

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 112**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/60** (2007.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

**C07K 14/605** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016** **PCT/KR2016/008050**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017** **WO17018742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016** **E 16830775 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024** **EP 3325496**

54 Título: **Método de preparación de un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo**

30 Prioridad:

**24.07.2015 KR 20150105310**

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

**05.09.2024**

73 Titular/es:

**HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)**  
**214 Muha-ro Paltan-myeon**  
**Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536, KR**

72 Inventor/es:

**MOON, SUN JIN;**  
**SHIN, CHEONG BYEOL;**  
**HONG, SUNG HEE;**  
**KIM, DAE JIN y**  
**KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 978 112 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

Método de preparación de un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un método de preparación de un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo en el que un polipéptido fisiológicamente activo y un polímero no peptídico están unidos entre sí mediante un enlace covalente. El método consiste en mejorar un rendimiento global del conjugado polipeptídico fisiológicamente activo mediante la mejora de una reacción del polímero no peptídico y el polipéptido fisiológicamente activo, y en particular, el método consiste en preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo en un alto rendimiento mediante la realización de una reacción en dos etapas a través de precipitación selectiva. La presente invención se define en las reivindicaciones.

15 **Antecedentes de la técnica**

Los péptidos tienden a desnaturalizarse fácilmente debido a su baja estabilidad y a ser degradados por enzimas proteolíticas *in vivo*, perdiendo así actividad. Los péptidos tienen un tamaño relativamente pequeño, por lo que pasan fácilmente a través del riñón. En consecuencia, para mantener el nivel en sangre y la potencia de un fármaco que incluye un péptido como componente farmacéuticamente activo, es necesario administrar el fármaco peptídico a un paciente con frecuencia. Sin embargo, los fármacos peptídicos suelen administrarse en forma de preparaciones inyectables, y una administración tan frecuente para mantener los niveles sanguíneos del péptido fisiológicamente activo causa un dolor intenso a los pacientes. Ha habido muchos intentos de resolver estos problemas, incluyendo la administración de un fármaco peptídico en el cuerpo a través de la inhalación oral o nasal mediante el aumento de la permeabilidad de la bio membrana del fármaco peptídico; la modificación de una secuencia particular de aminoácidos sensibles a la proteasa con el fin de estabilizar el péptido y evitar la degradación por la proteasa (por ejemplo, la modificación de una secuencia de aminoácidos de GLP-1 para evitar la pérdida de potencia por la dipeptidil peptidasa, etc.); adición química de un material polimérico de alta solubilidad, como el polietilenglicol (PEG), a la superficie del péptido; y preparación de una proteína de fusión de un polipéptido fisiológicamente activo y albúmina sérica humana o un fragmento de inmunoglobulina (Fc) mediante una tecnología de fusión recombinante.

Sin embargo, la preparación de la proteína de fusión es problemática en el sentido de que la unión no específica del polímero al péptido fisiológicamente activo bloquea los dominios activos del péptido para reducir la actividad del péptido y, por lo tanto, la unión específica del sitio para evitar la unión no específica reduce el rendimiento de la preparación o requiere la manipulación artificial del péptido fisiológicamente activo.

Para resolver el problema de la preparación ineficiente de un conjugado del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico, se ha intentado modificar un sitio específico del polipéptido fisiológicamente activo en el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo con un polímero no peptídico (Patente coreana nº 10-1164453). Además, en la preparación de una proteína de fusión de un polipéptido fisiológicamente activo y albúmina sérica humana o un fragmento de inmunoglobulina (Fc) mediante el uso de un polímero no peptídico que tiene dos grupos funcionales, se han intentado muchos métodos para aumentar el rendimiento de la preparación.

Los presentes autores han continuado sus estudios, y han descubierto que tras una primera reacción de conjugación entre un polímero no peptídico y un polipéptido fisiológicamente activo, el polipéptido fisiológicamente activo que no ha reaccionado (no conjugado) se separa por precipitación selectiva, y a continuación se somete a una segunda reacción para producir un conjugado de polímero no peptídico y polipéptido fisiológicamente activo de alto rendimiento y alta pureza, y el conjugado se utiliza para producir un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo y portador fisiológicamente activo de alto rendimiento y alta pureza, completando así la presente divulgación.

<insertar página 2>

**Divulgación**55 **Problema técnico**

En el presente documento se describe un método para preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo, que incluye:

- 1) precipitar selectivamente de una mezcla de reacción un polipéptido fisiológicamente activo no conjugado con un polímero no peptídico, conjugando dicha reacción el polímero no peptídico con un residuo de aminoácido del polipéptido fisiológicamente activo; y
- 2) hacer reaccionar el polipéptido fisiológicamente activo recuperado del precipitado con el polímero no peptídico en la reacción de conjugación de la etapa 1).

También se divulga un método para preparar un conjugado de un polipéptido fisiológicamente activo y un portador

fisiológicamente activo, el método comprende conjugar mediante un enlace covalente, el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo preparado como se ha descrito anteriormente con un portador fisiológicamente activo para preparar un conjugado de polipéptido y portador, en el que en el conjugado de polipéptido y portador, los dos extremos del polímero no peptídico se conjugan respectivamente con el portador fisiológicamente activo y el polipéptido fisiológicamente activo.

### Solución al problema

US 2012/003712 A1 se refiere a un "método para preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo en un sitio específico".

US 2014/296475 A1 se refiere a "un método para preparar un conjugado de un polipéptido fisiológicamente activo y un polímero no peptídico".

Lovrien et al (Curr Protoc Protein Sci. 2001 May; Chapter 4:Unit 4.5 ) se refiere a protocolos para la "precipitación selectiva de proteínas".

WO 01/57084 A1 se refiere a la "cristalización de un análogo de GLP-1".

Atha et al (J Biol Chem. 1981 Dic 10;256(23):12108-17.) se refiere al "mecanismo de precipitación de proteínas por polietilenglicoles".

WO 2013/1333659 A1 se refiere a "un proceso mejorado para la preparación de complejo polipeptídico fisiológicamente activo".

WO 2010/011096 A2 se refiere a "un complejo polipeptídico que comprende un polímero no peptídico con tres extremos funcionales".

US 2007/041967 se refiere a un "fragmento IgG Fc para un portador de fármaco y un método para su preparación".

Para lograr los objetos anteriores, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo, el método incluye:

1) precipitar selectivamente de una mezcla de reacción un polipéptido fisiológicamente activo no conjugado con un polímero no peptídico, conjugando dicha reacción el polímero no peptídico con un residuo de aminoácido del polipéptido fisiológicamente activo; y 2) hacer reaccionar el polipéptido fisiológicamente activo recuperado del precipitado con el polímero no peptídico en la reacción de conjugación de la etapa 1).

También se proporciona un método de preparación en el que el polipéptido fisiológicamente activo precipitado se disuelve y después se conjuga con el polímero no peptídico.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que la mezcla de reacción en la etapa 1) incluye un 10 % en peso o más basado en el peso total de la mezcla, del polipéptido fisiológicamente activo al que no está unido el polímero no peptídico.

En la presente invención la precipitación selectiva en la etapa 1) se realiza utilizando un disolvente orgánico, en el que el disolvente orgánico es isopropanol etanol, 1-propanol, 1-butanol, acetona, acetonitrilo, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de la presente invención la mezcla de reacción en la etapa 1) se trata con isopropanol en 2 volúmenes o más de la mezcla de reacción.

En algunas realizaciones de la presente invención la mezcla de reacción en la etapa 1) se trata con isopropanol en 3 a 7 volúmenes de la de la mezcla de reacción.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que, en la etapa 2), el polipéptido fisiológicamente activo recuperado se hace reaccionar con el polímero no peptídico durante 0,5 horas a 4 horas.

Se divulgan, pero no forman parte de la invención, realizaciones en las que el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en péptido secretor de insulina, factor de coagulación sanguínea, hormona promotora de la digestión, insulina, oxintomodulina, glucagón, hormona adrenocortical, hormona tiroidea, hormona intestinal, citoquinas, enzimas, factor de crecimiento, neuropéptido, hormona hipofisaria, hormona del hipotálamo, péptido antiobesidad, péptido antiviral y un derivado peptídico no natural con actividad fisiológica.

Se divulgan, pero no forman parte de la invención, realizaciones en las que el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos, amilina,

somatostatina, péptido YY (PYY), neuropéptido Y (NPY), angiotensina, bradiquinina, calcitonina, corticotropina, eleudoisina, gastrina, leptina, oxitocina, vasopresina, hormona luteinizante, hormona luteotrófica, hormona foliculoestimulante, hormona paratiroidea, secretina, sermorelina, hormona del crecimiento humano (hGH), péptido liberador de la hormona del crecimiento, factores estimulantes de colonias de granulocitos (GCSF), interferones (IFN), interleucinas, péptido liberador de prolactina, orexina, péptido liberador de tiroides, colecistoquinina, péptido inhibidor de gastrina, calmodulina, péptido liberador de gastrina, motilina, péptido intestinal vasoactivo, péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético barínico (BNP), péptido natriurético tipo C (CNP), neuroquinina A, neuromedina, renina, endotelina, péptido sarafotoxina, péptido carsomorfina, dermorfina, dinorfina, endorfina, encefalina, factor de células T, factor de necrosis tumoral, receptor del factor de necrosis tumoral, receptor de la uroquinasa, supresor tumoral, inhibidor de la collagenasa, timopoyetina, timulina, timopentina, timosina, factor humoral tímico, adrenomodulina, allostatina, fragmento de proteína beta amiloide, péptido antibacteriano, péptido antioxidante, bombesina, osteocalcina, péptido CART, E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, leucokina, Kringle-5, laminina, inhibina, galanina, fibronectina, pancreastatina y fuzeon.

En la presente invención el polipéptido fisiológicamente activo es insulina, un derivado de exendina, una combinación de los mismos.

El derivado de exendina se selecciona del grupo que consiste en des-amino-histidil(DA)-exendina-4, beta-hidroxi-imidazo-propionil(HY)-exendina-4, imidazo-acetil(CA)-exendina-4, y dimetil-histidil(DM)-exendina-4.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que el polímero no peptídico se conjuga con Lys27 del derivado de exendina.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que el polímero no peptídico se conjuga con el N-terminal de la insulina.

En la presente invención, el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polivinil etil éter y una combinación de los mismos.

Se divulgan, pero no forman parte de la invención, realizaciones en las que el polímero no peptídico es polisacárido, dextrano, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitinas o ácido hialurónico.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que el polímero no peptídico es polietilenglicol.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que el polímero no peptídico incluye al menos un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado succinimida.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que el polímero no peptídico tiene un grupo aldehído como grupo reactivo.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que el grupo aldehído es un grupo propionaldehído.

En la presente invención, el polímero no peptídico tiene un peso molecular de 0,5 kDa a 20 kDa. Se divulgan, pero no forman parte de la invención, realizaciones en las que el polímero no peptídico tiene un peso molecular de 500 Da a 100.000 Da.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación que incluye además separar el conjugado polipeptídico fisiológicamente activo después de la etapa 2).

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que la separación se realiza utilizando cromatografía de intercambio iónico.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio iónico de alta presión.

También se divulga en el presente documento un método para preparar un conjugado de un polipéptido fisiológicamente activo y un portador fisiológicamente activo (polipéptido fisiológicamente activo-portador fisiológicamente activo, conjugado polipéptido-portador). Este método incluye conjugar mediante un enlace covalente el portador fisiológicamente activo con el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo preparado como se ha descrito anteriormente, preparando de este modo un conjugado (conjugado de polipéptido fisiológicamente activo-portador fisiológicamente activo, conjugado de polipéptido-portador) en el que los dos extremos del polímero de no peptídico se conjugan respectivamente con el portador fisiológicamente activo y el polipéptido fisiológicamente activo.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que el portador fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en albúmina, una región Fc de inmunoglobulina, transferrina, aptámero, toxina, gelatina, colágeno, dextrano, polisacárido, ácido graso y fibrinógeno.

La presente divulgación también proporciona el método de preparación en el que el portador fisiológicamente activo es una región Fc de inmunoglobulina.

### Efectos ventajosos

Un método de preparación de la presente divulgación se utiliza para producir un conjugado de polímero no peptídico-polipéptido fisiológicamente activo y un conjugado de portador fisiológicamente activo-polipéptido fisiológicamente activo mediante una reacción de dos etapas a través de precipitación selectiva en un alto rendimiento, y por lo tanto, el método puede utilizarse en el desarrollo de formulaciones de acción prolongada de varios fármacos peptídicos que mantienen la actividad *in vivo* a un nivel relativamente alto y tienen una semivida en sangre notablemente aumentada.

### Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es una ilustración esquemática de la pegilación conocida y de una pegilación mejorada a la que se aplica la precipitación selectiva;

La fig. 2 es un perfil de purificación de isómeros posicionales obtenido purificando un producto de pegilación utilizando una columna SOURCE S, en la que el producto de pegilación se preparó pegilando imidazo-acetil-exendina-4 a una concentración de 15 mg/ml durante 3 horas;

La fig. 3 es un perfil de purificación de isómeros posicionales obtenidos purificando un producto de pegilación usando una columna SP-HP, en la que el producto de pegilación se preparó pegilando análogo de insulina a una concentración de 5 mg/ml durante 2 horas;

La fig. 4 muestra un resultado del análisis SDS-PAGE de mezclas que contienen soluciones acuosas y precipitados obtenidos por tratamiento de un producto de pegilación con isopropanol, 1-propanol, 1-butanol, acetona y acetonitrilo para precipitación selectiva, en el que el producto de pegilación se preparó por pegilación de imidazo-acetil-exendin-4 a una concentración de 15 mg/ml durante 3 horas;

La fig. 5 muestra un resultado del análisis SDS-PAGE de mezclas que contienen soluciones acuosas y precipitados obtenidos por tratamiento de un producto de pegilación con isopropanol, etanol, 1-propanol, acetona y acetonitrilo para precipitación selectiva, en el que el producto de pegilación se preparó por pegilación de análogo de insulina a una concentración de 5 mg/ml durante 2 horas;

La fig. 6 es un perfil de purificación de isómeros posicionales obtenidos purificando una solución acuosa utilizando una columna SOURCE S (LRC, 15 X 161 mm, 28 ml, PALL), en la que la solución acuosa se obtuvo eliminando un precipitado tras el tratamiento de un producto de pegilación con isopropanol, y el producto de pegilación se obtuvo pegilando imidazo-acetil-exendin-4 a una concentración de 15 mg/ml durante 3 horas;

La fig. 7 es un perfil de purificación de isómeros posicionales obtenido purificando un producto de pegilación precipitado utilizando una columna SOURCE S, en la que el precipitado se preparó tratando un producto de pegilación con isopropanol, y el producto de pegilación se obtuvo pegilando imidazo-acetil-exendina-4 a una concentración de 15 mg/ml durante 3 horas;

La fig. 8 es un perfil de purificación de isómeros posicionales obtenido purificando un producto de pegilación y un producto de pegilación de un precipitado utilizando una columna SOURCE S, en la que el precipitado se preparó por precipitación selectiva;

La fig. 9 es un perfil de purificación de isómeros posicionales obtenido con una columna SP-HP (Hitrap, 5 ml x 4 cada una, 20 ml, GE Healthcare) a partir de una solución acuosa obtenida eliminando un precipitado tras el tratamiento de un producto de pegilación con isopropanol, en el que el producto de pegilación se obtuvo pegilando un análogo de insulina a una concentración de 5 mg/ml durante 2 horas;

La fig. 10 es un perfil de purificación de isómeros posicionales obtenidos purificando un producto de pegilación precipitado usando una columna SP-HP, en la que el precipitado se preparó tratando un producto de pegilación con isopropanol, y el producto de pegilación se obtuvo pegilando el análogo de insulina a una concentración de 5 mg/ml durante 2 horas;

La fig. 11 es un gráfico que muestra un rendimiento mejorado de un método de pegilación aplicado por precipitación selectiva, que se representó como porcentaje del método de pegilación conocido;

La fig. 12 es un resultado del análisis de pureza de un conjugado imidazo-acetil-exendin-4-PEG (CA-exendin-4-PEG) del Ejemplo 1 utilizando una columna de fase inversa;

5 La fig. 13 es un resultado del análisis de pureza de un conjugado de imidazo-acetil-exendina-4-PEG del Ejemplo 7 utilizando una columna de fase inversa;

La fig. 14 es un perfil de análisis de los isómeros posicionales Lys27-pegilados de imidazo-acetil-exendin-4 del Ejemplo 1 mediante mapeo peptídico;

10 La fig. 15 es un perfil de análisis de los isómeros posicionales Lys27-pegilados de imidazo-acetil-exendin-4 del Ejemplo 7 mediante mapeo peptídico;

15 La fig. 16 es un resultado del análisis de pureza del conjugado imidazo-acetil-exendina-4-PEG-inmunoglobulina Fc del Ejemplo 1 utilizando una columna de fase inversa;

La fig. 17 es un resultado del análisis de pureza del conjugado imidazo-acetil-exendina-4-PEG-inmunoglobulina Fc del Ejemplo 7 utilizando una columna de fase inversa;

20 La fig. 18 es un gráfico que muestra una comparación del rendimiento entre un conjugado imidazo-acetil-exendin-4-PEG-inmunoglobulina Fc (inmunoglobulina Fc-CA-exendin-4-PEG(Lys27)) preparado mediante un método de pegilación aplicado por precipitación selectiva y un conjugado preparado mediante el método de pegilación conocido;

25 La fig. 19 muestra un resultado del mapeo peptídico para examinar el estado antes de la aplicación de la precipitación selectiva (tratamiento con isopropanol);

La fig. 20 muestra un resultado de la cartografía peptídica para examinar el estado tras la aplicación de la precipitación selectiva (tratamiento con isopropanol);

30 La fig. 21 muestra los cambios en una secuencia estructural primaria de la imidazo-acetil-exendina-4 antes y después de la aplicación de la precipitación selectiva (tratamiento con isopropanol) (IPA: isopropanol);

La fig. 22 muestra cambios en una estructura secundaria de la imidazo-acetil-exendina-4 antes y después de la aplicación de la precipitación selectiva (tratamiento con isopropanol) (IPA: isopropanol); y

35 La fig. 23 muestra un resultado de la medición de la actividad *in vivo* de la imidazo-acetil-exendina-4 antes y después de la aplicación de la precipitación selectiva (tratamiento con isopropanol) (IPA: isopropanol) mediante un experimento con AMPc.

