



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 107**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98963221 .1**

86 Fecha de presentación : **16.12.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1039921**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2000**

54

Título: **Conjugados de proteína-polímero por histidina sustancialmente puros.**

30

Prioridad: **19.12.1997 US 994621**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

73

Titular/es: **ENZON, Inc.**
20 Kingsbridge Road
Piscataway, New Jersey 08854-3998, US

72

Inventor/es: **Lee, Seoju y**
McNemar, Charles

74

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 280 107 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

Conjugados de proteína-polímero por histidina sustancialmente puros.

5 Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a conjugados de proteína-polímero sustancialmente puros. En particular, la invención se refiere a conjugados de proteína-polímero ligados por histidina y los procedimientos para fabricar los mismos.

2. Descripción de la técnica relacionada

Las proteínas activas biológicamente conjugadas a polímeros se han indicado para mejorar una o más de las propiedades de la vida circulante, solubilidad en agua o antigenicidad *in vivo*. Por ejemplo, algunos de los conceptos iniciales de la unión de péptidos o polipéptidos a polietilenglicol (PEG) y polímeros solubles en agua parecidos se describen en la Patente de los Estados Unidos número 4.179.337.

La insulina y hemoglobina están entre los primeros agentes terapéuticos conjugados. Estos polipéptidos relativamente largos contienen varios sitios de unión de ϵ -amino lisina libre. Varios polímeros se podrían unir sin pérdida significativa de actividad biológica.

Para muchos materiales activos biológicamente, el procedimiento de conjugación, sin embargo, no se realiza sin complicaciones. El procedimiento de conjugación no es específico con respecto a los sitios de unión. Se debe tener cuidado para limitar la pérdida de la actividad biológica causada por la reacción de conjugación. Por ejemplo, si demasiado polímero activado se une a la proteína o polipéptido diana, se puede reducir o perder gravemente la actividad biológica. Además, si se usa el ligando equivocado para unir el polímero a la proteína o si una cantidad insuficiente de polímero se une a la diana, el valor terapéutico del conjugado resultante está bastante limitado. A menudo, dichos conjugados no demuestran que haya un aumento en la vida circulante para compensar la pérdida de bioactividad. También pueden resultar problemas cuando un sitio del resto activo terapéutico (es decir, cuando se encuentran grupos asociados con la bioactividad) se llega a bloquear como resultado de la unión del polímero. Este problema puede ser difícil de evitar hasta que el polímero y proteína se unen normalmente en unas reacciones basadas en la disolución y el procedimiento de conjugación del polímero no es específico con respecto a los sitios de unión. Se han sugerido sitios de actividad prebloqueantes con materiales tales como fosfato de piridoxal, pero los resultados han sido contradictorios. La falta de variantes de proteínas de lisina también se ha sugerido como una vía de control de unión del polímero. Esta técnica, sin embargo, es a menudo nada práctica hasta se añade considerablemente al coste del producto final. Los problemas son especialmente graves con proteínas y péptidos de peso molecular más bajo. Esos materiales bioactivos a menudo tienen poco sitios de unión no asociados con la bioactividad.

En otro intento para evitar la pérdida de bioactividad tras la conjugación del polímero, se conjugó factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF") con un éster carboximetil-N-hidroxisuccinimidílico de mPEG luego se trató con hidroxilamina dos molar (pH 7,3) para eliminar los ligandos "inestables", seguido por una reducción del pH a 3,5. Kinstler y col., 1996, *Pharmaceutical Res.* 13(7): 996-1002. No se proporcionó ninguna descripción o sugerencia para lograr G-CSF mejorado ni orientación con respecto al tratamiento de cualesquiera otros conjugados de proteínas.

Los interferones, más adelante también referidos como IFN, son un ejemplo particular de proteínas las cuales podrían ser benéficas como técnicas de conjugación de polímeros mejoradas. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos número 4.766.106 y 4.917.888 las cuales describen entre otros el interferón beta conjugado con polimeros activados que incluye mPEG-2,4,6-tricloro-S-triazina, glutarato de mPEG-N-succinimidilo, succinato de mPEG-N-succinimidilo. Las patentes describen que la modificación covalente de la proteína se hace a un pH de 5 a 9 y cuando la proteína reacciona a través de sus residuos de lisina, la modificación covalente de la proteína se hace a un pH de 8 a 9. También se usan excesos molares relativamente altos (10, 20 y 50 veces) del polímero activado.

La Solicitud de Patente Europea que lleva a la publicación número 0 236 987 describe la reacción de interferones alfa y gama con excesos molares altos de éster imidoalquílico-polietilénicoles activados bajo condiciones las cuales incluyen preferiblemente incluyen un pH desde aproximadamente 7 a 9. La Solicitud de Patente Europea que lleva a la publicación número 0 510 356 describe conjugación de interferón alfa con PEG activado con piridinilcarbonilo y PEG activado con tiocarbonilo a un pH de 7 a 9. No hubo mención en estas descripciones de que los aminoácidos distintos de la lisina estuvieran implicados en la conjugación o de que sería ventajoso hacerlo así.

El documento WO 96/11953 informa que los conjugados se prepararon mediante reacción de una proteína, ilustrada por IFN consenso, con un polímero, a un pH ácido (pH 4) usando una reacción de alquilación reductora para la unión selectiva de polímero, por ejemplo, PEG, al N-terminal. El documento WO 96/11953 afirma que esta reacción impide selectivamente la unión a grupos amino épsilon de lisina, mientras favorece el enlace con el grupo amino alfa N-terminal. El documento WO 96/1195 también describe un procedimiento de tratamiento de pH en dos etapas en el que G-CSF se hace reaccionar con un PEG a pH 8,0, seguido mediante la reducción del pH a pH 4,0, simplemente como un prelude para cargar el producto en una columna de separación. El documento WO 96/11953 no enseña o

sugiere las ventajas de una reacción de acilación de una reacción de acilación para unir selectivamente a residuos de IFN distintos aparte del N-terminal o las lisinas.

5 El documento WO 95/00162 se refiere a un procedimiento para sintetizar un polipéptido que contiene un polímero sustancialmente no antigénico en un sitio predeterminado, en el que se inicia la síntesis del polipéptido y se introduce el polímero en un punto en la síntesis el cual corresponde al sitio predeterminado. El procedimiento usa un polímero de aminoácido conjugado para introducir el polímero a un punto seleccionado en la síntesis. Se menciona que el aminoácido se puede seleccionar de arginina, ácido glutámico, lisina, ácido aspártico, cisteína, histidina, triptófano, tirosina, asparagina, glutamina, serina y treonina. La enseñanza actual sin embargo se restringe a la lisina como el sitio
10 de unión.

El documento WO 98/51784 publicado el 19 de noviembre de 1998 y que reivindica datos de prioridad del 12 de mayo de 1997 y 13 de febrero de 1998, se refiere a deiminasa de arginina (ADI) unida covalentemente mediante un grupo de unión a un polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular promedio del peso total del peso total
15 entre 12.000 y 40.000. El grupo enlazante se puede seleccionar a partir de muchos grupos, especialmente un grupo maleimida, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo éster, un grupo epoxi, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un carbohidrato, un grupo tirosina, un grupo cisteína, y un grupo de histidina. Generalmente, el PEG se une a una amina primaria de ADI, especialmente de varias lisinas en ADI. No se describe la unión específica de una histidina de ADI.
20

El documento WO 95/13090 enseña un procedimiento para preparar una composición que contiene un interferón alfa de acción prolongada que comprende una reacción de conjugación de interferón alfa con un polímero en presencia de un tensioactivo. Los conjugados formados en este procedimiento tienen el polímero predominantemente unido a grupos ϵ -amino de lisinas.
25

Gotoh y col., *Bioconjugate Chem.* Vol. 4, No. 6, 1993, 554-559, analiza el sitio de reacción de fibra de seda (SF) cuando reacciona con poli(etilenglicol) activado-cloruro cianúrico mediante espectroscopia RMN ^1H . Se enseñó que más de 3,3 moles en % de los residuos en SF se modificaron mediante la reacción y que la lisina (0,32 moles en %), histidina (0,18 moles en %) y residuos de tirosina (5 moles en %) reaccionaron con el PEG activado.
30

En vista de las descripciones descritas anteriormente, se cree que aumentos adicionales en conjugados interferón-polímero son deseables con el fin de tratar diversas deficiencias. La presente invención proporciona mejoras adicionales al campo y así trata estos defectos.
35

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones sustancialmente puras de conjugados de proteína-polímeros unidos a His. Los conjugados incluyen una proteína, tal como un interferón alfa, covalentemente conjugada a un polímero, tal como un polietilenglicol, en un residuo de histidina (His) de la proteína. En el caso de un interferón alfa, la histidina es preferiblemente la histidina 34. Preferiblemente, el interferón alfa es interferón $\alpha 2\text{b}$ y los conjugados contienen aproximadamente una hebra de polímero por molécula de interferón alfa. Los conjugados monopolímeros unidos a histidina de otras proteínas, tales como IL-10, se incluyen también como parte de la invención. Las composiciones que contienen los conjugados unidos a histidina monopolímeros preferidos pueden contener también cantidades menores de otras especies de proteína-mono-PEG, si se desea.
45

En otra realización de la invención, se proporcionan procedimientos de preparación de dichas composiciones sustancialmente puras de conjugados de proteína-polímero proporcionan conjugados de proteína-polímero unidos por histidina. En particular, los procedimientos se refieren a preparar los conjugados de polímero unidos a residuos de histidina de proteína. Los procedimientos incluyen la formación de una pluralidad de especies de conjugados proteína-polímero o isómeros de posición haciendo reaccionar una proteína tal como interferón alfa, con una cantidad suficiente de polímero adecuadamente activado bajo condiciones suficientes para facilitar la unión covalente de moléculas de proteína a hebras de polímero activadas y a partir de entonces aislar sustancialmente las especies conjugadas o isómeros de posición en los cuales el enlace de His entre la proteína y el polímero se establece a partir de las especies conjugadas restantes. En un aspecto preferido de esta realización, el polímero activado es un polímero activado de carbonato de benzotriazol. En un aspecto alternativo, el polímero activado es un polímero activado de oxicarbonilo-N-dicarboximida tal como carbonato de succinimidilo (SC-PEG). Estos polímeros activados permiten al trabajador formar una mezcla de reacción en la cual una parte sustancial de los conjugados incluye la hebra del polímero covalentemente unido a un residuo de histidina en el interferón alfa más que en un residuo de lisina o N-terminal.
55

