



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 561**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00978902 .5**
86 Fecha de presentación : **04.10.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1221975**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.07.2002**

54 Título: **Neuropéptidos estabilizados por polímeros.**

30 Prioridad: **04.10.1999 US 157503 P**
19.11.1999 US 166589 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

73 Titular/es: **Nektar Therapeutics AI, Corporation**
490 Discovery Drive
Huntsville, Alabama 35806-2902, US

72 Inventor/es: **Bentley, Michael, David y**
Roberts, Michael, James

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 275 561 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

Neuropéptidos estabilizados por polímeros.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un conjugado entre un péptido y polietilenglicol o un polímero sustancialmente sustituible y a un procedimiento para el uso del mismo.

10 **Antecedentes de la invención**

Durante la última década ha habido progresos significativos en el descubrimiento y desarrollo de potenciales agentes neurofarmacéuticos (moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y antisentido) para el tratamiento del dolor y de afecciones cerebrales tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, la administración sistémica de muchos agentes neurofarmacéuticos nuevos se vio obstaculizada por la falta de un sistema eficaz para administrarlos. La administración intravenosa es frecuentemente ineficaz debido al transporte inadecuado a través de la barrera entre el cerebro y el suministro de sangre ("barrera hematoencefálica" o "BHE"). La barrera hematoencefálica es una barrera física continua que separa el sistema nervioso central, es decir el tejido cerebral, de la circulación general de un animal. La barrera comprende células endoteliales microvasculares que están unidas una con otra por medio de complejas uniones intracelulares firmes. La barrera permite un intercambio selectivo de moléculas entre el cerebro y la sangre y previene la entrada de muchos fármacos y péptidos hidrófilos al cerebro. Muchos de los nuevos agentes neurofarmacéuticos no cruzan la BHE porque tienen un peso molecular por encima de 500 daltons y son hidrófilos. Los compuestos que no son lipófilos y que tienen un peso molecular superior a 500 daltons generalmente no cruzan la BHE.

Se han desarrollado varias estrategias para administrar fármacos no lipófilos, con peso molecular alto al cerebro, incluyendo la infusión intracerebroventricular, el transplante de células modificadas genéticamente que secretan el compuesto neuroactivo y la implantación de una matriz polimérica que contiene el agente farmacéutico. Ver Pardridge, W. M., *J. Controlled Rel.*, (1996) 39:281-286. Sin embargo, todas éstas incluyen procedimientos quirúrgicos invasivos que pueden ocasionar una diversidad de complicaciones.

Se han identificado cuatro mecanismos de transporte no quirúrgicos para cruzar la BHE, incluyendo: (i) difusión transmembrana, (ii) transporte mediado por receptores, (iii) endocitosis mediada por absorción y (iv) transporte mediado por vehículos. Ver Brownless y col., *J. Neurochemistry*, (1993) 60(3):793-803. La permeabilidad vascular puede aumentarse abriendo las firmes uniones con soluciones hiperosmóticas de sacáridos y análogos de bradiquinina. Un problema inherente en este procedimiento es la posibilidad de que compuestos indeseables entren al cerebro a través de las aberturas artificialmente dilatadas en la barrera hematoencefálica.

Se ha descubierto que las células endoteliales capilares en la barrera hematoencefálica tienen un alto nivel de receptores para transferrina, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina I y II, lipoproteína de baja densidad y factor natriurético atrial. Ver Friden, P.M., *J. Controlled Rel.*, (1996) 46:117-128. La Patente de EEUU N° 5.833.988 de Friden describe un procedimiento para administrar un agente neurofarmacéutico o de diagnóstico a través de la barrera hematoencefálica usando un anticuerpo contra el receptor de transferrina. Se conjuga un factor de crecimiento neural o un factor neurotrófico a un anticuerpo específico para el receptor de transferrina. Se administra el conjugado resultante a un animal y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica hacia el cerebro del animal.

La Patente de EEUU N° 4.902.505 de Pardridge y col. describe el uso de péptidos quiméricos para la administración de neuropéptidos a través de la barrera hematoencefálica. Se usa un péptido específico para el receptor para transportar un péptido neuroactivo hidrófilo a través de la BHE. Las proteínas vehículo descritas, que son capaces de cruzar la BHE por transcitosis mediada por receptores, incluyen histona, insulina, transferrina, factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I), factor de crecimiento similar a insulina II (IGF-II), albúmina básica y prolactina. La Patente de EEUU N° 5.442.043 de Fukuta y col. describe el uso de un fragmento de insulina como un vehículo en un péptido quimérico para transportar un neuropéptido a través de la barrera hematoencefálica.

Los enfoques no invasivos para administrar agentes neurofarmacéuticos a través de la BHE son típicamente menos eficaces que los procedimientos invasivos para llevar el agente realmente dentro del cerebro. Para alcanzar el efecto terapéutico deseado son necesarias altas dosis de péptidos quiméricos porque son propensos a la degradación. La concentración de los péptidos quiméricos en la circulación sanguínea puede disminuir rápidamente por proteólisis. Un sistema acuoso de administración generalmente no es eficaz para administrar fármacos hidrófobos.

En *Pharm. Res.* (1998) 15(4):576-582, Pardridge y col. describen otro procedimiento para administrar compuestos hidrófilos dentro del cerebro por transcitosis mediada por receptores. Se usa un anticuerpo monoclonal para el receptor de transferrina (OX26 MAb) modificado con estreptavidina para transportar la proteína catiónica, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) a través de la BHE. Primero se modifica el BDNF con biotina-PEG²⁰⁰⁰ para formar BDNF-biotina-PEG²⁰⁰⁰, que posteriormente se une al anticuerpo modificado con estreptavidina OX26 MAb. El conjugado resultante demostró ser capaz de atravesar la BHE hacia el cerebro.

Mejorar la duración de los efectos anticonceptivos en los animales puede dar como resultado una menor frecuencia de administración de analgésicos, que puede mejorar la conformidad del paciente y reducir los potenciales efectos colaterales. Maeda y col. en Chem. Pharm. Bull. (1993) 41(11): 2053-2054, Biol. Pharm Bull. (1994) 17(6):823-825, y Chem. Pharm. Bull. (1994) 42(9):1859-1863 demostraron que uniendo polietilenglicolamina 4000 a la leucina del extremo C-terminal de Leu-encefalina (alejada del residuo tirosina necesario para la antinocicepción), puede incrementarse la potencia y duración de Leu-encefalina cuando se administra directamente al cerebro por inyección intracerebroventricular.

Existe una necesidad en la técnica para administrar agentes neuroactivos desde la circulación sistémica a través de la barrera hematoencefálica y dentro del cerebro que reduzca o elimine algunos de los inconvenientes y desventajas asociados con la técnica anterior.

En el documento WO-A1 9500162 se describen conjugados de péptidos con polímeros no antigénicos en sitios predeterminados. La Patente de EEUU N° 5.932.462 describe polímeros monofuncionales multiarmados, hidrolíticamente estables para unir a moléculas biológicamente activas tales como proteínas. En la Patente de EEUU N° 5.681.811 se describen otros conjugados, sin embargo éstos tienen un fragmento lipófilo como parte fundamental.

Resumen de la invención

Esta invención provee un procedimiento para administrar un péptido dentro del cerebro de un ser humano y otro animal a través de la barrera hematoencefálica. El péptido a administrar está unido a un polímero no peptídico, soluble en agua para formar un conjugado. Posteriormente se administra el conjugado a un animal dentro de la circulación sanguínea de manera que el conjugado pase a través de la barrera hematoencefálica y entre en el cerebro. El polímero no peptídico soluble en agua puede seleccionarse del grupo constituido por polietilenglicol y copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol activados para conjugación por medio de unión covalente al péptido.

En una forma de realización de esta invención, se provee un conjugado sustancialmente hidrófilo que tiene un péptido analgésico transportable, es decir un péptido analgésico capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, unido covalentemente a un polímero no peptídico, soluble en agua tal como polietilenglicol. El conjugado es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica de un animal.

Los péptidos transportables adecuados para uso en esta forma de realización de la invención incluyen dinorfinas, encefalinas, endorfinas, endomorfina y bifenilina. Típicamente, estos pequeños neuropéptidos son susceptibles de degradación dentro del cuerpo dentro de la circulación sanguínea y en el cerebro. En contraste, cuando están conjugados con polietilenglicol o a otro polímero no peptídico, no inmunogénico, soluble en agua con propiedades similares, estos péptidos exhiben una estabilidad significativamente aumentada.

En otra forma de realización de esta invención, se provee una composición que comprende un conjugado de esta invención como se describió anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede administrarse directamente en la circulación general de un animal por cualquier medio adecuado, por ej. inyección parenteral, inyección en vena intracerebral y por administración intranasal, pulmonar, ocular y bucal.

