eliminación de su grupo α -amino N-terminal y (c) el residuo de aminoácido N-terminal del polipéptido no sea serina ni treonina.

Según se utiliza en la presente, "polipéptido" incluye péptidos y proteínas. "Péptido" significa un polipéptido de menos de 10 residuos de aminoácidos de longitud, y "proteína" significa un polipéptido de 10 o más residuos de aminoácidos de longitud. En esta invención, los polipéptidos pueden ser polipéptidos existentes en la naturaleza o recombinantes (esto es, producidos mediante la tecnología de ADN recombinante) y pueden contener mutaciones (por ejemplo mutaciones puntuales, por inserción y delección) así como otras modificaciones covalentes (por ejemplo glicosilación y marcaje [a través de biotina, estreptavidina, fluoracina y radioisótopos tales como I¹³¹]). Además, cada una de las presentes composiciones puede contener más de un único polipéptido, esto es, cada una puede ser un monómero (un polipéptido unido a un polímero) o un multímero (dos o más polipéptidos unidos a un polímero o entre sí).

Los polipéptidos incluyen, a manera de ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, citoquinas tales como M-CSF y GM-CSF, linfoquinas, IL-2, IL-3, factores de crecimiento tales como PDGF y EGF, hormonas peptídicas tales como hGH, EPO y derivados de las mismas, factores de coagulación de la sangre tales como el Factor VIII, inmunógenos, enzimas, inhibidores enzimáticos y otros ligandos. En la realización preferida de las presentes composiciones, el polipéptido es EPO o un derivado de la misma. La EPO puede ser la existente en la naturaleza o recombinante. Los derivados de EPO incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos

GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG,

GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG,

GGDYHCRMGPITWVCKPLGG,

VGNYMCHFGPITWVCRPGGG,

GGVYACRMGPITWVCSPLGG,

VGNYMAHMGPIWVCRPGG,

GGTYSCHFGPLTWVCKPQ,

GGLYACHMGPMTWVCQPLRG,

TIAQYICYMGPETWECRSPKA,

ES 2 273 373 T3

YSCHFGPLTWVCK y

YCHFGPLTWVC,

5 así como los mutantes enumerados en la Tabla 1 siguiente.

TABLA 1

10	Mutación	Actividad relativa al tipo salvaje [†]	Referencia
15	L5S	+/-	9
	L5S/W51S/M54S/V82S/W88S/L112A/A124S/A125S	+/-	9
20	S9A	++++	3
	R10A	++++	3
	E13A	++++	3
25	R14L	++++	3
	R14A	++	3
	L17A	++++	3
30	E18A	++++	3
	K20A	++++	3
	E21A	++++	3
35	N24Q	++	1
	N24Q/N83Q	+	1
40	N24Q/N38Q/N83Q	+++	1
	C29Y/C33Y	++++	3
	A30S/L35S	+++	9

45

50

55

60

65

ES 2 273 373 T3

TABLA 1 (Continuación)

5	Mutación	Actividad relativa al tipo salvaje [†]	Referencia
10	A30S/A124S/A125S	++	9
10	C33P/R139C	++++	7
15	L35S/A124S/A125S	++	9
15	N38Q	++	1
15	N38Q/N83Q	++++	1
20	V41S	+/-	9
20	K45A	++++	3
20	F48S	++++	3
25	Y49S	++++	3
25	A50S	++++	3
30	W51S	++++	3
30	W51S/V144S	+	9
30	W51S/V82S/W88S	++	9
35	W51S/V82S/W88S/V144N	++	9
35	W51S/V82S/W88S/L112A/I119A A124S/A125S	+++	9
35	W51S/M54S/V82S/W88S/A124S A125S	++	9
40	W51S/M54S/V82S/W88S/L112A A124S/A125S	+	9
40	W51S/M54S/V82S/W88S/L112A A124S/A125S/L130A	+++	9
40	W51S/M54S/V82S/W88S/I119A A124S/A125S	+	9
45	W51S/M54S/V82S/W88S/L112A I119A/A124S/A125S	+++	9
45	W51S/M54S/V82S/W88S/A124S A125S/L130A	+++	9
45	W51S/V82S/W88S/A125S/A125S L130A	+++	9
50	K52S	++++	3
50	M54L	++++	10
50	M54S/V56S	++++	9
55	W57S/V82S/W88S/L112A/I119A A124S/A125S	+++	9
55	E62A	++++	3
60	W64A	++++	3
60	Q65A	++++	3
60	G66A	++++	3
65	L69A	++++	3

ES 2 273 373 T3

TABLA 1 (Continuación)

5	Mutación	Actividad relativa al tipo salvaje [†]	Referencia
10	L69N	++++	4
15	S71A	+++	3
20	A73G	++++	3
25	R76A	++++	3
30	V82S	+/-	9
35	V82S/W88S/V144N	++	9
40	V82S/W88S/A124S/A125S	++++	9
45	N83Q	++	9
50	Q92A	++++	3
55	L93A	++++	3
60	K97A	++++	3
65	S100A	++++	3
70	G101A	++++	3
75	L102A	++++	8
80	R103A	++	2
85	S104A	++	3
90	S104N	+/-	6
95	L105A	++	8
100	L105F	+/-	6
105	T106A	++++	3
110	T107A	+++	8
115	L108A	++	3
120	L109A	+++	8
125	L112A	+/-	9
130	L112A/I119S/L130A/I133A	++++	9
135	P122Q	+/-	6
140	A124P/A125T	++++	4
145	A125T	++++	4
150	A125N/A127S	++++	4
155	L130A	+/-	9
160	D136A	++++	3
165			

ES 2 273 373 T3

TABLA 1 (Continuación)

	Mutación	Actividad relativa al tipo salvaje [‡]	Referencia
5	R139A	++++	3
	K140A	++++	3
10	R143A	++++	3
	S146A	++++	3
15	N147A	++++	3
	R150A	+++	3
	K152A	++	3
20	L153A	+++	3
	K154A	++++	3
	L155A	++++	3
25	Y156A	++	3
	T157A	++++	3
	G158A	++++	3
30	E159A	++++	3
	R162K/T163D/G164E/D165L	++	3
	R162H/T163H/G164H/D165H/R166H/ (167)H	++++	3
35	E2-5	++	3
	E13-17	++++	2
40	E32-36	++	3
	E43-47	++	3
	E53-57	++	3
45	E78-82	+	3
	E111-119	+++	3
	E115-121	+++	2
50	E120-122	++++	5
	E123-125	++++	5
	E126-129	+++	5
55	E163-166	++++	3
	K116 (inserción de LISEEDL)	++++	3
60	[‡] relativa al tipo salvaje se define según sigue: ++++ = actividad igual que la del tipo salvaje o mejor +++ = un 75% de la actividad del tipo salvaje aproximadamente ++ = un 50% de la actividad del tipo salvaje aproximadamente + = un 25% de la actividad del tipo salvaje aproximadamente +/- = EPO mutante que se ha informado que es activa, sin embargo, los datos no están completos para la determinación de la actividad relativa al tipo salvaje.		
65			

Referencias citadas

(1) **Akai, K., Yamaguchi, K. y Ueda, M.**, Modified forms of human erythropoietin and DNA sequences encoding genes which can express them, EP 0427 189 A1.

(2) **Bittorf, T., Jaster, R. y Brock, J.** (1993) *FEBS Letts.* 336: 133-136.

(3) Resultados de **Bunn, H.F.** y col.

(4) **Byrne, T.E. y Elliott, S.G.**, Erythropoietin isoforms, EP 0 668 351 A1.

(5) **Chern, Y., Chung, T. y Sytkowski, A.J.** (1991) *Eur. J. Biochem.* 202: 225-229.

(6) **Funakoshi, A., Muta, H., Baba, T. y Shimizu, S.** (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 717-722.