Algunas de las condiciones las cuales permiten al isómero de posición de His de proteína, tal como el isómero IFN- α His 34, formarse en cantidades relativamente altas con respecto a otros isómeros de posición incluyen dirigir la reacción de congelación del polímero acilante al polímero acilante dentro de un intervalo de pH particular, es decir preferiblemente menor que aproximadamente 7 y más preferiblemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,8. Esto facilita la unión covalente preferente de al menos una parte de las hebras del polímero a grupos amino de residuos de histidina de la proteína. Los conjugados de proteína deseados, sustancialmente puros, se aíslan después preferiblemente a partir de los conjugados de proteína restantes en la mezcla de reacción usando columnas de cromatografía tales como filtración de gel seguida por intercambio catiónico o intercambio aniónico seguido por intercambio catiónico.
65

Los interferones alfa adecuados incluyen interferones alfa recombinantes y no recombinantes aislados a partir de mamíferos. La parte de polímeros del conjugado es preferiblemente un óxido de polialquileno (PAO), tal como un monometoxipolietilenglicol (mPEG). En realizaciones alternativas, también se pueden usar otros polímeros sustancialmente no antigénicos. Los polímeros preferiblemente tienen un peso molecular desde aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000.

La composición de la invención es útil en procedimientos para tratar diversas afecciones médicas tales como afecciones susceptibles al interferón alfa en mamíferos. En este aspecto, el tratamiento incluye administrar una cantidad efectiva de una composición que contiene los conjugados de proteína descritos en el presente documento para mamíferos que requieren tal terapia.

Para propósitos de la presente invención, el término “isómero de posición” se entendería que describe generalmente un conjugado que tiene una hebra de polímero unida a uno de los residuos de aminoácidos adecuados. Los isómeros de posición específicos se describen en el presente documento en referencia al punto de unión del residuo de aminoácido. Por ejemplo, el isómero de posición de proteína-Lys31-polímero se refiere a un conjugado monopolímero de una proteína que tiene el polímero unido a la Lys31. Otros isómeros de posición, es decir aquellos conjugados que tienen el polímero unido a otro lugar sobre la proteína se designarían de manera similar.

Para propósitos de la presente invención, el término “sustancialmente puro” se entendería para designar el nivel o grado de pureza de una composición que contiene un isómero de posición deseado de un conjugado polímero-proteína. Dependiendo de la proteína conjugada y la técnica de separación conjugada empleada, se estimará que las composiciones de acuerdo con la presente invención son sustancialmente puras si ellas contienen una mayoría del isómero de posición deseado.

También para propósitos de la presente invención, “separando sustancialmente” se entendería para describir una parte del procedimiento de la invención en el que un isómero de posición deseado se recupera a partir del espectro de los isómeros de posición como un resultado de usar (preferiblemente) cromatografía líquida de alta resolución. Los aislados resultantes contienen aislados sustancialmente puros del isómero de posición deseado y posiblemente cantidades menores, por ejemplo, menos del 15%, de otros isómeros de posición.

Como un resultado de la presente invención, se ha encontrado de modo inesperado que son posibles mejoras adicionales en composiciones de conjugados de proteína-polímero. Por ejemplo, ahora es posible obtener isómeros de posición sustancialmente puros, incluyendo aquellos que tienen niveles relativamente altos de bioactividad en rendimientos relativamente altos. En el caso de IFN- α , los isómeros de posición preferidos, es decir los conjugados IFN- α -2b unidos al mono-polímero His34, demuestran de modo inesperado altos niveles de bioactividad no sólo en relación al interferón alfa nativo sino también a otros isómeros de posición. Los otros isómeros de posición, es decir, aquellos conjugados que tienen el polímero unido en otro lugar en el interferón, como el extremo N-terminal o un grupo amino de lisina, a menudo muestran cantidades más bajas pero sin embargo útiles de bioactividad y se pueden incluir en algunas composiciones de la invención en cantidades menores.

También se ha encontrado sorprendentemente que cuando la reacción de conjugación incluye ciertos polímeros activados, tales como polímeros activados de carbonato de benzotriazol (BTC), de modo inesperado se forman cantidades altas de isómeros de posición unidos por histidina.

Para un mejor entendimiento de la presente invención, se hace referencia a las siguientes descripción y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un cromatograma referido en el Ejemplo 1.

La figura 2 es un cromatograma referido en el Ejemplo 2.

La figura 3 es una gráfica referida en el Ejemplo 7 que ilustra la actividad biológica de diversos isómeros de posición en el suero humano normal.

Descripción detallada de la invención

1. Proteínas

Para propósitos de la presente invención el término “proteína” se entendería para abarcar no solamente proteínas sino también polipéptidos, enzimas, péptidos y similares que tengan al menos una histidina disponible para la unión del polímero. Además, las proteínas contempladas para usar en el presente documento no se limitan a aquellas que tienen actividades psicológicas o farmacológicas. Por ejemplo, también se incluyen las enzimas conjugadas las cuales son capaces de catalizar reacciones en disolventes orgánicos. Asimismo, algunos conjugados de polímeros de la invención también son útiles como diagnósticos de laboratorio. Dos características clave de todos los conjugados es que se unen preferiblemente mediante residuos His y mantienen al menos alguna parte de la actividad asociada con la proteína no modificada.

Proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, hemoglobina, proteínas de suero tales como factores de sangre que incluyen factores VII, VIII y IX; inmunoglobulinas, citoquinas tales como interleuquinas, es decir, de IL-1 a IL-13, interferones α , β y γ , preferiblemente interferón- α descrito con más detalle a continuación, los factores de crecimiento de colonias que incluyen factores estimuladores de colonias de granulocitos, factores de crecimiento derivado de plaquetas y proteína activada de fosfolipasa (PLAP). Otras proteínas de biología general o interés terapéutico incluyen insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y proteínas relacionadas, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento transformantes, tales como TGF α o TGF β y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, eritropoietina, hormonas pigmentarias, factores de liberación hipotalámicos, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante de los folículos, hormona de estimulación del tiroides, activador de plasminógeno de tejidos, y similares. Las inmunoglobulinas de interés incluyen IgG, IgE, IgM, IgA, IgD y fragmentos de las mismas.

Algunas proteínas tales como las interleuquinas, interferones y los factores de crecimiento de colonias también existen en la forma de no glicosilada, usualmente como un resultado de las técnicas de recombinación. Las versiones no glicosiladas están también entre las proteínas de la presente invención.

Las enzimas de interés incluyen enzimas específicas de carbohidrato, enzimas proteolíticas, oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Sin limitarse a enzimas particulares, ejemplos de enzimas interés incluyen asparaginasa, arginasa, arginina deaminasa, adenosina deaminasa, superóxido dismutasa, endotoxinasas, catalasas, quimotripsina, lipasas, uricasas, adenosina difosfatasa, tirosinasas y bilirrubina oxidasa. Enzimas específicas de carbohidratos de interés incluyen glucosa oxidasas, glucodasas, galactosidasas, glucocerebrosidasas, glucuronidasas, etc.

También se incluye en el presente documento cualquier parte de un polipéptido que demuestre bioactividad *in vivo*. Esto incluye histidina que contiene secuencias de amino ácidos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de unión a antígenos de cadena sencilla, véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos número 4.946.778, que unen moléculas que incluyen fusiones de anticuerpos o fragmentos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y anticuerpos catalíticos.

Las proteínas o partes de las mismas se pueden preparar o aislar mediante el uso de técnicas conocidas para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica tales como cultivo de tejidos, extracción a partir de fuentes animales, o mediante metodologías de recombinación de ADN. También se contemplaron fuentes transgénicas de las proteínas, polipéptidos, secuencias de aminoácidos y similares. Dichos materiales se obtienen a partir de animales transgénicos, es decir, ratones, cerdos, vacas, etc., en los que las proteínas se expresan en leche, sangre o tejidos. También se contemplan sistemas de expresión de baculovirus e insectos transgénicos como fuentes. Además, las versiones mutantes de proteínas, tales como interferones mutantes también están dentro del alcance de la invención.

Otras proteínas de interés son proteínas alérgenas tales como ambrosía, Antígeno E, veneno de abeja, alergenitos diminutos y similares.

Una proteína preferida es el interferón alfa descrito con más detalle a continuación. Lo anterior es ilustrativo de las proteínas las cuales son adecuadas para la presente invención. Se entiende que aquellas proteínas, tal como se definen en el presente documento, no se mencionan específicamente pero también se desea que tengan grupo histidina disponible y están dentro del alcance de la presente invención.

También se entendería por el trabajador de habilidad ordinaria que la invención incluye proteínas, como se definen en el presente documento, que se han manipulado específicamente para incluir una histidina para usar como un sitio de unión de polímero.

2. Interferones

En aquellos aspectos de la invención donde la proteína es un interferón (IFN), se entendería que la proteína se puede preparar u obtener a partir de una diversidad de fuentes que incluyen técnicas de recombinación tales como aquellos que usan genes sintéticos expresados en *E. coli*. Véase también Pestka, "Interferon α " en *Human Cytokines*, Blackwell Scientific Publications 1-16 (1992). Además, el IFN es preferiblemente un IFN- α y también puede ser un extracto de fuente mamífera tal como IFN- α humano, de rumiante o bovino. Un IFN particularmente preferido es IFN- α -2b, un producto fabricado recombinantemente de Schering Corp., Kenilworth, NJ.