De acuerdo con aún otra forma de realización de esta invención, se provee un procedimiento para administrar un péptido analgésico a través de la barrera hematoencefálica dentro del cerebro de un animal. El procedimiento comprende proveer un conjugado de esta invención como se describió anteriormente y administrar el conjugado en el torrente sanguíneo del animal huésped.

Se ha considerado previamente que los grandes polímeros hidrófilos tal como el polietilenglicol, cuando están unidos a un péptido que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, podrían interferir con el transporte del péptido a través de la barrera hematoencefálica. En particular, se ha creído que la conjugación directa de grandes polímeros hidrófilos con un péptido no sólo aumentaría la hidrofilia sino que también afectaría a la interacción entre el péptido y su receptor u otras estructuras en la BHE por interferencia estérica a partir de las grandes ramas del polímero.

Actualmente se descubrió que, aunque el conjugado es sustancialmente hidrófilo y contiene un polímero no peptídico soluble en agua, el conjugado es sin embargo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica de un animal. Comparados con su estado nativo, los péptidos conjugados con un polímero no peptídico soluble en agua pueden exhibir inmunogenicidad reducida, solubilidad en agua y estabilidad incrementadas. En particular, los péptidos conjugados con polietilenglicol de acuerdo con esta invención tienen un tiempo de circulación mayor, una susceptibilidad a la degradación metabólica y una depuración disminuidas y una vez administrados dentro del cerebro a través de la barrera hematoencefálica, exhiben vida útil aumentada en el cerebro. Por ello, esta invención permite la administración eficaz de péptidos analgésicos en cerebros de seres humanos y otros animales y puede mejorar significativamente la eficacia de los péptidos administrados.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en este documento, “atravesar la barrera hematoencefálica” o “cruzar la barrera hematoencefálica” significa que, una vez administrado en la circulación sanguínea de un animal en una dosis fisiológicamente aceptable, un conjugado o un péptido es capaz de tasar la barrera hematoencefálica del animal en un grado tal que se administra

ES 2 275 561 T3

una cantidad suficiente del conjugado o péptido dentro del cerebro del animal para ejercer su efecto terapéutico, anticonceptivos o profiláctico en el cerebro, o para afectar el funcionamiento biológico del cerebro hasta un grado detectable. “Atravesar la barrera hematoencefálica” o “cruzar la barrera hematoencefálica” puede también usarse en este documento para significar que el conjugado o péptido es capaz de ser captado por el cerebro de un animal en un grado que es detectable por un procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ej. la perfusión cerebral *in situ* como describen Williams y col. en J. Neurochem., 66 (3), págs.1289-1299, 1996, que se incorpora en este documento por referencia.

El conjugado de esta invención es normalmente sustancialmente hidrófilo. Por el término “sustancialmente hidrófilo”, se pretende significar que el conjugado de esta invención no contiene un fragmento sustancialmente lipófilo tales como ácidos grasos o glicolípidos. Los ácidos grasos y glicolípidos se usan en la técnica para aumentar la lipofilidad de una molécula con el fin de aumentar la capacidad de una molécula para atravesar membranas celulares.

El término “analgésico” como se usa en este documento significa cualquier sustancia química deseable, para administrar en el cerebro de seres humanos u otros animales con el objeto de aliviar, mitigar o prevenir el dolor en seres humanos u otros animales, o de otra manera mejorar el buen estado físico o mental de seres humanos o animales. Pueden introducirse péptidos analgésicos en el cerebro de un animal para ejercer un efecto terapéutico, anticonceptivo o profiláctico en las funciones biológicas del cerebro del animal y pueden usarse para tratar o prevenir el dolor.

Pueden unirse agentes no considerados típicamente “analgésicos” al conjugado péptido/polímero de la invención. Por ejemplo, pueden unirse al conjugado agentes para diagnóstico o para imágenes. Pueden usarse en el conjugado de esta invención fluoresceína, proteínas y otros tipos de agentes específicamente dirigidos a un tipo particular de célula o proteína, tales como anticuerpos monoclonales, para fines diagnósticos o de obtención de imágenes.

Como se describió anteriormente, cuando un agente no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, es decir, es no transportable a través de la BHE, se usará típicamente como un vehículo un péptido que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, es decir, que es transportable a través de la BHE, en un conjugado de esta invención.

En una forma de realización de esta invención, el péptido es un péptido analgésico transportable. Como se usa en este documento, el término “transportable” significa que el péptido es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica de un animal como se definió anteriormente. Por ello, se provee un conjugado que comprende un péptido transportable unido a un polímero no peptídico, no inmunogénico, soluble en agua, incluyendo polietilenglicol.

El término “péptido” significa cualquier secuencia de de α aminoácidos polimerizada constituida por desde 2 hasta 40 aminoácidos con un enlace peptídico (-CO-NH-) entre cada aminoácido que puede tener efecto en la afección y función biológica del cerebro de un animal. Un péptido analgésico normalmente es un péptido endógeno que se presenta naturalmente en un animal, o fragmentos o análogos del mismo. Sin embargo, se incluyen también péptidos no endógenos que pueden tener efecto sobre las afecciones y funciones biológicas del cerebro del animal.

En la técnica se conocen generalmente muchos péptidos que se cree son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de péptidos transportables capaces de cruzar la barrera hematoencefálica tras la PEGilación de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, bifalina y péptidos opioides tales como dinorfinas, encefalinas, endorfinas, endomorfina, etc.. En la práctica de la invención pueden usarse también muchos derivados y análogos de estos péptidos transportables.

Se cree que los péptidos opioides son especialmente adecuados para la práctica de la invención. Los péptidos opioides exhiben una diversidad de actividades farmacológicas, incluyendo entre ellas el alivio del dolor y la analgesia.

La encefalina es un pentapéptido que tiene una secuencia de aminoácidos H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH (metionina encefalina) o H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH (leucina encefalina). Se han identificado y sintetizado muchos análogos de encefalina que son específicos para diferentes tipos de receptores opiáceos. Ver, por ej., Hruby y Gehrig, (1989) Medicinal Research Reviews, 9(3):343-401, Por ejemplo, la Patente de EEUU N° 4.518.711 describe varios análogos de encefalina incluyendo DPDPE, [D-Pen², D-Pen⁵] encefalina, que es un análogo cíclico de encefalina generado sustituyendo el segundo y el quinto residuos aminoácidos de los pentapéptidos naturales con cisteína o con D- o L-penicilamina (beta, beta-dimetilcisteína) y uniendo las dos posiciones por medio de un enlace disulfuro. DPDPE ha demostrado ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica hacia el cerebro. Ver por ej., Williams y col. (1996) Journal of Neurochemistry, 66(3):1289-1299. La Patente de EEUU N° 5.326.751 describe el DPADPE preparado sustituyendo el residuo glicina en la posición tercera de DPDPE con un residuo alanina.

Otros análogos de encefalina incluyen bifalina (H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-)₂, que es un análogo sintético de encefalina que es un tetrámero dimerizado producido por acoplamiento de dos unidades que tienen la fórmula H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-OH en el extremo C-terminal con hidrazina. La forma dimérica de encefalina mejora la afinidad y especificidad para el receptor delta opioide. Los análogos diméricos de encefalina son descritos por Rodbard y col. en la Patente de EEUU N° 4.468.383,

Las dinorfinas son otra clase de péptidos opioides. La dinorfina aislada naturalmente tiene 17 aminoácidos. Se han propuesto en la técnica muchos fragmentos y análogos de dinorfina, incluyendo por ej., dinorfina (1-10), dinorfina (1-13), dinorfina (1-13) amida, [D-Pro¹⁰] Dinorfina (1-11) (DPDYN), análogos de dinorfina amida, etc. Ver por ej., las

ES 2 275 561 T3

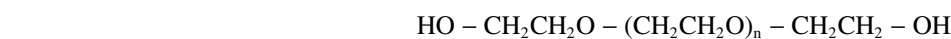
Patentes de EEUU 4.684.624 y 5.017.689, Aunque tales péptidos analgésicos son capaces de transportarse a través de la barrera hematoencefálica, muchos de ellos tienen una semivida muy corta debido a su susceptibilidad para la biodegradación dentro del cuerpo.

5 Aunque el polietilenglicol normalmente tiene un peso molecular alto y es hidrófilo, la conjugación con los péptidos transportables en ausencia de un fragmento lipófilo no interfiere con la transportabilidad de los péptidos. Los péptidos conjugados se mantienen con capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica. Típicamente, tras la administración dentro de la circulación general de un animal, el conjugado de la invención, que comprende un péptido transportable unido a polietilenglicol o un polímero equivalente, es captado por el cerebro en un porcentaje mucho mayor en
10 comparación con una forma no conjugada del péptido. Los péptidos en los conjugados de esta invención tienen mayor estabilidad y exhiben semivida prolongada dentro del cuerpo.