(7) **Okasinski, G., Devries, P.J., Mellovitz, B.S., Meuth, J.L. y Schaefer, V.G.**, Erythropoietin analog compositions and methods, WO 94/25055.

(8) **Grodberg, J., Davis, K.L. y Sytkowski, A.J.** (1993) *Eur. J. Biochem.* 218: 597-601.

(9) Resultados de **Pulito, V.** y col.

(10) **Shoemaker, C.B.**, Erythropoietin composition, U.S. 4.835.260.

Según se utiliza en la presente, la “función natural” de un polipéptido significa su función antes de la modificación covalente de su grupo α -amino N-terminal. Las funcionales naturales incluyen, por ejemplo, actividad enzimática, unión a receptores (por ejemplo anticuerpos), unión a ligandos e inmunogenicidad.

Los presentes métodos descritos con más detalle posteriormente causan la pérdida del grupo α -amino N-terminal del polipéptido que está siendo modificado covalentemente. Por consiguiente, el polipéptido debe tener una estructura primaria de tal manera que se conserve su función natural después de la modificación covalente y no pueda ser eliminada. La función natural del polipéptido es “eliminada” por la eliminación de su grupo α -amino N-terminal si tal eliminación reduce, más de un 99%, la capacidad del polipéptido para realizar su función natural. En una realización, la eliminación no reduce la capacidad del polipéptido para llevar a cabo su función natural en más de un 90%. En la realización preferida, la eliminación no reduce la capacidad del polipéptido para llevar a cabo su función natural en más de un 50%.

Según se utiliza en la presente, un “enlace hidrazona” es un enlace que comprende la estructura covalente NH-N=C, y un “enlace hidrazona reducida” es un enlace que comprende la estructura covalente NH-NH-C. En la presente se proporcionan compuestos que contienen enlaces hidrazona reducida, ya que estos enlaces poseen mayor estabilidad química.

Según se discutió anteriormente, se conocen métodos en la técnica para unir polímeros solubles en agua al átomo de carbono α N-terminal de un polipéptido a través de un enlace hidrazona siempre que el residuo de aminoácido N-terminal sea serina o treonina. Estos métodos conocidos no funcionan en polipéptidos que tengan otro residuo N-terminal. Aunque estos métodos conocidos difieren fundamentalmente de los presentes métodos, tienen como resultado polipéptidos con serina y treonina N-terminales que tienen un polímero unido en el átomo de carbono α N-terminal a través de un enlace hidrazona. Por esta razón, la presente primera composición no incluye un polipéptido unido a un polímero a través de un enlace hidrazona, cuando el residuo de aminoácido N-terminal del polipéptido sea serina o treonina.

Los polímeros solubles en agua utilizados en la presente invención incluyen, (d) polialquilén glicol y derivados del mismo, incluyendo PEG, mPEG, homopolímeros de PEG, homopolímeros de polipropilén glicol, copolímeros de etilén glicol con propilén glicol, donde dichos homopolímeros y copolímeros no están sustituidos o están sustituidos en un extremo con un grupo alquilo. Estos polímeros pueden ser lineales, ramificados o con forma de estrella, con un amplio rango de pesos moleculares. En la realización preferida, el polímero es mPEG.

Cuando las presentes composiciones van a ser utilizadas como agentes farmacéuticos, el polímero no es tóxico. Además, cuando se dice que un polímero tiene un peso molecular dado, ese peso molecular puede ser únicamente aproximado, reflejando el peso molecular medio de una población de moléculas poliméricas que difieren unas respecto a las otras con relación al número de subunidades presentes en cada molécula.

En la realización preferida, el PEG o derivado del mismo tiene un peso molecular de 5.000 daltons aproximadamente. Además, en la realización preferida de las presentes composiciones, el polipéptido es EPO y el polímero es mPEG con un peso molecular de 5.000 daltons aproximadamente.

ES 2 273 373 T3

Esta invención proporciona también cuatro métodos para unir covalentemente un polímero soluble en agua al átomo de carbono α N-terminal de un polipéptido. El primer método, que une el polímero al átomo de carbono a través de un enlace hidrazona, comprende las etapas de

- (a) la puesta en contacto del polipéptido con (i) un ión glioxilato o un derivado del mismo a una concentración de 0,1 M a 2,0 M, (ii) un ión de un metal de transición a una concentración de 10 μ M a 1 M, y (iii) una base de Lewis α a una concentración de 10 mM a 10 M, a un pH de 5,0 a 7,0 y a una temperatura de 0°C a 100°C, para formar un polipéptido transaminado que tiene un grupo α -carbonilo N-terminal; y
- (b) la puesta en contacto del polipéptido transaminado, a un pH de 3,0 a 5,0, con un polímero soluble en agua que tiene unido covalentemente a él un resto que reacciona con el grupo α -carbonilo N-terminal del polipéptido transaminado para formar un enlace hidrazona, uniendo de este modo covalentemente el polímero al átomo de carbono α N-terminal del polipéptido a través de un enlace hidrazona, con la condición de que el polímero tenga un peso molecular de 700 a 20.000 daltons y que la función natural del polipéptido no sea eliminada después de la eliminación de su grupo α -amino N-terminal.

El tercer método comprende las etapas del primer método, así como una etapa adicional de reducción del enlace hidrazona formado en la etapa (b). La etapa de reducción puede ser realizada mediante la utilización de, por ejemplo, borohidruro de sodio (NaBH_4) y cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN), de acuerdo con métodos conocidos.

Los derivados del ión glioxilato incluyen, pero no se limitan a, iones glioxilamida y fenilglioxilo. Los iones de metales de transición incluyen, pero no se limitan a, los iones cúprico, níquel, cobaltoso o zinc. Las bases de Lewis incluyen, pero no se limitan a, acetato y piridina.

Los restos que reaccionan con el grupo α -carbonilo N-terminal del polipéptido transaminado para formar un enlace hidrazona incluyen, pero no se limitan a, carboxilato de hidrazina, hidrazina, semicarbazida, hidrazida, tiosemicarbazina, dihidrazida del ácido carbónico, carbazida, tiocarbazida y arilhidrazida. Polímeros solubles en agua con estos restos unidos covalentemente a los mismos están disponibles comercialmente. Además, los restos que reaccionan con el grupo α -carbonilo N-terminal del polipéptido transaminado para formar un enlace oxima incluyen, pero no se limitan a, oxilamina. Polímeros solubles en agua con oxilamina (así como con otros restos que forman oximas) unida covalentemente a los mismos están disponibles comercialmente.

En la realización preferida de los presentes métodos, la proteína es EPO o un derivado de la misma.

En la realización preferida, el PEG o derivado del mismo tiene un peso molecular de 5.000 daltons.

En una realización del primer método, el resto unido al polímero que reacciona con el péptido transaminado es carboxilato de hidrazina. En la realización preferida, el polipéptido es EPO, el polímero es mPEG con un peso molecular de 5.000 daltons aproximadamente y el resto unido covalentemente al polímero es carboxilato de hidrazina.

En cada uno de los presentes métodos, el tiempo de contacto preferido para la etapa (a) es de 20 minutos a 2 horas, y para la etapa (b), el tiempo de contacto y la temperatura preferidos son de 10 a 50 horas y de 4°C a temperatura ambiente, respectivamente.

Con ciertos polipéptidos, el extremo N de un polipéptido está “enterrado”, esto es, no está expuesto a solventes o reactivos, cuando el polipéptido está en su conformación nativa. Pueden utilizarse reactivos tales como tetrametilurea o urea para desplegar tal polipéptido con el fin de permitir que su residuo N-terminal experimente las reacciones requeridas de los presentes métodos.