El término "interferón" o "IFN" tal como se usa en el presente documento significa la familia de proteínas altamente homólogas que inhiben la replicación viral y la proliferación celular y modelan la respuesta inmune. Los interferones humanos se agrupan dentro de tres clases basadas en su origen celular y antigenicidad: α -interferón (leucocitos), β -interferón (fibroblastos) y γ -interferón (células B). Se han desarrollado y están disponibles comercialmente las formas recombinantes de cada grupo. Los subtipos en cada grupo se basan en las características estructurales/antigénicas. Se han identificado al menos 24 interferones alfas (agrupados en subtipos de la A a la H) que tienen secuencias de aminoácidos distintas aislando y secuenciando ADN que codifica estos péptidos. Véase también Viscomi, 1996 *Biotherapy* 10:59-86. Los términos "interferón- α ", "alfa interferón", "interferón alfa" e "interferón de leucocitos humanos" se usa intercambiamente en esta aplicación para describir los miembros de este grupo. Se pueden usar en la práctica de la invención ambos interferones- α recombinantes que se dan en la naturaleza, incluyendo el interferón consenso tal como aquel descrito en la Patente de Estados Unidos número 4.897.471.

La purificación del interferón alfa a partir de leucocitos humanos aislados a partir de la fracción de la capa leucocitaria de sangre completa se describe en la Patente de los Estados Unidos número 4.503.035. El interferón de leucocitos humanos preparado de esta forma contiene una mezcla de interferones de leucocitos humanos que tienen secuencias de aminoácidos diferentes. Se pueden usar α -interferones humanos naturales purificados y mezclas de los mismos los cuales se pueden usar en la práctica de la invención incluyendo pero no limitados a interferón alfa-n1 Sumiferon® disponible de Sumitomo, Japón, alfa-n1 interferón Wellferon® (Ins) disponible de Glaxo-Wellcome Ltd., Londres, Gran Bretaña, e interferón alfa-n3 Alferon® disponible de la Purdue Frederick Co., Norwalk, CT.

La llegada de la tecnología de ADN recombinante aplicada a la producción del interferón ha permitido que diversos interferones humanos se sinteticen con éxito, permitiendo de este modo la fermentación, producción, aislamiento y purificación a gran escala de diversos interferones hasta homogeneidad. El interferón producido recombinantemente retiene sus actividades antivirales e inmunomodulatorias *in vitro* e *in vivo*. También se entiende que las técnicas de recombinación también podrían incluir un sitio de glicosilación para la adición de un resto de carbohidrato en el polipéptido recombinantemente derivado.

La construcción de plásmidos de ADN recombinante que contienen secuencias que codifican al menos parte de interferón de leucocitos humanos y la expresión en *E. coli*. de un polipéptido que tiene actividad inmunológica o biológica de interferón de leucocitos humanos se describe en la Patente de Estados Unidos número 4.530.901 y la Patente Europea número EP 0 032 134.

La construcción de genes de interferón- α híbridos que contiene combinaciones de diferentes subtipos de secuencias (por ejemplo, A y D, A y B, A y F) se describe en las Patentes de los Estados Unidos números 4.414.150, 4.456.748 y 4.678.751. Los interferones- α recombinantes adecuados típicos que se pueden usar en la práctica de la invención incluyen pero no se limitan a interferón alfa-2b tal como Intron® A disponible de Schering Corporation, Kenilworth, N.J., interferón alfa-2a tal como Roferon® A disponible de Hoffmann-La Roche, Nutley, N.J., e Infergen® disponible de Amgen, Thousand Oaks, CA.

Realizaciones alternas, donde el IFN- α precedente no es completamente autólogo, se pueden usar también si se desea. Una clave, sin embargo, es que el IFN- α no autólogo tiene suficiente bioactividad o efecto de IFN- α tal como una actividad antiviral en el mamífero objetivo. Otras sustancias que incluyen fracciones IFN- α o polipéptidos predecesores también se pueden en los conjugados de la presente invención. Como se usa en el presente documento, "efecto de IFN- α en los mamíferos" significa actividad *in vivo* correspondiente a aquello observado con IFN- α . Estas sustancias se preparan usando técnicas conocidas por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica tal como cultivo de tejido, extracción a partir de fuentes animales o mediante metodologías de ADN recombinante. También se contemplan fuentes transgénicas de IFN- α y restos relacionados. Tales materiales se obtienen a partir de animales transgénicos, por ejemplo ratones, cerdos, vacas, etc. donde la proteína IFN- α se expresa en leche, sangre u otros tejidos. El procedimiento por el cual el IFN- α se prepara para los conjugados de la presente invención no se limita a aquellos descritos en el presente documento. Para propósitos de la presente invención, se prefieren los IFN- α debido a sus propiedades bioquímicas y serológicas. En particular, IFN- α ha documentado en propiedades antivíricas y se difunde más efectivamente en el torrente sanguíneo que otros interferones.

3. Polímeros no-antigénicos

Para conjugar la proteína a polímeros tales como poli(óxidos de alquileo), uno de los grupos finales hidroxilo de polímeros se convierte en un grupo funcional reactivo el cual permite la conjugación. Este procedimiento se refiere frecuentemente como "activación" y el producto se denomina polímero "activado" o poli(óxido de alquileo) activado. Otros polímeros sustancialmente no antigénicos se "activan" o funcionalizan de forma similar.

De acuerdo con la presente invención, los polímeros activados se hacen reaccionar con una proteína tal como IFN- α tal que tenga lugar la unión del polímero preferiblemente en grupos amino en histidinas, y, a una menor extensión, en grupos ϵ -amino de lisinas y en el grupo amino N-terminal. Grupos de ácidos carboxílicos libres, grupos carbonilo activados de manera adecuada, restos de carbohidrato oxidados y grupos mercapto si están disponibles en la proteína se pueden usar también como sitios de unión suplementarios, si se desea.

En un aspecto preferido de la invención, los ligandos de uretano (carbamato) se forman preferiblemente entre un residuo del grupo amino de histidina de la proteína y el polímero activado. En un aspecto preferido de la invención, el polímero activado es un polímero activado de carbonato de benzotriazol tal como aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos número 5.650.234. En un aspecto alternativo, el ligando de uretano se forma usando un grupo oxicarbonil-oxi-N-dicarboximida terminal tal como un grupo carbonato de succinimidilo. Grupos activadores alternativos incluyen N-succinimida, N-ftalimida, N-glutarimida, N-tetrahidroftalimida y N-norboreno-2,3-dicarbóxido. Estos grupos formadores de uretano se describen en la Patente de los Estados Unidos número 5.122.614.

Cuando se usaron como una parte de la invención, estos polímeros activados preferidos permiten al trabajador formar una pluralidad de conjugados de proteína-polímero que pueden o no pueden incluir el espectro entero de isómeros de posición. La colección agregada de conjugados formada en la reacción basada en la solución, sin embargo, contendrá una parte significativa de los conjugados los cuales que incluyen la hebra de polímero unida covalentemente por un residuo de histidina en la proteína diana, es decir, interferón alfa, con cantidades menores de hebras de polímeros unidas a residuo de lisina o unidos a extremo N-terminal.

ES 2 280 107 T3

Entre los polímeros sustancialmente no antigénicos, se prefieren mono-activados, óxidos de polialquileno alcoxi terminados (PAO), tales como polietilenglicoles monometoxi terminados (mPEG); los óxidos de polietileno bis-activados (glicoles) también se contemplan para propósitos de proteínas de reticulación o para proporcionar un medio para unir otros restos tales como agentes diana para localizar el conjugado de proteína-polímero en un área particular tal como, por ejemplo, el hígado.

Los polímeros adecuados variarán sustancialmente en peso. Los polímeros que tienen pesos promedio en número molecular que varían desde aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000 se seleccionan usualmente para propósitos de la presente invención. Se prefieren pesos moleculares desde aproximadamente 1.000 a aproximadamente 25.000 y en particular se prefieren de 2.000 a aproximadamente 20.000.

Las sustancias polímeras incluidas son también preferiblemente solubles en agua a temperatura ambiente. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye homopolímeros de óxidos de polialquilenos tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros del mismo y copolímeros de bloque del mismo, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloque. Además de mPEG, también son útiles los polímeros de alquilo C₁₋₄ terminales.

Se pueden usar como una alternativa a los polímeros basados en PAO, materiales efectivamente no antigénicos tales como dextrano, polivinilpirrolidonas, poli(acrilamidas) tales como hidroxipropilmetacrilamidas-HPMA, alcoholes de polivinilo, polímeros basados en carbohidratos, copolímeros de los precedentes, y similares. Aquellos de habilidad normal en la técnica se darán cuenta de que la lista precedente es meramente ilustrativa y que se contemplan todos los materiales polímeros que tienen las cualidades descritas en el presente documento. Para propósitos de la presente invención, "no-antigénico sustancialmente o efectivamente" quiere decir que todos los materiales se entienden en la técnica que son no tóxicos y que no provocan una respuesta inmunógena apreciable en mamíferos.

4. Condiciones de reacción

Las reacciones de conjugación, algunas veces referidas como reacciones de PEGilación, a menudo se llevan a cabo en solución sin tomar en consideración donde el polímero se unirá a la proteína. Tales técnicas también se llevan a cabo usualmente a pHs ligeramente alcalinos, es decir, pH 7 + a aproximadamente 9 para conjugar IFN- α . Una clave de la presente invención, sin embargo, es que en ciertos casos, tales como con IFN- α , la bioactividad de la proteína retenida puede ser maximizada si una hebra de polímero simple se une a una histidina más una lisina o al N-terminal. En el caso de los IFN- α , y de IFN- α 2b en particular, el punto de unión preferido es His34. Se apreciará por el trabajador que aunque varias especies del IFN- α pueden o no pueden tener una histidina en el aminoácido 34, las condiciones de la reacción sin embargo proporcionarían preferiblemente al menos algunos isómeros de posición que contengan un polímero unido por una histidina disponible. El trabajador también apreciará que para proteínas distintas de IFN- α , el residuo de histidina óptimo para la unión de polímero se determinará sin experimentación indebida.