En otra forma de realización de esta invención, se provee un conjugado que comprende un primer péptido, que es un péptido transportable, y un segundo agente neuroactivo unidos uno al otro por medio de polietilenglicol o un
15 polímero equivalente. Este segundo agente neuroactivo puede o no ser capaz de cruzar la barrera hematoencefálica por sí mismo. El péptido transportable se usa como un vehículo para transportar un agente neuroactivo no transportable a través de la barrera hematoencefálica hacia el cerebro de un animal. El polímero de unión sirve no sólo como un enlace sino que también aumenta la solubilidad y estabilidad del conjugado y reduce la inmunogenicidad del neuropéptido y del agente neuroactivo a administrar.

20 De acuerdo con la invención, el péptido transportable y, opcionalmente, otro agente neuroactivo como se describió anteriormente, están unidos de manera covalente a un polímero no peptídico soluble en agua para formar un conjugado de esta invención. Los polímeros no peptídicos solubles en agua para uso en diversos aspectos de esta invención incluyen polietilenglicol, otros polialquilenglicoles y copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

25 Como se usa en este documento, el término polietilenglicol ("PEG") está incluido y significa cualquiera de una serie de polímeros con fórmula general:



en los que n varía desde aproximadamente 10 hasta 2.000, PEG también se refiere a la unidad estructural:



en la que n varía desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 2.000. Por ello, por PEG se entiende PEGs modificados incluyendo metoxi-PEGs; PEGs con al menos un fragmento terminal diferente de un grupo hidroxilo que es reactivo con otro fragmento; PEGs ramificados; PEGs pendientes, PEGs bifurcados y similares.

40 El polietilenglicol útil en la práctica de esta invención normalmente tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 200 hasta 100.000 daltons. Los pesos moleculares de desde aproximadamente 200 hasta 10.000 son un tanto más comúnmente usados. Los pesos moleculares de desde 300 hasta 8.000 y en particular desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 5.000 daltons son un tanto típicos.

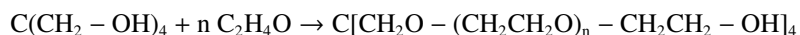
45 PEG es útil en aplicaciones biológicas porque tiene propiedades que son muy deseables y está generalmente aprobado para aplicaciones biológicas o biotécnicas. PEG es típicamente claro, incoloro, inodoro, soluble en agua, estable al calor, inerte para muchos agentes químicos, no hidroliza ni se deteriora y es generalmente no tóxico. Se considera que el poli(etilenglicol) es biocompatible, lo que es igual a decir que PEG es capaz de coexistir con tejidos vivos u organismos son causar daño. Más específicamente, PEG, es por sí mismo normalmente considerado no inmunogénico, lo que es igual a decir que PEG no tiende a producir una respuesta inmune en el cuerpo. Los grupos activadores terminales deseables por los que PEG puede unirse a diversos péptidos no deberían alterar el carácter no inmunogénico del PEG, de manera de evitar efectos inmunogénicos. Los conjugados de PEG deseables no tienden a producir una respuesta inmune sustancial ni causan coagulación u otros efectos indeseables.

55 PEG es un polímero al azar en rollo altamente hidratado que puede proteger a las proteínas o péptidos de la digestión enzimática, moléculas y células del sistema inmune y puede aumentar el volumen hidrodinámico para demorar la depuración del sistema retículo endotelial (RES). PEG es un polímero útil que tiene las propiedades de solubilidad en agua así como también solubilidad en muchos solventes orgánicos. Las propiedades de solubilidad únicas del PEG permiten la conjugación (PEGilación) con ciertos compuestos con baja solubilidad en agua, con el conjugado resultante siendo soluble en agua. Sin embargo, la PEGilación, que es conjugar una molécula de PEG con otra molécula, tiene sus dificultades. Los efectos de un derivado de PEG en particular no son necesariamente previsibles. Los resultados dependen de la interacción específica entre un compuesto particular y el polímero PEG no peptídico funcional.

65 El polímero usado en esta invención normalmente puede ser lineal o ramificado. Los esqueletos de polímeros ramificados son generalmente conocidos en la técnica. Típicamente, un polímero ramificado tiene un fragmento nuclear central y una pluralidad de cadenas de polímeros lineales unidas al núcleo central. Se usa PEG comúnmente en formas ramificadas que pueden prepararse por agregado de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, pentae-

ES 2 275 561 T3

ritrol y sorbitol. Por ejemplo, el PEG ramificado, de cuatro brazos preparado a partir de pentaeritritol se muestra a continuación:



El fragmento central puede derivar también de diversos aminoácidos. Un ejemplo es la lisina.

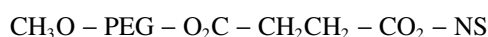
Los polietilenglicoles ramificados pueden representarse en forma general como R(-PEG-OH)_n donde R representa el fragmento central, tal como glicerol o pentaeritritol y n representa el número de brazos. Pueden prepararse PEGs ramificados adecuados de acuerdo con la Patente de EEUU N° 5.932.462, Estos PEGs ramificados pueden usarse de acuerdo con las enseñanzas de este documento.

Los PEGs bifurcados y polímeros relacionados deberían ser útiles en la práctica de la invención. El término "ramificado" se usa para describir aquellos PEGs que están ramificados en posición adyacente al menos a un extremo terminal del mismo. El polímero tiene un fragmento ramificado en un extremo de la cadena del polímero y dos grupos reactivos, uno en cada extremo del fragmento ramificado, para unión covalente a otra molécula. Cada fragmento reactivo tiene un grupo conector, incluyendo, por ejemplo una cadena de alquilo, que une un grupo reactivo al fragmento ramificado. Por ello, el extremo terminal ramificado permite al polímero reaccionar con dos moléculas para formar conjugados. Los PEGs bifurcados y los polímeros bifurcados relacionados se describen en la solicitud de patente de EEUU en tramitación Ser. N° 09/265,989, que fue presentada el 11 de Marzo de 1999 y se titula Poly(ethylene glycol) Derivatives with Proximal Reactive Groups. Los PEGs bifurcados pueden ser lineales o ramificados en el esqueleto unido al extremo terminal ramificado.

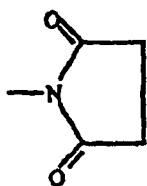
Los polímeros no peptídicos, sustancialmente no inmunogénicos, solubles en agua diferentes de PEG deberían ser también adecuados para la práctica de la invención, aunque no necesariamente con resultados equivalentes. Estos otros polímeros pueden estar en forma lineal o ramificada e incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenóxidos), incluyendo copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares. En la Patente de EEUU N° 5.990.237 se presenta una lista de ejemplos de polímeros. Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros aleatorios o de bloque y terpolímeros basados en los monómeros de los polímeros anteriores, de cadena lineal o ramificada.

Los ejemplos específicos de polímeros adicionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, poli(acrilolmorfolina) ("PACM") y poli(vinilpirrolidona) ("PVP"), y poli(oxazolona). PVP y poli(oxazolona) son bien conocidos en la técnica y su preparación debería resultar fácilmente evidente para los expertos en la técnica. En las Patentes de EEUU N° 5.629.384 y 5.631.322 se describen el PACM y su síntesis y uso.

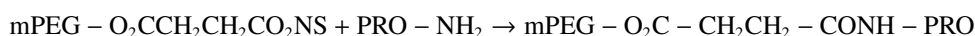
Para acoplar PEG a un péptido, por ej., un péptido transportable, para formar un conjugado de esta invención, es frecuentemente necesario "activar" el PEG para preparar un derivado de PEG con un grupo reactivo en el extremo terminal para reaccionar con cierto fragmento en el péptido. Muchos derivados activados de PEG se describieron en la técnica y todos pueden usarse en esta invención, aunque no necesariamente con resultados equivalentes. Un ejemplo de tales derivados activados es el "éster activado" de succinimidil succinato:



donde NS =



El éster activo de succinimidilo es un compuesto útil porque reacciona rápidamente con grupos amino en proteínas y otras moléculas para formar un enlace amida (-CO-NH-). Por ejemplo, la Patente de EEUU N° 4,179,337 de Davis y col. describe el acoplamiento de este derivado a proteínas (representado como PRO-NH₂):



Otras moléculas PEG activadas conocidas en la técnica incluyen PEGs con un fragmento cloruro cianúrico reactivo, succinimidilcarbonatos de PEG, fenilcarbonatos de PEG, derivados imidazolil formato de PEG, PEG carboximetil azida, PEG imidoésteres, PEG vinilsulfona, derivados etilsulfona activos de PEG, tresilatos de PEG, PEG fenilglicoxal, PEGs activados con un grupo aldehído, PEG maleimidias, PEGs con un fragmento amino terminal y otros. Estos derivados de polietilenglicol y los procedimientos para conjugar tales derivados con un agente son generalmente cono-

ES 2 275 561 T3

cidos en la técnica y están descritos en Zalipsky y col., Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycol)s for Modification of Polypeptides, en Use of Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Ed., Plenum Press, New York (1992), y en Zalipsky, Advanced Drug Reviews (1995) 16:157-182,

5 Típicamente, la conjugación de un polímero no inmunogénico, soluble en agua con un péptido de acuerdo con esta invención da como resultado la formación de un enlace entre el polímero y el péptido. El término “enlace” se usa en este documento para referirse a grupos o uniones normalmente formadas como resultado de una reacción química.