Esta invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de las presentes primera o segunda composición, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. A manera de ejemplo, la presente composición farmacéutica puede contener una cantidad de la presente mPEG-EPO eficaz para tratar a un sujeto que padezca anemia.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M, y preferiblemente 0,05 M, o solución salina al 0,8%. Adicionalmente, tales vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de solventes no acuosos son propilén glicol, polietilén glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa en Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos tales como los basados en la dextrosa en Ringer, etc. Pueden estar también presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

Finalmente, esta invención proporciona kits para ser utilizados en la preparación de las presentes composiciones. El primer kit, para preparar la primera presente composición, comprende los siguiente:

(a) un ión glioxilato o un derivado del mismo;

(b) un ión de un metal de transición;

(c) una base de Lewis y

(d) un polímero soluble en agua con un peso molecular de 700 a 20.000 daltons, y que tiene unido covalentemente al mismo un resto que reacciona con el grupo α -carbonilo N-terminal de un polipéptido transaminado para formar un enlace hidrazona, uniendo de este modo covalentemente el polímero al átomo de carbono α N-terminal del polipéptido.

Los reactivos de estos kits pueden estar envasados en una cantidad predeterminada y pueden estar contenidos en compartimentos separados. Alternativamente, ciertos reactivos pueden estar contenidos en el mismo compartimento cuando las restricciones de los presentes métodos lo permitan. Finalmente, los kits pueden contener además reactivos reductores para generar enlaces hidrazona reducida de acuerdo con los presentes métodos, así como tampones y recipientes de reacción adecuados.

Esta invención será comprendida mejor mediante referencia los Ejemplos Experimentales siguientes, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son únicamente ilustrativos de la invención según está descrita con más detalle en las reivindicaciones que siguen posteriormente.

Ejemplos experimentales

1. Preparación de EPO Transaminada

Se intercambiaron 5 mg de EPO en citrato de sodio 20 mM (pH 6,9) y NaCl 100 mM con tampón acetato de sodio 100 mM (pH 7,0) utilizando Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA). Las concentraciones finales fueron ajustadas a 1 mg/ml de EPO, acetato de sodio 2 M, ácido acético 0,4 M, ácido glioxílico 0,1 M y sulfato cúprico 10 mM (pH 5,5) (Figura 1). La reacción se dejó 2 horas a temperatura ambiente y fue parada por la adición de 100 ml de EDTA 0,5 M. La EPO transaminada fue purificada a través de una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia, Piscataway, NJ) utilizando tampón acetato de sodio 100 mM (pH 4,5).

El grado de transaminación fue calculado por la 2,4-dinitrofenilhidrazina según está descrito en la literatura (Fields, R. y col., *Biochem. J.*, 1971, 121, 587). Se midió la extinción a 370 nm después de los primeros minutos y después de una hora. La diferencia en absorbancia es proporcional a la cantidad de grupos carbonilo presentes en la molécula de EPO. La EPO transaminada fue sometida también a análisis de aminoácidos en un sistema ABI 420H (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando la química de PITC en la pre-columna. Los resultados indican que los residuos de lisina, esto es residuos que no son N-terminales, no estaban transaminados.

2. Preparación de mPEG-EPO con mPEG-Carboxilato de Hidrazina

EPO transaminada (1 mg) en acetato de sodio 100 mM (pH 4,5) fue ajustada a cloruro de sodio 0,5 M para un volumen final 1 ml, a lo cual se añadieron 10 mg de mPEG5000 carboxilato de hidrazina (Shearwater Polymers, Huntsville, AL). La mezcla de reacción fue agitada durante 40 horas a temperatura ambiente y purificada a través de una columna Sephadex S-200 (Pharmacia, Piscataway, NJ) utilizando un tampón citrato de sodio 20 mM (pH 7,0) conteniendo NaCl 100 mM. Adicionalmente, puede añadirse a la mezcla de reacción un 0,1% de SDS para incrementar el rendimiento de la conjugación.

En cromatografía de permeación en gel, el conjugado mPEG-EPO mostraba un peso molecular sustancialmente incrementado comparado con los de EPO y mPEG5000 carboxilato de hidrazina (Figura 2).

Se utilizó espectrometría de masas con desorción por láser asistida por una matriz (Finnigan-MAT LaserMAT 2000, tiempo de vuelo lineal) para caracterizar la mPEG-EPO por determinación del peso molecular (Figura 3). El mPEG500 carboxilato de hidrazina muestra un ión en m/z 5157,4. La EPO muestra un monómero de dos cargas (m/z 14604), un monómero de una carga (m/z 28569), un dímero (m/z 57208) y un trímero (m/z 85284). De manera similar, mPEG-EPO muestra un monómero de dos cargas (m/z 17092), un monómero de una carga (m/z 34279), un dímero (m/z 69071) y un trímero (m/z 102955).

Un espectro de dicroísmo circular (DC) (Jobin-YVON CD6, Dichrograph Spectrometer Instruments, SA, Edison, NJ) de mPEG-EPO mostró que la proteína retenía la estructura del haz α -helicoidal presente en la EPO nativa (datos no mostrados). Este resultado indica que una molécula de PEG en el extremo N-terminal de la EPO no altera su estructura secundaria.

3. Preparación de mPEG-EPO con mPEG-Hidrazida

EPO transaminada (1 mg) en acetato de sodio 100 mM (pH 4,5) fue ajustada a cloruro de sodio 0,5 M, SDS 0,1% para un volumen final de 1 ml y se añadieron 10-20 mg de mPEG5000 hidrazida. La mezcla de reacción fue agitada durante 40 horas a temperatura ambiente y purificada mediante una columna de Sephacryl-200 (Pharmacia, Piscataway, NJ) utilizando un tampón citrato de sodio 20 mM (pH 7,0) conteniendo NaCl 100 mM.

Los conjugados mPEG-EPO fueron analizados mediante SDS 4-15%-PAGE (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.) con varios métodos: tinción de Coomassie (específica para proteínas), transferencia Western (específica para EPO) y tinción con yodo (específica para PEG). La distancia de migración en SDS-PAGE de los conjugados mPEG-EPO de peso molecular más elevado es menor que la de la EPO nativa. El patrón de enfoque isoeléctrico indica que el punto isoeléctrico (pI) de la EPO no se ha alterado significativamente después de la modificación. Sin embargo, la EPO transaminada es ligeramente más ácida que la EPO nativa y que mPEG-EPO.

Como las bandas de EPO y de mPEG-EPO se separan bien mediante SDS-PAGE, puede utilizarse esta técnica para monitorizar la eficacia de la reacción de conjugación. Se observó que la reacción de conjugación era >95% completa cuando se utilizó mPEG5000 carboxilato de hidrazina, mientras que la reacción era solamente un 20% completa aproximadamente cuando se utilizó mPEG5000 hidrazida, mPEG5000-semicarbazida o mPEG5000-oxilamina. Por tanto, el resto carboxilato de hidrazina parece ser más reactivo hacia los grupos carbonilo que el resto hidrazida, semicarbazida u oxilamina.

4. Reactividad de mPEG-EPO con un Anticuerpo Anti-EPO

La antigenicidad de mPEG-EPO fue estudiada utilizando un kit de ELISA para EPO Quantikine™ IVD™ (R&D Systems, Minneapolis, MN). El ensayo consta de una placa de microvaloración revestida con un anticuerpo monoclonal hacia EPO. Se deja interaccionar la EPO o la mPEG-EPO con la placa revestida. Después de lavar la placa, se añade un conjugado de anticuerpo policlonal anti-EPO y peroxidasa de rábano picante. Después de eliminar el exceso de conjugado, se añade a los pocillos un cromógeno y es oxidado por la reacción enzimática para formar un complejo de color azul. Se mide la absorbancia de este complejo a 450 nm.

