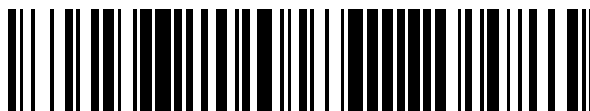


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 397**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/10 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2010 PCT/KR2010/001674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO10107256**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2010 E 10753706 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2408800**

54 Título: **Procedimiento para preparar un conjugado específico de sitio de un polipéptido fisiológicamente activo**

30 Prioridad:

20.03.2009 KR 20090023953

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

24.10.2016

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550 Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon,
Hwaseong-si
Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**SONG, DAE HAE;
SHIN, JAE HEE;
LEE, JAE MIN;
PARK, YOUNG KYUNG;
KWON, SE CHANG y
LEE, GWAN SUN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 587 397 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

Procedimiento para preparar un conjugado específico de sitio de un polipéptido fisiológicamente activo

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo específico de sitio, más particularmente, a un procedimiento para preparar dicho conjugado en un alto rendimiento mediante la unión de un polipéptido fisiológicamente activo con un polímero no peptidílico.

Antecedentes de la invención

- 10 Los péptidos se desnaturalizan fácilmente debido a su baja estabilidad, se degradan por proteasas *in vivo* y se excretan a través del riñón debido a su tamaño relativamente pequeño. En consecuencia, para mantener una concentración específica en la sangre de un fármaco peptídico en su forma activa, es necesario administrar el fármaco peptídico con frecuencia a un paciente. Sin embargo, los fármacos peptídicos se administran normalmente en forma de preparaciones inyectables, y dicha administración frecuente provoca fuertes molestias para los pacientes. Para resolver dicho problema, se han desarrollado varios procedimientos, por ejemplo, un procedimiento para transferir el fármaco peptídico a través de inhalación orofaríngea o nasofaríngea mediante el aumento de la penetración del fármaco peptídico a través de las membranas biológicas, un procedimiento para modificar una secuencia de aminoácidos específica que es sensible a las proteasas (por ejemplo, secuencia de aminoácidos de GLP-1 para prevenir la pérdida de los títulos por una dipeptidil peptidasa) para estabilizar el péptido mediante la inhibición de la degradación por la enzima, y un procedimiento para añadir químicamente un polímero no peptidílico con una alta solubilidad, tal como polietilenglicol (PEG), sobre la superficie del péptido.

- 20 El PEG, que se ha usado como un polímero no peptidílico, se une de forma no específica a un sitio específico o a múltiples sitios de un péptido diana para lograr el efecto de aumentar el peso molecular del péptido, el PEG-péptido resultante resiste la pérdida a través del riñón y la hidrólisis enzimática, sin provocar ningún efecto secundario. Por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO 2006/076471 describe el mantenimiento de la actividad fisiológica de un péptido natriurético de tipo B (BNP) usado como agente terapéutico para insuficiencia cardíaca congestiva mediante la unión de PEG al mismo, y la patente de EE. UU. n.º 6.924.264 describe el aumento del tiempo de residencia *in vivo* de un fármaco de exendina-4 por medio de la unión de PEG al residuo de lisina del mismo.

- 25 Estos procedimientos prolongan el tiempo de residencia *in vivo* de un fármaco peptídico mediante el aumento del peso molecular de PEG, pero a medida que aumenta el peso molecular, el título del fármaco peptídico se reduce significativamente. Además, la unión no específica de PEG puede ocultar el dominio activo de un polipéptido fisiológicamente activo para disminuir significativamente la actividad del polipéptido.

- 30 Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar un procedimiento mejorado para preparar un conjugado de un polipéptido fisiológicamente activo y un polímero no peptidílico, en el que el polímero se una al péptido de una manera específica de sitio que no afecte a la actividad del polipéptido.

- 35 Los autores de la presente invención han completado la invención mediante la confirmación de que se puede preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo que tiene un polímero no peptidílico unido de forma específica de sitio en un alto rendimiento mediante el ajuste del pH y el contenido de alcohol del medio de reacción.

Sumario de la invención

- 40 En consecuencia, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento de alto rendimiento para preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo en el que un polímero no peptidílico se une de forma específica de sitio a un polipéptido fisiológicamente activo.