10 Los enlaces covalentes formados en la práctica de esta invención pueden ser hidrolíticamente estables. El enlace puede ser sustancialmente estable en agua y no reaccionar en agua a un pH útil, bajo condiciones fisiológicas, durante un período de tiempo prolongado, de preferencia indefinidamente. Alternativamente, el enlace covalente puede también ser hidrolíticamente degradable bajo condiciones fisiológicas de manera que el agente neuroactivo puede liberarse del PEG en el cuerpo de un animal, de preferencia tras su administración dentro del cerebro del animal.

15 El enfoque en el que los fármacos a administrar se liberan por degradación de agentes más complejos bajo condiciones fisiológicas es un potente componente de la administración de fármacos. Ver R. B. Greenwald, Exp. Opin. Ther. Patents, 7(6):601-609 (1997). Por ejemplo, pueden formarse conjugados de la invención uniendo PEG a péptidos transportables y/o agentes neuroactivos usando enlaces que son degradables bajo condiciones fisiológicas. La semivida de un conjugado de PEG-agente neuroactivo *in vivo* depende del tipo de grupo reactivo de la molécula de PEG que
20 une el PEG con el agente neuroactivo. Típicamente, los enlaces éster, formados por reacción de PEG ácidos carboxílicos o PEG activado ácidos carboxílicos con grupos alcohol en agentes neuroactivos, hidrolizan bajo condiciones fisiológicas para liberar el agente neuroactivo. Ver, por ej., S. Zalipsky, Advanced Drug Delivery Reviews, 16:157-182 (1995). Por ejemplo, en la Publicación PCT N° WO 96/23794, se describe que paclitaxel puede unirse a PEG usando
25 enlaces éster y el paclitaxel unido puede liberarse en suero por hidrólisis. También se demostró la actividad antimalaria de dihidroartemisinina unida a PEG a través de un enlace éster hidrolizable. Ver Bentley y col., Polymer Preprints, 38(1):584 (1997). Otros ejemplos adecuados de enlaces hidrolíticamente inestables incluyen ésteres de carboxilato, ésteres de fosfato, disulfuros, acetales, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos.

30 Típicamente, la tasa de degradación del conjugado debería controlarse de manera que no se produzca degradación sustancial hasta que el conjugado pasa dentro del cerebro del animal. Muchos péptidos en su estado nativo son objeto de degradación sustancial en la circulación sanguínea y en órganos tales como el hígado y el riñón. Los enlaces hidrolíticamente degradables pueden formarse de manera tal que la semivida del conjugado sea mayor que el tiempo necesario para que la circulación del conjugado en el torrente sanguíneo alcance la barrera hematoencefálica. Puede
35 necesitarse algún pequeño grado de experimentación para determinar el enlace hidrolíticamente inestable adecuado entre los agentes neuroactivos específicos y los derivados de PEG, lo que se encuentra dentro de la capacidad de un experto en la técnica una vez informado de la presente invención.

Puede formarse el enlace covalente entre un péptido y un polímero haciendo reaccionar un derivado del polímero tal como un PEG activado con un fragmento activo en el péptido. Pueden estar unidas una o más moléculas de PEG a
40 un péptido.

A la inversa, péptidos múltiples, incluyendo péptidos transportables y/u otros tipos de agentes neuroactivos, pueden estar unidos a una molécula de PEG. Típicamente, tal molécula de PEG tiene múltiples fragmentos reactivos para reaccionar con el péptido y agentes neuroactivos. Por esta razón, pueden usarse PEGs bifuncionales, PEGs pendent
45 y PEGs dendríticos. Se han sintetizado también PEGs reactivos en los que diversos grupos funcionales activos están localizados a lo largo del esqueleto del polímero. Por ejemplo, en la técnica se prepararon conjugados de lisina-PEG en los que un número de grupos activados están localizados a lo largo del esqueleto del polímero. Zalipsky y col., Bioconjugate Chemistry, (1993) 4:54-62,

50 En una forma de realización de esta invención, se provee un conjugado que tiene una estructura de pesa en el que un péptido transportable u otro agente neuroactivo transportable capaces de atravesar la barrera hematoencefálica de un animal está unido al otro extremo de la molécula de PEG. Este otro agente neuroactivo puede ser un péptido transportable, o cualquier otro agente neuroactivo. Típicamente, no es transportable y no puede atravesar por sí solo la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, el péptido transportable u otro agente en un extremo de la molécula de PEG
55 actúa como vehículo para administrar el agente neuroactivo no transportable dentro del cerebro. Para este objetivo, pueden usarse PEGs bifuncionales, ya sean PEGs homobifuncionales o heterobifuncionales. Como se usa en este documento “PEG bifuncional” significa un derivado de PEG que tiene dos fragmentos activos, cada uno capaz de reaccionar con un fragmento activo en otra molécula. Los dos fragmentos activos pueden estar en los dos extremos de una cadena de PEG, o próximos uno al otro en un extremo bifurcado de una molécula de la cadena de PEG, teniendo
60 cuenta el impedimento estérico, si lo hay. A continuación se describen péptidos transportables adecuados para uso en esta invención incluyendo, pero no limitados a, dinorfinas, encefalinas, bifalina, endorfinas, endomorfina y derivados y análogos de los mismos.

65

ES 2 275 561 T3

El conjugado de esta invención puede administrarse a un animal con el objetivo de tratar, mitigar o aliviar el dolor. Los ejemplos de animales huésped incluyen, pero no se limitan a, mamíferos tales como seres humanos y animales domésticos, incluyendo gatos, perros, vacas, caballos, ratones y ratas.

5 El conjugado de esta invención puede administrarse a un animal de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, puede administrarse el conjugado por vía parenteral por medio de inyección intravenosa, inyección intramuscular o inyección subcutánea. Alternativamente, puede también introducirse el conjugado de esta invención en el cuerpo por inhalación intranasal y pulmonar o por administración oral y bucal. De preferencia, se usa la inyección intravenosa de manera que sustancialmente todo el conjugado en una inyección se administra al torrente sanguíneo del animal, a través del cual el conjugado circula hacia la barrera hematoencefálica del animal.

10 Puede inyectarse el conjugado en la forma de cualquier tipo de formulación adecuada. Por ejemplo, puede prepararse una composición inyectable por cualquier procedimiento conocido en la técnica conteniendo el conjugado de esta invención en un solvente tal como agua o solución, incluyendo solución salina y solución de Ringer. Pueden agregarse uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables compatibles con los otros ingredientes en la formulación. También pueden incluirse excipientes, incluyendo manitol, alginato de sodio y carboximetil celulosa. Pueden también incluirse en la formulación otros componentes farmacéuticamente aceptables, incluyendo antisépticos tal como feniletanol; estabilizantes tales como polietilenglicol y albúmina; agentes para mantener la isotonicidad tales como glicerol, sorbitol y glucosa; compuestos para ayudar a la disolución; tampones estabilizadores tales como citrato de sodio, acetato de sodio y fosfato de sodio; conservantes tales como alcohol bencílico; espesantes tal como dextrosa; y otros aditivos comúnmente usados. La formulación inyectable puede también prepararse en una forma sólida tal como una forma liofilizada.

15 Pueden administrarse los péptidos PEGilados de la invención en una variedad de formulaciones, incluyendo, por ejemplo, administración intranasal, bucal y oral. La dosificación del conjugado administrado a un ser humano u otro animal variará dependiendo del animal huésped, los tipos de péptidos transportables y/o agentes neuroactivos usados, los medios de administración y los síntomas sufridos por el animal. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuada en una situación específica deberían poder determinarse fácilmente por un experto en la técnica sin excesiva experimentación.

20 La invención es además ilustrada por medio de los siguientes ejemplos, los que tienen una finalidad sólo ilustrativa y que no deberían considerarse de ninguna manera como limitadores de la invención.

Ejemplo 1

35 *Modificación y purificación de PEG-Dinorfina A*

Se disolvió dinorfina A (1-11) (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-NH₂) (1,47 mg) en 0,25 ml de agua desionizada y 0,25 ml de tampón NaP 25 mM, pH 5,8 en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se agregó el reactivo NHS-PEG_{2K}-Fluoresceína (1,0 mg) a la solución de péptido en un exceso molar de aproximadamente el doble. Tras 30 minutos de reacción se agregó 0,1 ml de tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 7,4 y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas.