#### 40 **Mejor modo**

La divulgación proporciona un método para preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo, el método incluye:

45 1) precipitar selectivamente de una mezcla de reacción un polipéptido fisiológicamente activo no conjugado con un polímero no peptídico, conjugando dicha reacción el polímero no peptídico con un residuo de aminoácido del polipéptido fisiológicamente activo; y 2) hacer reaccionar el polipéptido fisiológicamente activo recuperado del precipitado con el polímero no peptídico en la reacción de conjugación de la etapa 1).

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "conjugado de polipéptido fisiológicamente activo" se refiere a un material en el que un polipéptido fisiológicamente activo está unido covalentemente a un extremo de un polímero no peptídico. En la presente divulgación, conjugado de polipéptido fisiológicamente activo se utiliza indistintamente con conjugado de polímero no peptídico y polipéptido fisiológicamente activo.

55 La etapa 1) se caracteriza por la precipitación selectiva del polipéptido fisiológicamente activo al que no está unido el polímero no peptídico a partir de la (primera) mezcla de reacción de conjugación. Esta (primera) reacción de conjugación conjugua el polímero no peptídico con el polipéptido fisiológicamente activo, preferentemente de forma selectiva, y más preferentemente de forma sitio-específica.

60 En la presente divulgación, el "polipéptido fisiológicamente activo al que no está unido el polímero no peptídico" se utiliza indistintamente con "polipéptido fisiológicamente activo no reaccionado" o "polipéptido fisiológicamente activo no conjugado".

65 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sitio-específico" significa que el polímero no peptídico está unido específicamente a una posición de aminoácido deseada, en particular, a una amina de un residuo de lisina o al residuo N-terminal entre las posiciones de aminoácidos del polipéptido fisiológicamente activo. Cuando el polímero no

- peptidílico está unido específicamente a un sitio, la formulación de acción prolongada que se va a preparar, en la que se maximiza la actividad fisiológica, puede protegerse de la reducción de la actividad fisiológica atribuible a la presencia de otros conjugados menos deseables, por ejemplo, aquellos en los que el polímero no peptidílico está unido a un residuo de aminoácido importante para la actividad fisiológica. Por ejemplo, en el caso de la exendina-4, cuando el
- 5 polímero no peptídico está unido al extremo N-terminal del polipéptido fisiológicamente activo, se reduce la actividad *in vitro*. En cambio, cuando el polímero no peptidílico se une a un residuo de lisina del mismo, se mantiene la actividad *in vitro*. En particular, de los residuos de lisina en las posiciones 12 y 27 de exendin-4, el conjugado resultante muestra una mayor actividad *in vitro* cuando el polímero no peptidílico se une al residuo de lisina en la posición 27.
- 10 Por lo tanto, en algunos casos en los que el polipéptido fisiológicamente activo es un derivado de exendina, el polímero no peptidílico puede unirse específicamente a la lisina en la posición 12 o 27, en particular, a la lisina en la posición 27 del derivado de exendina. El método de pegilación de exendina se describe en detalle en Publicación de Patente Coreana N° 10-2010-0105494.
- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "precipitación selectiva" significa que el conjugado de polímero no peptídico y polipéptido fisiológicamente activo resultante de una reacción de conjugación de una mezcla del polímero no peptídico y el polipéptido fisiológicamente activo permanece en una solución acuosa, pero el polipéptido fisiológicamente activo que no ha reaccionado se precipita selectivamente.
- 20 Se dan a conocer, pero no forman parte de la invención, casos en los que la precipitación selectiva puede ser cualquier método sin limitación, siempre que sea capaz de precipitar el polipéptido fisiológicamente activo sin reaccionar en la mezcla de reacción. algunos ejemplos de métodos de precipitación de polipéptidos ampliamente conocidos son los siguientes:
- 25 1. Salazón,  
2. Precipitación isoiónica,  
3. Precipitación con cosolventes orgánicos de dos carbonos (C2),  
4. C4 y C5, precipitación con cosolventes orgánicos, partición de fases y extracción de polipéptidos,  
5. Exclusión de polipéptidos y agentes de aglomeración (polímeros neutros) y osmolitos,  
30 6. Precipitación de polielectrolitos sintéticos y semisintéticos,  
7. Precipitación de heteropolianiones metálicos y polifenólicos,  
8. Ligandos de emparejamiento de iones hidrófobos (HIP),  
9. Coprecipitación matriz-apilamiento-ligando,  
10. Precipitación de cationes metálicos di- y trivalentes.
- 35 En la presente invención, la precipitación selectiva se realiza usando un disolvente orgánico. El polipéptido fisiológicamente activo sin reaccionar puede precipitarse selectivamente añadiendo un disolvente orgánico a la mezcla de reacción, el disolvente orgánico puede ser, específicamente, alcohol, cetona, nitrilo o una combinación de los mismos, y más específicamente, etanol, isopropanol, 1-propanol, 1-butanol, acetona, acetonitrilo, o una combinación
- 40 de los mismos. Además, la mezcla de reacción puede tratarse con el disolvente orgánico en 2 volúmenes o más, específicamente, de 2 a 7 volúmenes, más específicamente, de 3 a 7, de 4 a 7, o de 5 a 7 volúmenes, y mucho más específicamente de 3 a 7 volúmenes de la de la mezcla de reacción para la precipitación selectiva del polipéptido fisiológicamente activo sin reaccionar, pero no se limita a ello.
- 45 En la presente divulgación, la mezcla de reacción utilizada para la precipitación selectiva puede incluir, basándose en el peso total de la mezcla de reacción, un 10 % en peso o más, específicamente un 20 % en peso o más de polipéptido fisiológicamente activo no reaccionado o no conjugado, pero no se limita a ello.
- 50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido fisiológicamente activo" se refiere a un material destinado a mostrar una actividad fisiológica en el cuerpo humano.
- Se dan a conocer, pero no forman parte de la invención, casos en los que el péptido fisiológicamente activo puede ser cualquier péptido capaz de mostrar una actividad fisiológica. Por ejemplo, el péptido fisiológicamente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en péptido secretor de insulina, factor de coagulación sanguínea, hormona promotora de la digestión, glucagón, insulina, oxintomodulina, hormona corticosuprarrenal, hormona tiroidea, hormona intestinal, citoquinas, enzimas, factor de crecimiento, neuropéptido, hormona hipofisaria, hormona del hipotálamo, péptido antiobesidad, péptido antiviral y un derivado peptídico no natural con actividad fisiológica.
- 55 También se divulgan, pero no forman parte de la invención, casos en los que el péptido fisiológicamente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos, amilina, somatostatina, péptido YY (PYY), neuropéptido Y (NPY), angiotensina, bradiquinina, calcitonina, corticotropina, eleudoisina, gastrina, leptina, oxitocina, vasopresina, hormona luteinizante, hormona luteotrófica, hormona foliculoestimulante, hormona paratiroidea, secretina, sermorelina, hormona del crecimiento humano (hGH), péptido liberador de la hormona del crecimiento, factores estimulantes de colonias de granulocitos (GCSF), interferones (IFN), interleucinas, péptido liberador de prolactina, orexina, péptido liberador de tiroides, colecistoquinina, péptido inhibidor de gastrina, calmodulina, péptido liberador de gastrina, motilina, péptido intestinal vasoactivo, péptido natriurético
- 60  
65

auricular (ANP), péptido natriurético barínico (BNP), péptido natriurético tipo C (CNP), neuroquinina A, neuromedina, renina, endotelina, péptido sarafotoxina, péptido carsomorfina, dermorfina, dinorfina, endorfina, encefalina, factor de células T, factor de necrosis tumoral, receptor del factor de necrosis tumoral, receptor de la uroquinasa, supresor tumoral, inhibidor de la colagenasa, timopoyetina, timulina, timopentina, timosina, factor humoral tímico, adrenomodulina, alatostatina, fragmento de proteína beta amiloide, péptido antibacteriano, péptido antioxidante, bombesina, osteocalcina, péptido CART, E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, leucokina, Kringle-5, laminina, inhibina, galanina, fibronectina, pancreastatina y fuzeon.

En estos casos que no forman parte de la invención, el polipéptido fisiológicamente activo también puede incluir precursores, derivados, fragmentos y variantes del polipéptido, que tienen la actividad fisiológica del polipéptido.

En la invención reivindicada, el polipéptido fisiológicamente activo puede ser insulina, un derivado de exendina o combinaciones de los mismos. El derivado de exendina puede seleccionarse específicamente del grupo que consiste en des-amino-histidil(DA)-exendina-4, beta-hidroxi-imidazo-propionil(HY)-exendina-4, imidazo-acetil(CA)-exendina-4, y dimetil-histidil(DM)-exendina-4.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polímero no peptídico" se refiere a un polímero biocompatible que incluye una o más unidades repetitivas unidas entre sí por un enlace covalente, excluyendo un enlace peptídico.

El polímero no peptídico que puede utilizarse en la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polivinil etil éter, y combinaciones de los mismos, y específicamente, polietilenglicol.

Se dan a conocer, pero no forman parte de la invención, realizaciones en las que el polímero no peptídico es polisacárido, dextrano, un polímero biodegradable, un polímero lipídico como PLA (poli(ácido láctico)) PVP (polivinilpirrolidona) y PLGA (ácido poliláctico glicólico), quitinas o ácido hialurónico. También se dan a conocer, pero no forman parte de la invención, realizaciones en las que puede utilizarse cualquier polímero no peptídico, siempre que sea un polímero que tenga una resistencia a las enzimas proteolíticas *in vivo*, y por tanto no sea fácilmente escindible por las enzimas proteolíticas para permitir que el polipéptido fisiológicamente activo muestre una actividad suficiente. El polímero no peptídico tiene un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 100 kDa, y específicamente, de 0,5 kDa a 20 kDa. Asimismo, el polímero no peptídico, unido al polipéptido fisiológicamente activo, puede ser un polímero o una combinación de diferentes tipos de polímeros.

En la presente invención, el polímero no peptídico tiene un peso molecular de 0,5 kDa a 20 kDa. Además, el polímero no peptídico utilizado puede tener un grupo reactivo en un extremo del mismo o en ambos extremos. El polímero de no-peptídico que tiene un grupo reactivo en ambos extremos del mismo puede unirse a un portador fisiológicamente activo y a un fármaco proteico que ayuda a funcionar como una formulación de acción prolongada.

Específicamente, el polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos que se selecciona del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida, más específicamente, el grupo aldehído, y mucho más específicamente, el grupo propionaldehído, pero no se limita a ello. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, hidroxisuccinimidilo, carboximetilo de succinimidilo o carbonato de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptídico tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos, es eficaz para unirse en ambos extremos con un polipéptido fisiológicamente activo y un portador fisiológicamente activo con reacciones inespecíficas mínimas. Un producto final generado por alquilación reductora mediante un enlace aldehído es mucho más estable que cuando se une mediante un enlace amida. El grupo reactivo aldehído se une selectivamente a un amino N-terminal a un pH bajo, por ejemplo, a un pH de 2,0 a 7,0, específicamente, a un pH de 3,0 a 6,0, y más específicamente, a un pH de 4,0 a 6,0. También el grupo reactivo aldehído puede unirse a un residuo de lisina para formar un enlace covalente a un pH alto, por ejemplo, a un pH de 6,5 a 9,0, específicamente, a un pH de 6,5 a 8,0, y más específicamente, a un pH de 6,5 a 7,5.

En la presente divulgación, los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes entre sí. Cuando se utiliza como polímero no peptídico un polietilenglicol que tiene un grupo hidroxilo reactivo en ambos extremos del mismo, el grupo hidroxilo puede activarse en varios grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o puede utilizarse un polietilenglicol disponible comercialmente que tenga un grupo reactivo modificado.

En un ejemplo específico, el polímero no peptídico es polietilenglicol con grupos terminales aldehído y la reacción de conjugación de la etapa 1) es una pegilación específica del sitio. Esta pegilación sitio-específica puede realizarse por métodos conocidos, por ejemplo, aminación reductora a un grupo amino tal como el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina o el N-terminal del polipéptido fisiológicamente activo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "conjugado de polipéptido fisiológicamente activo" se refiere a un material en el que un polipéptido fisiológicamente activo está unido covalentemente a un extremo de un polímero no peptídico. En la presente divulgación, conjugado de polipéptido fisiológicamente activo se utiliza indistintamente



con conjugado de polímero no peptídico y polipéptido fisiológicamente activo.

Además, en la reacción del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico, la relación molar de reacción no está limitada, siempre que el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico formen un enlace covalente, y la relación molar de reacción de polipéptido fisiológicamente activo: polímero no peptídico puede estar adecuadamente dentro del intervalo de 1:1 a 1:30.

Además, en la reacción del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico, no se limita un tiempo de reacción, siempre que el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico formen un enlace covalente, y el tiempo de reacción puede ser, específicamente, de 0,5 horas a 4,0 horas, y más específicamente, de 0,5 horas a 2,0 horas, pero no se limita a ello.

Además, en la reacción del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico, la temperatura de reacción no está limitada, siempre que el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico formen un enlace covalente, y la temperatura de reacción puede ser, específicamente, de 0°C a 14°C o de 15°C a 30°C, y más específicamente, de 4°C a 8°C o de 20°C a 25°C, pero no está limitada a ello.

Además, en la reacción del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico, una concentración del polipéptido fisiológicamente activo no está limitada, siempre que el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico formen un enlace covalente, y la concentración puede ser, específicamente, de 1 mg/ml a 25 mg/ml, y más específicamente, de 5 mg/ml a 18 mg/ml, pero no está limitada a ello.

En algunos casos, la divulgación proporciona el método para preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo en el que una exendina-4 modificada está unida a polietilenglicol (PEG). En algunos casos, esta exendina-4 modificada es imidazo-acetil-exendina-4 (CA-exendina-4) y puede pegarse en su posición Lys utilizando un polietilenglicol de 3,4 kDa con funcionalidad aldehído en ambos extremos (por *ejemplo*, 3,4K ALD(2) PEG) a una relación molar del péptido y PEG de aproximadamente 1:7,5 y una concentración de péptido de aproximadamente 5 mg/ml a 18 mg/ml durante 0,5 horas a 4,0 horas a 4°C a 8°C y 20°C a 25°C en una solución tampón HEPES 100 mM a un pH de 6,5 a 7,5 que contiene 20 mM de cianoborohidruro sódico (SCB, NaCNBH<sub>3</sub>) como agente reductor. Específicamente, 15 mg/ml del péptido pueden reaccionar durante 3 horas a 4°C a 8°C, y después el imidazo-acetil exendin-4-PEG puede separarse de cada mezcla de reacción usando una columna SOURCE 15S con un gradiente de concentración lineal de KCl en una solución tampón de ácido cítrico a pH 2,0. Por ejemplo, los autores pudieron confirmar que dicha mezcla de reacción incluye aproximadamente del 10 % al 40 % de (PEG)<sub>n</sub>-imidazo-acetil exendin-4 + imidazo-acetil exendin-4-PEG(Lys12), del 40 % al 50 % de imidazo-acetil exendin-4-PEG, y aproximadamente del 20 % al 50 % de imidazo-acetil exendin-4 sin reaccionar (Tablas 1 y 2).

Se divulga, pero no forma parte de la invención, un método para preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo en el que un análogo de insulina está unido a polietilenglicol (PEG). 4K ALD(2) PEG en una proporción molar del péptido y PEG de aproximadamente 1:4 y una concentración de péptido de aproximadamente 5 mg/ml a 18 mg/ml durante 0,5 horas a 4,0 horas a 4°C a 8°C y 20°C a 25°C en una solución tampón de citrato de sodio 50 mM a un pH de 4,0 a 6,0 que contiene 3~5 mM SCB (NaCNBH<sub>3</sub>) como agente reductor. Específicamente, 5 mg/ml del péptido pueden ser reaccionados durante 2 horas a 4°C a 8°C, y después el análogo de insulina puede ser separado de cada mezcla de reacción usando una columna SP-HP con un gradiente de concentración lineal de KCl en una solución tampón de ácido cítrico a pH 3,0. Por ejemplo, los autores pudieron confirmar que dicha mezcla de reacción incluye aproximadamente 10 % a 20 % de (PEG)<sub>n</sub>-análogo de insulina, 50 % a 60 % de análogo de insulina-PEG, y aproximadamente 5 % a 20 % de análogo de insulina sin reaccionar.

En algunos casos, la mezcla de reacción para el conjugado pegilado de CA-exendin-4 o el análogo de insulina anterior se hace reaccionar con 2 o más volúmenes de isopropanol, específicamente, de 3 a 7 volúmenes (a la de la mezcla de reacción). Esta mezcla de reacción tratada con isopropanol se separa entonces en una solución acuosa que comprende el conjugado pegilado (de imidazo-acetil-exendin-4 o del análogo de insulina) y un precipitado del polipéptido fisiológicamente activo no conjugado, es *decir*, no-pegilado, imidazo-acetil-exendin-4 sin reaccionar o análogo de la insulina sin reaccionar (FIG. 4 y 5). Por ejemplo, la solución acuosa se purificó (FIG. 6 y 9), y como resultado, los autores pudieron confirmar que la solución acuosa incluye entre un 10 % y un 40 % de (PEG)<sub>n</sub>-imidazo-acetil-exendin-4 + imidazo-acetil-exendin-4-PEG(Lys12), entre un 40 % y un 50 % de imidazo-acetil-exendin-4-PEG, y entre un 5 % y un 15 % de imidazo-acetil-exendin-4 sin reaccionar. En el caso del análogo de insulina, la solución acuosa incluye entre un 10 % y un 20 % de (PEG)<sub>n</sub>-análogo de insulina, entre un 50 % y un 60 % de análogo de insulina-PEG, y entre un 5 % y un 15 % de análogo de insulina sin reaccionar.

El contenido del precipitado de imidazo-acetil-exendina-4 separado es del 15 % al 30 % (Tabla 3).