- 45 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo específico de sitio, que comprende las etapas de: i) someter a una reacción un polipéptido fisiológicamente activo y un polímero no peptidílico en un medio de reacción que contiene una cantidad específica de un alcohol y tiene un pH específico para posibilitar que el polímero no peptidílico se una a un sitio diana del polipéptido fisiológicamente activo; y ii) aislar y purificar el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo a partir de la mezcla de reacción de la etapa (i) por cromatografía de intercambio iónico usando un alcohol, en el que las condiciones del procedimiento y los reactivos son como se expone en la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

- 50 Los objetivos y características anteriores y otros de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se toma en relación con los dibujos adjuntos, que muestran respectivamente:

La Fig. 1: un perfil de purificación de isómeros posicionales de DA-exendina-4-PEG usando la columna SOURCE S;

la Fig. 2: un perfil de purificación de isómeros posicionales de CA-exendina-4-PEG usando la columna SOURCE S;

- la Fig. 3: un gráfico que muestra isómeros Lys27-pegilados obtenido cuando se pegila CA-exendina-4 a pH variable;
- la Fig. 4: un gráfico que muestra isómeros Lys27-pegilados obtenidos cuando se pegila CA-exendina-4 a pH variable y en EtOH al 45 %.
- 5 la Fig. 5: un gráfico que muestra isómeros Lys27-pegilados obtenidos cuando se pegila CA-exendina-4 a pH 7,5 y en una cantidad variable (%) de etanol;
- la Fig. 6: un gráfico que muestra isómeros Lys27-pegilados obtenidos cuando se pegila CA-exendina-4 a pH 7,5 y en una cantidad variable (%) de isopropanol;
- la Fig. 7: un análisis de SDS-PAGE de CA-exendina-PEG-Fc de inmunoglobulina;
- la Fig. 8: un análisis de SDS-PAGE de CA-exendina-PEG Lys12 y Lys27;
- 10 la Fig. 9: un perfil de análisis de isómeros Lys12-pegilados de CA-exendina-4 por identificación genética;
- la Fig. 10: un perfil de análisis de isómeros Lys27-pegilados de CA-exendina-4 por identificación genética;
- la Fig. 11: un perfil de purificación de isómeros posicionales de oxintomodulina-PEG usando la columna SOURCE S;
- la Fig. 12: un perfil de purificación de isómeros posicionales de imidazo-acetiloxintomodulina-PEG usando la columna SOURCE S;
- 15 la Fig. 13: un perfil de análisis de isómeros Lys30-pegilados de oxintomodulina por identificación genética;
- la Fig. 14: un perfil de purificación de un conjugado de imidazo-acetiloxintomodulina-PEG y Fc de inmunoglobulina usando la columna SOURCE Q;
- la Fig. 15: un análisis de SDS-PAGE de un conjugado de imidazo-acetiloxintomodulina-PEG y Fc de inmunoglobulina;
- 20 la Fig. 16: un perfil de purificación de isómeros posicionales de análogo de oxintomodulina-PEG usando la columna SOURCE S;
- la Fig. 17: un perfil de análisis de isómeros Lys27-pegilados de análogo de oxintomodulina por identificación genética;
- la Fig. 18: un perfil de purificación de isómeros posicionales de imidazo-análogos de acetiloxintomodulina-PEG usando la columna SOURCE S;
- 25 la Fig. 19: un perfil de análisis de isómeros Lys27-pegilados de imidazo-análogo de acetiloxintomodulina por identificación genética;
- la Fig. 20: un perfil de purificación de un conjugado de imidazo-análogo de acetiloxintomodulina-PEG y Fc de inmunoglobulina usando la columna SOURCE Q;
- la Fig. 21: un análisis de SDS-PAGE de un conjugado de imidazo-análogo de acetiloxintomodulina-PEG y Fc de inmunoglobulina;
- 30 la Fig. 22: un perfil de purificación de isómeros posicionales de GLP-1-PEG usando la columna SOURCE S;
- la Fig. 23: un perfil de análisis de isómeros Lys34-pegilados de GLP-1 por identificación genética;
- la Fig. 24: un perfil de purificación de isómeros posicionales de imidazo-acetil GLP-1-PEG usando la columna SOURCE S;
- la Fig. 25: un perfil de análisis de isómeros Lys34-pegilados de imidazo-acetil GLP-1 por identificación genética;
- 35 la Fig. 26: un perfil de purificación de un conjugado de imidazo-acetil GLP-1-PEG y Fc de inmunoglobulina usando la columna SOURCE Phe;
- la Fig. 27: un análisis de SDS-PAGE de un conjugado de imidazo-acetil GLP-1-PEG y Fc de inmunoglobulina;
- la Fig. 28: un perfil de purificación de isómeros posicionales de GLP-2-PEG usando la columna SOURCE S;
- la Fig. 29: un perfil de análisis de isómeros Lys30-pegilados de GLP-2 por identificación genética;
- 40 la Fig. 30: un perfil de purificación de isómeros posicionales de imidazo-acetil GLP-2-PEG usando la columna SOURCE S;
- la Fig. 31: un perfil de purificación de un conjugado de imidazo-acetil GLP-2-PEG y Fc de inmunoglobulina usando la columna SOURCE Phe;