45 Se controló la conjugación de NHS-PEG_{2K}-Fluoresceína por medio de electroforesis capilar (EC) y espectrometría de masa (MALDI). Se realizó la purificación del conjugado PEG-Dinorfina A en una columna de intercambio catiónico HiTrap SP de Amersham/Pharmacia usando un gradiente de elución de tampón fosfato de sodio desde 5 mM, pH 4,0 hasta fosfato de sodio 50 mM, tampón NaCl 1,5M, pH 7,5 en 53 minutos. Se recogieron las fracciones y se analizaron los contenidos mediante MALDI. Se combinaron estas fracciones y se almacenaron congeladas previo a su ensayo *in vivo*.

50 Ejemplo 2

Modificación y purificación de PEG-Endomorfina II

55 Se disolvió endomorfina II (H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂, 2,3 mg) en 1,15 ml de tampón fosfato de sodio 5 mM, pH 8,0. La modificación de Endomorfina II se realizó en 1,5 horas a temperatura ambiente agregando mPEG₂₀₀₀-SPA (38 mg) en un exceso de 5 moles. Se analizó la mezcla de reacción mediante espectrometría de masa (MALDI) para determinar la extensión de la modificación. Se usó MALDI para verificar que se completó la reacción entre mPEG₂₀₀₀-SPA y Endomorfina II. Se dializó la muestra contra agua usando una membrana 2000 MWCO y se liofilizó previo a su ensayo *in vivo*.

Ejemplo 3

65 *Perfusión in situ, Depleción Capilar, Extracción Cerebral y Estudios de Unión a Proteínas de PEG-Dinorfina A y PEG-Endomorfina II*

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Arizona aprobó el protocolo para los experimentos de perfusión en cerebro de rata. La perfusión *in situ*, depleción capilar, extracción cerebral y los

ES 2 275 561 T3

estudios de unión a proteínas se realizaron como se informó previamente (Williams y col., J. Neurochem., 66 (3), págs. 1289-1299, 1996). La PEG-dinorfina A (PdinA) tuvo un valor R_{Br} de captación *in situ* muy alto de $0,343 \pm 1,84$. En contraste, la perfusión *in situ* con I^{125} Dinorfina, dio un R_{Br} muy alto de aproximadamente 0,96. Se recuperó la radiactividad total en el frente de solvente de HPLC subsiguiente mostrando que la dinorfina A (1-11) marcada se degradada, probablemente a I^{125} Tyr.

Se realizaron los estudios de depleción capilar de PdinA, y revelaron aproximadamente el 88% de la radiactividad asociada con la fracción capilar más que con el parénquima cerebral.

La captación *in situ* de PEG-endomorfina II (Pend) dio un valor de R_{Br} de $0,057 \pm 0,008$, similar al informado previamente para péptidos. La depleción capilar subsiguiente mostró que de la radiactividad que entró al cerebro, 32% se asoció con la fracción capilar con 67% en el parénquima cerebral.

Se estudió la unión a proteínas de Pend usando el sistema de filtro centrifree. Se halló que 30% de 25.000 dpm de Pend estaba unido a 1% de solución de SAB.

La principal contribución es que la PEGilación mejoró dramáticamente la estabilidad enzimática en cerebro y en sangre. La endomorfina y la dinorfina son muy inestables en cerebro y en sangre con semividas del orden de minutos. Tras la PEGilación, aquellas semividas aumentaron hasta horas para endomorfina II. En el caso de endomorfina II, la semivida en plasma sanguíneo era de 3,2 minutos y en tejido cerebral de 13 minutos. Tras la PEGilación, aquellas semividas aumentaron hasta más de dos horas.

Ejemplo 4

Conjugación de PEG-Doxorrubicina con Endomorfina I

Se disolvió endomorfina I (H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, 3,0 mg, 4,9 E-6 moles) en 1 ml de tampón fosfate de sodio 50 mM, pH 8,2 conteniendo 150 mM de NaCl y 50 mM de DTT. Se agregó un exceso molar de cuatro veces de reactivo de Traut (2,7 mg) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Se purificó la endomorfina modificada con tiol a partir de DTT y reactivo de Traut usando una columna de exclusión por tamaño Superdex 30 (Pharmacia). Se recogieron las fracciones de endomorfina modificada y se liofilizaron.

Se disolvió clorhidrato de doxorrubicina (3,0 mg, 5,2 E-6 moles) en 1,0 ml de tampón fosfate de sodio 50 mM, pH 7,2 conteniendo 150 mM de NaCl. Se tituló el pH de la solución hasta 8,0 con hidróxido de sodio 0,1N. Se agregó un exceso molar de diez veces de PEG heterobifuncional (NHS-PEG_{2K}-OPSS) a la solución de doxorrubicina. Se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se purificó la OPSS-PEG_{2K}-doxorrubicina a partir de PEG sin reaccionar y doxorrubicina libre usando una columna de exclusión por tamaño Superdex 30. Se recogieron las fracciones de OPSS-PEG_{2K}-doxorrubicina y se liofilizaron.

Se reconstituyeron los polvos liofilizados de endomorfina I modificada y OPSS-PEG_{2K}-doxorrubicina en tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0. Se mezcló una cantidad equimolar de cada solución y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 6 horas. Se purificó el conjugado de doxorrubicina-PEG_{2K}-endomorfina en una columna de exclusión por tamaño Superdex 30.

Ejemplo 5

Conjugación de PEF con DPDPE

Se disolvieron 3,0 g de DPDPE (Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen) en 5 ml de acetonitrilo anhidro. Se agregó un exceso molar de 20% molar de reactivo PEG (mPEG-SPA 5K [27,9 mg] o mPEG-SPA 2K [11,1 mg]) y trietilamina (0,8 μ l) al DPDPE. Se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 2 días. Se diluyó la muestra hasta 15 ml con agua desionizada y se liofilizó. Se reconstituyó el polvo de PEG-DPDPE en 5 ml de agua desionizada y se purificó en una columna de exclusión por tamaño Superdex 30. Se combinaron las fracciones pertinentes juntas, se dializó contra agua y se congeló hasta los experimentos de perfusión *in situ*.

Tanto PEG_{2K}-DPDPE como PEG_{5K}-DPDPE se yodaron y probaron en estudios de perfusión *in situ*, depleción capilar, extracción cerebral y de unión a proteínas como en el Ejemplo 3. Se observó un aumento significativo en la captación en cerebro para PEG_{2K}-DPDPE y PEG_{5K}-DPDPE. Se determinó que para ambos compuestos, el aumento de captación fue debido a la entrada del péptido al cerebro más que por el atrapamiento en los capilares.

Ejemplo 6

Conjugación de PEG con Bifalina

a. (mPEG_{2K})₂-Bifalina

Se disolvió bifalina (21,1 mg, 0,046 mmol) en 15 ml de acetonitrilo anhidro y se trató con 16 μ l de trietilamina (0,115 mmol, exceso molar de 2,5 veces). Al mismo tiempo, se disolvió mPEG_{2K}-SPA (110 mg, 0,055 mmol, exceso

ES 2 275 561 T3

molar de 1,2 veces) en 5 ml de acetonitrilo. Se agregó lentamente el mPEG_{2K}-SPA disuelto en la solución anterior de bifalina y se agitó la mezcla de reacción durante 66 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno.

Se separaron [(mPEG_{2K})₂-bifalina] di-pegilada y [mPEG_{2K}-bifalina]monopegilada del PEG sin reaccionar y bifalina libre en una columna de fase inversa Vydac C18 a 1 ml/min y detector UV 215 nm usando un gradiente de elución de 30% hasta 60% de solvente B. El solvente A es 0,1% TFA en agua y el solvente B es 0,1% TFA en acetonitrilo.

b. (mPEG_{5K})₂-Bifalina

Se disolvieron 118,7 mg de metoxi-PEG_{5K}-SPA ($2,374 \times 10^{-5}$ moles, exceso molar 1,5 veces) en 3,0 ml de acetonitrilo anhidro. Sobre un flujo lento de Argón, se agregaron 10,0 mg de Bifalina ($1,583 \times 10^{-5}$ moles de grupo -NH₂) seguidos por 4,4 μ l de trietilamina mediante pipeta ($3,166 \times 10^{-5}$ moles, exceso molar 2,0 veces) en la solución. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante la noche.

Se evaporó el disolvente en un evaporador rotatorio a 40°C hasta casi sequedad, posteriormente se secó más en alto vacío durante 5 minutos (se usó una trampa de nitrógeno líquido al aplicar el vacío). Se disolvió el producto restante en 10 ml de agua desionizada. El pH de la solución fue de 4,5. Se cargó la solución por medio de inyección en una caja de diálisis Slide-A-Lyzer con 3500 MWCO (de PIERCE) y se dializó contra 2 x 900 ml de agua desionizada durante tres días.