En algunos casos se observaron cambios en el imidazo-acetil exendin-4 antes y después del tratamiento con isopropanol. Como resultado, no hubo cambios en todos los aspectos antes y después del tratamiento con isopropanol (FIGS. 19 y 20), y no hubo cambios en la estructura primaria (FIG. 21), el contenido de una estructura secundaria (FIG. 22 y Tabla 7), y la actividad (FIG. 23 y Tabla 8).

Estos resultados indican que la precipitación selectiva mediante tratamiento con isopropanol no causa ningún efecto adverso en el polipéptido fisiológicamente activo imidazo-acetil exendin-4.

En la presente divulgación, imidazo-acetil-exendin-4-PEG se utiliza indistintamente con imidazo-acetil-exendin-4-PEG(Lys27), imidazo-acetil-exendin-4(Lys27)-PEG, CA-exendin-4-PEG y CA-exendin-4-PEG(Lys27).

La etapa 2) se caracteriza porque una segunda mezcla de reacción conjuga el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico para preparar un conjugado polímero no peptídico-fipéptido fisiológicamente activo utilizando el polipéptido fisiológicamente activo recuperado del precipitado en la etapa 1). Específicamente, el polipéptido fisiológicamente activo precipitado puede disolverse y, a continuación, conjugarse con el polímero no peptídico preferentemente de forma selectiva, más preferentemente de forma sitio-específica, pero sin limitarse a ello. Las soluciones acuosas preparadas aplicando la precipitación selectiva a la mezcla de reacción secundaria y a la primera mezcla de reacción incluyen el conjugado preparado de polímero de no peptídico y polipéptido fisiológicamente activo.

En la presente divulgación, las condiciones de reacción del polipéptido fisiológicamente activo precipitado y el polímero no peptídico no están limitadas, siempre que puedan formar una forma covalente, y específicamente, la reacción puede realizarse en las condiciones de reacción de la etapa 1).

En particular, el tiempo de reacción del polipéptido fisiológicamente activo precipitado y el polímero no peptídico puede ser específicamente, de 0,5 horas a 4,0 horas, y más específicamente, de 0,5 horas a 2,0 horas, pero no está limitado a ello.

En algunos casos, alrededor del 20 % al 30 % de un precipitado de imidazo-acetil-exendin-4 separado mediante precipitación selectiva por tratamiento con isopropanol en el Ejemplo 3 se recicló para realizar la pegilación. Como resultado, cuando se purificó una solución de repegilación del precipitado de imidazo-acetil-exendin-4 no pegilado, se incluyeron en la solución de reacción entre un 15 % y un 40 % de (PEG)<sub>n</sub>-imidazo-acetil-exendin-4 + imidazo-acetil-exendin-4-PEG(Lys12), entre un 40 % y un 50 % de imidazo-acetil-exendin-4-PEG, y entre un 10 % y un 40 % de imidazo-acetil-exendin-4 sin reaccionar (FIG. 7).

El método de preparación aquí divulgado puede incluir además la separación del conjugado polipeptídico fisiológicamente activo después de la etapa 2). Este procedimiento puede realizarse utilizando diversos métodos de separación tales como la cromatografía conocida en la técnica. Específicamente, puede usarse cromatografía de intercambio iónico, y más específicamente, cromatografía de intercambio iónico de alta presión, pero no se limita a ello.

En la presente divulgación, el conjugado polipeptídico fisiológicamente activo puede separarse de la primera mezcla de reacción, de la solución acuosa preparada aplicando precipitación selectiva a la primera mezcla de reacción, de la segunda mezcla de reacción, o de combinaciones de las mismas.

En particular, cuando el conjugado polipeptídico fisiológicamente activo se separa de una mezcla de la solución acuosa preparada aplicando precipitación selectiva a la primera mezcla de reacción y la mezcla de reacción secundaria preparada utilizando el polipéptido fisiológicamente activo precipitado, se incrementa notablemente un rendimiento del conjugado polipeptídico fisiológicamente activo en comparación con la separación de la primera mezcla de reacción.

En algunos casos, la solución acuosa preparada aplicando precipitación selectiva a la primera mezcla de reacción se mezcló con la segunda mezcla de reacción preparada redisolviendo el precipitado que contenía imidazo-acetil exendin-4 o análogo de insulina sin reaccionar para realizar la pegilación, y después se realizó la separación usando una columna SOURCE 15S o una columna SP-HP con un gradiente de concentración lineal de KCl en tampón de ácido cítrico a pH 2,0 - pH 3,0. El resultado fue que el rendimiento del conjugado preparado por el método de pegilación aplicado por precipitación selectiva fue mucho mayor que el del método de pegilación conocido (FIG. 11 y Tabla 4). Como resultado, el rendimiento del conjugado preparado por el método de pegilación aplicado por precipitación selectiva fue mucho mayor que el del método de pegilación conocido (FIG. 11 y Tabla 4).

En algunos casos, el imidazo-acetil exendin-4 tenía una pureza del 97 % tanto por el método de pegilación conocido como por el método de pegilación al que se aplica precipitación selectiva usando isopropanol, y los isómeros posicionales pegilados tenían una pureza similar (Tabla 5).

La presente divulgación también proporciona un método de preparación de un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo y portador fisiológicamente activo, el método incluye preparar un conjugado en el que ambos extremos del polímero no peptídico se conjugan respectivamente con el portador fisiológicamente activo y el polipéptido fisiológicamente activo conectando el polímero no peptídico y el portador fisiológicamente activo mediante un enlace covalente en los conjugados de polipéptido fisiológicamente activo preparados por el método de preparación anterior del conjugado de polipéptido fisiológicamente activo.

En algunos casos, el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo preparado mediante una pegilación específica de sitio en dos etapas por precipitación selectiva produce un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo y

portador fisiológicamente activo (conjugado de polipéptido y portador) de alto rendimiento y pureza. Tales conjugados fisiológicamente activos de polipéptido-portador fisiológicamente activo muestran actividades completamente diferentes en comparación con los conjugados fisiológicamente activos de polipéptido de los que derivan, es decir, las actividades fisiológicas sobresalientes como la excelente duración prolongada de los efectos farmacológicos del polipéptido fisiológicamente activo, la focalización en un sitio específico como una lesión a tratar, o la inducción de necrosis.

En la presente divulgación, el polímero no peptídico en el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo y portador fisiológicamente activo debería ser un polímero no peptídico con dos extremos para unirse al polipéptido fisiológicamente activo y al portador fisiológicamente activo. Es decir, el portador fisiológicamente activo puede estar unido covalentemente al extremo del polímero no peptídico al que no se une el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo. Como resultado, se prepara un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo y portador fisiológicamente activo en el que ambos extremos del polímero no peptídico están unidos respectivamente al polipéptido fisiológicamente activo y al portador fisiológicamente activo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "portador fisiológicamente activo" se refiere a una sustancia fisiológicamente activa que muestra actividades adicionales distintas a la actividad fisiológica del polipéptido fisiológicamente activo, que puede mantener las actividades fisiológicas del polipéptido fisiológicamente activo, como los efectos farmacológicos, o inducir la focalización en un sitio específico o la necrosis mediante la unión al polipéptido no peptídico junto con el polipéptido fisiológicamente activo.

El portador fisiológicamente activo utilizado puede incluir una sustancia que tenga las actividades antes mencionadas sin ninguna limitación, por ejemplo, albúmina, región Fc de inmunoglobulina, transferrina, aptámero, toxina, gelatina, colágeno, dextrano, polisacáridos, ácidos grasos, fibrinógeno o similares. Específicamente, el portador fisiológicamente activo puede ser una albúmina, una región Fc de inmunoglobulina, o una transferrina, y más específicamente, una región Fc de inmunoglobulina, pero no está limitado a ello.

La región Fc de la inmunoglobulina se refiere a la región constante de la cadena pesada 2 (CH2) y la región constante de la cadena pesada 3 (CH3) de una inmunoglobulina, excluyendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y la región constante de la cadena ligera 1 (CL1). Puede incluir además una región bisagra en la región constante de la cadena pesada. Asimismo, la región Fc de la inmunoglobulina puede ser una forma extendida que contenga una parte o la totalidad de la región Fc, incluida la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de la cadena ligera 1 (CL1), excepto las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, siempre que tenga una función fisiológica sustancialmente similar o mejor que la inmunoglobulina Fc nativa, y puede incluir regiones Fc de inmunoglobulina modificadas por fosforilación, sulfatación, acrilación, glucosilación, metilación, famesilación, acetilación, amidación o similares. La gama de inmunoglobulina Fc, el método de preparación de la misma y el método de unión covalente de la inmunoglobulina Fc al conjugado de polímero no peptídico y polipéptido fisiológicamente activo se describen en detalle en Patente coreana nº 10-775343, 10-725314, 10-725315 y 10-824505.

En algunos casos, cuando el polímero no peptídico está unido específicamente a un aminoácido específico del polipéptido fisiológicamente activo en el conjugado polipeptídico, se minimiza la generación de conjugados adicionales distintos del conjugado polipeptídico fisiológicamente activo. Esto es beneficioso para la actividad fisiológica y para aumentar el rendimiento del conjugado polipeptídico fisiológicamente activo con valor farmacológico.

En algunos casos, cada uno de los conjugados imidazo-acetil-exendina-4(Lys27)-PEG preparados por el método de pegilación conocido y el método de pegilación que incluye precipitación selectiva usando isopropanol se unió a un fragmento Fc de inmunoglobulina humana, y se analizaron la pureza y el rendimiento de la imidazo-acetil-exendina-4-inmunoglobulina Fc. Como resultado, ambos conjugados tenían la misma pureza del 27,6 % (Tabla 5), pero el conjugado imidazo-acetil-exendina-4-inmunoglobulina Fc preparado por el método de pegilación incluye precipitación selectiva mostró un mayor rendimiento que el del conjugado preparado por el método conocido.

En la presente divulgación, imidazo-acetil-exendina-4-inmunoglobulina FC se utiliza indistintamente con CA-exendina-4-PEG-inmunoglobulina Fc o inmunoglobulina FC-CA-exendina-4-PEG(Lys27).

## Modo

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle haciendo referencia a los siguientes Ejemplos.

Sin embargo, estos Ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos, y no se pretende que la invención esté limitada por estos Ejemplos.

### Ejemplo 1. Pegilación de imidazo-acetil exendin-4 y separación de isómeros posicionales

Se utilizó 3,4K ALD(2) PEG (un PEG de 3,4 kDa con dos grupos aldehído, NOF, Japón) para realizar la pegilación en Lys de la imidazo-acetil-exendina-4 (CA-exendina-4, Bachem, EE.UU.).

Para pegar la posición Lys de la imidazo-acetil-exendina-4 usando ALD(2) PEG 3,4K, el péptido y el PEG se hicieron reaccionar en una proporción molar de aproximadamente 1:3 a 1:30 con una concentración de péptido de aproximadamente 5 mg/ml a 18 mg/ml durante 0,5 horas a 4,0 horas a 4°C a 8°C y 20°C a 25°C. La reacción se permitió en una solución tampón HEPES 100 mM a un pH de 6,5 a 7,5 con adición de un agente reductor, 20 a 30 mM SCB (NaCNBH<sub>3</sub>). A este respecto, se permitió que la reacción procediera en una solución tampón HEPES 100 mM a un pH de 6,5 a 7,5 con adición de un agente reductor, 20 a 30 mM SCB (NaCNBH<sub>3</sub>). Las condiciones específicas de reacción y el resultado de la separación por el método siguiente se muestran en las Tablas 1 y 2 siguientes. En detalle, se hicieron reaccionar a una concentración de péptido de aproximadamente 15 mg/ml durante 3 horas a 4°C a 8°C, y en la FIG. 2 se muestra un resultado de la separación por el método siguiente.

La imidazo-acetil exendina-4-PEG se separó de las impurezas relacionadas con el proceso, como la forma multiPEGilada y la forma sin reaccionar (denotada (PEG)<sub>n</sub>-imidazo-acetil exendina-4 en la tabla siguiente) en cada solución de reacción utilizando una columna SOURCE 15S con un gradiente de concentración lineal de KCl en una solución tampón de ácido cítrico a pH 2,0 - 4,0.

[Tabla 1]

| Condiciones de reacción según el pH y la concentración de proteínas |                       |                            | Fracción eluida de la columna SOURCE S (%)                                          |                                       |                                          |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| pH                                                                  | Concentración (mg/ml) | Tiempo de reacción (horas) | (PEG) <sub>n</sub> -imidazo-ac etil exendin-4 + imidazo-acetil exendin-4-PEG(Lys12) | Imidazo-ace tyl exendin-4-PEG (Lys27) | Imidazo-acet yl exendin-4 sin reaccionar |
| 6,5                                                                 | 5                     | 4                          | 15                                                                                  | 37                                    | 50                                       |
|                                                                     | 12                    | 4                          | 17                                                                                  | 43                                    | 27                                       |
| 7,5                                                                 | 5                     | 4                          | 12                                                                                  | 41                                    | 44                                       |
|                                                                     | 12                    | 4                          | 30                                                                                  | 44                                    | 26                                       |
|                                                                     | 15                    | 3                          | 25                                                                                  | 45                                    | 30                                       |
|                                                                     | 18                    | 4                          | 43                                                                                  | 40                                    | 17                                       |

[Tabla 2]

| Condiciones de reacción en función de la concentración de proteínas (pH 7,5, 20°C a 25°C, 20 mM SCB) |    |                            | Fracción eluida de la columna SOURCE S (%)                                          |                                       |                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| Concentración de proteínas (mg/ml)                                                                   | de | Tiempo de reacción (horas) | (PEG) <sub>n</sub> -imidazo -acetil exendin-4 + imidazo-acetil exendin-4-PEG(Lys12) | Imidazo-acetil exendin-4-PEG (Lys 27) | Imidazo-acetil exendin-4 sin reaccionar |
| 10                                                                                                   |    | 0,5                        | 27                                                                                  | 43                                    | 30                                      |
|                                                                                                      |    | 1                          | 38                                                                                  | 45                                    | 17                                      |
|                                                                                                      |    | 1,5                        | 43                                                                                  | 47                                    | 10                                      |
| 15                                                                                                   |    | 0,5                        | 15                                                                                  | 43                                    | 42                                      |
|                                                                                                      |    | 1                          | 21                                                                                  | 45                                    | 34                                      |
|                                                                                                      |    | 1,5                        | 30                                                                                  | 47                                    | 23                                      |
| 20                                                                                                   |    | 0,5                        | 30                                                                                  | 40                                    | 30                                      |
|                                                                                                      |    | 1                          | 29                                                                                  | 39                                    | 32                                      |

Como resultado, los picos de (PEG)<sub>n</sub> -imidazo-acetil exendin-4 e imidazo-acetil exendin-4-PEG(Lys12) se eluyeron antes, y después se eluyó un pico de Lys27-pegilado, y en la última porción se eluyó un pico de imidazo-acetil-exendin-4 sin reaccionar (FIG. 2). Además, el contenido de (PEG)<sub>n</sub> -imidazo-acetil-exendin-4 + imidazo-acetil-exendin-4-PEG(Lys12) era aproximadamente del 10 % al 40 %, el contenido de imidazo-acetil-exendin-4-PEG era aproximadamente del 40 % al 50 %, y el contenido de imidazo-acetil-exendin-4 sin reaccionar era aproximadamente del 10 % al 50 %.

## Ejemplo 2. Pegilación de un análogo de la insulina y separación de isómeros posicionales

Se utilizó PEG 3.4K ALD(2) para realizar la pegilación en el N-terminal de la cadena β de un análogo de insulina (WO2014-133324, Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd, Korea ).

Para pegar la posición N-terminal del análogo de insulina utilizando 3,4K ALD(2) PEG, el péptido y el PEG se hicieron reaccionar en una relación molar de aproximadamente 1:4 con una concentración de péptido de aproximadamente 5 mg/ml a 18 mg/ml durante 0,5 horas a 4,0 horas a 4°C a 8°C y 20°C a 25°C. A este respecto, se dejó que la reacción procediera en una solución tampón de citrato sódico 50 mM a un pH de 4,0 a 6,0 con adición de un agente reductor, 3~5 mM SCB (NaCNBH<sub>3</sub>). En detalle, se hicieron reaccionar a una concentración de péptido de aproximadamente 5 mg/ml durante 2 horas a 4°C a 8°C, y en la FIG. 3 se muestra el resultado de la separación por el método siguiente.

El análogo de insulina-PEG se separó de cada solución de reacción usando una columna SP-HP con un gradiente de concentración lineal de KCl en una solución tampón de ácido cítrico a pH 2.0-4.0

Como resultado, los picos para el (PEG)<sub>n</sub>-análogo de insulina se eluyeron antes, y después se eluyó un pico N-terminal-pegilado, y un pico para el análogo de insulina sin reaccionar se eluyó en la última porción (FIG. 3). Además, el contenido de (PEG)<sub>n</sub>-análogo de insulina fue de aproximadamente 10 % a 20 %, el contenido de análogo de insulina-PEG fue de aproximadamente 50 % a 60 %, y el contenido de análogo de insulina sin reaccionar fue de aproximadamente 5 % a 20 %.

### 10 Ejemplo 3. Pegilación de imidazo-acetil-exendina-4 y separación de imidazo-acetil-exendina-4 no pegilada mediante precipitación selectiva con disolvente orgánico.

Se utilizó 3,4K ALD(2) PEG para realizar la pegilación en la posición Lys de la imidazo-acetil-exendina-4 (CA-exendina-4, Bachem, EE.UU.).

Las condiciones de reacción son las mismas que en el Ejemplo 1. La solución de pegilación se trató con isopropanol, 1-propanol, 1-butanol, acetona, acetonitrilo en 2 volúmenes o más, específicamente, con 3 a 7 volúmenes de la de la solución de reacción. De la solución de reacción tratada con disolvente orgánico, se separaron una solución acuosa de imidazo-acetil-exendin-4 pegilado y un precipitado de imidazo-acetil-exendin-4 sin pegilar ni reaccionar (FIG. 4). De éstas, la solución acuosa se purificó de la misma manera que en el Ejemplo 1 (FIG. 6), y el contenido de cada fracción purificada se muestra en la siguiente Tabla 3.