la Fig. 32: un análisis de SDS-PAGE de un conjugado de imidazo-acetil GLP-2-PEG y Fc de inmunoglobulina;

la Fig. 33: un perfil de purificación de isómeros posicionales de insulina humana-PEG (B1F) usando la columna SOURCE S;

5 la Fig. 34: un perfil de purificación de isómeros posicionales de insulina humana-PEG (A1G) usando la columna SOURCE S;

la Fig. 35: un perfil de purificación de isómeros posicionales de insulina humana-PEG (B29K) usando la columna SOURCE S; y

la Fig. 36: un perfil de análisis de isómeros A1G-, B1F- o B29K-pegilados de insulina humana por identificación genética.

10 Descripción detallada de la invención

A continuación en el presente documento, se describirá en detalle la presente invención.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo específico de sitio, que comprende las etapas de:

15 i) tratar un polipéptido fisiológicamente activo con un polímero no peptídico en un medio de reacción que contiene una cantidad específica de un alcohol y tiene un pH específico para posibilitar que el polímero no peptídico se una a un sitio diana del polipéptido fisiológicamente activo; y

ii) aislar y purificar el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo a partir de la mezcla de reacción de la etapa (i) por cromatografía de intercambio iónico usando un alcohol, en el que las condiciones del procedimiento y los reactivos son como se expone en la reivindicación 1.

20 Un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo en el presente documento se refiere a una sustancia en la que un polipéptido fisiológicamente activo y un extremo de un polímero no peptídico se unen covalentemente entre sí, y la presente invención se caracteriza por la unión de un polipéptido con un polímero en una condición específica y el aislamiento del conjugado de polipéptido resultante que tiene el polímero unido en un sitio diana del mismo.

25 La expresión "polipéptido o péptido fisiológicamente activo", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido que puede mostrar una actividad fisiológica in vivo, por ejemplo, se puede seleccionar de un grupo que consiste en péptido insulínico, factor sanguíneo, hormona digestiva, hormona adrenocorticotrófica, hormona tiroidea, hormona intestinal, citocina, enzima, factor de crecimiento, neuropéptido, hormona hipofisiotrófica, hormona hipofisiotrófica, péptido antiobesidad, péptido antivírico, y derivados de péptidos no naturales que retienen la propiedad fisiológicamente activa, pero no limitada a los mismos. Más particularmente, el polipéptido o péptido
30 fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina, GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos), amilina, glucagón, insulina, somatostatina, PYY (péptido YY), NPY (neuropéptido Y), GLP-1, GLP-2, exendina-4, oxintomodulina, grelina, angiotensina, bradisinina, calcitonina, corticotropina, eleodisina, gastrina, leptina, oxitocina, vasopresina, LH (hormona luteinizante), prolactina, FSH (hormona foliculoestimulante), PTH (hormona paratiroidea), secretina, sermorelina, hGH (hormona humana del crecimiento), péptido liberador de la hormona del crecimiento, G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), interferones, interleucinas, péptido liberador de prolactina, orexina, péptido liberador de hormona tiroidea, pancreocimina, péptido inhibidor de gastrina, calmodulina, péptido liberador de gastrina, motilina, péptido vasoactivo intestinal, ANP (péptido natriurético auricular), BNP (péptido natriurético cerebral), CNP (péptido natriurético de tipo C), neurocinina A, neuromedina, renina, endotelina, péptido sarafotóxina, péptido carsomorfina, dermorfinina, dinorfina, endorfina, encefalina, factor de linfocitos T, factor de necrosis tumoral, receptor del factor de necrosis tumoral, receptor de urocinasa, factor inhibidor tumoral, inhibidor de colagenasa, timopoyetina, timulina, timopentina, timosina, factor humoral tímico, adrenomodulina, allostatina, fragmento de proteína beta-amiloide, péptido antimicrobiano, péptido antioxidante, bombesina, osteocalcina, péptido CART, E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, leucocina, kringle-5, laminina, inhibina, galanina, fibronectina, pancreastatina y Fuzon. Además, el polipéptido fisiológicamente activo
45 incluye un precursor, un derivado, un fragmento o una variante de los mismos.