Los procedimientos de la presente invención lo por tanto incluyen:

1) hacer reaccionar una solución que contenga una cantidad suficiente de una proteína tal como un interferón alfa con una cantidad suficiente de un polímero adecuadamente activado, tales polímeros de carbonato de benzotriazol activados o de oxicarbonil-oxi-N-dicarboximida activados bajo condiciones suficientes para facilitar la unión covalente de la proteína al polímero activado y formar una pluralidad de conjugados de proteína-polímero; y

2) separar sustancialmente los conjugados de proteína-polímero que contienen un polímero conjugado a un residuo de histidina de la proteína desde la pluralidad de los conjugados de proteína-polímero restantes.

En aspectos preferidos cuando la proteína es IFN- α -2b, las composiciones sustancialmente puras contienen sustancialmente un polímero conjugado a la His34 de la IFN- α -2b.

La reacción se lleva a un pH el cual es suficiente para facilitar la unión covalente de al menos una parte de las hebras del polímero a una histidina encontrada en la proteína diana. En particular, el pH es preferiblemente ligeramente ácido, es decir, menos que aproximadamente 7,0; más preferiblemente, menos que aproximadamente 6,8 y más preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,8.

Las condiciones de reacción para efectuar la conjugación incluyen además la conducción de la reacción de unión con desde aproximadamente equimolar a aproximadamente un pequeño exceso molar relativamente del polímero activado con respecto a la proteína. En esta consideración, el procedimiento se puede llevar a cabo con aproximadamente 1-25 veces el exceso molar de polímero; preferiblemente aproximadamente 1,5-7 veces el exceso molar de polímero y lo más preferible aproximadamente 1,75-5 el exceso molar de polímero. Se entendería que, dependiendo de las preferencias del trabajador, el polímero activado se puede añadir como un sólido o en solución a la proteína diana. La reacción de conjugación se puede llevar a cabo a lo largo de un relativamente amplio intervalo de temperatura, por ejemplo aproximadamente 0-25°C. El tiempo de reacción también variaría de acuerdo con la preferencia del trabajador y puede variar desde menos de una hora a veinticuatro horas o incluso más largo, dependiendo del polímero activado seleccionado. La inactivación de la reacción es opcional. Estas condiciones de reacción proporcionan una mezcla de isómeros de posición de proteína-polímero que cuentan de modo inesperado con cantidades relativamente altas de isómeros de posición His. Preferiblemente, cada isómero contiene una hebra de polímero sencilla unida a la

proteína mediante un residuo de aminoácido. En realizaciones alternativas, puede haber más de una hebra de polímero unida como resultado del procedimiento de conjugación. Las soluciones que contienen estos conjugados de polímero también son útiles como se procesa o se puede procesar adicionalmente para separar los conjugados en las bases del peso molecular para obtener conjugados mono-polímero.

5

5. Aislamiento de conjugados mono-peg

Aunque el procedimiento de la invención produce una cantidad sustancial de conjugados que tienen una hebra de polímero única, conjugados que tienen grados que varían de la sustitución del óxido de polialquileño y así también se genera el peso molecular. También pueden estar presentes PAO no conjugados residuales y proteínas. Esta mezcla normalmente está en una reacción tampón que contiene uno o más de aniones fosfato, cloruro y bicarbonato. Preferiblemente se fraccionan el PAO, la proteína y la mezcla conjugada en una solución tampón que contiene desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/ml de conjugados de proteína. Soluciones de fraccionamiento adecuadas tienen un pH de desde aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0 y preferiblemente desde aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5. Las soluciones preferiblemente contienen una o más sales tamponadas seleccionadas de KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaHCO₃, NaBO₄, (NH₄)₂CO₃ y NaOH de glicina. Se prefieren tampones de fosfato de sodio.

10

15

Dependiendo del tampón de reacción, el conjugado proteína-polímero contiene una solución que puede primero tiene que sufrir un tampón de intercambio/ultrafiltración. Por ejemplo, las soluciones conjugadas IFN- α pueden ultrafiltrarse a través de una membrana de corte peso molecular bajo (10.000 a 30.000 Dalton) que también elimina más tensioactivo, si está presente, también.

20

La división de los conjugados en las especies deseadas basadas en el peso se lleva a cabo usando preferiblemente un medio de intercambio de aniones. Tales medios son capaces de unir selectivamente aquellos conjugados de proteína-polímero que tengan un polímero en exceso y proteína no modificada predeterminados, es decir una o más hebras de polímero. Este fraccionamiento tiene lugar partiendo de que las moléculas de proteínas de diversos grados de sustitución tendrán puntos isoeléctricos los cuales varían en un modo algo predecible. Por ejemplo, el punto isoeléctrico de proteínas se determina por el número disponible de grupos amino disponible en la superficie de la proteína. Estos grupos amino también sirven como el punto de unión de conjugados de óxido polialquileño. Por lo tanto, como el grado de sustitución del óxido de polialquileño aumenta, el punto isoeléctrico disminuye y la capacidad del conjugado para unirse a una resina de intercambio aniónico se debilita. La HPLC de filtración de gel también se puede usar para eliminar los conjugados de peso molecular más alto (de multihebra).

25

30

El uso de resinas de intercambio aniónico fuertemente polares se prefieren especialmente para el procedimiento de la presente invención. Por esta razón, se utilizan las resinas de intercambio aniónico recubiertas de amina cuaternaria. La resina de amina cuaternaria se puede recubrir en una matriz polimérica o de sílice; sin embargo se prefieren las matrices poliméricas. Un número de tetrametilamina, o metilamina cuaternaria, resinas de intercambio iónico están disponibles comercialmente, recubriendo las matrices de apoyo. Entre las se incluyen las resinas de intercambio aniónico cuaternarias comercialmente disponibles adecuadas para usar con la presente invención están Q-HD disponible de BioSeptra, QMA TRISACRYL[®] y QMA-SPHEROSIL[®], resinas de amina cuaternaria recubriendo una matriz de polímero, fabricadas por IBF de Garenne, Francia, por Sepracor, Inc. de Marlborough, Massachussets; TMAE650M[®], una resina de etiltetrametilamino recubriendo una matriz polimérica, fabricada por EM-Separators of Gibbstown, Nueva Jersey; se pueden usar también QAE550C[®] y SUPERQC[®], cada una de ellas una resina de amina cuaternaria recubriendo una matriz de polímero y fabricada por TosoHaas of Montgomeryville, PA. QMA Accell, fabricado por Millipore of Millford, MA y resinas PEI fabricadas por JT Baker of Phillipsburg, NJ.

35

40

45

La resina de intercambio iónico se empaqueta en la columna y se equilibra por medios convencionales. Se usa un tampón que tiene el mismo pH y osmolalidad que la solución de proteína conjugada. La solución que contiene el conjugado luego se adsorbe en la columna. A la finalización de la carga, un flujo de gradiente de un tampón de elución con aumento de las concentraciones de la sal se aplica a la columna para eluir las fracciones deseadas de proteína conjugadas con óxido de polialquileño. Las fracciones son esencialmente de peso molecular uniforme y grado de sustitución uniforme. La separación de diversos isómeros de posición, sin embargo, no se efectúa durante este tipo de separación.

55

Dependiendo de la proteína, las fracciones conjugadas preferidas tienen de 1-4 hebras de polímero por molécula de proteína. Más preferiblemente, la fracción contiene aproximadamente 1-2 y, más preferiblemente, aproximadamente 1 hebra de polímero por molécula de proteína. El tampón de elución contiene preferiblemente uno o más sales seleccionadas de KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄ y (NH₄)₂CO₃. Estas fracciones están sustancialmente libres de otros conjugados. Cualquier especie no conjugada luego se puede volver a lavar desde la columna mediante técnicas convencionales.

60

También se puede usar técnicas utilizando múltiples etapas isocráticas para aumentar la concentración. Las etapas múltiples de elución isocráticas para aumentar la concentración resultarían en la elución secuencial de los conjugados proteína-polímero. El grado de conjugación del polímero dentro de cada fracción sería uniforme sustancialmente. Sin embargo, el grado de conjugación del polímero por cada fracción disminuirá con el tiempo de elección. La purificación del intercambio iónico de los conjugados también se lleva a cabo con, por ejemplo, una columna Q-HD desde BioSeptra, Inc. junto con una solución de fosfato de sodio diluido. Por ejemplo, muestras que contienen muestras de

65

ES 2 280 107 T3

PEG-IFN se lavan con NaPO₄ 10 mM para eliminar cualquier PAO que no ha reaccionado y a partir de entonces se usa una etapa de elución del gradiente con NaCl. La elución con NaCl 10 mM recupera las fracciones que contienen conjugados con más de 3 hebras de polímero PAO por IFN; la elución con 50 mM NaCl recupera conjugados que contienen de 1-2 hebras; la elución con 150 mM NaCl recupera el IFN no modificado.

El intervalo de temperatura para la elución está entre aproximadamente 4°C y aproximadamente 25°C. Preferiblemente, la elución se lleva a cabo a una temperatura desde aproximadamente 6°C a aproximadamente 22°C. La elución de la fracción PAO-IFN- α se detecta mediante la absorbancia de UV a 254 nm. La recolección de la fracción se puede lograr a través de perfiles del tiempo de elución simples. Otros conjugados de proteína se eluyen de manera similar.