[Tabla 3]

| Cantidad de tratamiento de isopropanol (veces el volumen de la solución de pegilación) | Fracción eluida de la columna SOURCE S (%)                                         |                                 |                                            | Tasa de recuperación del precipitado de imidazo-acetil-exendin-4 sin reaccionar tras el tratamiento con IPA (%) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                        | (PEG) <sub>n</sub> -imidazo-acetil-exendin-4 + imidazo-acetil-exendin-4-PEG(Lys12) | Imidazo-acetilo 1 exendin-4-PEG | Imidazo-acetilo sin reaccionar 1 exendin-4 |                                                                                                                 |
| ninguno                                                                                | 25                                                                                 | 45                              | 30                                         | n/a                                                                                                             |
| 4 X                                                                                    | 25                                                                                 | 45                              | 15                                         | 15                                                                                                              |
| 5 X                                                                                    | 25                                                                                 | 45                              | 10                                         | 19                                                                                                              |
| 6 X                                                                                    | 25                                                                                 | 45                              | 8                                          | 22                                                                                                              |

En la solución acuosa, el contenido de (PEG)<sub>n</sub>-imidazo-acetil-exendin-4 + imidazo-acetil-exendin-4-PEG(Lys12) era de aproximadamente 10 % a 40 %, el contenido de imidazo-acetil-exendin-4-PEG era de aproximadamente 40 % a 50 %, y el contenido de imidazo-acetil-exendin-4 sin reaccionar era de aproximadamente 5 % a 15 %. Además, el contenido del precipitado de imidazo-acetil-exendin-4 separado era del 15 % al 30 % (Tabla 3).

### 30 Ejemplo 4. Pegilación del análogo de insulina y separación del análogo de insulina no pegilado mediante precipitación selectiva con disolvente orgánico.

Se utilizó 3,4K ALD(2) PEG (PEG con dos grupos aldehído, NOF, Japón) para realizar la pegilación en el N-terminal de la cadena β del análogo de insulina (Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd, Corea).

Las condiciones de reacción son las mismas que en el Ejemplo 2. La solución de pegilación se trató con isopropanol, etanol, 1-propanol, acetona, acetonitrilo en 2 volúmenes o más, específicamente, con 3 a 7 volúmenes de la de la solución de reacción. De la solución de reacción tratada con disolvente orgánico, se separaron una solución de análogo de insulina pegilado y un precipitado de análogo de insulina no pegilado y sin reaccionar (FIG. 5). De éstos, la solución acuosa se purificó de la misma manera que en el Ejemplo 2 (FIG. 9).

### Ejemplo 5. Re-pegilación de precipitado selectivo de imidazo-acetil exendin-4 no-pegilado y separación de isómeros posicionales.

Se utilizó 3,4K ALD(2) PEG (PEG con dos grupos aldehído, NOF, Japón) para realizar la pegilación en la posición Lys de imidazo-acetil-exendin-4 (CA-exendin-4, Bachem USA) y se recicló y se sometió a pegilación alrededor del 20 % al 30 % de un precipitado de imidazo-acetil-exendin-4 que se separó realizando una precipitación selectiva utilizando isopropanol de la misma manera que en el Ejemplo 3. El precipitado de imidazo-acetil-exendin-4 se recicló y se sometió a pegilación.

Para pegilar Lys del precipitado de imidazo-acetil-exendina-4 utilizando 3,4K ALD(2) PEG, se hizo reaccionar un precipitado de imidazo-acetil-exendina-4 y PEG a una relación molar de 1:7,5 durante 0,5 horas a 2,0 horas a 20 °C a 25 °C a una concentración de solución de redisolución del precipitado de imidazo-acetil-exendina-4 de aproximadamente 15 mg/ml. A este respecto, se dejó que la reacción procediera en una solución tampón HEPES 100 mM a pH 7,5 con adición de un agente reductor, 20 mM SCB (NaCNBH<sub>3</sub>). La purificación se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1. Un resultado de la purificación de la solución de re-pegilación de un precipitado de

imidazo-acetil exendin-4 no-pegilado muestra que el contenido de (PEG)<sub>n</sub> - imidazo-acetil exendin-4 + imidazo-acetil exendin-4-PEG(Lys12) era de aproximadamente 15 % a 40 %, el contenido de imidazo-acetil exendin-4-PEG era de 40 % a 50 %, y el contenido de imidazo-acetil exendin-4 no reaccionado era de aproximadamente 10 % a 40 % (FIG. 7), que son similares a los resultados de la pegilación primaria (Tabla 2).

#### **Ejemplo 6. Repegilación de precipitado selectivo de análogo de insulina no pegilado y separación de isómeros posicionales.**

Se utilizó 3,4K ALD(2) PEG para realizar la pegilación en el N-terminal de la cadena β del análogo de insulina (Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd, Corea), y se reciclaron y se sometieron a pegilación aproximadamente del 0,5 % al 10 % de los precipitados que se separaron realizando precipitaciones selectivas utilizando isopropanol de la misma manera que en el Ejemplo 4.

Para pegilar el N-terminal del precipitado análogo de insulina utilizando 3,4K ALD(2) PEG, se hizo reaccionar un precipitado análogo de insulina y PEG en una proporción molar de 1:4 durante 0,5 horas a 4,0 horas a 4°C a 8°C a una concentración de solución de redisolución del precipitado análogo de insulina de aproximadamente 5~18 mg/ml. A este respecto, se dejó que la reacción procediera en una solución tampón de citrato sódico 50 mM a pH 4,0 a 6,0 con adición de un agente reductor, 3~5 mM SCB (NaCNBH<sub>3</sub>). La purificación se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2. Un resultado de la purificación de la solución de re-pegilación de un precipitado no-pegilado muestra que el contenido de (PEG)<sub>n</sub> -análogo de insulina era de aproximadamente 0 % a 15 %, el contenido de análogo de insulina-PEG era de 20 % a 40 %, y el contenido de análogo de insulina sin reaccionar era de aproximadamente 30 % a 45 % (FIG. 10).

#### **Ejemplo 7. Rendimiento tras separación de isómeros posicionales a partir de mezcla de solución acuosa de imidazo-acetil exendin-4 pegilado y precipitado repegilado.**

Se usó 3,4K ALD(2) PEG para realizar la pegilación en la posición Lys de imidazo-acetil-exendin-4 (CA-exendin-4, Bachem USA). La reacción se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1, y la solución de reacción se sometió a precipitación selectiva mediante tratamiento con isopropanol de la misma manera que en el Ejemplo 3. El precipitado resultante se volvió a pegilar. El precipitado resultante se repegiló del mismo modo que en el Ejemplo 5. La solución acuosa tratada con isopropanol y el precipitado repegilado se mezclaron y purificaron del mismo modo que en el Ejemplo 1 para separar los isómeros posicionales (FIG. 8).

Como resultado, el contenido de (PEG)<sub>n</sub> -imidazo-acetil-exendin-4 + imidazo-acetil-exendin-4(Lys 12) -PEG fue de aproximadamente 25 % a 30 %, el contenido de imidazo-acetil-exendin-4-PEG fue de aproximadamente 50 % a 60 %, y el contenido de imidazo-acetil-exendin-4 sin reaccionar fue de 10 % a 20 %.

Además, los resultados de comparar el rendimiento del conjugado imidazo-acetil-exendin-4-PEG preparado por el método de pegilación aplicado por precipitación selectiva con el del método de pegilación conocido se dan en la FIG. 11 y en la siguiente Tabla 4. Como resultado, el rendimiento del conjugado imidazo-acetil-exendin-4-PEG preparado por el método de pegilación aplicado por precipitación selectiva fue mucho mayor que el del método de pegilación conocido. Como resultado, el rendimiento del conjugado imidazo-acetil-exendina-4-PEG preparado por el método de pegilación aplicado por precipitación selectiva fue mucho mayor que el del método de pegilación conocido.

[Tabla 4]

| Condiciones de pegilación                       | Rendimiento de CA exendin-4-PEG (%) |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Pegilación conocida                             | 100                                 |
| Pegilación selectiva aplicada por precipitación | 132                                 |

#### **Ejemplo 8. Pureza tras la separación del isómero posicional pegilado imidazo-acetil exendin-4**

Para examinar la diferencia de pureza entre los conjugados de imidazo-acetil exendin-4 preparados por el método de pegilación conocido y el método de pegilación que incluye precipitación selectiva usando isopropanol, las soluciones eluidas de los Ejemplos 1 y 7 se usaron para realizar HPLC de fase inversa (RP) (FIGS. 12 y 13).

Como resultado, los conjugados de imidazo-acetil exendin-4 del Ejemplo 1 según el método conocido y del Ejemplo 7 según el método de pegilación por precipitación selectiva aplicada mostraron la misma pureza del 97 % (Tabla 5).

[Tabla 5]

| Condiciones         | Tabla 3)                                                  |                          |      |                                |
|---------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------|------|--------------------------------|
|                     | Pureza (%)                                                |                          |      | Solución de acoplamiento de RP |
|                     | CA exendin-4-PEG(Lys27) eluido de columna tras pegilación |                          |      |                                |
|                     | RP                                                        | Control de la pegilación |      |                                |
|                     |                                                           | K12                      | K27  |                                |
| Pegilación conocida | 97.0                                                      | 0.4                      | 97.6 | 27.6                           |

|                                                 |      |     |      |      |
|-------------------------------------------------|------|-----|------|------|
| Pegilación selectiva aplicada por precipitación | 97,0 | 0,1 | 97,4 | 27,6 |
|-------------------------------------------------|------|-----|------|------|

#### **Ejemplo 9. Mapeo del péptido Lys-C tras la separación del isómero posicional pegilado imidazo-acetil exendin-4**

- 5 Para examinar el sitio de conjugación del PEG en la imidazo-acetil-exendina-4, se digirió la imidazo-acetil-exendina-4 con una proteasa lisina-C, y se analizó por cromatografía de fase inversa. El experimento se realizó como sigue: Los conjugados de PEG purificados en los Ejemplos 1 y 7 y la imidazo-acetil-exendina-4 se disolvieron en una solución tampón trietilamina-HCl (10 mmol/l; pH 7,5) a una concentración de 1 mg/ml, y después se añadieron 10 µl de enzima (0,1 mg/ml) para permitir la reacción a 37 °C durante 4 horas. Una vez completada la reacción, las mezclas de reacción se analizaron por cromatografía de fase inversa (FIGS. 14 y 15).

Como resultado, las purezas de los isómeros posicionales pegilados según cada reacción se dan en la Tabla 5, y los conjugados de PEG purificados de los Ejemplos 1 y 7 tenían una pureza similar (Tabla 5), respectivamente.

#### **Ejemplo 10. Preparación del conjugado imidazo-acetil exendina-4-inmunoglobulina Fc.**

- Para preparar un conjugado imidazo-acetil-exendina-4-inmunoglobulina Fc, el conjugado imidazo-acetil-exendina-4-PEG obtenido en el Ejemplo 1 se conjugó con un fragmento de inmunoglobulina humana Fc adquirido a Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd., que se utilizó para preparar el conjugado imidazo-acetil-exendina-4-PEG. El conjugado imidazo-acetil-exendin-4(Lys27)-PEG y la inmunoglobulina Fc se hicieron reaccionar a una relación molar de 1:2,5 con una concentración total de proteína de aproximadamente 10 mg/ml a 4 °C a 8 °C durante 12 horas a 16 horas. La solución de reacción fue 100 mM HEPES a pH 8,2, y tratada con 3 % Triton X-100 y un agente reductor, 50 mM NaCNBH<sub>3</sub>. Tras la reacción de acoplamiento, el resultado del análisis por HPLC de fase inversa de la solución de reacción de acoplamiento (FIG. 16) muestra que la pureza de un conjugado imidazo-acetil exendina-4-inmunoglobulina Fc era del 27,6 % (Tabla 5).

#### **Ejemplo 11. Preparación del conjugado imidazo-acetil exendina-4-inmunoglobulina Fc mediante precipitación selectiva.**

- El conjugado imidazo-acetil exendina-4(Lys27)-PEG obtenido en el Ejemplo 7 se conjugó con un fragmento Fc de inmunoglobulina humana adquirido a Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd (Corea). El acoplamiento se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 10, y se analizó la pureza. El resultado del análisis por HPLC en fase inversa de la solución de reacción (FIG. 17) muestra que su pureza era del 27,6 % (Tabla 5). El efecto de la mejora del rendimiento del conjugado imidazo-acetil exendin-4-inmunoglobulina Fc del Ejemplo 7 se comparó con el rendimiento del Ejemplo 1, y el resultado se muestra en la FIG. 18 y en la Tabla 6 siguiente. Como resultado, el rendimiento del conjugado imidazo-acetil exendina-4-PEG preparado por el método de pegilación aplicado por precipitación selectiva fue superior al del método conocido. Por lo tanto, puede observarse que, cuando el conjugado imidazo-acetil exendina-4-PEG preparado mediante el método de pegilación por precipitación selectiva aplicada se utiliza para preparar el conjugado imidazo-acetil exendina-4-inmunoglobulina Fc, el rendimiento es superior al del método de pegilación conocido.

[Tabla 6]

| Condiciones de pegilación                       | Rendimiento del conjugado imidazo-acetil exendin-4-inmunoglobulina Fc (%) |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Pegilación conocida                             | 100                                                                       |
| Pegilación selectiva aplicada por precipitación | 128                                                                       |

#### **Ejemplo 12. Cartografía del péptido lisina-C para el análisis de la pureza de la imidazo-acetil exendina-4 según la aplicación de la precipitación selectiva (mediante el uso de isopropanol).**

- Para examinar los cambios en el estado de la imidazo-acetil exendina-4 antes y después del tratamiento con isopropanol, se realizó un mapeo del péptido lisina-C. La FIG. 19 muestra el resultado del mapeo de la imidazo-acetil exendina-4 antes del tratamiento con isopropanol. La fig. 19 muestra un resultado del mapeo de imidazo-acetil exendin-4 antes del tratamiento con isopropanol, y la fig. 20 muestra un resultado del mapeo de imidazo-acetil exendin-4 después de la aplicación de la precipitación selectiva (tratamiento con isopropanol). Como resultado, no hubo cambios antes y después del tratamiento. El análisis se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 9.

#### **Ejemplo 13. LC-Mass para análisis de pureza de imidazo-acetil exendin-4 según aplicación de precipitación (mediante uso de isopropanol).**

- Para examinar una secuencia proteica como estructura primaria de imidazo-acetil exendin-4 antes y después del tratamiento con isopropanol, se realizó LC-Mass. Como resultado, no hubo cambios en la estructura primaria antes y después de la aplicación de la precipitación selectiva (tratamiento con isopropanol) (FIG. 21).

**Ejemplo 14. Espectroscopia CD para el análisis de la estructura secundaria del imidazo-acetil exendin-4 según la aplicación de la precipitación (mediante el uso de isopropanol).**

Para examinar los cambios en una estructura secundaria de imidazo-acetil exendin-4 antes y después del tratamiento con isopropanol (IPA), se realizó espectroscopia CD. Como resultado, no hubo cambios en el contenido de la estructura secundaria antes y después de la aplicación de la precipitación selectiva (tratamiento con isopropanol) (FIG. 22 y Tabla 7).

[Tabla 7]

| Estructura secundaria | Contenido (%) (rango UV: 190 nm a 260 nm) |                                                 |
|-----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                       | CA-exendin 4 antes del tratamiento IPA    | CA-exendin 4 reciclado tras tratamiento con IPA |
| Hélice                | 33,1                                      | 33,5                                            |
| Antiparalelo          | 11,2                                      | 10,9                                            |
| En paralelo           | 7,8                                       | 7,7                                             |
| Beta-Turn             | 17,5                                      | 17,4                                            |
| Bobina aleatoria      | 27,6                                      | 27,1                                            |
| Total                 | 97                                        | 96,6                                            |

**Ejemplo 15. Medición de la actividad *in vitro* del imidazo-acetil exendin-4 antes y después de la aplicación de la precipitación selectiva.**

Para medir la eficacia de una formulación de acción prolongada de imidazo-acetil exendin-4 antes y después del tratamiento con isopropanol, se midió la actividad celular *in vitro*. Un método de medición de la actividad celular *in vitro* de GLP-1 consiste en medir un aumento del AMPc intracelular tratando células CHO clonadas con receptor de GLP-1 con GLP-1.

El método de medición de la actividad celular *in vitro* utilizado en este experimento se llevó a cabo tratando CHO/GLP-1 con exendin-4 y materiales de prueba variando las concentraciones de los mismos y después midiendo los niveles de AMPc para comparar los valores de EC<sub>50</sub>. Como grupo de control de imidazo-acetil exendin-4 después del tratamiento con isopropanol, se utilizó imidazo-acetil exendin-4 antes del tratamiento con isopropanol. En la fig. 23 y la tabla 8 se muestra el resultado de la medición de la actividad *in vitro*. Como resultado, no hubo diferencia en la actividad entre los conjugados de imidazo-acetil exendin-4 antes y después del tratamiento con isopropanol.