Los polipéptidos activos exendina, insulina, GLP-1, GLP-2, oxintomodulina, grelina, angiotensina, bradisinina, calcitonina o un derivado de las mismas. El derivado de los mismos se puede preparar, por ejemplo, por sustitución (por ejemplo, alfa-metilación o alfa-hidroxilación), eliminación (por ejemplo, desaminación o eliminación de carbono) o modificación (por ejemplo, N-metilación) química de cualquier grupo en un residuo de aminoácido y, particularmente,
50 la preparación del derivado de exendina se describe en detalle en la solicitud de patente coreana n.º 2008-69234.

En cambio, la expresión "polímero no peptídico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades de repetición unidas entre sí por un enlace covalente excepto un enlace peptídico.

El polímero no peptídico que se puede usar en la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en

polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, poli(alcohol vinílico), polisacáridos, dextrano, poli(éter vinilético), polímeros biodegradables, tales como PLA (poli(ácido láctico)) y PLGA (poli(ácido láctico-glicólico)), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos, y se reivindica polietilenglicol. Se podría prever un derivado del mismo, que se conozca en la técnica o se prepare fácilmente basado en la experiencia de la técnica. El polímero no peptídico que se puede usar en la presente invención funciona aumentando el peso molecular de un polipéptido fisiológicamente activo para prevenir la pérdida del conjugado a través del riñón. Se puede usar sin ninguna limitación cualquier polímero no peptídico, siempre que sea resistente a las proteasas *in vivo*. El peso molecular del polímero no peptídico puede estar en el intervalo de 0,5 a 100 kDa, preferentemente de 0,5 a 20 kDa, y la proporción molar adecuada del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico se puede elegir en el intervalo de 1:1 a 1:50.

El polímero no peptídico usado en la presente invención tiene un grupo reactivo en un extremo o en ambos extremos. En el caso de que el polímero no peptídico tenga un grupo reactivo en ambos extremos, se puede unir a un vehículo fisiológicamente activo y un fármaco proteico que ayude a que funcione como una formulación de acción prolongada.

El grupo reactivo en un extremo o ambos extremos del polímero no peptídico se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un grupo succinimida reactivo. Los ejemplos del grupo succinimida incluyen propionato de succinimidilo, butanoato de succinimidilo, hidroxisuccinimidilo, carboximetilsuccinimidilo o carbonato de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptídico tiene un grupo reactivo aldehído o un grupo reactivo succinimidilo en un extremo, es eficaz en la unión en ambos extremos con un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina con reacciones no específicas mínimas. El grupo reactivo aldehído se une de forma selectiva a un extremo N a un pH bajo, y se puede unir a un residuo de lisina para formar un enlace amida a un pH alto, tal como a pH 9,0. Además, el grupo reactivo succinimidilo puede formar un enlace amida estable con un extremo amino o residuo de lisina a pH 7,0 ~ 9,0.