Se cargó la solución en una columna de Sefarose DEAE de 2 ml. Se recogió el eluyente. Se eluyó la columna con 125 ml más de agua desionizada, se recogió el eluyente (pH 7,6). Se combinaron las dos fracciones, se congeló la solución por medio de nitrógeno líquido y se liofilizó en un secador de congelación.

c. (mPEG_{12K})₂-Bifalina

Se disolvieron 141,4 mg de metoxi-PEG_{12K}-SPA ($1,187 \times 10^{-5}$ moles, exceso molar 1,5 veces) en 2,0 ml de acetonitrilo anhidro. Bajo un flujo lento de Argón se agregaron 5,0 mg de Bifalina-2TFA ($7,915 \times 10^{-6}$ moles de grupo -NH₂) seguidos por 2,2 μ l de trietilamina por medio de pipeta ($1,583 \times 10^{-5}$ moles, exceso molar 2,0 veces) en la solución. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante la noche.

Se evaporó el disolvente en alto vacío a temperatura ambiente hasta sequedad (se usó una trampa de nitrógeno al aplicar vacío). Se disolvió el compuesto restante en 10 ml de agua desionizada. Se cargó la solución por medio de inyección en una Caja de Diálisis prehidratada con 10000 MWCO (de PIERCE) y se dializó contra 2 x 800 ml de agua desionizada durante tres días.

Se diluyó la solución hasta 18 ml con agua desionizada. Se cargó la solución en una columna de DEAE Sefarose de 10 ml. Se recogió el eluyente. Se eluyó la columna con otros 90 ml de agua desionizada. Se combinaron las fracciones, se congeló por medio de nitrógeno líquido y posteriormente se liofilizó en un secador de congelación.

d. (mPEG_{20K})₂-Bifalina

Se disolvieron 255,2 mg de metoxi-PEG_{20K}-SPA ($1,187 \times 10^{-5}$ moles, exceso molar 1,5 veces) en 3,0 ml de acetonitrilo anhidro. Bajo un flujo lento de Argón se agregaron 5,0 mg de Bifalina-2TFA ($7,915 \times 10^{-6}$ moles de grupo -NH₂) seguidos por 2,2 μ l de trietilamina por medio de pipeta ($1,583 \times 10^{-5}$ moles, exceso molar 2,0 veces) en la solución. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante la noche.

Se evaporó el disolvente en alto vacío a temperatura ambiente hasta sequedad (se usó una trampa de nitrógeno al aplicar vacío). Se disolvió el compuesto restante en 10 ml de agua desionizada. Se cargó la solución por medio de inyección en una Caja de Diálisis prehidratada con 10000 MWCO (de PIERCE) y se dializó contra 2 x 800 ml de agua desionizada durante tres días.

Se diluyó la solución hasta 25 ml con agua desionizada. Se cargó la solución en una columna de DEAE Sefarose de 15 ml. Se recogió el eluyente. Se eluyó la columna con otros 150 ml de agua desionizada. Se combinaron las fracciones, se congeló por medio de nitrógeno líquido y posteriormente se liofilizó en un secador de congelación.

Se determinó la pureza de cada muestra por medio de HPLC en fase inversa y mediante espectrometría de masa (MALDI).

Ejemplo 7

Ensayo de Analgesia

Animales

Se usaron ratones ICR macho (20-25 g) o ratas Sprague-Dawley (250-300 g) (Harlan Sprague-Dawley Inc., Indianapolis, IN) para estos experimentos. Se alojó a los animales de a cuatro por jaula en una instalación de cuidado

ES 2 275 561 T3

animal, se mantuvieron a $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con un ciclo alternado de 12 horas de luz-oscuridad. Tuvieron alimento y agua disponibles *ad libitum*. Se usaron los animales sólo una vez.

Protocolo

Se disolvieron todos los fármacos en solución salina estéril y se prepararon de manera que la dosis adecuada se administraría en $5 \mu\text{l}$ (i.c.v.), $100 \mu\text{l}$ (i.v.), $100 \mu\text{l}$ (s.c.) y $100 \mu\text{l}$ (i.m.) de vehículo. Se registró la latencia basal de todos los roedores previo a la inyección del fármaco. Se usó un control de morfina con los procedimientos de inyección i.c.v. e i.v. para comparar las eficacias analgésicas del compuesto de prueba.

Inyección I.C.V.

Se colocaron los roedores en una jarra conteniendo gasa empapada con éter etílico hasta conseguir un sueño ligero. Se retiraron los roedores inmediatamente de la jarra y se realizó una incisión de $\frac{1}{2}$ '' con un escalpelo para exponer la parte superior del cráneo. Se localizó el ventrículo lateral derecho midiendo 2 mm laterales a la línea media y 2 mm caudales al Bregma. En este punto se colocó una jeringa Hamilton (22G, $\frac{1}{2}$ '') a través del cráneo y se administró una inyección de $5 \mu\text{l}$ del compuesto. Posteriormente se colocó nuevamente a los roedores en sus jaulas hasta el momento especificado de la prueba. Se colocó azul de metileno en el sitio de la inyección para asegurar la administración adecuada del compuesto dentro del ventrículo lateral.

Inyección I.V.

Se colocaron los roedores en soportes para restringir sus movimientos y se colocaron sus colas en un recipiente con agua templada y se frotaron con etanol para maximizar la vasodilatación de las venas de la cola. Se seleccionó una vena y se ajustó el soporte para prevenir excesivos movimientos. Se seleccionó una aguja 30 G como el tamaño apropiado para administrar los compuestos. Se insertó cuidadosamente la aguja en la vena de cada ratón y se administró lentamente un bolo de $100 \mu\text{l}$. El empalidecimiento de la vena hacia el cuerpo fue indicativo de una administración adecuada.

Inyección S.C.

Se cogieron las ratas con la mano para prevenir excesivo movimiento. Se seleccionó una aguja 30 G como tamaño apropiado para administrar los compuestos. Se insertó cuidadosamente la aguja dentro del pescuezo de cada rata y se administró lentamente un bolo de $100 \mu\text{l}$.

Inyección I.M.

Se cogieron las ratas con la mano para prevenir excesivo movimiento. Se seleccionó una aguja 30 G como tamaño apropiado para administrar los compuestos. Se insertó cuidadosamente la aguja dentro del músculo de la pata trasera derecha de cada rata y se administró lentamente un bolo de $100 \mu\text{l}$.

Prueba de Analgesia

Se colocaron los roedores en soportes para restringir sus movimientos y se colocaron sus colas bajo un haz de luz emisor de calor. Se encendió la luz y se registró el tiempo hasta que el animal retiró con un movimiento rápido la cola del haz de luz en cada momento puntual. Cuando los animales movieron sus colas sin movimientos rápidos, se los sometió nuevamente a la prueba sólo si la duración del tiempo bajo el haz de luz radiante era menor que 5 segundos.

Evaluación de los Datos de Analgesia

Se convirtieron los datos sin procesar (tiempos registrados) en un porcentaje del máximo efecto posible (% M.E.P.) que se determinó como 15 segundos. El % de M.E.P. se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ M.E.P.} = (\text{Tiempos registrados} - \text{Basal}) / (15 - \text{Basal}) \times 100$$

Estos porcentajes permitieron posteriormente realizar una gráfica % M.E.P. vs Tiempo del compuesto. Posteriormente puede analizarse la curva para determinar el área bajo la curva (ABC).

Los resultados de la administración i.c.v. del PEG-DPDPE indican claramente que la PEGilación no interfiere con la capacidad del DPDPE para producir un efecto analgésico (Figura 1). Además, el estudio mostró una tendencia hacia una prolongación del efecto analgésico del compuesto PEGilado en comparación con el compuesto inicial.

La inyección intravenosa de PEG-DPDPE mostró que el compuesto PEGilado es capaz de cruzar la barrera hemoencefálica, en cantidad suficiente como para mantener sus propiedades analgésicas (Figura 2). Este estudio también ayudó a confirmar que la PEGilación de DPDPE prolonga significativamente la duración del efecto analgésico.

Todas las muestras de bifalina PEGilada y bifalina exhibieron una respuesta analgésica potente en ratones con una respuesta máxima de 80-90% alcanzada entre 30-45 minutos. La (mPEG_{2K})₂-bifalina continuó prolongando el

ES 2 275 561 T3

efecto analgésico con un 50% de M.E.P. observado en el minuto 400 del estudio en comparación con el minuto 90 para bifalina nativa. Los datos también muestran una relación inversa entre el peso molecular del PEG y el % M.E.P. (Figura 3). Al comparar el efecto analgésico de bifalina monopegilada (mPEG_{2K}-bifalina) en la misma concentración en ratones, la duración del efecto analgésico para mPEG_{2K}-bifalina es casi la mitad del efecto para (mPEG_{2K})₂-bifalina en el 50% M.E.P. (Figura 4). De hecho, hay un efecto analgésico casi equivalente de mPEG_{2K}-bifalina con la mitad de la dosis de (mPEG_{2K})₂-bifalina.