[Tabla 8]

| Muestra                                               | CE <sub>50</sub> (nM) | Actividad relativa (% frente al lote original) |
|-------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|
| CA-exendin 4 antes del tratamiento de 2-propanol      | 2,41 ± 0,19           | 100,0 (ns)                                     |
| CA-exendin 4 reciclado tras tratamiento de 2-propanol | 2,32 ± 0,26           | 103,8 (ns)                                     |
| ns, sin significación p>0,05 por prueba T             |                       |                                                |
| Rango histórico                                       |                       |                                                |
| 1) CA Exendin-4: de 1,85 nm a 2,33 nm                 |                       |                                                |



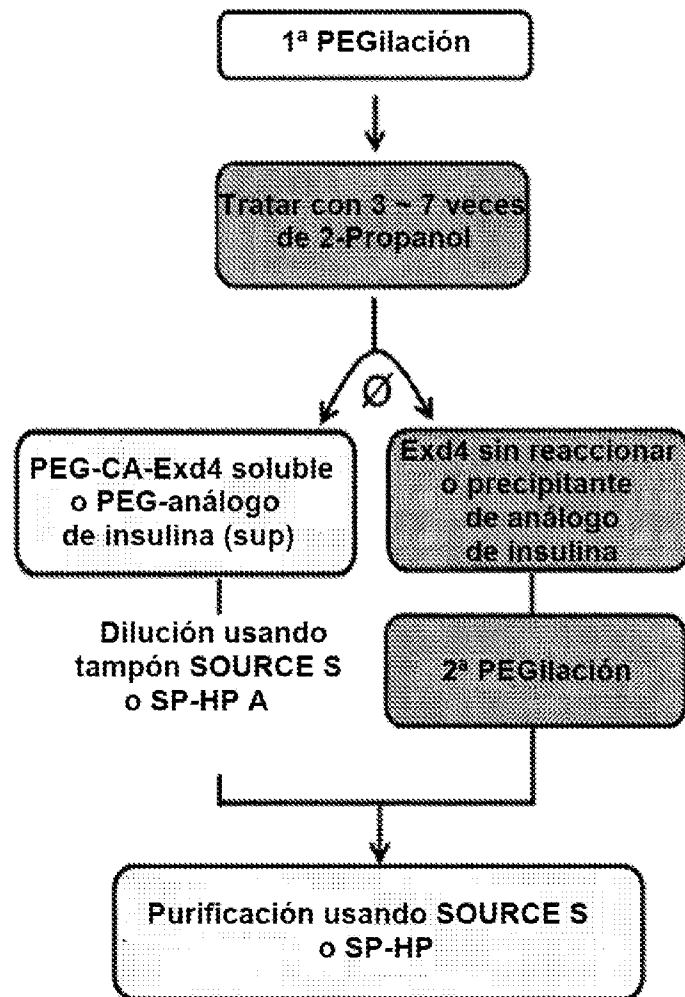
## REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo, que comprende:

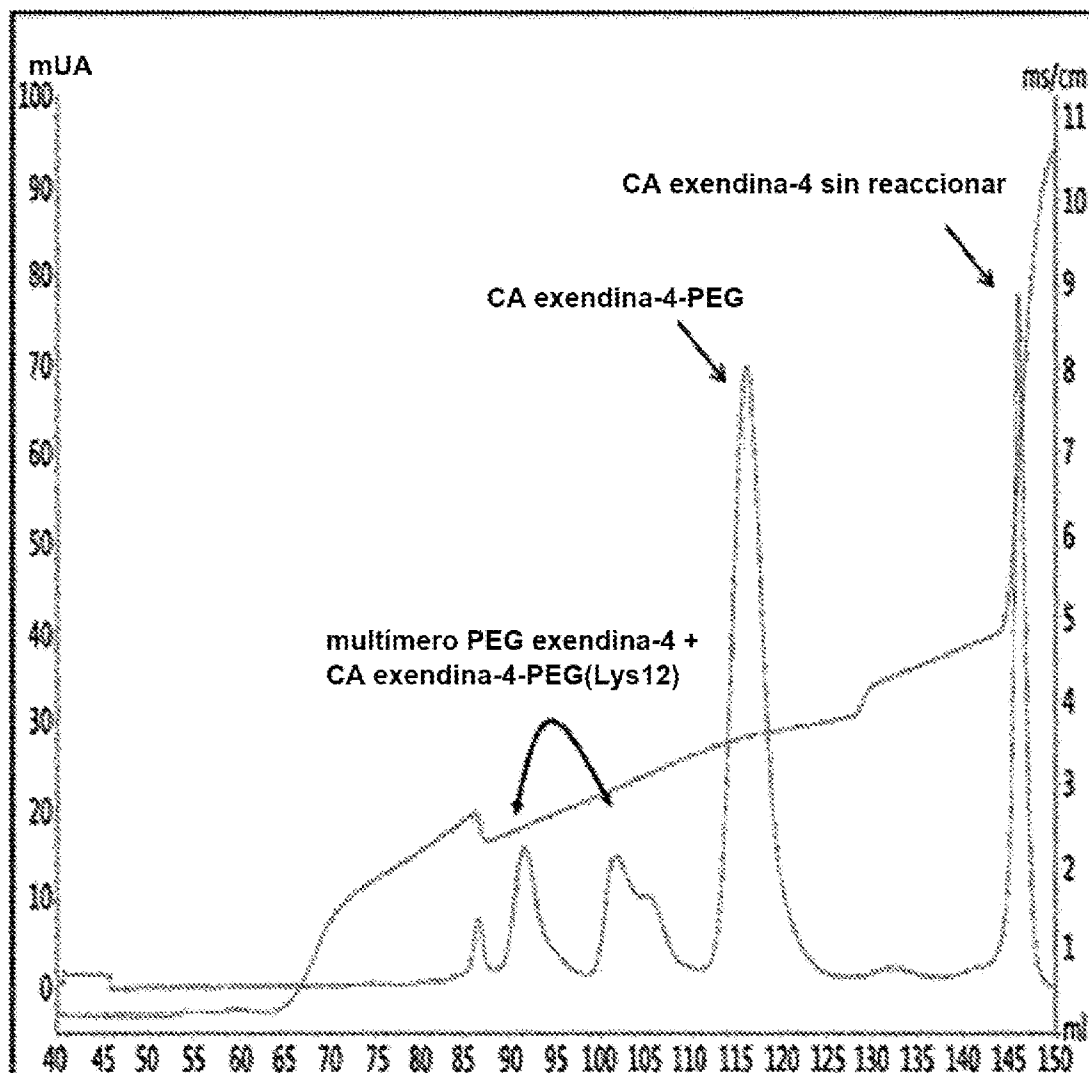
- 5           1) precipitar selectivamente a partir de una mezcla de reacción un polipéptido fisiológicamente activo no conjugado con un polímero no peptidílico usando un disolvente orgánico, conjugando dicha reacción el polímero no peptidílico con un residuo de aminoácido del polipéptido fisiológicamente activo; y
- 10           2) hacer reaccionar el polipéptido fisiológicamente activo recuperado del precipitado con el polímero no peptidílico en la reacción de conjugación de la etapa 1),  
 en el que el polímero no peptidílico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polivinil etil éter y una combinación de los mismos;  
 en el que el polímero no peptidílico tiene un peso molecular de 0,5 kDa a 20 kDa;  
 en el que el polipéptido fisiológicamente activo es un derivado de exendina, insulina o una combinación de los mismos, en el que el derivado de la exendina se selecciona del grupo que consiste en des-amino-histidil(DA)-exendina-4, beta-hidroxi-imidazo-propionil(HY)-exendina-4, imidazo-acetil(CA)-exendina-4 y dimetil-histidil(DM)-exendina-4; y  
 en el que el disolvente orgánico es isopropanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, acetona, acetonitrilo o una combinación de los mismos.
- 20           2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa 2) comprende disolver el polipéptido fisiológicamente activo precipitado y después conjugarlo con el polímero no peptidílico, o  
 en el que en la etapa 2), el polipéptido fisiológicamente activo recuperado se hace reaccionar con el polímero no peptidílico durante 0,5 horas a 4 horas.
- 25           3. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción en la etapa 1) comprende, basándose en el peso total de la mezcla de reacción, un 10 % en peso o más del polipéptido fisiológicamente activo no conjugado.
- 30           4. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción en la etapa 1) se trata con 2 a 7, preferentemente 3 a 7, volúmenes de isopropanol.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el polímero no peptidílico se conjuga con la Lys27 de un derivado de la exendina, o con el N-terminal de la insulina.
- 35           6. El método de la reivindicación 1, en el que el polímero no peptidílico es polietilenglicol.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el polímero no peptidílico comprende al menos un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado succinimida.
- 40           8. El método de la reivindicación 7, en el que el polímero no peptidílico tiene un grupo aldehído, preferentemente un grupo propionaldehído, como grupo reactivo.
9. El método de la reivindicación 1, que comprende además separar el conjugado polipeptídico fisiológicamente activo después de la etapa 2).
- 45           10. El método de la reivindicación 9, en el que la separación se realiza mediante cromatografía de intercambio iónico, preferentemente cromatografía de intercambio iónico de alta presión.
- 50           11. Un método para preparar un conjugado de un polipéptido fisiológicamente activo y un portador fisiológicamente activo, comprendiendo el método:  
             preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; y
- 55           conjugarlo mediante un enlace covalente el polipéptido fisiológicamente activo conjugado con un portador fisiológicamente activo para preparar un conjugado polipéptido-portador, en el que, en el conjugado polipéptido-portador, los dos extremos del polímero no peptidílico se conjugan respectivamente con el portador fisiológicamente activo y con el polipéptido fisiológicamente activo.
- 60           12. El método de la reivindicación 11, en el que el portador fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en albúmina, una región Fc de inmunoglobulina, transferrina, aptámero, toxina, gelatina, colágeno, dextrano, polisacárido, ácido graso y fibrinógeno, preferentemente una región Fc de inmunoglobulina.

[Fig. 1]

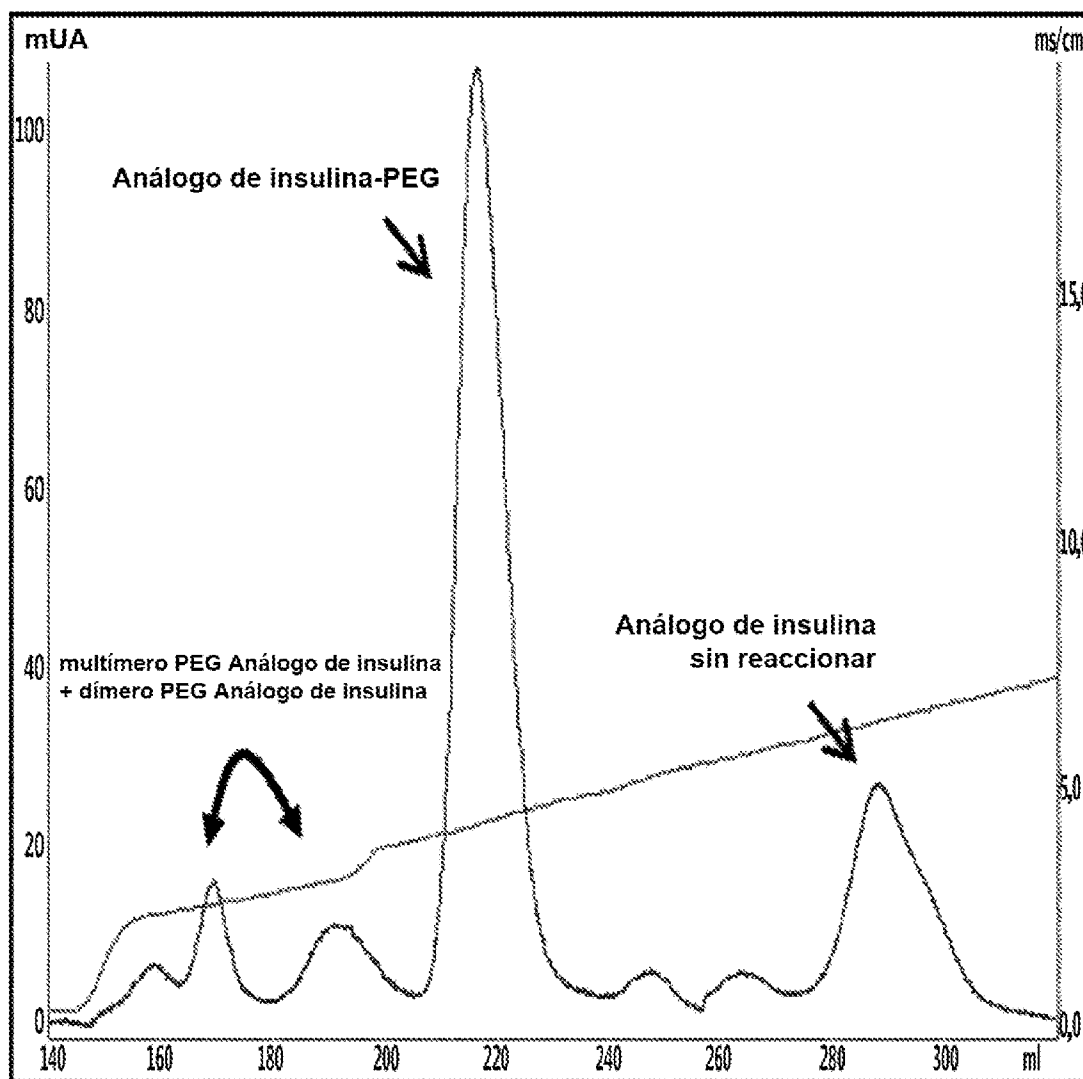
[precipitación selectiva-  
método de pegilación aplicado]



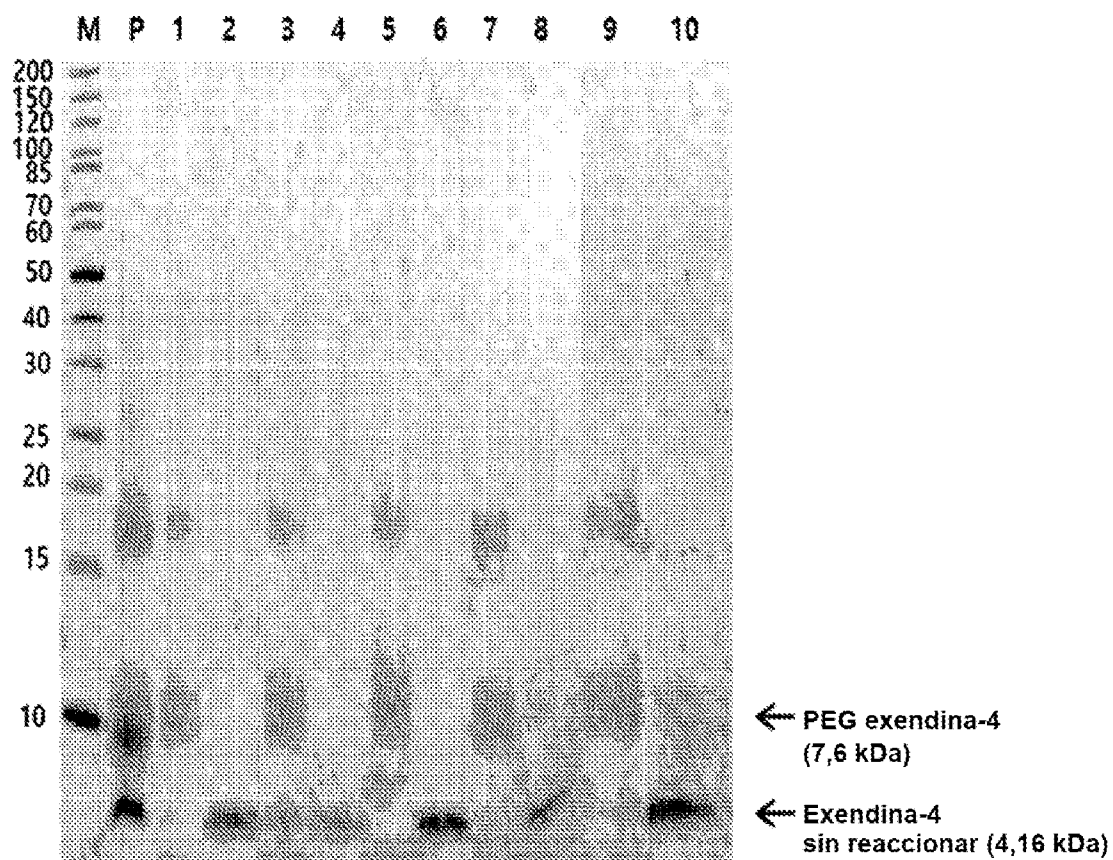
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



M: Marcador    P: Solución de reacción de 1ª PEGilación

1: Solución acuosa después de añadir isopropanol a la mezcla de reacción

2: Precipitado después de añadir isopropanol a la mezcla de reacción

3: Solución acuosa después de añadir 1-propanol a la mezcla de reacción

4: Precipitado después de añadir 1-propanol a la mezcla de reacción

5: Solución acuosa después de añadir 1-butanol a la mezcla de reacción

6: Precipitado después de añadir 1-butanol a la mezcla de reacción

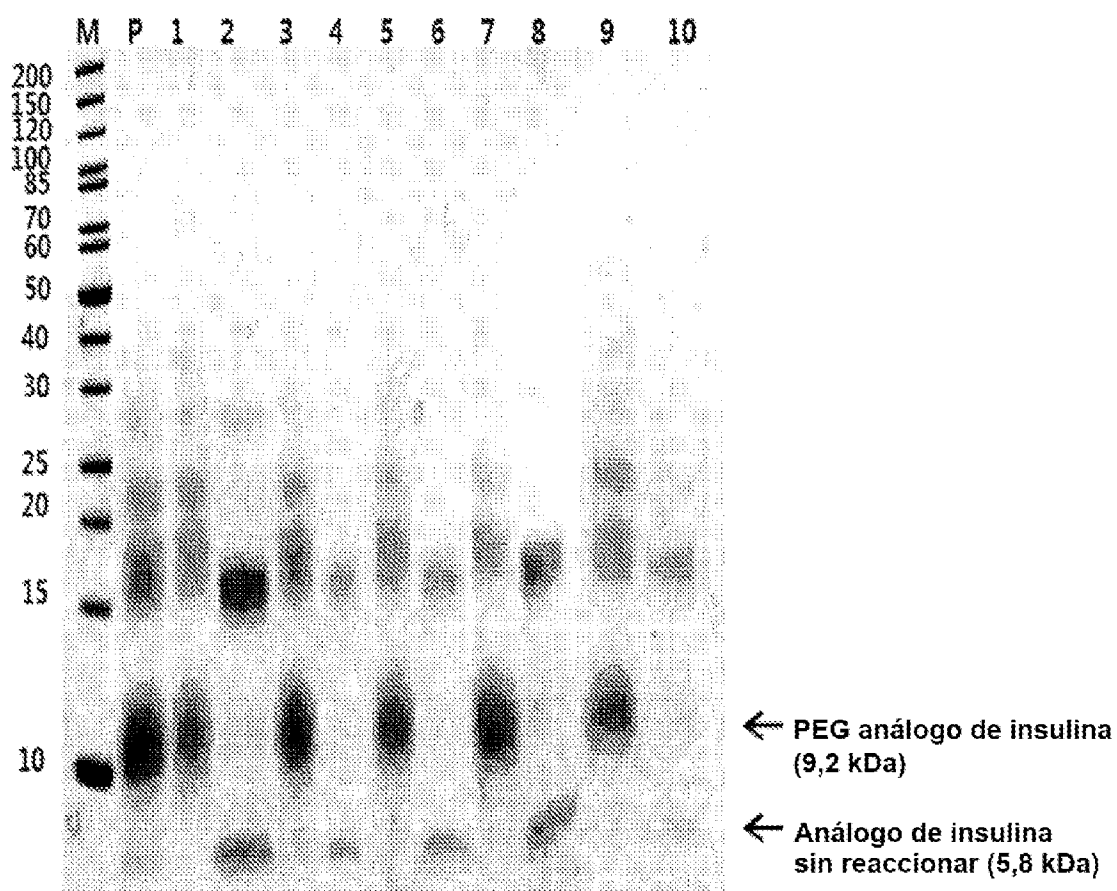
7: Solución acuosa después de añadir acetona a la mezcla de reacción