Además, los grupos reactivos de ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes. Cuando se usa un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo hidroxilo en ambos extremos del mismo como el polímero no peptídico, se puede activar el grupo hidroxilo en varios grupos reactivos por reacciones químicas conocidas, o se puede usar un polietilenglicol disponible comercialmente que tenga un grupo reactivo modificado.

La etapa (i) de la presente invención es preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo uniendo de forma específica de sitio un polímero no peptídico con un polipéptido fisiológicamente activo en un medio de reacción adecuado.

La expresión "específico de sitio" o "de forma específica de sitio", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de un polímero no peptídico en un sitio del aminoácido diana específico de un polipéptido fisiológicamente activo, preferentemente una amina del residuo de lisina o extremo N. La unión o enlace específico de sitio puede prevenir la formación de conjugados incidentales en los que el polímero no peptídico se une a un residuo de aminoácido fisiológicamente importante. Por ejemplo, cuando un polímero no peptídico se une al extremo N de exendina-4, se reducía la actividad *in vitro* de la exendina-4, pero cuando un polímero no peptídico se une a un residuo de lisina, se mantenía la actividad *in vitro*. En particular, cuando un polímero no peptídico se une al 27.º residuo de lisina en lugar del 12.º residuo de lisina, se observó actividad *in vitro* mucho mayor (véase el ejemplo 10 y la tabla 2).

Los autores de la presente invención han encontrado que la presencia de un alcohol en un medio de reacción y el pH del medio de reacción en la etapa (i) son factores críticos para una unión específica de sitio de un polímero no peptídico y un polipéptido fisiológicamente activo. En consecuencia, en la etapa (i) de la presente invención, un polímero no peptídico se une a un sitio específico de un polipéptido fisiológicamente activo, usando un medio de reacción que contiene un contenido específico de un alcohol y que tiene un pH específico.

En un modo de realización específico de la presente invención, la proporción de un isómero posicional específico del conjugado de polipéptido se puede variar basándose en el pH del medio de reacción, o basándose en la concentración (%) de un alcohol al mismo pH. Por lo tanto, es posible unir un polímero no peptídico a un aminoácido deseado de un polipéptido fisiológicamente activo de una manera específica de sitio.

Es decir, la etapa (i) de la presente invención se lleva a cabo a un pH específico para posibilitar que el polímero no peptídico se una a un sitio deseado (o diana), es decir, que la dosis no afecte a la actividad del polipéptido. El intervalo de pH puede depender de los tipos de polipéptido fisiológicamente activo. Por ejemplo, en caso de un péptido insulínico (por ejemplo, la exendina-4), se observó en gran medida un isómero en el que el polímero está unido a la 12.º lisina a pH bajo del medio de reacción, mientras que se observó en gran medida un isómero en el que el polímero está unido a la 27.º lisina que no afecta a la actividad insulínica a pH alto del medio de reacción (véase el ejemplo 3 y la Fig. 3). En consecuencia, la etapa (i) se lleva a cabo preferentemente a un pH de 7,5 a 9,0 de manera que el polímero no peptídico se acople selectivamente a la 27.º lisina.

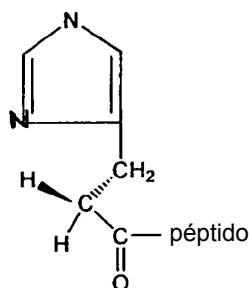
Además, la etapa (i) de la presente invención se lleva a cabo en un medio de reacción que contiene un alcohol de modo que un polímero no peptídico se pueda unir a un sitio que no afecte a la actividad del polipéptido. Los ejemplos

del alcohol incluyen alcohol primario, secundario y terciario, preferentemente un alcohol que tiene un número de carbonos de uno a diez, más preferentemente etanol o isopropanol. En el caso de un péptido insulínico (por ejemplo, la exendina-4), puede estar presente un alcohol en el medio de reacción, en una cantidad que varía, en volumen, de un 25 % a un 90 %, preferentemente de un 35 % a un 60 %, basándose en el volumen total del medio de reacción, para posibilitar que un polímero no peptídico se una a la 27.^o lisina que no afecta a la actividad insulínica.