6. Separación de los isómeros de posición

De acuerdo con el procedimiento, los isómeros de posición de la proteína-polímero seleccionados están sustancialmente separados de la mezcla de la reacción, preferiblemente después los conjugados mono-polímeros se han separado a partir de otros reactivos. Debido a la naturaleza de las reacciones de conjugación basadas en la solución, los conjugados son una mezcla heterogénea de especies que contienen las hebras de polímero unidos a diferentes sitios en la proteína. En cualquier solución o mezcla de reacción que contiene los conjugados, es probable que sustancialmente esté presente el espectro entero de isómeros de posición. En el caso de IFN- α -2b, las soluciones que contienen conjugados preferidas contienen conjugados en los que el polímero se une a uno de tres residuos de histidina disponibles, tales como His34 y opcionalmente a uno o más de Cys1, Lys31, Lys49, Lys83, Lys121, Lys131 y Lys134 del interferón alfa-2b. Cuando se emplean las condiciones de reacción y los polímeros activados descritos en el presente documento, la unión del polímero a un residuo de His en un interferón alfa 2b es al menos aproximadamente el 50% del total de la mezcla de la reacción, preferiblemente al menos aproximadamente el 75% y más preferiblemente al menos aproximadamente el 85% de los conjugados en la mezcla de reacción. Por ejemplo, cuando se usa BTC-activado mPEG para formar conjugados IFN- α -2b, aproximadamente el 90% de los conjugados formados eran isómeros de posición IFN-His-PEG. También se han encontrado cantidades menores de otros isómeros de posición. Se entendería que el IFN alternativo tan bien como otras proteínas proporcionará distribuciones alternativas de los isómeros de posición, dependiendo de la secuencia de aminoácido del material de partida.

Los solicitantes han determinado que dentro del espectro de los isómeros de posición para cualquier conjugado de proteína, diferirá la actividad biológica de los isómeros de posición individuales. Mientras que los solicitantes no se limitan a la teoría, se cree que las diferencias en la actividad para los diversos isómeros de posición no son generalmente predecibles. En vista de esta determinación, los procedimientos de la presente invención permiten al trabajador determinar cuales isómeros proporcionan altas cantidades de isómeros de posición particular y cual medio para aislar los isómeros de posición particular a partir de la mezcla de reacción es altamente deseable.

La separación de los isómeros de posición His deseados u otros isómeros de posición a partir del espectro de conjugados se pueden efectuar mediante procedimientos tales como cromatografía de intercambio iónico. Para los propósitos de la presente invención, el intercambio iónico incluye el intercambio catiónico y/o aniónico. El procedimiento de la conjugación conduce a la formación de diversos resultados de isómeros de posición en los isómeros de posición individuales que se forman teniendo diferentes distribuciones de carga. La diferencia en las distribuciones de carga luego se puede usar para resolver (recuperar) cualquier isómero de posición deseado usando cromatografía de intercambio iónico (es decir, catiónico y/o aniónico). Por ejemplo, previamente a la separación, el espectro de diversos isómeros de posición que resulta a partir de la reacción de conjugación se coloca en una solución reguladora que contiene desde aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 10% de conjugados en peso. Se prefieren las soluciones reguladoras que contienen una o más sales reguladoras seleccionadas a partir de la lista no limitante de KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄, (NH₄)₂CO₃ y reguladores de NaOH de glicina para usar en la presente invención. Las condiciones de elución dependerían, por supuesto, de la necesidad de los trabajadores y el movimiento del isómero de posición.

Generalmente se siguen las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución convencionales. Uno de tales aparatos para efectuar la separación deseada es un sistema de HPLC que comprende una columna de intercambio catiónico Mini-S, disponible a partir de Pharmacia Biotech. Será patente para aquellos de habilidad normal que el aparato alternativo y las columnas como un sistema de HPLC que comprende una columna SP-5PW, disponible de Toso Haas, se usará también para lograr la separación deseada. Una lista no limitante de resinas adecuadas para llevar a cabo la separación incluye las resinas de intercambio catiónico o aniónico tales como Sefarosa SP y CM, Q o DEAE (de Pharmacia) y Sefarosa CM, Q-Hyper D de BioSeptra.

Como un ejemplo ilustrativo, una composición que contiene conjugados de polímeros His I IFN- α -2b sustancialmente puros, es decir $\geq 90\%$, se puede aislar a partir de conjugados de polímero IFN en una mezcla de reacción usando columnas de cromatografía tales como filtración de gel seguida por el intercambio catiónico o intercambio aniónico seguido por intercambio catiónico. Dichas técnicas proporcionan una composición que contiene al menos aproximadamente el 85% de conjugados de polímero His34 IFN- α -2b y preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de conjugados de polímero His34 IFN- α -2b. El porcentaje restante de las composiciones incluirá otros isómeros de posición que no restan mérito apreciablemente de la efectividad terapéutica del isómero de posición deseado sustancialmente puro. Otros isómeros de posición de interferón u otras proteínas se aíslan de manera similar. Para otros conjugados de proteína se usa una técnica de separación parecida. También se entenderá a partir de lo anterior que las técnicas de separación de gradiente lineales y/o de etapa también son útiles en obtener los conjugados correspondien-

tes a un pico particular. Además, los conjugados asociados con cada uno de los picos se pueden aislar de este modo, si se desea. Si es necesario, las fracciones recogidas se pueden volver a inyectar en el aparato de cromatografía con la misma relación de volumen de alimentación a volumen del lecho de la columna para aumentar la pureza de la fracción recogida. Los isómeros de posición sustancialmente puros se pueden someter a una secuencia de péptido con el fin de determinar el residuo de amino ácido modificado.

Como un ejemplo adicional de las técnicas descritas anteriormente, los correspondientes conjugados de polímero I IFN- α -2b para picos particulares se pueden recuperar usando una resina de intercambio catiónico tal como mini-S en un sistema de HPLC. Cada pico se purifica en el sistema de cromatografía de intercambio catiónico usando un gradiente lineal (A- acetato de sodio 40 mM, B- acetato de sodio 40 mM, NaCl 100mM) a pH 4,7 a 5,3, longitud de onda de 214 nanómetros. Las técnicas que usan múltiples etapas isocráticas de aumento de concentración del tampón de elución, tal como se discute anteriormente, para los propósitos de recuperación los conjugados de monolímeros también se pueden adaptar para la recuperación de los conjugados deseados correspondientes a un pico particular.

7. Efecto del pH de reacción en la distribución del isómero de posición

El procedimiento de la presente invención toma ventaja del descubrimiento que el sitio de unión del polímero la mayoría de proteínas está influido en gran medida por el pH del sistema de reacción. Como el pH de la solución de reacción varía, la reactividad hacia formas específicas de polímeros activados de los diversos grupos funcionales tales como alfa-aminas, imidazoles y aminos épsilon variarán. Típicamente, las reacciones de conjugación del polímero se llevan a cabo a pHs básicos con el fin de maximizar la unión a grupos amino epsilon de lisina. Por ejemplo, Zalipsky y col. *Biotech. & App. Biochem*, Vol. 15, p.100-114; (1992) evaluó el reactivo SC-PEG para la pegilación e informó de que la reactividad óptima estaba aproximadamente a pH 9,3. El procedimiento de la presente invención, sin embargo, incluye conducir la reacción a pHs significativamente más bajos con el fin de permitir unir una parte sustancial de las hebras de polímero activado a los grupos amino histidina y quitar importancia, pero no eliminar, los sitios de unión de lisina y el extremo N-terminal.

También se determina de modo inesperado que la distribución relativa de los isómeros de posición es, en gran parte dependiente del pH al cual se lleva a cabo la reacción de conjugación. Por ejemplo, cambiar el pH de básico a ligeramente ácido (aproximadamente de 4,5 a 6,8) favorece la formación de conjugados unidos a His34 en IFN- α 2b y en una menor extensión, al extremo N-terminal (Cysl) y los residuos de lisina. Usar pH (8-10) durante la reacción de conjugación, por el contrario, favorece la formación de sitios de unión relacionados con lisina, confirmado mediante cromatografía de intercambio catiónico. Por supuesto, cuando no se incluye IFN- α 2b, el residuo de His será diferente. Las condiciones de reacción sin embargo permiten la unión covalente de un polímero activado a una His.

8. Parámetros de farmacocinética

Según lo señalado anteriormente, las composiciones preferidas de la presente invención no contienen una mezcla heterogénea de especies de polímero-IFN en la cual la(s) hebra(s) de polímero este(n) unidas a diferentes sitios en la molécula de interferón. Así, las composiciones tienen perfiles de farmacocinética y bioactividad *in vivo* predecibles los cuales maximizan el efecto terapéutico de la proteína conjugada.

En el caso de IFN- α , algunas composiciones preferidas son isómeros de posición PEG-His34-IFN sustancialmente puros. Las composiciones retienen al menos aproximadamente el 20%, preferiblemente al menos aproximadamente el 35% y más preferiblemente al menos aproximadamente el 50% de la bioactividad de la proteína no modificada. Se entenderá que la cantidad de actividad retenida y la duración de la vida circulante dependerán de varios factores incluyendo la proteína y el número y peso de las hebras de polímero unidas a la proteína.

9. Procedimientos de tratamiento

La presente invención permite los procedimientos de tratamiento de diversas afecciones médicas en mamíferos, preferiblemente humanos. Los procedimientos incluyen administrar una cantidad efectiva de un conjugado de proteína-polímero que se ha preparado como se describe en el presente documento a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento. Los conjugados son útiles para, entre otras cosas, tratar afecciones que se tratan con la proteína no modificada. Por ejemplo, mamíferos en necesidad de terapia de sustitución de enzima o factores de sangre pueden estar dando conjugados de polímeros sustancialmente puros que contienen el material deseado. En el caso del interferón alfa, afecciones susceptibles a interferón o afecciones las cuales responderían positivamente o favorablemente según estos términos se conocen en las técnicas médicas a terapia basada en interferón.

Las afecciones que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención son generalmente aquellas que son susceptibles para el tratamiento con interferón alfa. Por ejemplo, las afecciones susceptibles incluyen afecciones que responderían positivamente o favorablemente según se conocen estos términos en las técnicas médicas a terapia basada en interferón alfa. Para propósitos de la invención, las afecciones que se pueden tratar con la terapia de interferón alfa incluyen aquellas afecciones en las cuales el tratamiento con un interferón alfa muestra alguna eficacia, pero las cuales no pueden ser tratables con interferón alfa porque los efectos secundarios negativos son mayores que los beneficios del tratamiento. Por ejemplo, los efectos secundarios que acompañan la terapia alfa han descartado virtualmente el tratamiento del virus Epstein Barr usando interferón alfa. La práctica de la invención resulta en los efectos secundarios sustancialmente eliminada o reducida comparada con el tratamiento de interferón alfa convencional.