8: Precipitado después de añadir acetona a la mezcla de reacción

9: Solución acuosa después de añadir acetonitrilo a la mezcla de reacción

10: Precipitado después de añadir acetonitrilo a la mezcla de reacción

[Fig. 5]



**M:** Marcador    **P:** Solución de reacción de 1ª PEGilación

**1:** Solución acuosa después de añadir isopropanol a la mezcla de reacción

**2:** Precipitado después de añadir isopropanol a la mezcla de reacción

**3:** Solución acuosa después de añadir etanol a la mezcla de reacción

**4:** Precipitado después de añadir etanol a la mezcla de reacción

**5:** Solución acuosa después de añadir 1-propanol a la mezcla de reacción

**6:** Precipitado después de añadir 1-propanol a la mezcla de reacción

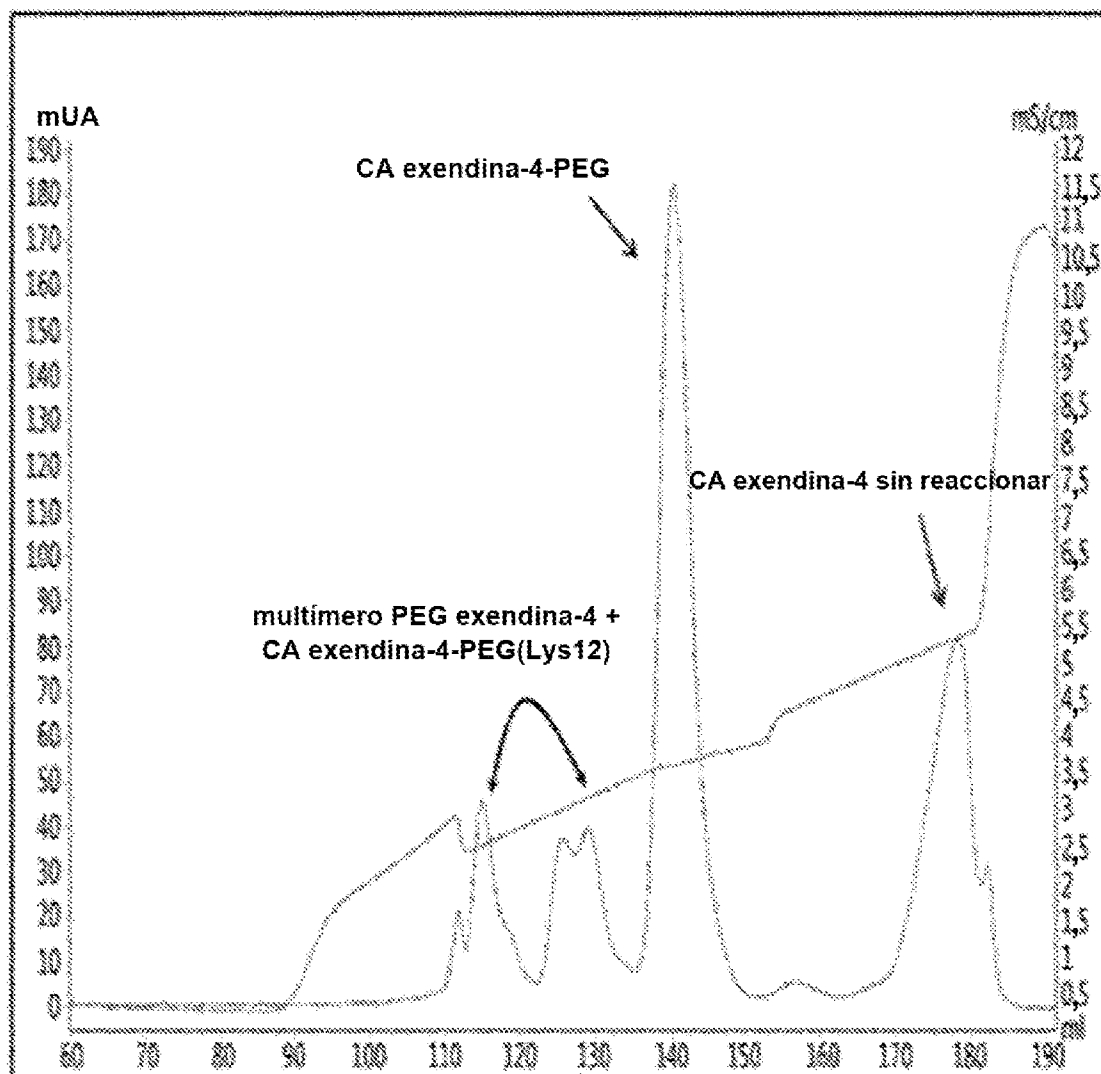
**7:** Solución acuosa después de añadir acetona a la mezcla de reacción

**8:** Precipitado después de añadir acetona a la mezcla de reacción

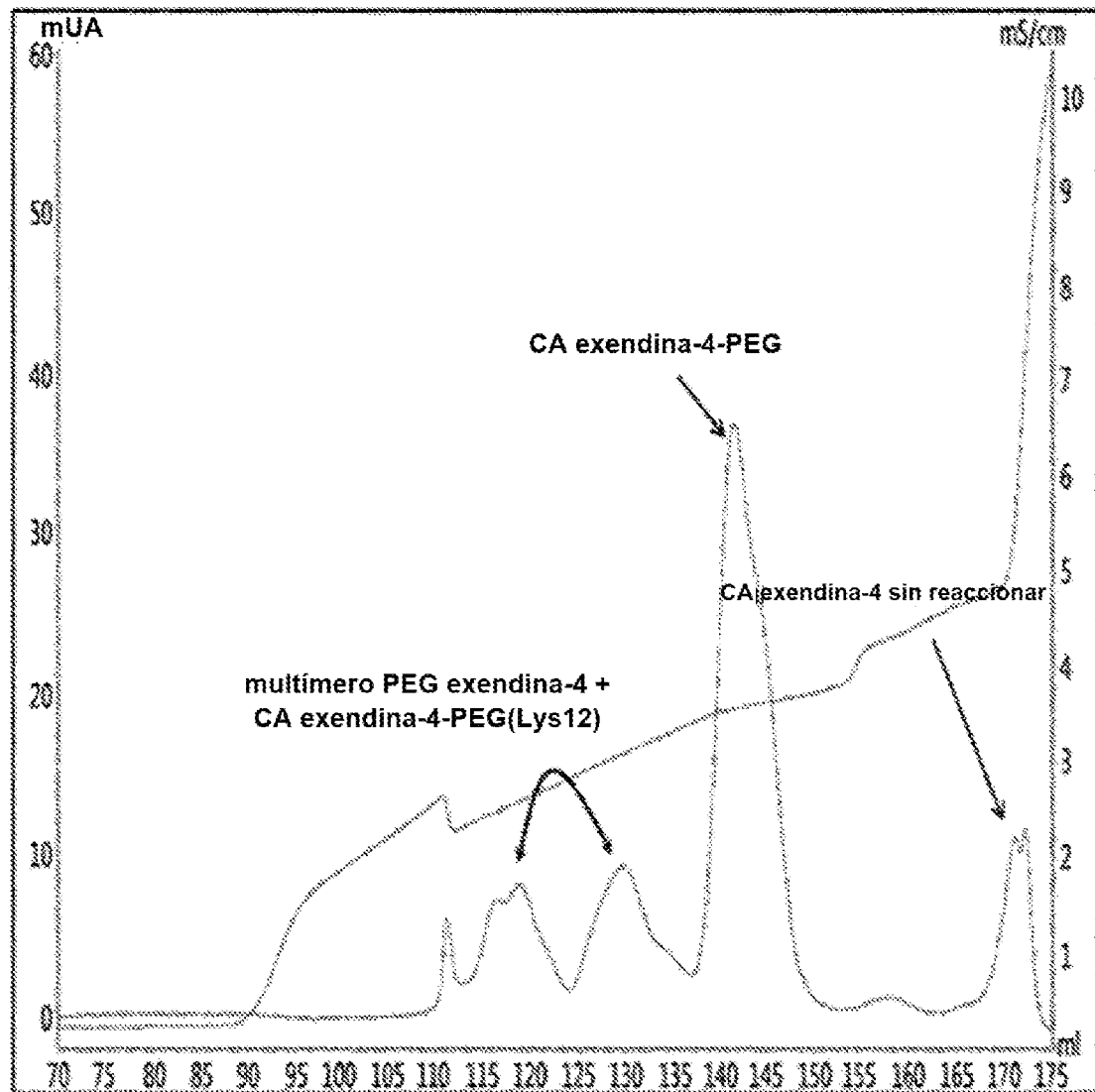
**9:** Solución acuosa después de añadir acetonitrilo a la mezcla de reacción

**10:** Precipitado después de añadir acetonitrilo a la mezcla de reacción

[Fig. 6]

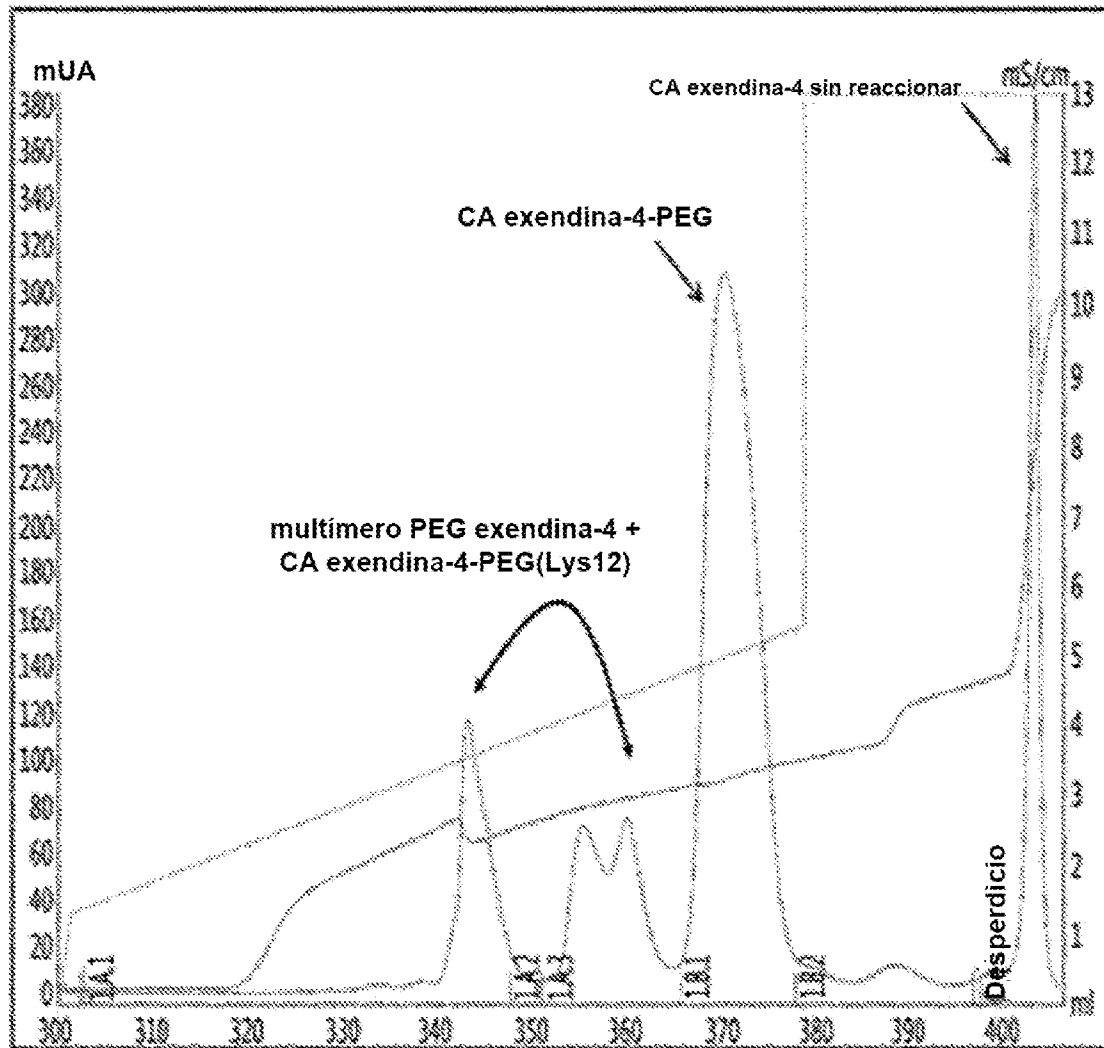


[Fig. 7]

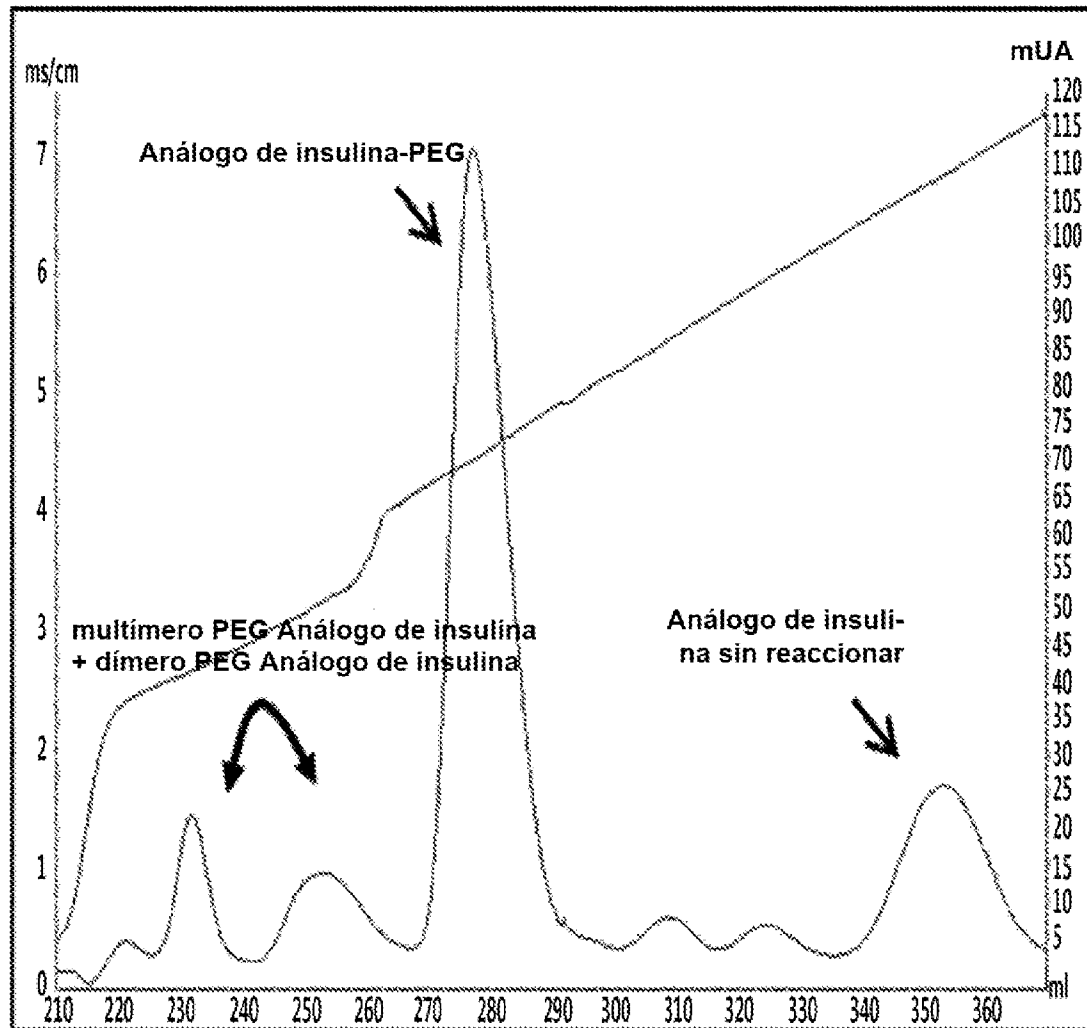




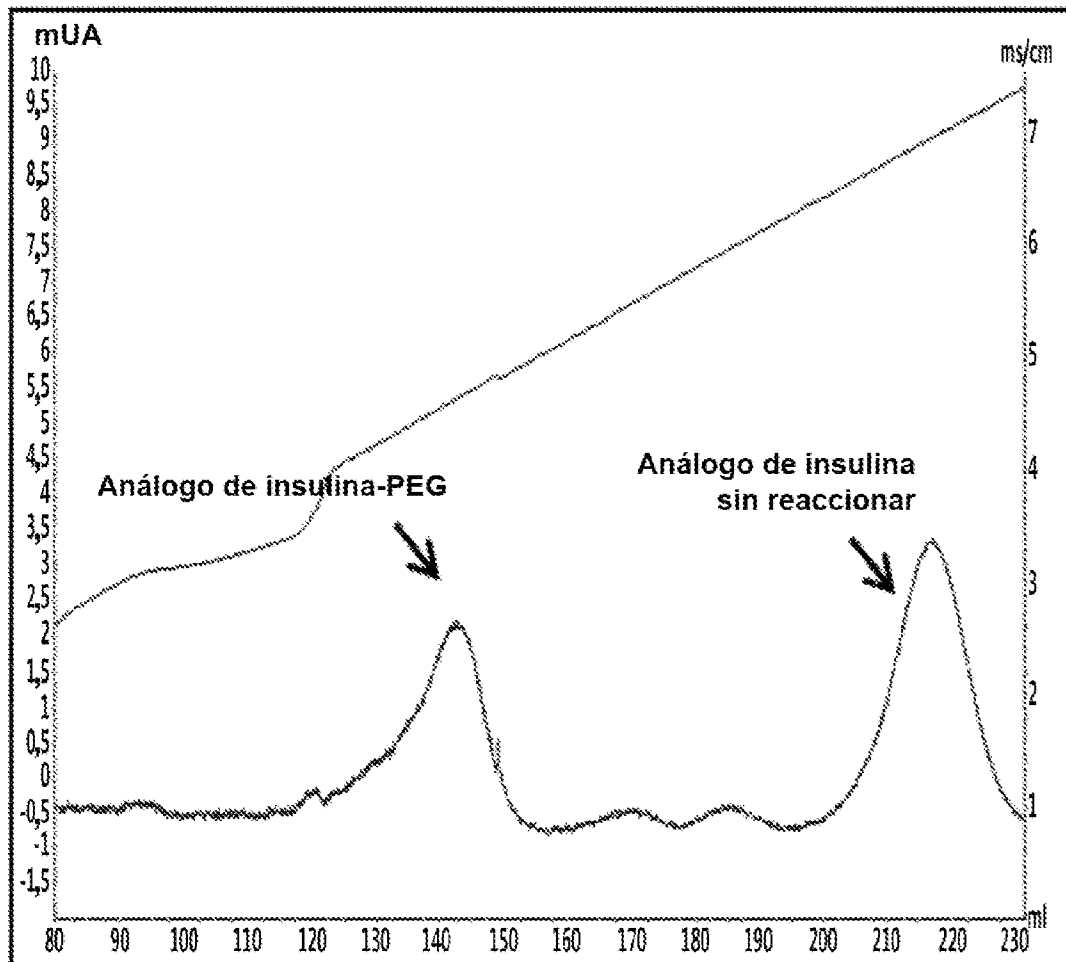
[Fig. 8]