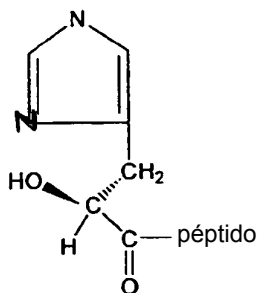
Cuando un polipéptido fisiológicamente activo es exendina-4 o un derivado de la misma, el pH empleado en la etapa (i) puede ser de 7,0 a 10,0 para potenciar la proporción de unión de un polímero no peptídico a Lys27. En otro modo de realización de la presente invención, cuando un polipéptido fisiológicamente activo es calcitonina, el pH empleado en la etapa (i) puede ser de 4,0 a 6,0 para potenciar la proporción de unión de un polímero no peptídico al extremo N. Cuando un polipéptido fisiológicamente activo es oxintomodulina o un derivado de la misma, el pH empleado en la etapa (i) puede ser de 7,0 a 10,0 para potenciar la proporción de unión de un polímero no peptídico a Lys27 o Lys30. Cuando un polipéptido fisiológicamente activo es insulina humana o un derivado de la misma, el pH empleado en la etapa (i) puede ser de 4,0 a 6,0 para potenciar la proporción de unión de un polímero no peptídico a Phe1 (1.^o fenilalanina) N-terminal en la cadena B. Cuando un polipéptido fisiológicamente activo es insulina humana o un derivado de la misma, el pH empleado en la etapa (i) puede ser de 7,0 a 10,0 para potenciar la proporción de unión de un polímero no peptídico a Gly1 (1.^o glicina) N-terminal en la cadena A, o a Lys29 (29.^o lisina) en la cadena B. Cuando un polipéptido fisiológicamente activo es GLP-1 o un derivado del mismo, el pH empleado en la etapa (i) puede ser de 7,0 a 10,0 para potenciar la proporción de unión de un polímero no peptídico a Lys34. Cuando un polipéptido fisiológicamente activo es GLP-2 o un derivado del mismo, el pH empleado en la etapa (i) puede ser de 7,0 a 10,0 para potenciar la proporción de unión de un polímero no peptídico a Lys30.

En consecuencia, el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo específico de sitio preferente de la presente invención es un conjugado de exendina-4 en el que está unido PEG a Lys27, un conjugado de calcitonina en el que está unido PEG al extremo N, un conjugado de oxintomodulina o un análogo de la misma en el que está unido PEG a Lys27 o Lys30, un conjugado de insulina humana o un análogo de la misma en el que está unido PEG a Phe1 N-terminal en la cadena B, Gly1 N-terminal en la cadena A o a Lys29 en la cadena B, o un conjugado de GLP 1 o GLP-2 en el que está unido PEG a Lys34 o Lys30.

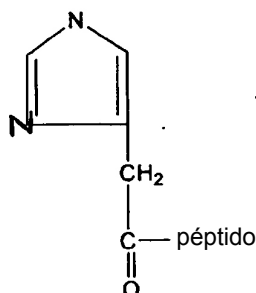
En un aspecto preferente de la presente invención, se puede usar un derivado del péptido (o análogo) para facilitar una unión específica de sitio entre un polímero no peptídico y un polipéptido fisiológicamente activo. El derivado es un péptido que tiene cualquiera de los otros sitios de aminoácidos no diana eliminados o protegidos para prevenir la unión no deseada. Por ejemplo, en el caso de un péptido insulínico como una exendina, se pueden usar varios derivados de la exendina, tales como des-amino-histidil (DA)-exendina-4 de fórmula (I), beta-hidroxi-imidazopropionil (HY)-exendina-4 de fórmula (II), imidazoacetil (CA)-exendina-4 de fórmula (III) y dimetil-histidil (DM)-exendina-4 de fórmula (IV), que se preparan usando los procedimientos en los que se elimina un grupo amina alfa del aminoácido N-terminal, histidina, se sustituye el grupo amina N-terminal con un grupo hidroxilo, se modifica el grupo amina alfa N-terminal de histidina con dos grupos metilo, o se eliminan un carbono alfa de histidina N-terminal y un grupo amina unido a la misma para dejar un grupo imidazoacetilo, pero no limitados a los mismos. Las estructuras de dichos derivados de exendina ejemplares y procedimientos de preparación de los mismos se describen en la publicación de patente coreana no examinada n.º 2009-0008151, que se incluye dentro del alcance de la presente invención por referencia a las fórmulas en la página 11 de la misma.