Las afecciones ejemplares las cuales se pueden tratar con interferón incluyen aunque no se limitan a trastornos de proliferación celular, en particular el cáncer (por ejemplo, leucemia de células velludas, sarcoma de Kaposi, leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple, carcinoma de célula basal y melanoma maligno, cáncer de ovario, linfoma de célula T cutánea), e infecciones virales. Sin limitación, el tratamiento con interferón se puede usar para tratar afecciones las cuales se beneficiarían a partir de inhibir la replicación de los virus sensibles a interferón. Las infecciones víricas las cuales se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otras hepatitis no A/no B, virus del herpes, virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpes simplex, virus del herpes humano de tipo 6 (HHV-6)), papiloma, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus linfotrópico T humano tipo 1 y tipo 2 (HTLV-1/-2), rotavirus humano, rabia, retrovirus que incluyen el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), encefalitis e infecciones virales respiratorias. El procedimiento implantado mediante medios de la invención también puede usarse para modificar diversas respuestas inmunes.

Las variantes de interferón alfa actualmente están aprobadas en los Estados Unidos y otros países para el tratamiento de la leucemia de células velludas, verrugas venéreas, Sarcoma de Kaposi y hepatitis crónica no A/no B; interferón alfa-2b, comercializado bajo el nombre comercial INTRON® A (Schering Corporation, Kenilworth N.J.), e interferón alfa-2a comercializado bajo el nombre comercial Roferon® A (Hoffmann-La Roche, Nutley, N.J.) y el interferón consenso comercializado bajo el nombre comercial Infergen™ (Amgen, Thousand Oaks, CA). Dado que el interferón alfa-2b, entre todos los interferones, tiene la aprobación más amplia por todo el mundo para tratar la infección de hepatitis C crónica, es el más preferido para usar en el tratamiento de hepatitis C crónica de acuerdo con las composiciones de la invención.

La administración de las dosificaciones descritas puede ser en días alternos, pero es preferible una o dos veces por semana. Las dosis son normalmente administradas durante al menos un periodo de 24 semanas por inyección.

La administración de la dosis puede ser intravenosa, subcutánea, intramuscular o cualquier otro procedimiento sistémico aceptable. En base al criterio del clínico a cargo, la cantidad de fármaco administrado y el régimen de tratamiento usado será, por supuesto, dependiente de la edad, el sexo y el historial médico del paciente que se trata, el recuento de neutrófilos (por ejemplo la gravedad de la neutropenia), la gravedad de la afección de la enfermedad específica y la tolerancia del paciente al tratamiento como se evidencie mediante efectos secundarios de toxicidad local o efectos secundarios sistémicos. La cantidad de dosificación y frecuencia se puede determinar durante los rastreos iniciales de recuento de neutrófilos.

Las formulaciones farmacéuticas convencionales también se pueden preparar usando los conjugados sustancialmente puros que contienen composiciones de la presente invención. Las formulaciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición del conjugado de polímero interferón sustancialmente puro junto con los vehículos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, coadyuvantes, diluyentes, conservantes y/o solubilizantes, si es necesario, se pueden usar. Composiciones farmacéuticas de interferón que incluyen aquellas de la presente invención pueden incluir diluyentes de varios tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) que tienen un intervalo de pH y fuerza iónica, vehículos (por ejemplo, seroalbumina humana), solubilizantes (por ejemplo, tween, polisorbato) y conservantes (por ejemplo, timerosol, alcohol bencílico). Véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 4.496.537.

La cantidad de conjugado de polímero IFN- α sustancialmente puro administrada para tratar las afecciones descrita anteriormente se basa en la actividad por IFN del conjugado polimérico. Es una cantidad que es suficiente para afectar significativamente la respuesta clínica positiva. Aunque la dosis clínica causará algún nivel de los efectos secundarios en algunos pacientes, la dosis máxima para mamíferos incluyendo seres humanos es la dosis más alta que no causa efectos secundarios clínicamente importantes inmanejables. Para los propósitos de la presente invención, tales efectos secundarios clínicamente importantes son aquellos que requerirían el cese de la terapia debida a síntomas similares a los de una gripe graves, depresión del sistema nervioso central, trastornos gastrointestinales graves, alopecia, prurito grave, erupción cutánea. También son limitantes de dosis las anormalidades enzimáticas de leucocitos y/o eritrocitos y/o hígado o afecciones similares a anemia.

Naturalmente, las dosificaciones de las diversas dosificaciones de IFN- α variarán algo dependiendo del resto de IFN- α y del polímero seleccionado. En general, sin embargo, el conjugado se administra en cantidades que varían desde aproximadamente 100.000 a aproximadamente varios millones de IU/m² por día, en base a las afecciones de los mamíferos. El intervalo expuesto anteriormente es ilustrativo y aquellos expertos en la técnica determinarán la dosificación óptima del conjugado seleccionado en base a la experiencia clínica y a la indicación del tratamiento.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una solución, suspensión, comprimido, cápsula, polvo liofilizado o similar, preparado según los procedimientos ya conocidos en la técnica. También se contempla que la administración de tales composiciones será principalmente por vía parenteral aunque también se pueden usar vías oral o de inhalación dependiendo de las necesidades del trabajador.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para proporcionar apreciación adicional de la invención pero no significan de ningún modo restringir el ámbito efectivo de la invención.

Ejemplo 1

En este ejemplo, el interferón α -2b recombinante, (rIFN- α), un producto de la Schering Corporation, Kenilworth, Nueva Jersey se conjugó con carbonato de polietilenglicol-N-succinimidilo activado (SC-PEG), peso molecular 12.000 que se preparó tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos número 5.122.614. La reacción de conjugación se lleva a cabo a temperatura ambiente y a un pH de aproximadamente 6,5. Se usó una proporción de 2,6 gramos de SC-PEG_{12,000} a 1 gramo de IFN. El SC-PEG se añadió como un sólido y la reacción se llevó a cabo a una temperatura de aproximadamente 4°C. Al final de la reacción, se añadió glicina inactivando cualquier reactivo de PEGilación residual. El producto a partir de la reacción se purificó luego usando una resina Q-HyperD a pH 8 con elución de sal eliminando los ingredientes puros y las especies multi-PEGiladas. El mono-PEG-IFN recuperado a partir de la resina Q-HyperD fue aproximadamente un 55% del PEG-IFN unido por His-34, 20% unido al extremo N-terminal, 12% unido a lisina-121 con el equilibrio siendo Lys 131, Lys 1134, Lys 49 y Lys 83. Este material que contiene los diversos isómeros de posición se dializó luego frente a tampón de acetato 20 mM a pH 4,9 y cargado en una columna empaquetada con SP-Sefarosa de Alta Resolución equilibrada con tampón de acetato 10 mM a pH 4,9 (aproximadamente 4 mg de material para 4 ml de resina). El material se eluyó usando un gradiente de cloruro de sodio (0-500 mM) en el regulador de acetato. La figura 1 muestra el perfil de elución a partir de la columna. Se encontró que el pico 1 es PEG-IFN unido por His34 por encima del 90%.

Ejemplo 2

En este Ejemplo, el procedimiento de conjugación del Ejemplo 1 se repitió varias veces. La identificación de los diversos isómeros de posición, sin embargo, se determinó usando un intercambio aniónico seguido por intercambio catiónico.

Se empleó una columna de intercambio catiónico Mini-S (Pharmacia Biotech) usando un HPLC determinando los sitios de unión del polímero e identificando los isómeros de posición individuales. La fase móvil A incluye tampón de pH 5,3 de acetato de sodio 10 mM y 2-propanol 25%. La fase móvil B contenía cloruro de sodio 500 mM disuelto en fase móvil A. La velocidad de flujo se puso a 0,5 ml/min y la proteína eluida se detectó a 214 nm. Las soluciones individuales de PEG-IFN se diluyeron con acetato de sodio 10 mM de pH 5,3, que contenía 2-propanol (5%) a concentración de proteína de 1 mg/ml. Los volúmenes de inyección variaron desde 10 a 30 μ l, dependiendo de la concentración de proteína. Se usó el siguiente gradiente lineal:

Tiempo (min)	A(%)	B(%)
0	100	0
5	93	7
50	83	17
60	0	100
65	0	100
66	100	0
75	100	0

Los resultados se proporcionan en la Tabla 1 más abajo y se ilustran gráficamente en la figura 2. En referencia ahora a la figura, se puede ver que se determinó que el pico 3 era el componente principal. Además, la separación por cromatografía dio como resultado la recuperación de los picos principales de diferente intensidad. Se destacará, sin embargo que las especies individuales, es decir los isómeros de posición, no están totalmente separadas las unas de las otras en este sistema. Por ejemplo, la fracción incorporada en el pico 3 se determinó que contiene aproximadamente el isómero de posición His-34 al 90% y aproximadamente el 10% del isómero de posición Lys-31. El aislamiento y la recuperación de esta fracción dieron como resultado una composición que contenía un IFN- α -2b-His-34-PEG sustancialmente puro. Hay algún solapamiento en la elución del isómero de posición. Se puede ver, sin embargo, que el pico o la fracción 3 representaron aproximadamente el 50% del total de las especies de PEG-interferón.