La administración intravenosa de (mPEG_{2K})₂-bifalina da un efecto analgésico de mayor duración en ratas que la bifalina nativa en las diversas dosis probadas. (Figura 5). Las ratas a las que se les administró (mPEG_{2K})₂-bifalina por vía subcutánea o intramuscular mostraron actividad analgésica elevada y sostenida en comparación con bifalina nativa en la misma concentración (Figura 6).

Ejemplo 8

15 *Estudios de Perfusión in situ de PEG-DPDPE y PEG-Bifalina*

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Arizona aprobó el protocolo para los experimentos de perfusión en cerebro de rata. Los estudios de perfusión *in situ* se realizaron como se informó anteriormente (Williams y col., J. Neurochem., 66 (3), págs. 1289-1299, 1996). PEG_{2K}-DPDPE tuvo un valor de captación RBr muy alto de 3,41 ± 0,15. La perfusión *in situ* de I¹²⁵ DPDPE es comparable con la de DPDPE monopegilado, R_{Br} = 3,54 ± 0,30. La Bifalina marcada con I¹²⁵ tiene una captación de perfusión *in situ* de 7,26 ± 0,11, mientras que la captación *in situ* de (mPEG_{2K})₂-Bifalina fue dramáticamente inferior, valor de RBr de 2,70 ± 0,27.

Muchas modificaciones y otras formas de realización de la invención surgirán en la mente de un experto en la técnica a la que pertenece esta invención con el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los gráficos asociados. Por consiguiente, debe entenderse que la invención no está limitada a las formas de realización específicas descritas y que la intención es incluir esas modificaciones y otras formas de realización dentro del alcance de las reivindicaciones. Aunque en este documento se usan términos específicos, sólo se los usa en un sentido genérico y descriptivo y sin intención de limitación alguna.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado polímero-péptido sustancialmente hidrófilo que comprende un péptido covalentemente unido a polietilenglicol o a un copolímero de polietilenglicol y polipropilenglicol que tiene un peso molecular promedio nominal de desde 200 daltons hasta 40.000 daltons, en el que dicho péptido se selecciona del grupo constituido por bifalina y [D-Pen2, D-Pen5] encefalina (DPDPE).
- 10 2. El conjugado de la Reivindicación 1 en el que dicho polímero está además **caracterizado** por la ausencia de fragmentos lipófilos.
3. El conjugado de la Reivindicación 1 **caracterizado** además por la unión covalente de polietilenglicol o un copolímero de polietilenglicol y polipropilenglicol en un residuo tirosina de dicho péptido.
- 15 4. El conjugado de la Reivindicación 1 en el que dicho polímero es polietilenglicol.
5. El conjugado de la Reivindicación 4, en el que dicho polietilenglicol se selecciona del grupo constituido por monometoxipolietilenglicol, polietilenglicol ramificado, polietilenglicol con enlaces degradables en el esqueleto, polietilenglicol homobifuncional, polietilenglicol heterobifuncional, polietilenglicol de brazos múltiples, polietilenglicol pendiente y polietilenglicol bifurcado.
- 20 6. El conjugado de la Reivindicación 1, en el que dicho péptido está conjugado con al menos una molécula de polietilenglicol.
- 25 7. El conjugado de la Reivindicación 1, que comprende bifalina unida covalentemente a dos fragmentos de polietilenglicol.
8. El conjugado de la Reivindicación 1, en el que dicho polímero es polietilenglicol con un peso molecular promedio nominal de desde 200 daltons hasta 10.000 daltons, ó 300 hasta 8.000 daltons, ó 500 hasta 5.000 daltons, ó 5.000 daltons, ó 2.000 daltons.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 10. El conjugado de la Reivindicación 1 que comprende además un agente neuroactivo que puede ser el mismo péptido o uno diferente, conjugado con dicho polímero.
11. El conjugado de la Reivindicación 10 **caracterizado** además por una estructura en forma de pesa.
- 40 12. El conjugado de la Reivindicación 1 que además comprende doxorrubicina o un agente para diagnóstico o para generación de imágenes conjugado con dicho polímero.
13. El uso del conjugado de la Reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el dolor, en el que dicha composición se administrará a través de la circulación general.
- 45 14. El uso del conjugado de la Reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para administrar un péptido dentro del cerebro de un animal, en el que dicha composición se administrará en el torrente sanguíneo de dicho animal.
- 50 15. El uso de la Reivindicación 14, en el que dicho polímero se selecciona del grupo constituido por monometoxipolietilenglicol, polietilenglicol ramificado, polietilenglicol con enlaces degradables en el esqueleto, polietilenglicol homobifuncional, polietilenglicol heterobifuncional, polietilenglicol de brazos múltiples, polietilenglicol pendiente y polietilenglicol bifurcado.
- 55 16. El uso de la Reivindicación 14 ó 15, en el que la etapa de administración de la composición comprende la inhalación pulmonar o intranasal en dicho animal.
17. El uso de la Reivindicación 14 ó 15, en el que la etapa de administración de la composición es por administración oral, ocular, bucal, transdérmica o rectal.
- 60 18. El uso de un conjugado polímero-péptido sustancialmente hidrófilo entre un péptido opioide y polietilenglicol o un copolímero de polietilenglicol y polipropilenglicol con un peso molecular promedio nominal de desde 200 hasta 40.000 daltons en el que el péptido se selecciona del grupo constituido por dinorfina, encefalina, endorfina y endomorfinas para la preparación de una composición farmacéutica para administrar un péptido opioide dentro del cerebro de un animal para el tratamiento del dolor, en el que dicha composición se administrará en el torrente sanguíneo de un animal.
- 65

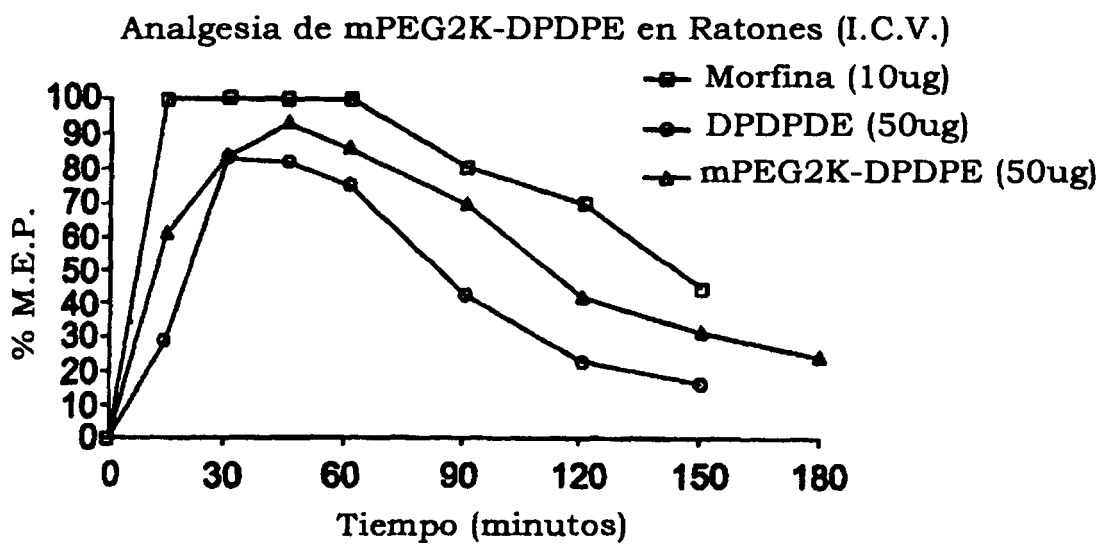


FIG. 1.

Analgesia de mPEG2K-DPDPE en Ratones (I.V.)