Los resultados del ensayo de ELISA para determinar mPEG-EPO con un enlace hidrazona formado a partir de carboxilato de hidrazina (HZC) e hidrazida (HZ) están presentados en la Figura 5. Los datos indican que incluso una molécula de PEG unida al extremo N de la EPO reduce significativamente la afinidad de la unión del anticuerpo monoclonal a la EPO, debido posiblemente a impedimento estérico.

5. Actividad *In Vitro* de mPEG-EPO

La actividad biológica *in vitro* de mPEG-EPO fue evaluada mediante un ensayo de proliferación celular utilizando células FDC-P1/HER, una línea celular hematopoyética murina. La línea celular expresa el receptor de EPO y es dependiente de EPO para su crecimiento. Una vez que las células hubieron crecido en ausencia de EPO durante 24 horas, se añadió a las células EPO o mPEG-EPO. Las células fueron incubadas durante 42 horas y posteriormente se añadió a las células timidina tritiada. Después de 6 horas, se determinó el crecimiento celular por la incorporación de timidina.

Los resultados del ensayo de proliferación celular obtenidos para la EPO transaminada y para mPEG-EPO con enlaces hidrazona formados a partir de carboxilato de hidrazina (HZC) e hidrazida (HZ) están presentados en la Figura 6. La EPO transaminada presenta una actividad biológica completa comparable a la EPO nativa, según se determinó por su DE₅₀. Las muestras de mPEG-EPO con enlaces hidrazona formados a partir de carboxilato de hidrazina (HZC) e hidrazida (HZ) conservan solamente un 38,5% y un 25% de actividad, respectivamente, según se determinó por su DE₅₀. Los datos indican que una molécula de PEG unida al extremo N de la EPO reduce significativamente la afinidad de EPO por su receptor, debido posiblemente a impedimento estérico.

6. Actividad *In Vivo* de mPEG-EPO

La actividad *in vivo* de mPEG-EPO fue evaluada por un bioensayo en ratón exhipóxico (Coates, P.M. y col., *Nature*, 1961, 191, 1065). La formación de glóbulos rojos endógenos murinos es suprimida por la policitemia producida mediante exposiciones a presión reducida. La EPO o el conjugado mPEG-EPO es inyectado en una cantidad de 1 unidad/ratón. Se administró hierro-59 48 horas después de la inyección de EPO o de mPEG-EPO. La incorporación de hierro-59, que indica la formación de nuevos glóbulos rojos sanguíneos, fue medida 48, 72 y 96 horas después de la administración de EPO o de mPEG-EPO.

Los resultados del bioensayo en ratón exhipóxico obtenidos para mPEG-EPO con enlaces hidrazona formados con carboxilato de hidrazina (HZC), hidrazida (HZ) y semicarbazida (SCZ) están presentados en la Figura 7. Las muestras de mPEG-EPO muestran una elevada actividad *in vivo* así como una mayor duración de la actividad, en comparación con la EPO nativa. Los resultados *in vivo* indican que las muestras de mPEG-EPO tienen un tiempo de circulación mayor *in vivo* y una liberación mantenida de EPO durante la circulación.

7. Preparación de mPEG-Dímero de Fibrina 17-29

El dímero de fibrina 17-29 tiene la estructura siguiente:

5 Gly-Pro-Arg-Val-Val-Glu-Arg-His-Gln-Ser-Ala-Cys-Lys
S
S
10 Gly-Pro-Arg-Val-Val-Glu-Arg-His-Gln-Ser-Ala-Cys-Lys

Se disolvieron 2 mg del dímero de fibrina 17-29 en 0,5 ml de acetato de sodio 2 M, ácido acético 0,4 M, ácido glioxílico 0,1 M y sulfato cúprico 10 mM (pH 5,5). Se dejó proceder la reacción 2 horas a temperatura ambiente y fue parada por la adición de 20 ml de EDTA 0,5 M. El dímero de fibrina transaminado fue purificado mediante una columna de Sephadex G-10 (Pharmacia, Piscataway, NJ) utilizando un tampón acetato de sodio 100 mM (pH 4,5). El dímero de fibrina transaminado mostraba una Gly significativamente reducida en el análisis de aminoácidos, indicando la transaminación de la Gly N-terminal.

Se añadió 1 mg del dímero de fibrina transaminado en 0,5 ml de acetato de sodio 100 mM (pH 4,5) a 10 mg de mPEG5000 carboxilato de hidrazina. La mezcla de reacción fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El mPEG-dímero de fibrina fue purificado mediante cromatografía de intercambio aniónico con una columna HEMA IEC BIO CM (Alltech). La fase móvil A era acetato de sodio 20 mM (pH 5,5). La fase móvil B era MOPS 0,2 M, fosfato de potasio monobásico 0,05 M y fosfato de potasio dibásico 0,25 M (pH 7,5). El gradiente fue de un 100% de A durante 5 minutos, posteriormente de 0 a 100% de B en 25 minutos. Se recogió para un análisis posterior un pico nuevo a los 14,5 minutos que aparecía antes que el dímero de fibrina sin modificar (18 minutos). Un espectro de masas con desorción por láser mostró el ión a m/z 8070,9, lo cual demostraba que se había unido una molécula de PEG al dímero de fibrina (m/z 2986,8).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de materia que consta esencialmente de un péptido o una proteína y PEG, o un derivado del mismo, unido covalentemente a ellos en el átomo de carbono α N-terminal del polipéptido, con la condición de que (a) el PEG y el polipéptido estén unidos entre sí a través de un enlace hidrazona o de un enlace hidrazona reducido, (b) el PEG tenga un peso molecular de 700 a 20.000 daltons, (c) no se elimine la función natural del polipéptido después de la eliminación de su grupo α -amino N-terminal y (d) el residuo de aminoácido N-terminal de la proteína no sea serina ni treonina.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la proteína es EPO o un derivado de la misma.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el PEG o el derivado del mismo tiene un peso molecular de 5000 daltons aproximadamente.
- 15 4. La composición de la reivindicación 1, en la que la proteína es EPO y el PEG es mPEG con un peso molecular de 5.000 daltons aproximadamente.
- 20 5. Un método para unir covalentemente PEG al átomo de carbono α N-terminal de un polipéptido, que comprende las etapas de:
 - (a) la puesta en contacto del polipéptido con (i) un ión glioxilato o un derivado del mismo a una concentración de 0,1 M a 2,0 M, (ii) un ión de un metal de transición a una concentración de 10 μ M a 1 M, y (iii) una base de Lewis a una concentración de 10 mM a 10 M, a un pH de 5,0 a 7,0 y a una temperatura de 0°C a 100°C, para formar un polipéptido transaminado que tiene un grupo α -carbonilo N-terminal; y
 - 25 (b) la puesta en contacto del polipéptido transaminado, a un pH de 3,0 a 5,0, con PEG, o un derivado del mismo, que tiene unido covalentemente a él un resto que reacciona con el grupo α -carbonilo N-terminal del polipéptido transaminado para formar un enlace hidrazona, uniendo de este modo covalentemente el PEG al átomo de carbono α N-terminal del polipéptido, con la condición de que el PEG tenga un peso molecular de 700 a 20.000 daltons y que la función natural del polipéptido no sea eliminada después de la eliminación de su grupo α -amino N-terminal.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en el que la proteína es EPO o un derivado de la misma.
- 35 7. El método de la reivindicación 5, en el que el PEG o el derivado del mismo tiene un peso molecular de 5.000 daltons aproximadamente.
8. El método de la reivindicación 5, en el que el resto unido covalentemente al PEG es carboxilato de hidrazina.
- 40 9. El método de la reivindicación 5, en el que la proteína es EPO, el PEG es mPEG con un peso molecular de 5.000 daltons aproximadamente y el resto unido covalentemente al PEG es carboxilato de hidrazina.
- 45 10. El método de la reivindicación 5, que comprende además la etapa de reducción del enlace hidrazona formado en la etapa (b) para formar un enlace hidrazona reducida.
11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la composición de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 12. Un kit para ser utilizado en la preparación de la composición de la reivindicación 1, que comprende lo siguiente:
 - (a) un ión glioxilato o un derivado del mismo;
 - (b) un ión de un metal de transición;
 - 55 (c) una base de Lewis y
 - (d) PEG, o un derivado del mismo, con un peso molecular de 700 a 20.000 daltons, y que tiene unido covalentemente al mismo un resto que reacciona con el grupo α -carbonilo N-terminal de un polipéptido transaminado para formar un enlace hidrazona, uniendo de este modo covalentemente el PEG al átomo de carbono α N-terminal del polipéptido.
 - 60
- 65