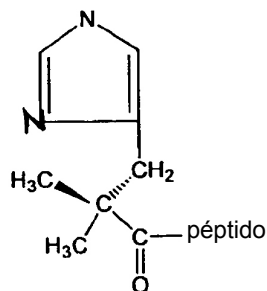
Fórmula I



Fórmula II



Fórmula III



Fórmula IV

Del mismo modo, la oxintomodulina, GLP-1 y GLP-2 que tienen una histidina como 1.º aminoácido también se usan como un derivado que tiene cualquier estructura seleccionada de las fórmulas (I) a (IV).

En un modo de realización particular de la presente invención, los autores de la presente invención han investigado los efectos del pH y el contenido de un alcohol (%) del medio de reacción sobre el aspecto de unión específica de sitio del polímero no peptidílico, y confirmaron que la proporción de los conjugados de péptido insulínico que tienen el polímero unido a la 12.º lisina/27.º lisina es variada dependiendo del cambio de pH y la cantidad de etanol o isopropanol, en particular. En particular, se obtuvo en gran medida un isómero más preferente que tiene el polímero no peptidílico unido al 27.º residuo de lisina cuando se usa de un 35 % a un 55 %, preferentemente aproximadamente un 45 % de etanol o isopropanol a pH 7,5.

Después de potenciar la proporción del conjugado de polímero no peptidílico-polipéptido fisiológicamente activo deseado mediante el ajuste en un pH y un contenido de alcohol específicos en la etapa (i), el conjugado deseado se puede aislar y purificar por cromatografía de intercambio iónico usando un alcohol en la etapa (ii).

El alcohol usado en la etapa (ii) está presente en una solución de purificación, y sus ejemplos específicos son como se define en la etapa (i). Sin embargo, el alcohol de la etapa (i) se empleó con el fin de aumentar la reactividad y especificidad de sitio del polipéptido mediante la modificación de la estructura secundaria o terciaria del mismo, mientras que el alcohol de la etapa (ii) se empleó con el propósito de facilitar el aislamiento de alto rendimiento y la purificación del conjugado de polipéptido fisiológicamente activo específico de sitio mediante la reducción de enlaces

no específicos entre la columna de intercambio iónico y el conjugado. El aislamiento y purificación se pueden llevar a cabo mediante el uso de varios procedimientos conocidos para un experto en la técnica, preferentemente por cromatografía de intercambio iónico, más preferentemente por cromatografía de intercambio iónico de alta presión.

En cambio, para facilitar el aislamiento y purificación del isómero posicional, la cromatografía de intercambio iónico se puede llevar a cabo a un pH específico. El pH se ajustó adecuadamente para aumentar la especificidad de sitio del conjugado en la etapa (i), mientras que se reajustó para unir el conjugado a y para separarlo de la columna de intercambio iónico en una solución de purificación que contenía un alcohol en la etapa (ii). El pH adecuado empleado en la etapa (ii) puede estar en el intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6,0.

Además, el polipéptido fisiológicamente activo de la presente invención además se puede unir con un vehículo fisiológicamente activo. En este caso, el polímero no peptidílico debe ser un polímero no peptidílico con ambos extremos para unirse con el vehículo fisiológicamente activo. Es decir, un vehículo fisiológicamente activo se une covalentemente a un extremo del polímero no peptidílico que no está unido covalentemente con el polipéptido fisiológicamente activo y, por lo tanto, se puede preparar un conjugado en el que ambos extremos del polímero no peptidílico están unidos con el polipéptido fisiológicamente activo y el vehículo fisiológicamente activo.

Como se describe anteriormente, el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo preparado en la etapa (ii) se puede unir además con un vehículo fisiológicamente activo, y el conjugado de polipéptido-polímero-vehículo resultante muestra actividades completamente diferentes en comparación con el conjugado de polipéptido-polímero, es decir, las excepcionales actividades fisiológicas, tales como la excelente duración prolongada de los efectos farmacológicos de un polipéptido fisiológicamente activo, dirigido a un sitio específico, tal como una lesión a tratar, o la inducción de necrosis.