ES 2 280 107 T3

TABLA 1

Cuantificación del porcentaje de área de los lotes PEG-IFN mediante cromatografía de intercambio iónico

Grupo	Pico 2	Pico 3/4	Pico 5	Pico 6	Pico 7 a	Pico 7 b	Pico 8
1	2,6	53,2	5,3	14,2	6,5	3,4	17,2
2	1,5	54,9	3,3	12,6	6,1	3,2	18,6
3	1,6	55,3	2,4	11,9	5,5	3,2	20,1
4	1,7	55,1	2,6	11,6	5,3	3,1	20,5
5	1,7	54,3	2,7	11,8	5,6	3,2	20,7
6	1,7	54,5	2,6	11,8	5,3	2,9	21,1
7	1,9	54,2	2,3	11,6	5,2	3,2	21,5

Principal pico asignado: Pico 2: PEG-IFN unido por Lys-134; Pico 3/4: PEG-IFN unido por His-34; Pico 6: PEG-IFN unido por Lys-121 y PEG-IFN unido por Lys-131; Pico 8: PEG-IFN unido por Cys-1.

Estos resultados ilustran que una mayoría de los conjugados se encontró en los picos 3 y 4 (PEG-IFN unido por His-34). Los resultados muestran también que al contrario de lo que se esperaba, la mayoría de los conjugados se formaron uniendo el polímero a una histidina más que a uno de los grupos amino de lisina.

Ejemplo 3

En este ejemplo, se identificaron los diversos isómeros de posición en el ejemplo 2 se recuperaron usando varios ciclos de un intercambio catiónico mono-S. Cada una de las fracciones de cromatografía recuperadas luego se probó por bioensayo de CPE (actividad antivírica). Más abajo la tabla 2 muestra la bioactividad relativa para interferón nativo (nativa= 100%).

TABLA 2

Bioactividad relativa (IFN)

Fracción de cromatografía #	Bioactividad relativa* (%)
IFN nativo	100
1	17,8
2	38,4
3	50,6
4	11,2
5	17,2
6	27,6
7	11,3
8	12,8
* Bioactividad tal como se determinó mediante el Bioensayo CPE	

Se puede ver a partir de la Tabla 2 que el sitio del isómero de posición de His34 (que también incluye una cantidad menor de Lys31) posee la bioactividad inherente más alta comparada con interferón nativo (51%). Así, las composiciones sustancialmente puras que contenían solamente esta fracción, que es principalmente el isómero de posición His-34, tienen ventajas sobre conjugados que contienen el espectro de los isómeros de posición.

ES 2 280 107 T3

Luego las fracciones se caracterizan usando un esquema de análisis de digestión enzimática usando Tripsina y Proteasa V-8 seguido por una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño limpiando. El material se sometió a análisis de secuencia de proteínas en el que la presencia del residuo aminoácido pegilado en el péptido interferón se dedujo por una vacante en la secuencia de proteína. El trabajo de caracterización reveló que el PEG se une a 8 sitios diferentes en la molécula de interferón- α -2b; Cys1, Lys31, His34, Lys49, Lys83, Lys121, Lys131 y Lys134. Los detalles se proporcionan a continuación.

TABLA 3

Fracción de cromatografía #	Sitio principal de pegilación
1	di-PEG?
2	Lys-134
3	Lys-31 y His34
4	Lys31
5	No determinado
6	Lys 121 y Lys 131
7	Lys 49, Lys83
8	Residuo de Cisteína/ Cys-1 N-terminal

Ejemplo 4

En este ejemplo, el procedimiento del Ejemplo 1 se repitió usando PEG activado con carbonato de benzotriazol (BTC-PEG) obtenido a partir de Shearwater Polymers, Inc. (peso molecular 12.000). En particular, el IFN- α -2b se hizo reaccionar con BTC-PEG usando una razón de 2,6 gramos de BTC por gramo de IFN. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas a una concentración de 2 mg de interferón/ml antes de ser inactivada con glicina. Se usó un total de 60 mg de IFN. La mezcla de reacción se dializó contra un regulador de gel de filtración que contenía un tampón de fosfato sódico 100 mM y cloruro sódico 150 mM, pH 5. Se cargaron 5 ml de material dializado en columna Superdex 200 de 200 ml equilibrada con el tampón de gel de filtración separando las especies mono-PEG a partir de las especies de multihebra.

Antes de llevar a cabo la caracterización de los diversos isómeros de posición, la mezcla de reacción mono-PEG-IFN se sometió a prueba de sensibilidad a hidroxilamina determinando el porcentaje de los conjugados que estaban pegilados en los sitios de histidina, incluyendo el IFN-His34. Se sabe que la hidroxilamina escinde selectivamente el PEG a partir de residuos de histidinas de IFN. Se diluyó una alícuota de cada una de las muestras (50 μ l) con 0,45 ml de fosfato de sodio de pH 7,0 10 mM. Una alícuota de esta solución de proteína (150 μ l) se trató con 150 μ l de hidroxilamina 0,5 M y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se determinó que más del 90% de los conjugados era hidroxilamina-sensitivo lo cual indica que sobre el 90% del material es interferón-PEG unido por His. La caracterización adicional de la mezcla de reacción verificó que el His34 era el único residuo conjugado de histidina. La cromatografía HPLC de la mezcla Superdex 200 indicó que efectivamente His34 era el sitio principal de pegilación. Esto se confirmó adicionalmente mediante caracterización del producto final usando un esquema de análisis de digestión enzimática similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 3 el cual indicó que el His34 era el sitio principal de pegilación. La actividad específica de este isómero de posición se encontró que era 89 MIU/mg.

Los conjugados IFN-His34-PEG sustancialmente puros también se recuperaron a partir de la mezcla de reacción BTC-PEG-IFN usando solamente un ciclo de cromatografía de intercambio catiónico. La mezcla de reacción se dializó en contra del tampón de acetato de sodio 40 mM a pH 5,1. Aproximadamente 3,2 ml de la mezcla de reacción dializada se cargaron en 4 ml de una columna SP-5PW y el pico His34-PEG-IFN se eluyó usando un gradiente de NaCl (0 a 500 mM) a pH 5,1. La pureza de His34-PEG-IFN de la mezcla del producto era al menos del 94%. Se determinó que el diPEG-IFN en la mezcla era aproximadamente del 3-5%.

Ejemplos 5-6

En estos ejemplos, el procedimiento del Ejemplo 4 se repitió usando BTC-PEG (peso molecular 5.000, Ej. 5. y 20.000, Ej. 6, respectivamente. La cantidad del interferón-His-PEG para el ejemplo 5 se determinó mediante la reacción de la hidroxilamina que era aproximadamente el 90-95% mientras que en el Ejemplo 6 se determinó que era aproximadamente el 91%. El aislamiento de los diversos isómeros de posición del PEG-IFN usando filtración de gel se llevó a cabo después eliminando los conjugados no mono hebrados. La actividad específica de los conjugados

ES 2 280 107 T3

de PEG_{5,000} se determinó que era aproximadamente 119 MIU/mg mientras que la actividad específica del isómero de posición PEG_{20,000}-His34 era 89 MIU/mg.

Ejemplo 7

5

En este ejemplo, las actividades biológicas de los isómeros de posición individuales (His34, Lys-121 y extremo N-terminal) identificados anteriormente se probaron después de la incubación en un suero humano normal a 37°C durante la subida a 72 horas y se compararon con interferón nativo no PEGilado. Los resultados se muestran en la figura 3.

10

En referencia ahora a la figura 3, se puede ver que inesperadamente sólo la actividad del isómero de posición His34 aumenta durante el tiempo mientras la actividad de los otros isómeros de posición permanece relativamente constante. El interferón nativo, por el contrario, demuestra un descenso predecible en la actividad durante el periodo de observación. Mientras los solicitantes no se enlazan por la teoría, el aumento en la actividad con el material unido por His34 se cree que está relacionado con la hidrólisis relativamente lenta del enlace His-PEG y la liberación subsiguiente de IFN libre. Esta figura muestra las propiedades únicas del enlace His-PEG en que bajo ciertas condiciones es más débil que los enlaces Lys-PEG y como tal su análisis proporciona un mecanismo de administración prolongado o de “liberación lenta”.

15

Ejemplos 8-9

20

Conjugados IL-10-PEG

25

En estos ejemplos, la proteína IL-10, un homodímero no covalente, se conjugó a BTC-PEG_{12,000} (Ej. 8) o SC-PEG_{12,000} (Ej. 9) a pH 6,5 con el fin de determinar el grado de isómeros de posición unidos a histidina en la mezcla de reacción resultante. El IL-10 tiene 3 histidinas disponibles.

30

Los procedimientos de pegilación descritos anteriormente con respecto a IFN se siguieron con el fin de llevar a cabo la conjugación. En particular, sin embargo, en cada caso se usó un exceso molar de 2-3 veces del polímero activado y la filtración de gel. La prueba de sensibilidad de hidroxilamina se hizo en cada lote determinando la cantidad de isómeros de posición que contienen His. El conjugado basado en BTC se encontró que contenía aproximadamente 50% más de conjugados lábiles por hidroxilamina que de conjugados basados en SC. La bioactividad específica de los conjugados basados en BTC se determinó que era aproximadamente el 84% usando el bioensayo de MC-9. Se encontró que los conjugados basados en SC-PEG tenían una bioactividad específica de aproximadamente el 49%.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de conjugado de proteína-polímero que comprende una mezcla de isómeros de posición de un conjugado de proteína de polímero, en la que una mayoría de los conjugados tiene el polímero conjugado covalentemente a la proteína en un residuo de histidina y una minoría son otros isómeros de posición.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho polímero comprende un óxido de polialquileno.
- 10 3. La composición de la reivindicación 2, en la que dicho óxido de polialquileno es un polietilenglicol.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho polietilenglicol es un monometoxi-poli(etilenglicol) (mPEG).
- 15 5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho polímero tiene un peso molecular desde 200 a 35.000.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho polímero tiene un peso molecular desde 1,000 a 25,000.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho polímero tiene un peso molecular desde 2.000 a 20.000.
- 20 8. La composición de la reivindicación 1, en la que al menos el 60% de los conjugados tienen el polímero conjugado covalentemente en la proteína a un residuo de histidina.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que al menos el 80% de los conjugados tiene el conjugado covalentemente del polímero en la proteína a un residuo de histidina.
- 25 10. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha proteína es un interferón alfa o IL-10.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicho interferón alfa es interferón alfa 2b.
- 30 12. La composición de la reivindicación 10, en la que al menos el 85% de los conjugados tiene el conjugado del polímero covalentemente al residuo de histidina en la posición 34 de interferón alfa 2b.
13. Una composición farmacéutica comprende una composición tal como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 14. Un procedimiento de preparación de una composición conjugado de polímero-proteína, que comprende:
- a) formar una mezcla de isómeros de posición de un conjugado de proteína-polímero mediante reacción de una proteína con una cantidad suficiente de un polímero activado bajo condiciones suficientes para facilitar la unión covalente de dicha proteína a dicho polímero activado; y
- 40 b) separar un conjugado de polímero proteína que tiene el polímero conjugado covalentemente a una histidina de la proteína a partir de otros isómeros de posición para obtener una composición en la que una mayoría de los conjugados son otros isómeros de posición.
- 45 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha proteína es un interferón alfa o IL-10.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicho polímero activado es polímero de carbonato de benzotriazol activado.
- 50 17. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicho polímero activado es un polímero oxicarbonil-oxi-N-dicarboximida activado.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho oxicarbonil-oci-N-dicarboximida es carbonato succinimidilo.
- 55 19. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha separación se efectúa por cromatografía de filtración de gel seguido por cromatografía de intercambio iónico.
- 60 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio aniónico.
21. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha separación se efectúa mediante la cromatografía seguida por cromatografía de intercambio catiónico.
- 65 22. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dichas condiciones incluyen llevar a cabo dicha reacción a un pH menor que 7,0.