FIG. 1

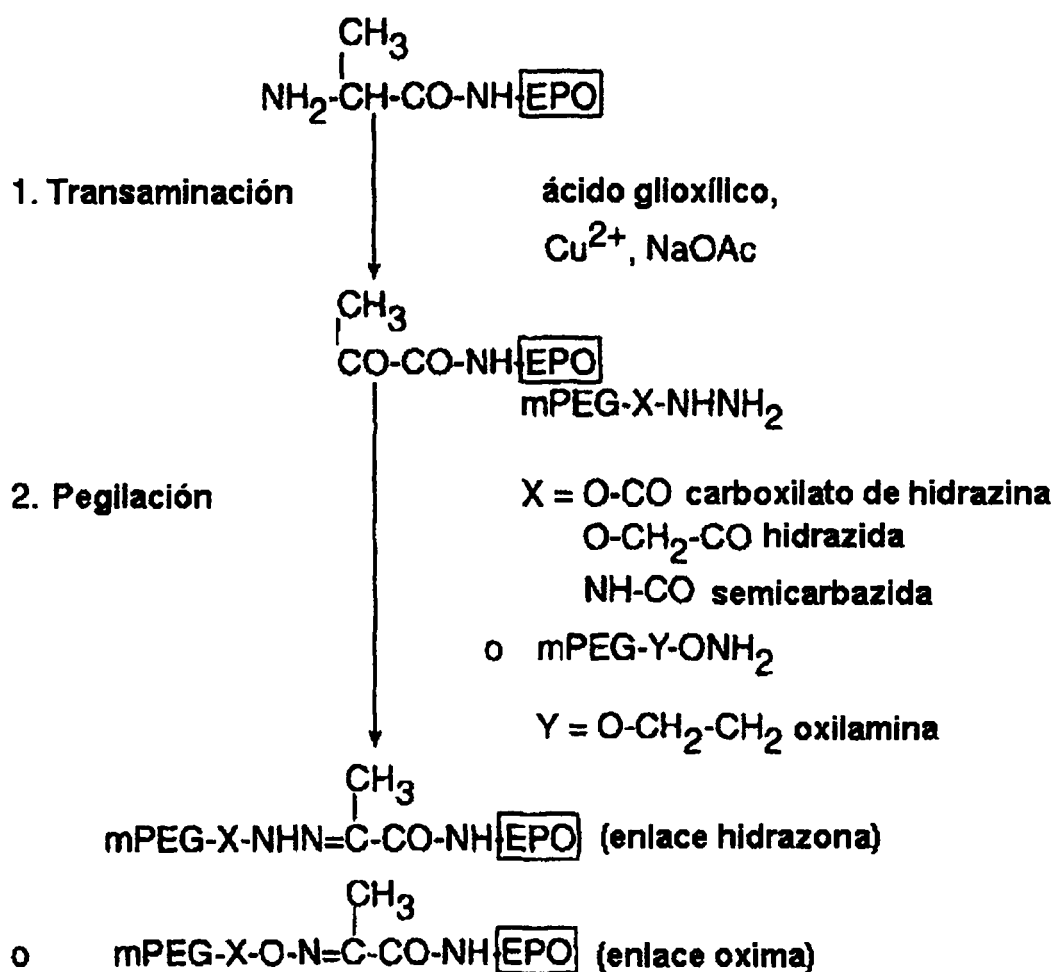


FIG. 2

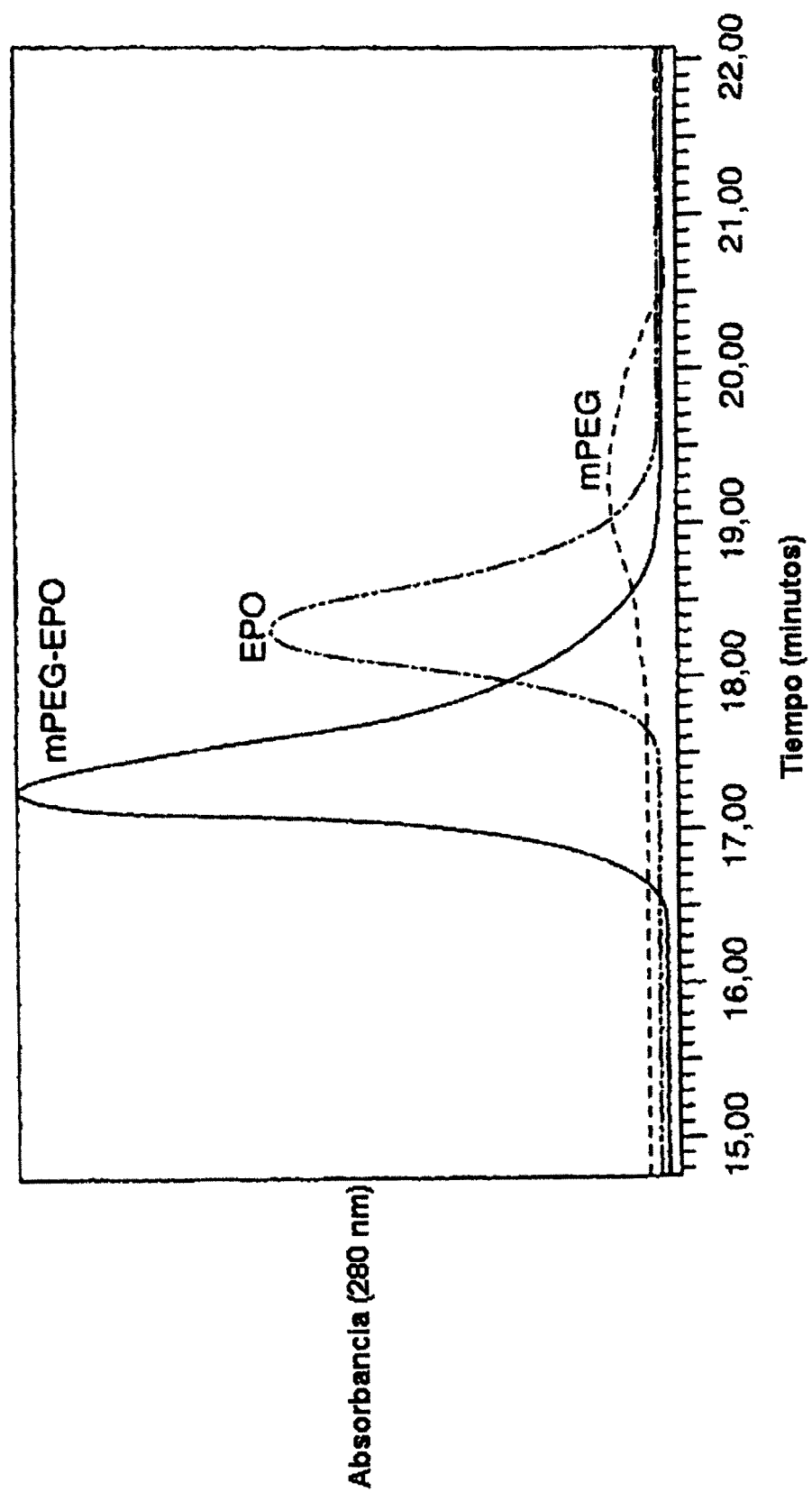