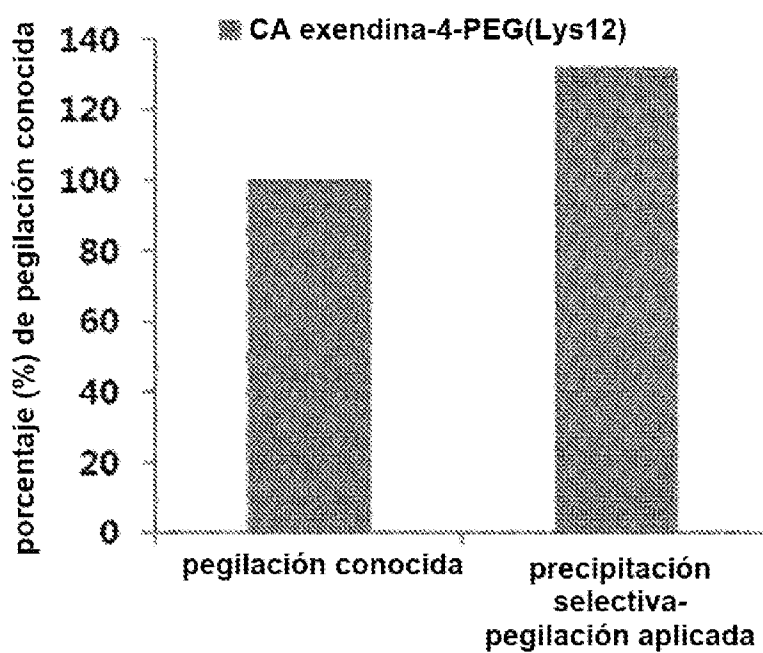
[Fig. 9]



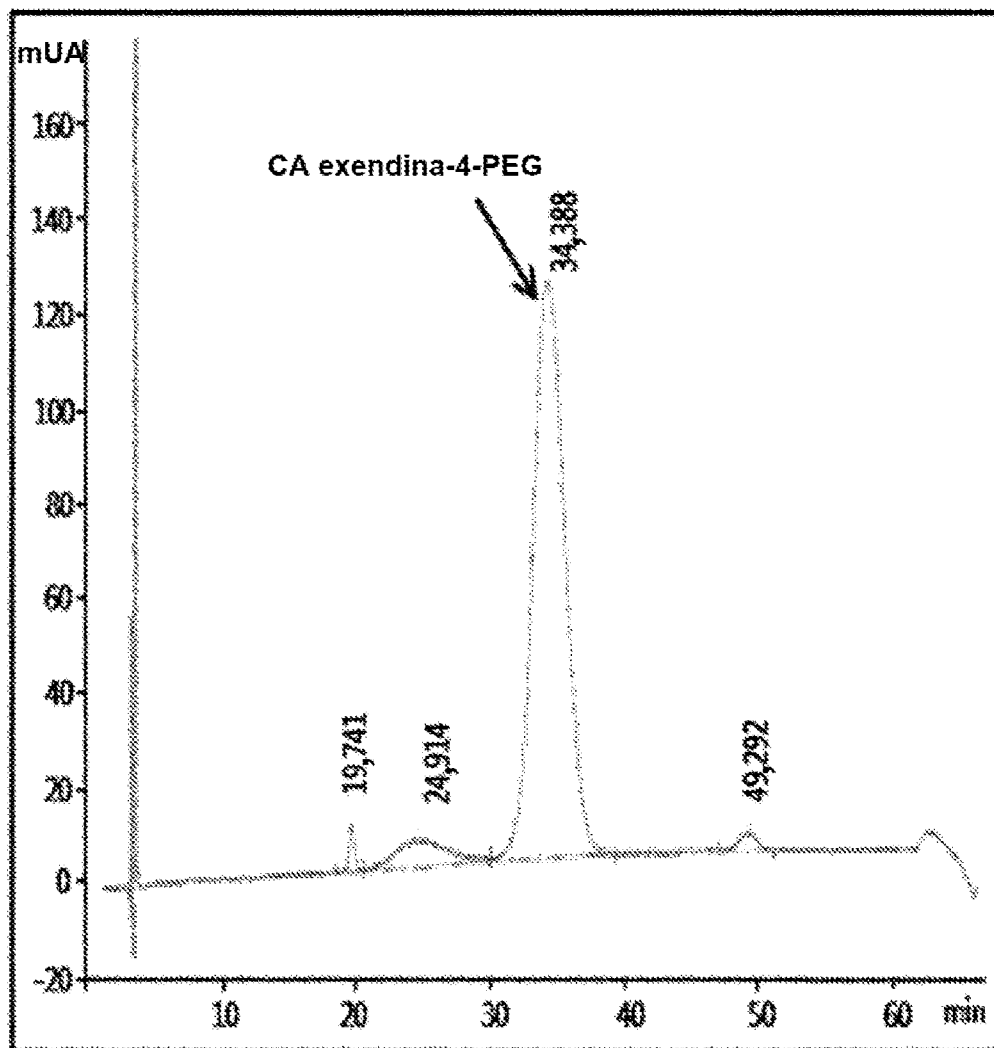
[Fig. 10]



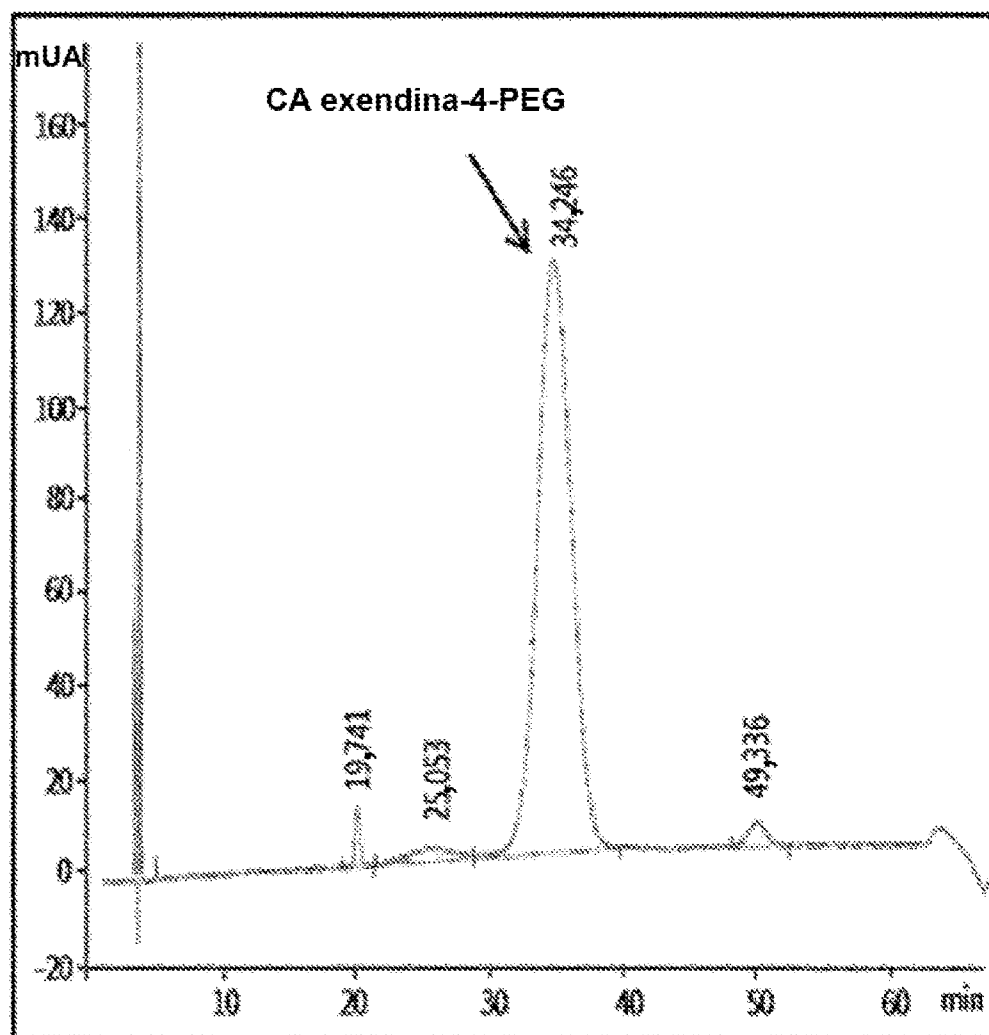
[Fig. 11]



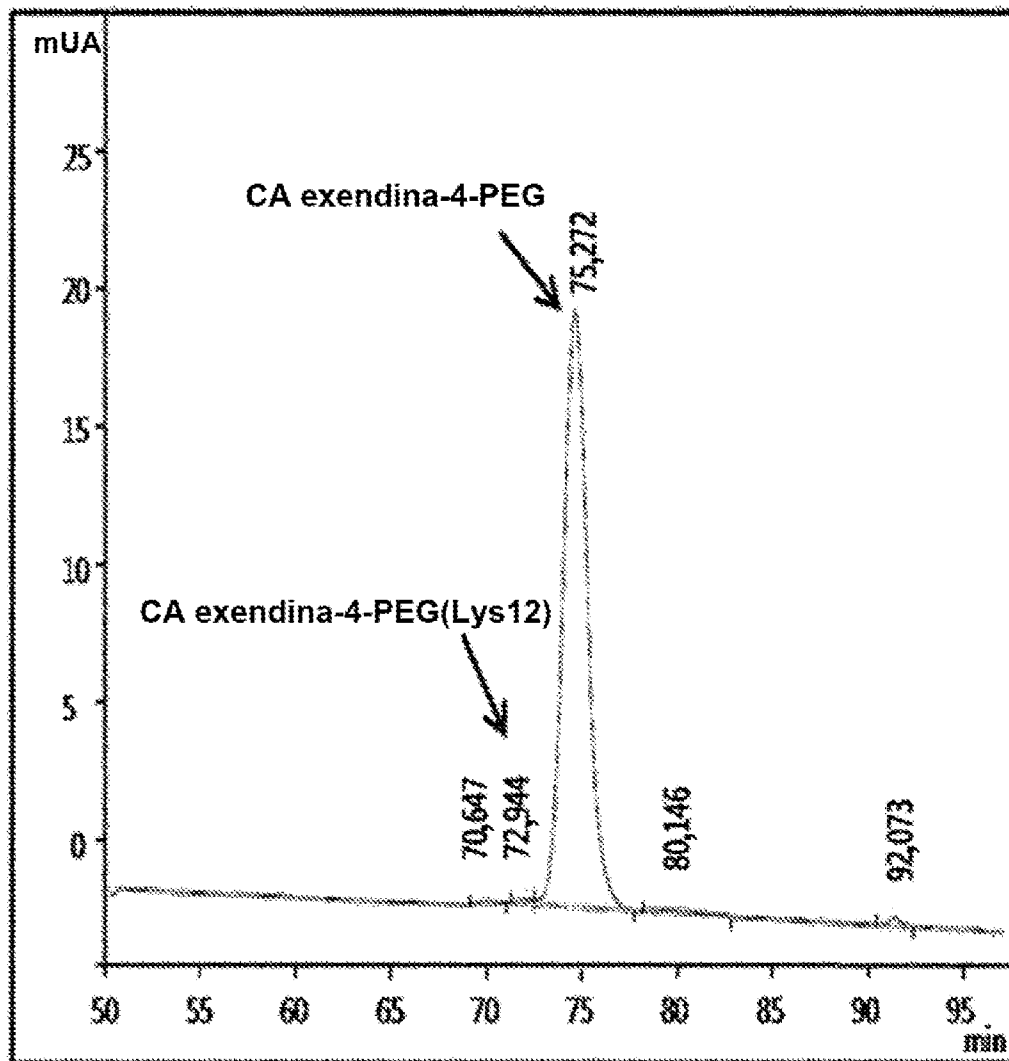
[Fig. 12]



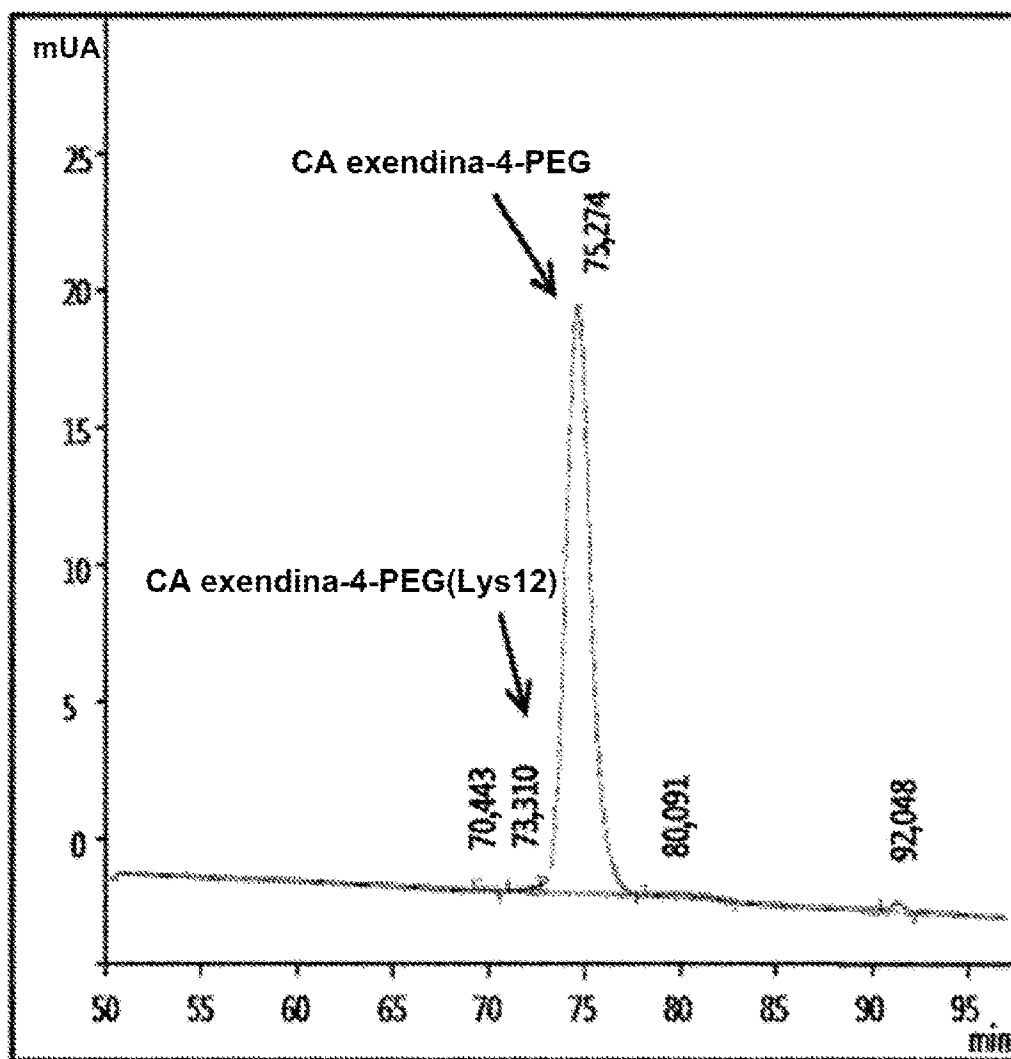
[Fig. 13]