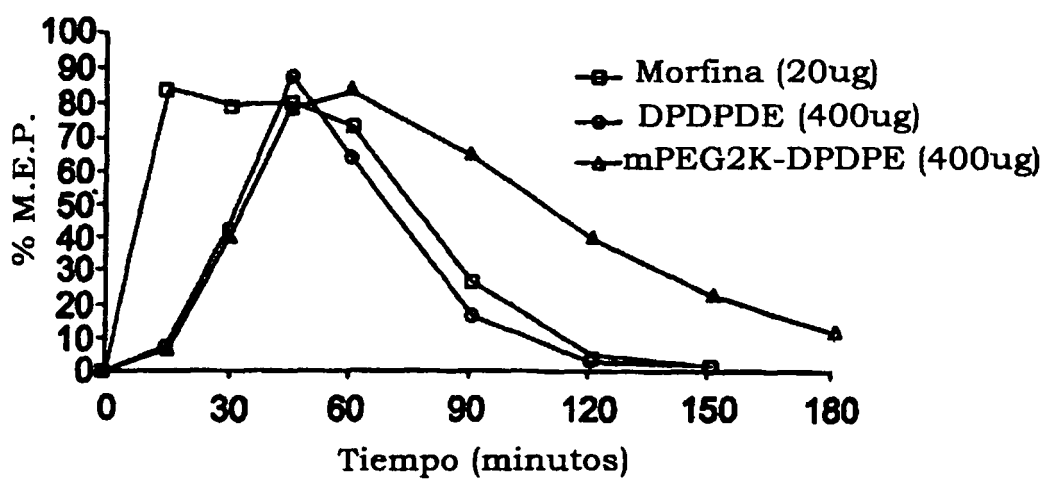


FIG. 2.

Dependencia del PM de PEG en la Analgesia con Bifalina en Ratones (I.V.)

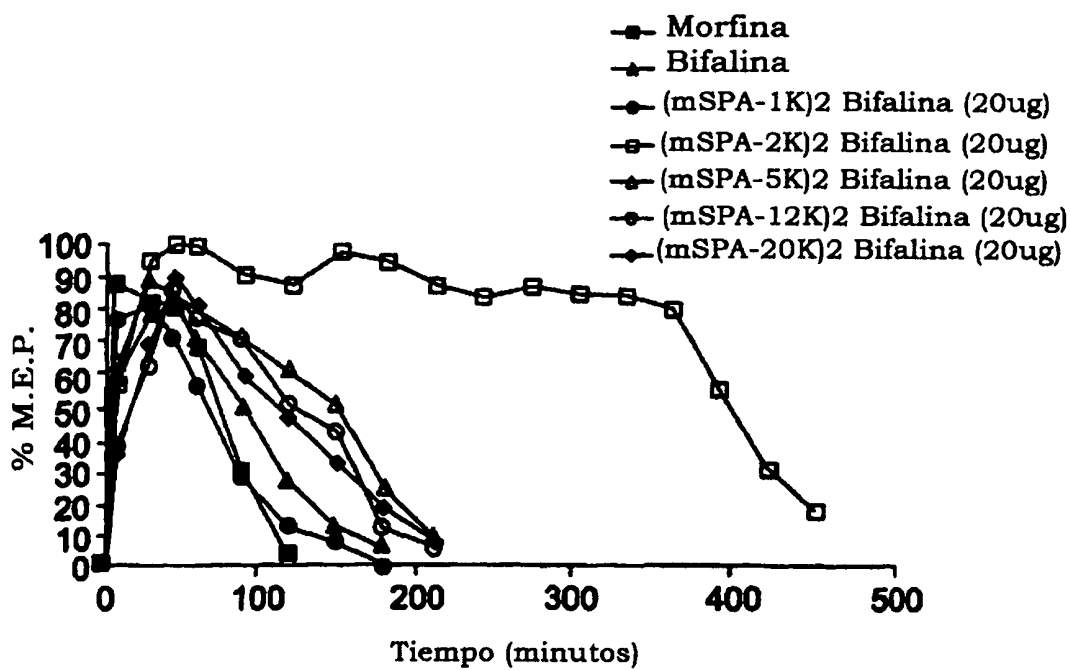


FIG. 3.

Analgesia de Análogos de mPEG2K-Bifalina

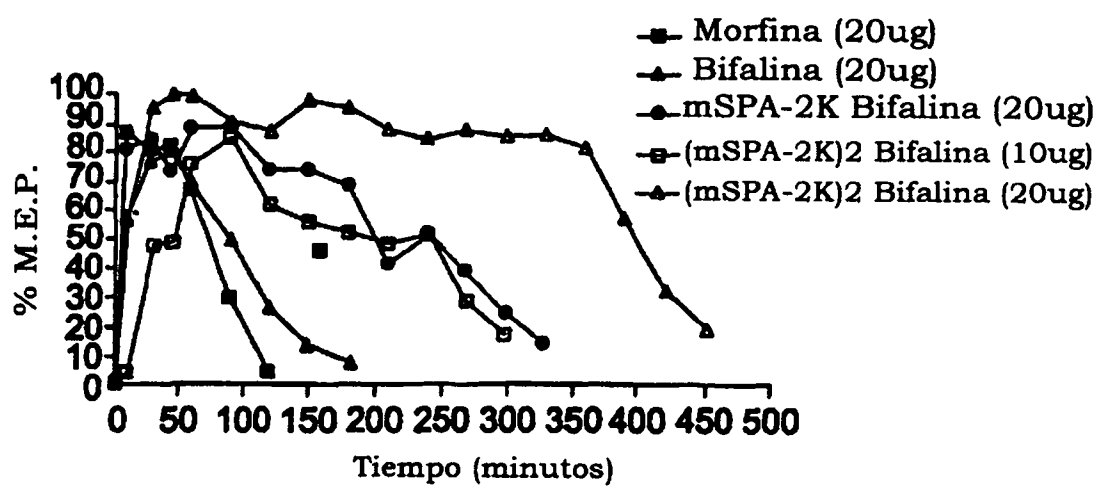


FIG. 4.

Analgesia de (mPEG2K)2 Bifalina en Ratas en Diversas Dosis

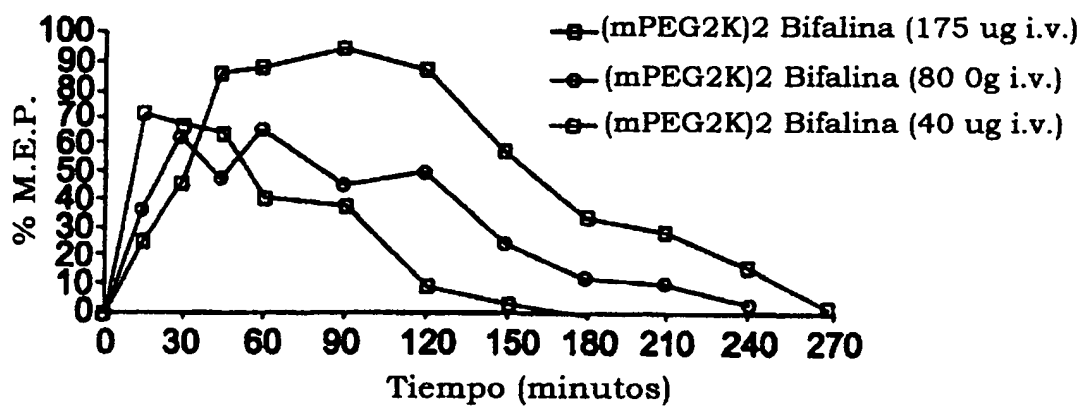


FIG. 5.

Inyección S.C. e I.M. de Bifalina y PEG Bifalina en Ratas

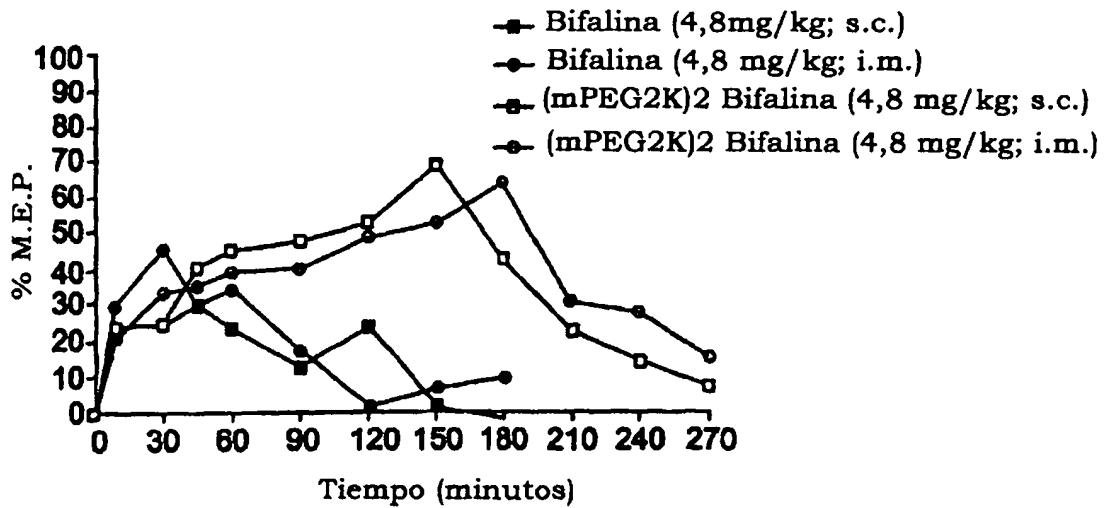


FIG. 6.