FIG. 3A

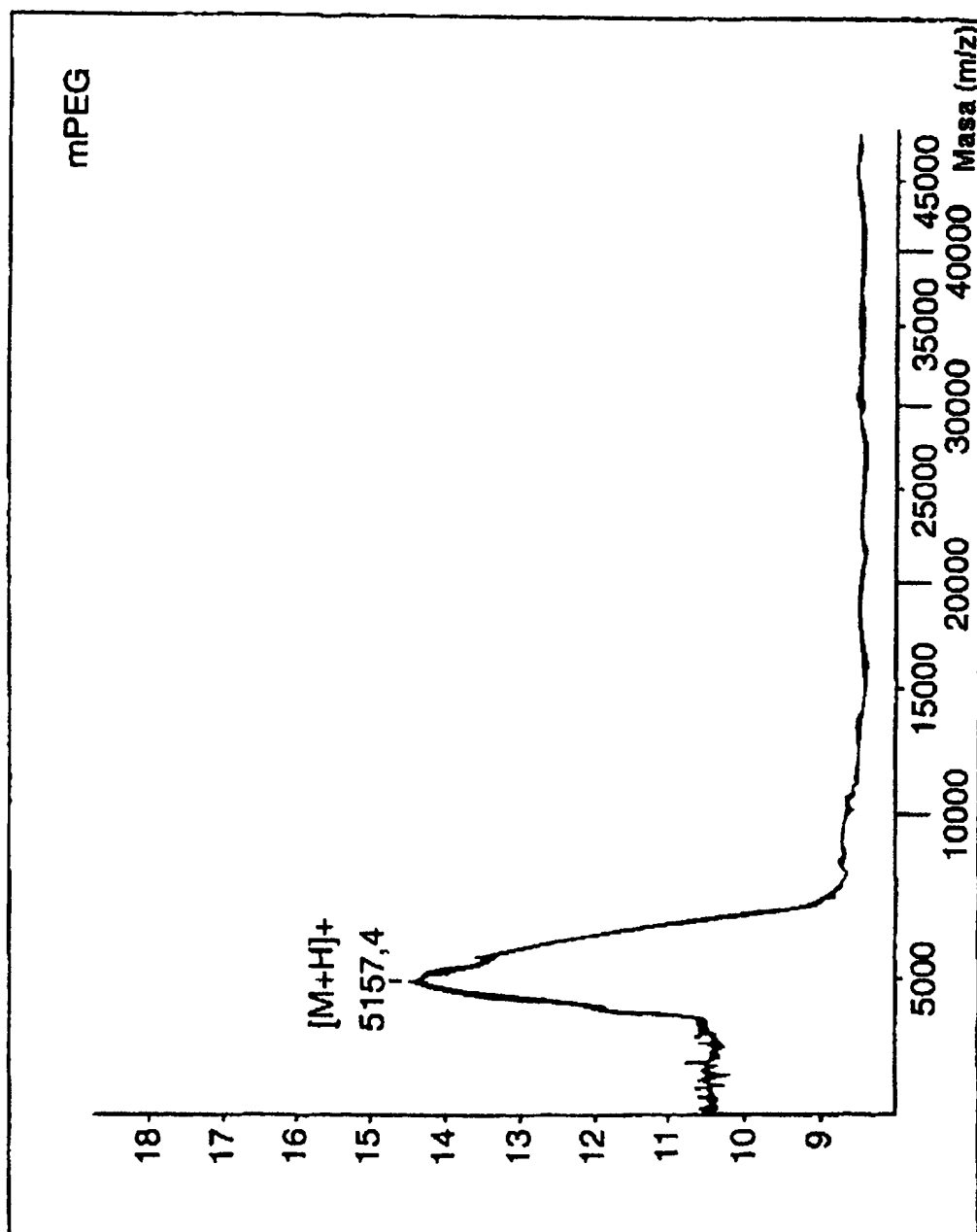


FIG. 3B

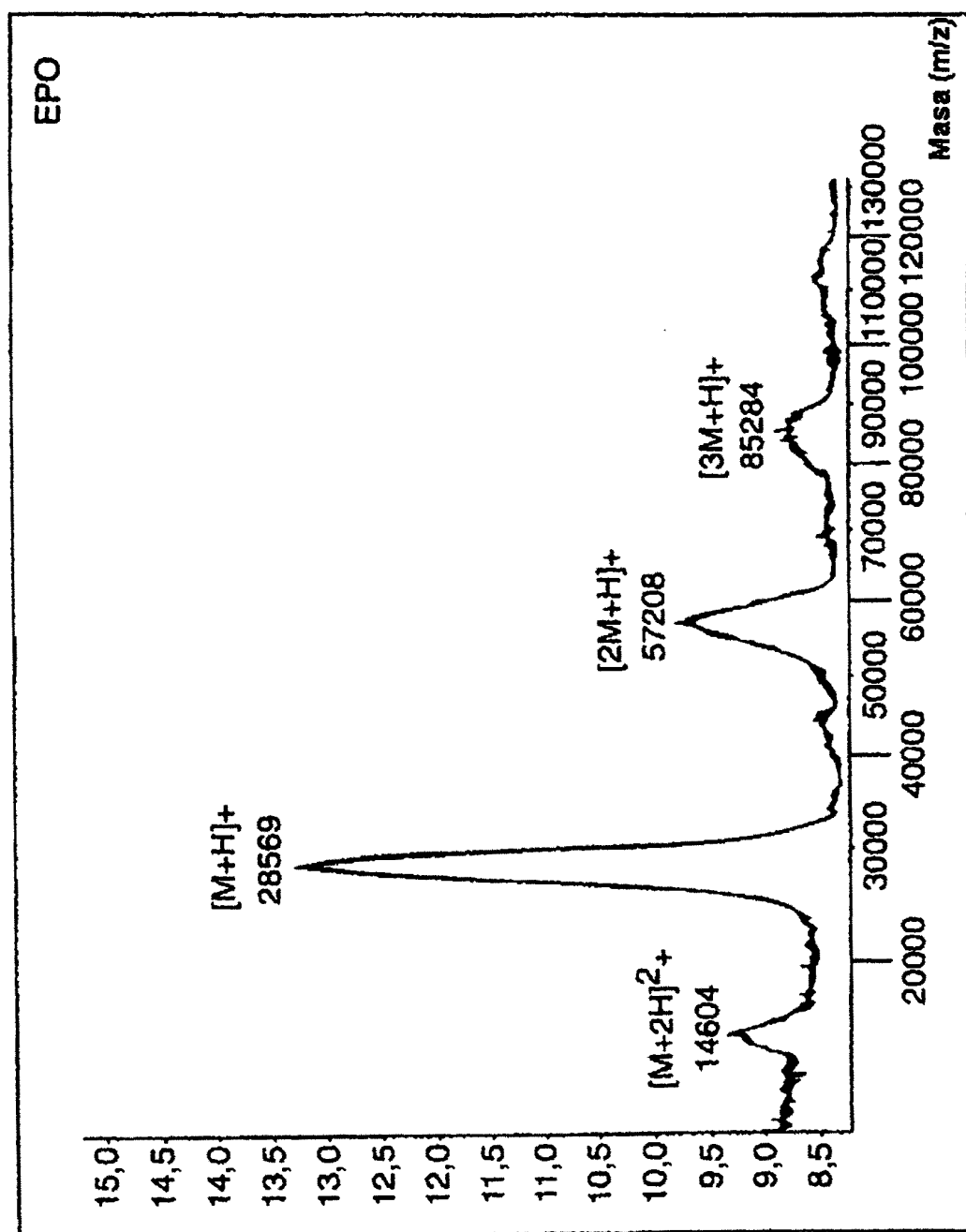