ES 2 280 107 T3

23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que dichas condiciones incluyen llevar a cabo dicha reacción a un pH menor que 6,8.

5 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que dichas condiciones incluye llevar a cabo dicha reacción a un pH desde 4,5 a 6,8.

25. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicho interferón alfa es interferón alfa 2b.

10 26. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicho polímero activado esta presente en un exceso molar con respecto a dicha proteína.

27. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicho polímero comprende un óxido de polialquileno.

15 28. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que dicho óxido de polialquileno es un polietilenglicol.

29. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicho polímero tiene un peso molecular desde 200 a 35.000.

20 30. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que dicho polímero tiene un peso molecular desde 1.000 a 25.000.

31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que dicho polímero tiene un peso molecular desde 2.000 a 20.0000.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG-1

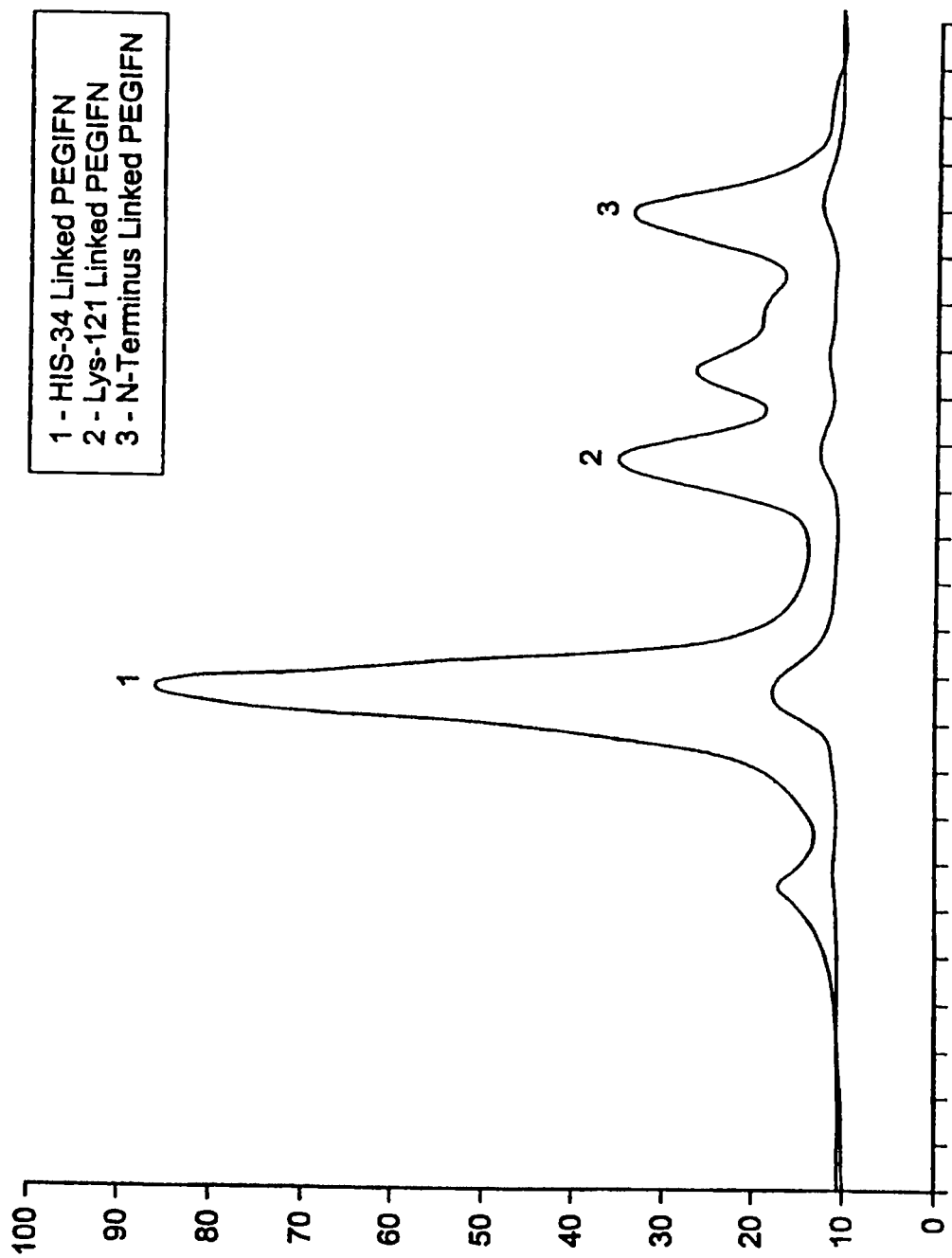


FIG-2

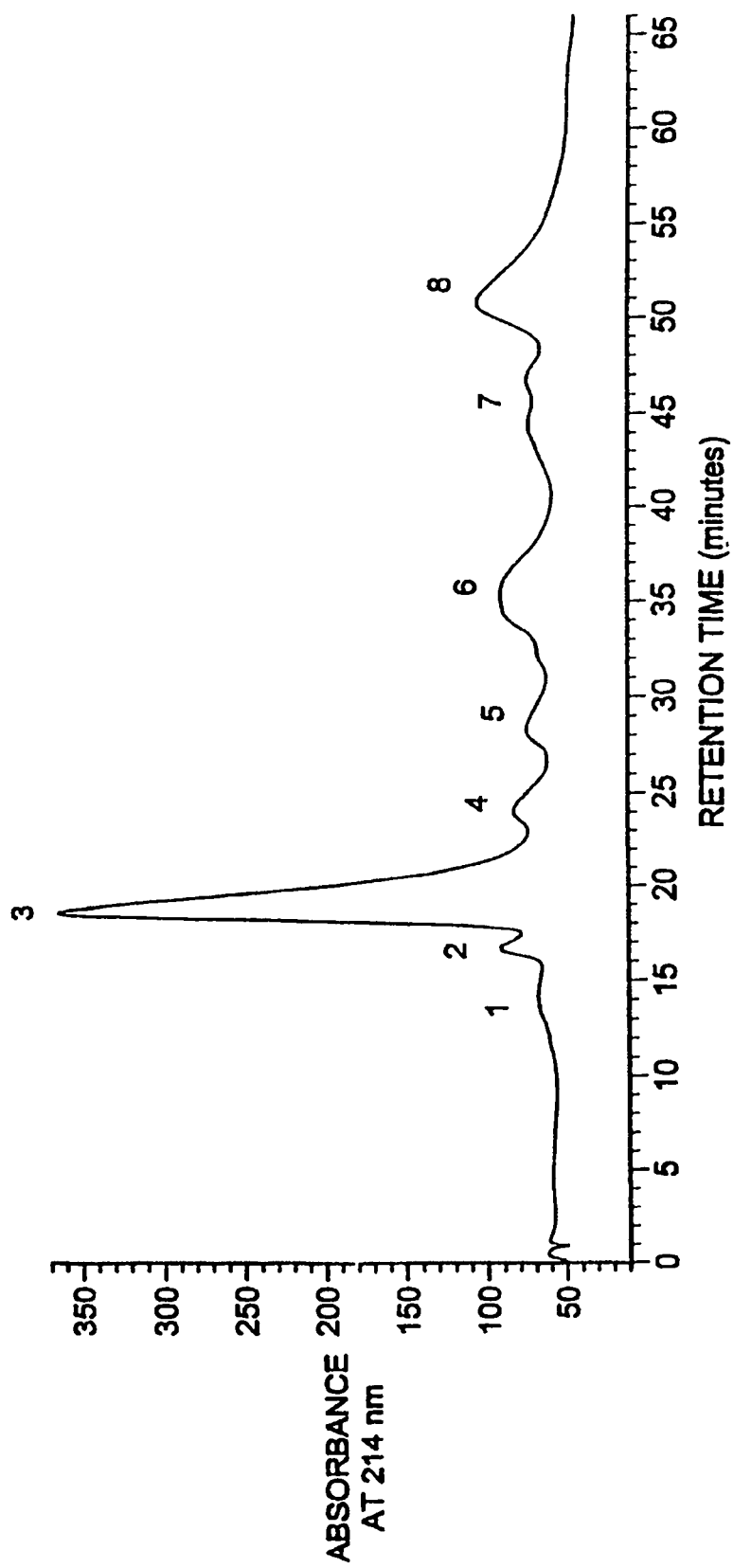


FIG-3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN SUERO HUMANO NORMAL A 37 °C