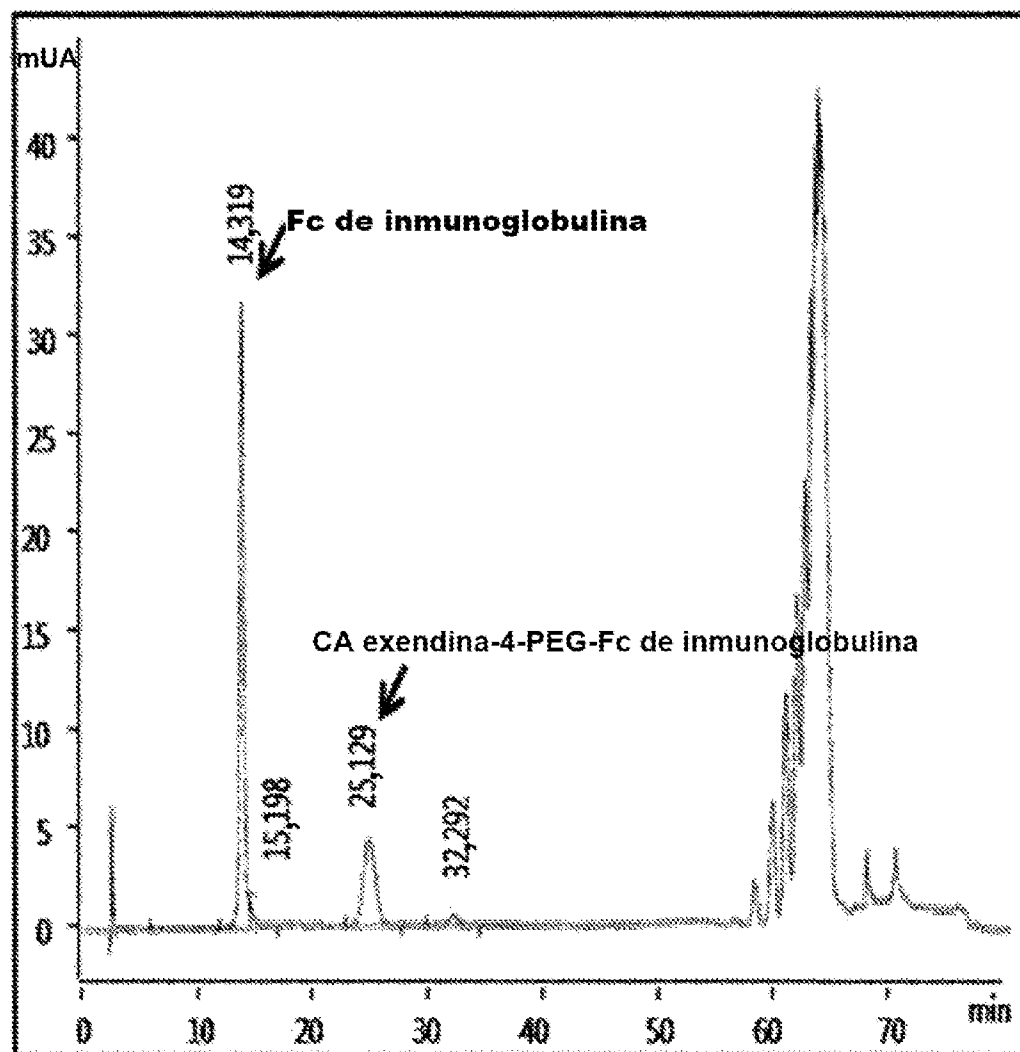
[Fig. 14]



[Fig. 15]

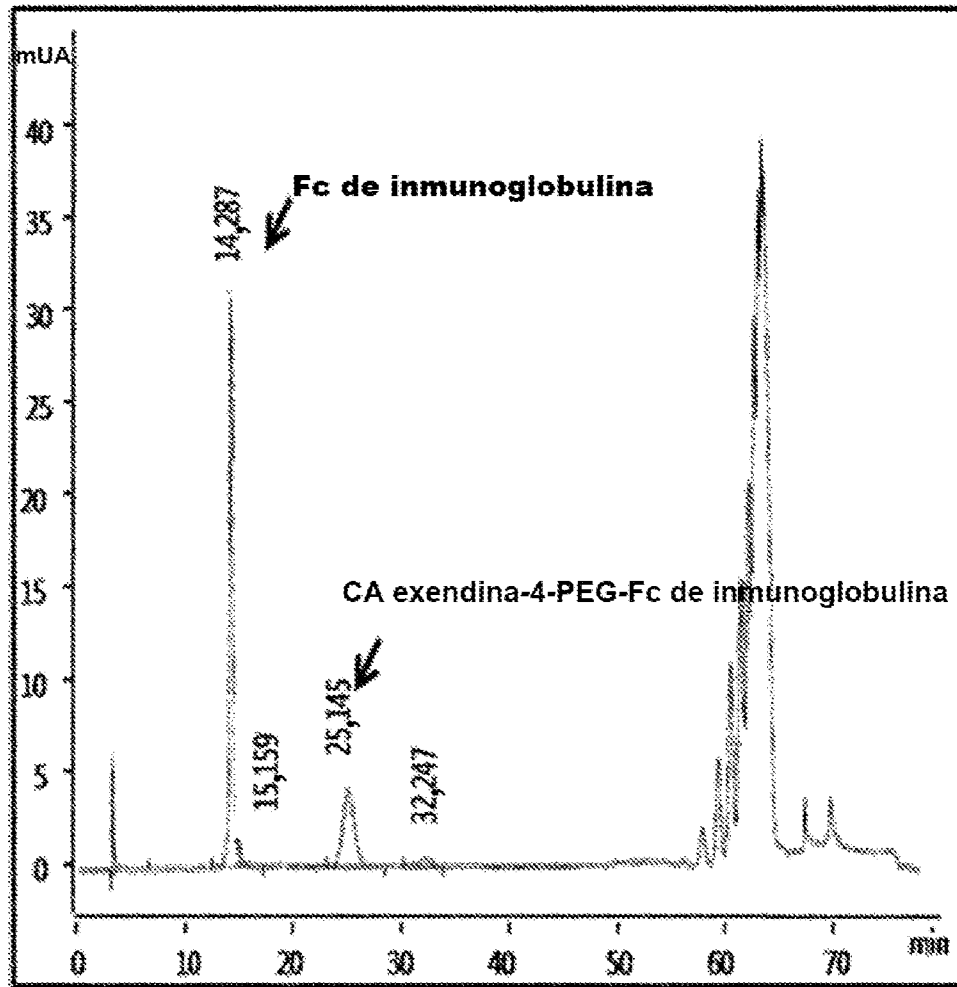


[Fig. 16]

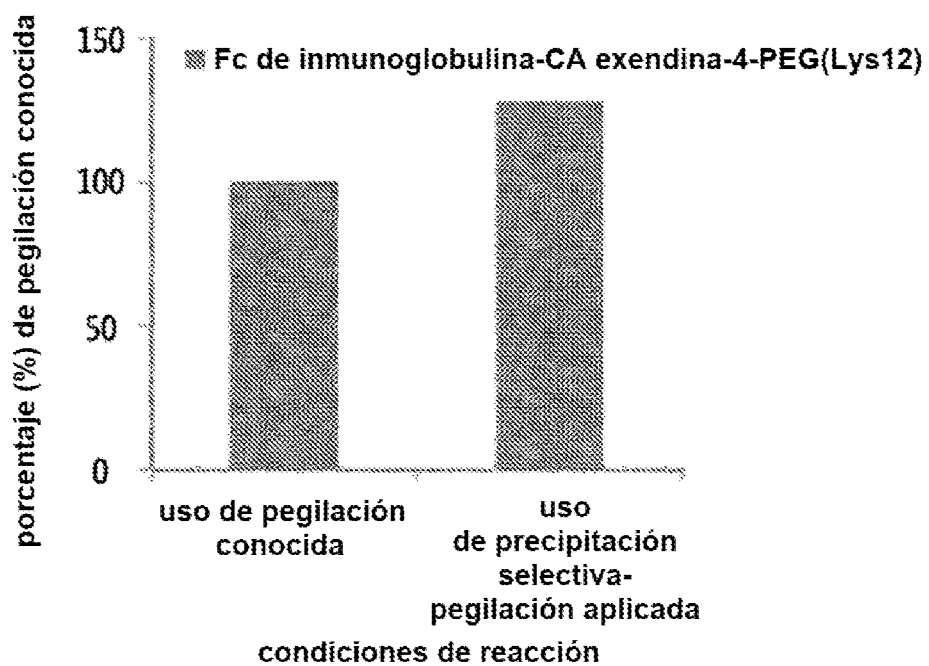




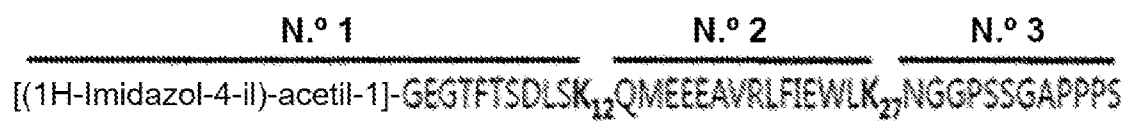
[Fig. 17]



[Fig. 18]

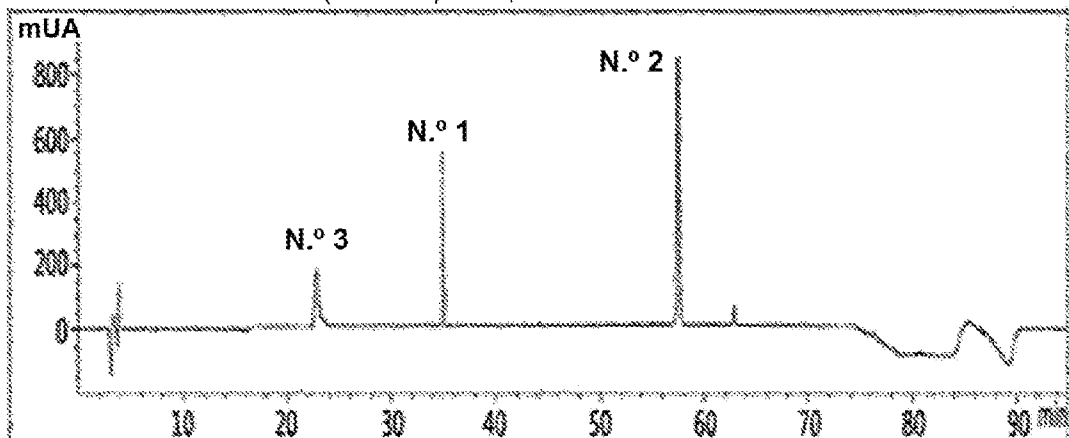


[Fig. 19]

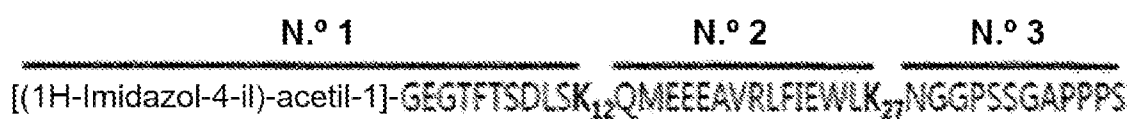


Imidazo-acetil-exendina-4, Escisión de Lisina-C

Imidazo-acetil-exendina-4(Lisina12)-PEG, Escisión de Lisina-C

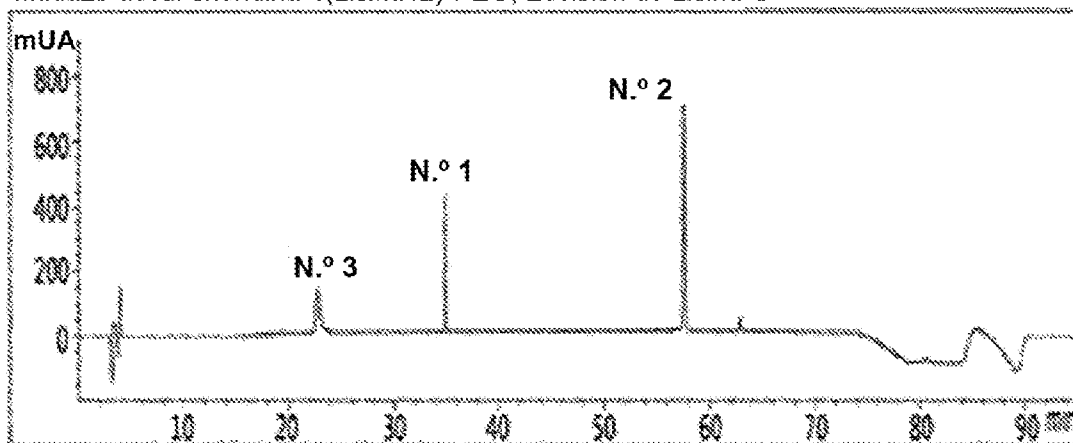


[Fig. 20]

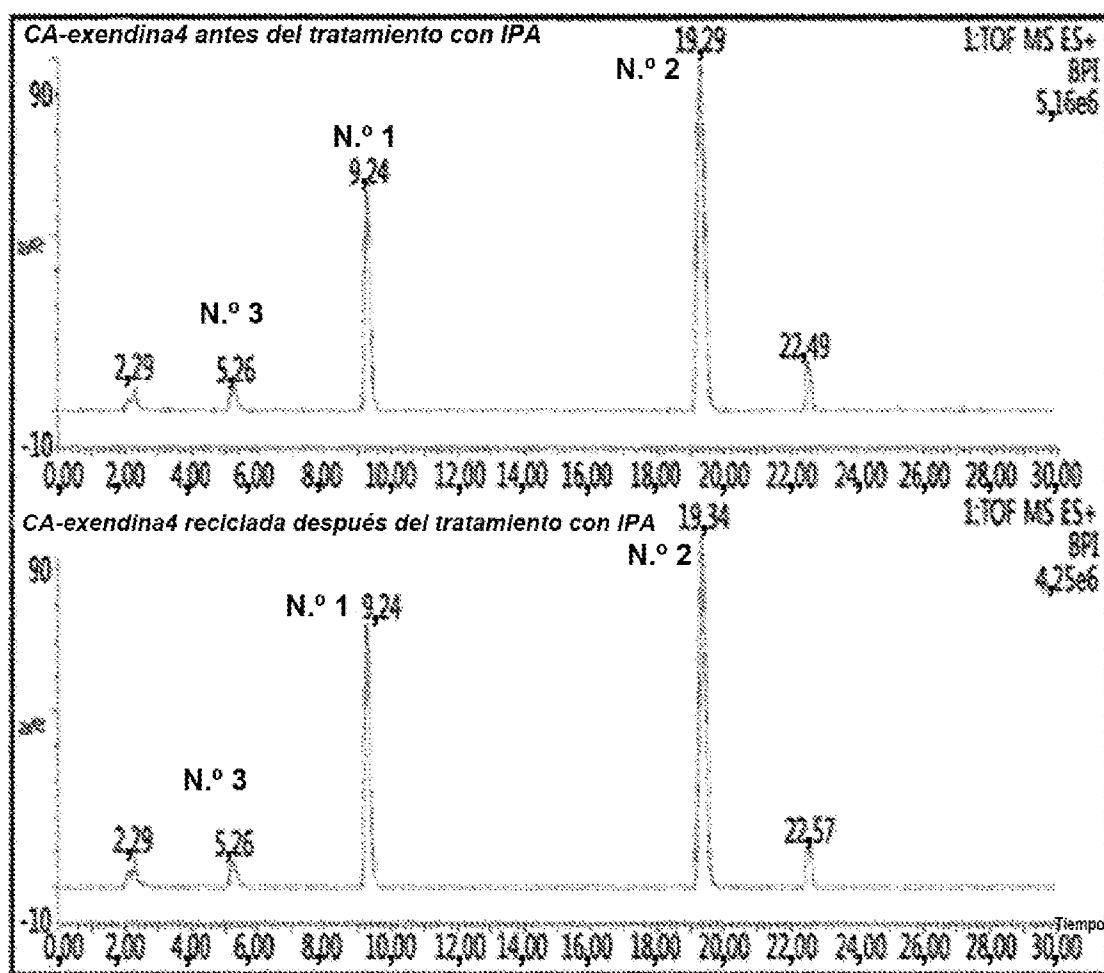


Imidazo-acetil-exendina-4, Escisión de Lisina-C

Imidazo-acetil-exendina-4(Lisina12)-PEG, Escisión de Lisina-C



[Fig. 21]

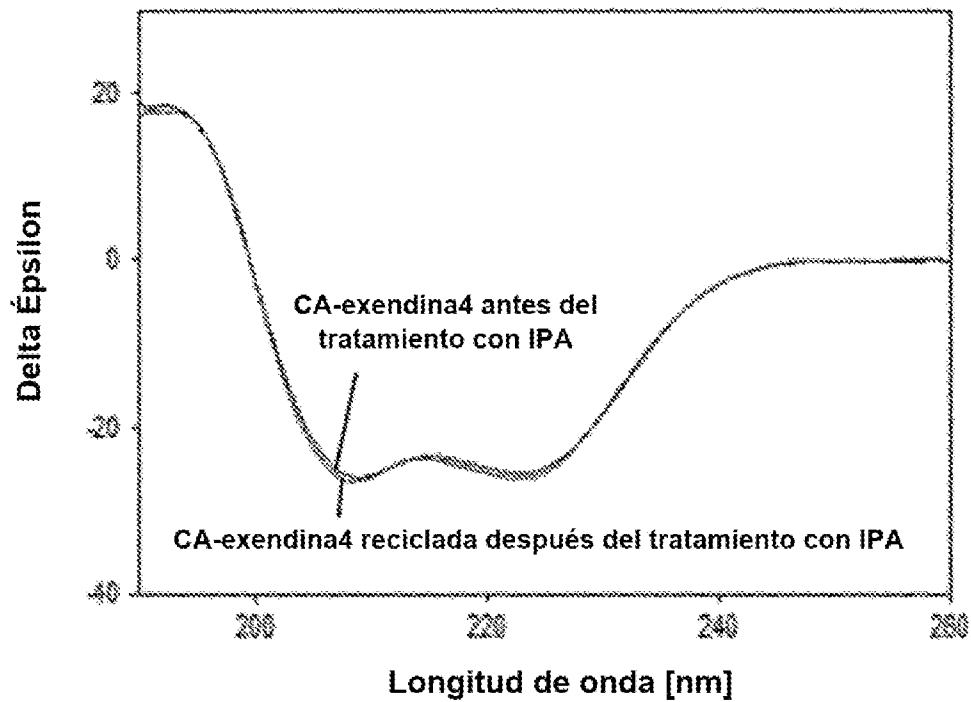


N.º 1: [(1H-Imidazol-4-il)-acetil-1]-Gly(2)-Lys(12) (masa exacta 1248,6)

N.º 2: Gln(13)- Lys(27) (masa exacta 1920,0)

N.º 3: Asn(28)-Ser(39)-NH<sub>2</sub> (masa exacta 1022,5)

[Fig. 22]



[Fig. 23]