FIG. 3C

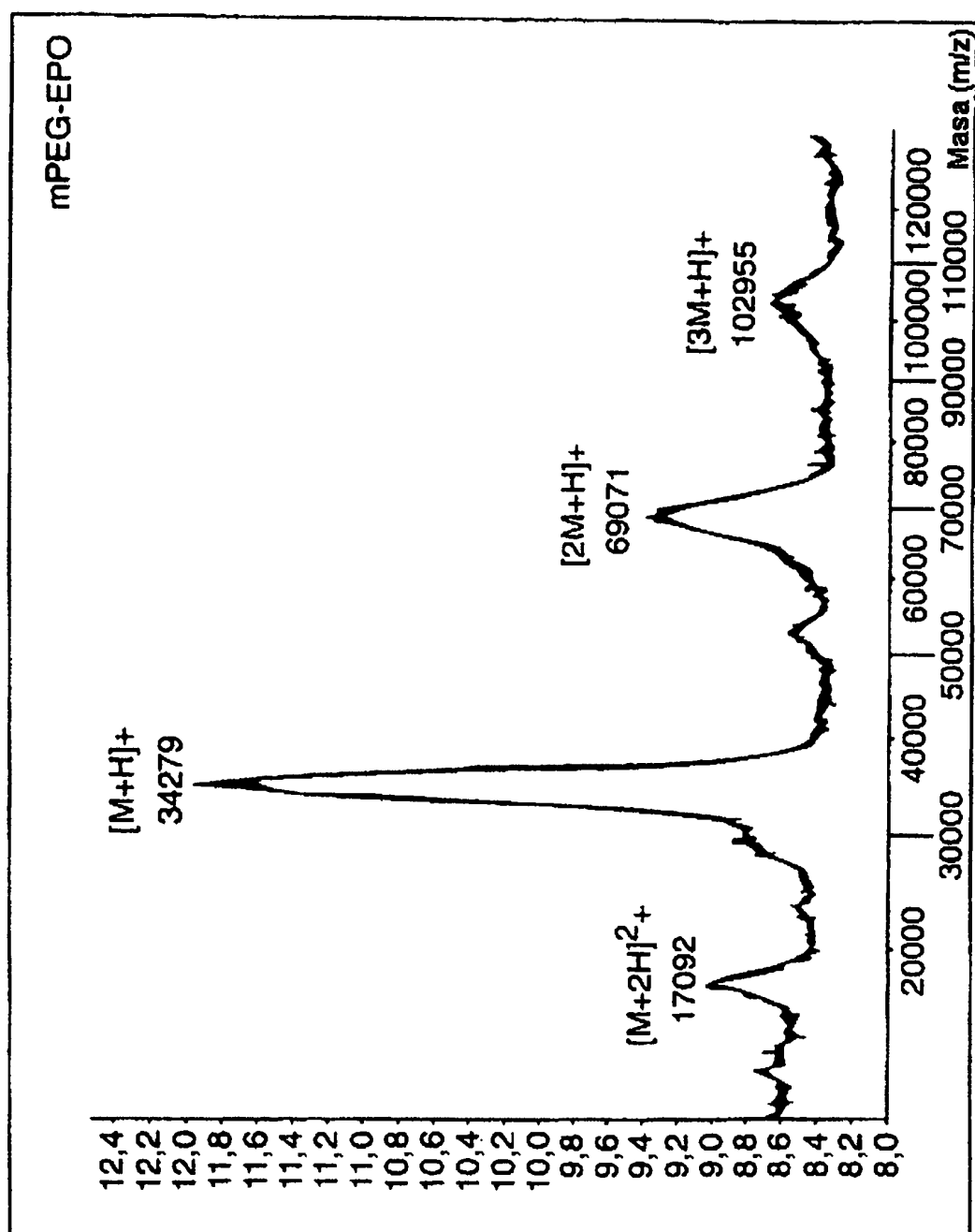
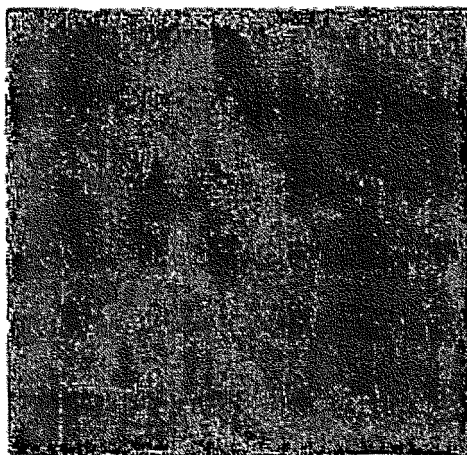


FIG. 4A

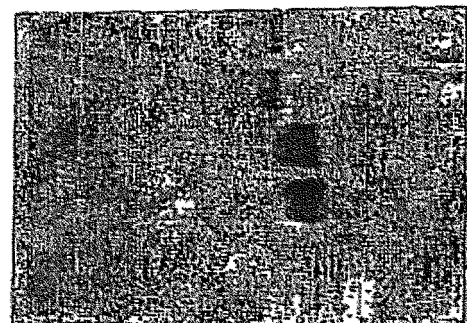
Tinción de Coomassie



Marcadores de
Peso Molecular
200,0->
97,4->
45,0->
31,0->
21,5->

FIG. 4B

Transferencia Western



Marcadores de
Peso Molecular
100,0->
80,0->
49,5->
32,5->
18,5->

1 2 3 4 5

1 2 3 4 5

FIG. 4C

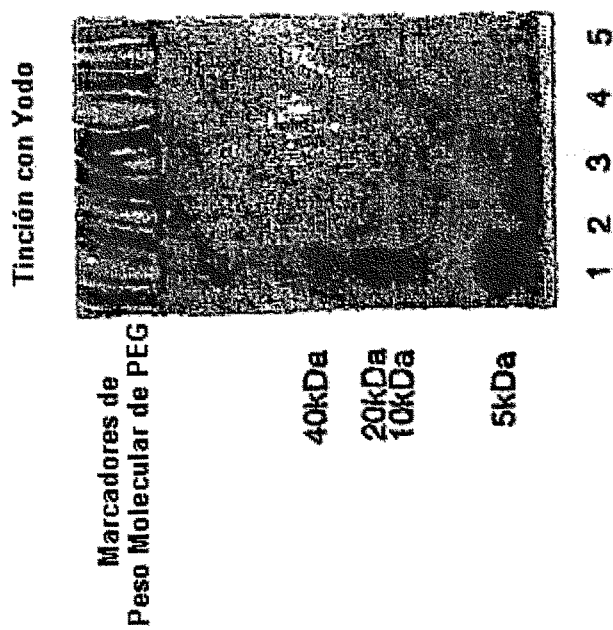


FIG. 4D

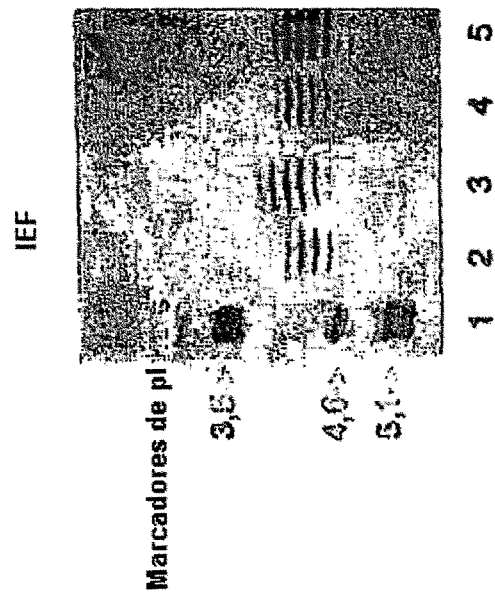


FIG. 5

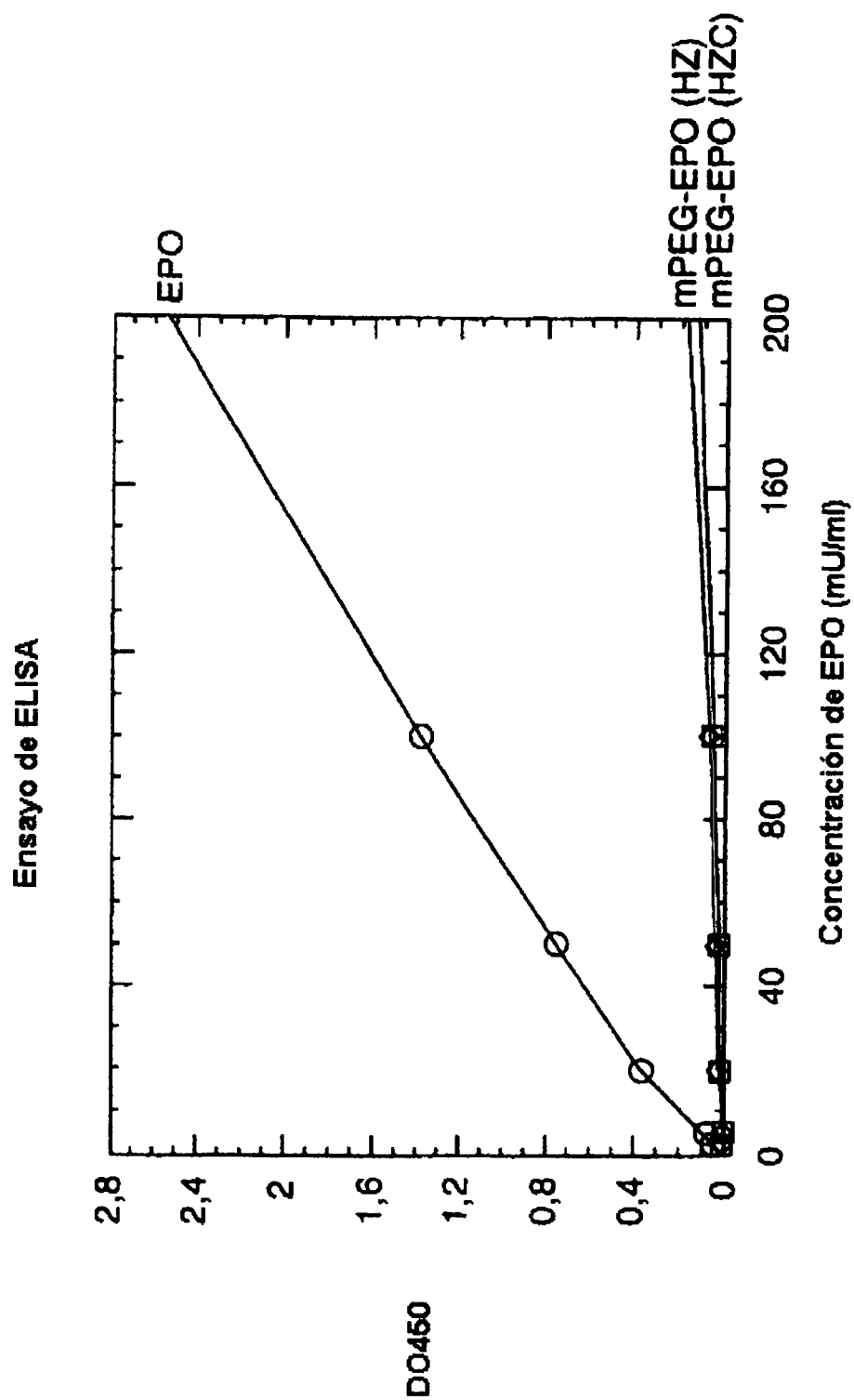


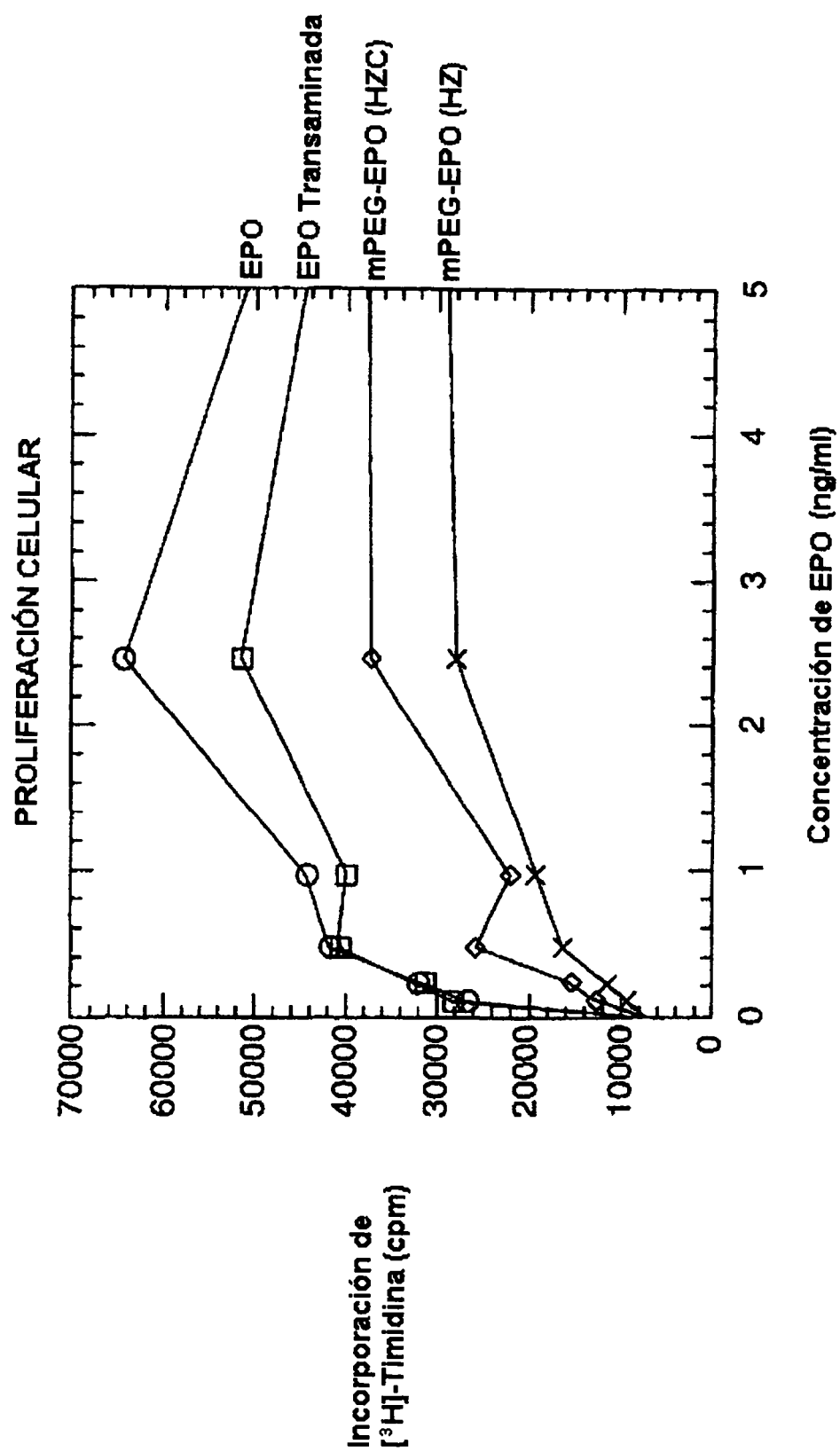
FIG. 6

FIG.7