La expresión "vehículo fisiológicamente activo", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia fisiológicamente activa que muestra actividades adicionales distintas de la actividad fisiológica del polipéptido natural, que puede mantener las actividades fisiológicas del polipéptido, tales como los efectos farmacológicos, o inducir la dirección a un sitio específico o necrosis, mediante la unión a un polipéptido no peptidílico junto con un polipéptido fisiológicamente activo.

El vehículo fisiológicamente activo usado en la presente invención incluye una sustancia que tiene actividades mencionadas anteriormente sin ninguna limitación, por ejemplo, albúmina, región Fc de inmunoglobulina, transferrina, aptámero, toxina, colágeno, dextrano, polisacáridos, ácidos grasos, fibrinógeno y similares. Preferentemente, el vehículo fisiológicamente activo se puede seleccionar de una albúmina, una región Fc de inmunoglobulina y una transferrina, más preferentemente una región Fc de inmunoglobulina.

La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención se refiere a la región constante de la cadena pesada 2 (CH2) y la región constante de la cadena pesada 3 (CH3) de una inmunoglobulina, excluyendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y la región constante de la cadena ligera 1 (CL1). Puede incluir además una región bisagra en la región constante de la cadena pesada. Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser una forma prolongada que contiene parte o la totalidad de la región Fc, incluyendo la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de la cadena ligera 1 (CL1), excepto las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, siempre que tenga una función fisiológica sustancialmente similar a o mejor que la de Fc de inmunoglobulina natural, y puede incluir regiones Fc de inmunoglobulina modificadas por fosforilación, sulfatación, acrilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares. La gama de Fc de inmunoglobulina, el procedimiento para la preparación de la misma, y el procedimiento para la unión covalente de una Fc de inmunoglobulina a un conjugado de polímero no peptidílico-polipéptido fisiológicamente activo se divulgan en las patentes coreanas n.º 775343, 725314, 725315 y 824505.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se puede preparar un conjugado de polipéptido deseado que tenga una excelente actividad fisiológica en un alto rendimiento uniéndose de forma específica de sitio un polímero no peptidílico a un aminoácido específico de un polipéptido fisiológicamente activo, a la vez que se minimiza la formación de conjugados adicionales.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la presente invención.

Ejemplo 1: preparación y aislamiento de conjugado de DA-exendina-4 pegilada (Lys27)

<1-1> Preparación de conjugado de DA-exendina-4 pegilada (Lys27)

Para preparar un conjugado de péptido pegilado mediante unión covalente de Lys en el péptido con el PEG, la des-amino-histidil-exendina-4 (DA-exendina-4, AP, EE. UU.) y el 3,4 K PropionALD (2) PEG (PEG que tiene dos grupos propionaldehído, BID Inc., Corea) se sometieron a una reacción a 4 °C durante 12 horas en una proporción molar de 1:30, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En este momento, se usó tampón HEPES 100 mM (pH 7,5) que contenía isopropanol al 45 % como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH3 20 mM como agente reductor.

<1-2> Aislamiento de isómero posicional

Un péptido monopegilado se purificó principalmente de la mezcla de reacción del ejemplo <1-1> mediante el uso de una cromatografía de intercambio iónico SOURCE Q (XK 16 ml, GE Healthcare, Corea) en las siguientes condiciones, y los isómeros posicionales se aislaron mediante el uso de una cromatografía de intercambio iónico SOURCE S (XK 16 ml, GE Healthcare, Corea) en las siguientes condiciones. En este procedimiento, se usó etanol para facilitar el aislamiento de los isómeros, incluyéndolo en una solución de purificación. Los sitios pegilados se confirmaron a partir de los picos eluidos por el procedimiento de identificación genética.

Columna: SOURCE Q

Caudal: 2,0 ml/min

10 Solución de elución: A (Tris 20 mM, pH 8,5) y B (A + NaCl 0,5 M); Gradiente A de 0—40 %, 80 min

Columna: SOURCE S

Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (ácido cítrico 20 mM, pH 3,0 + etanol al 45 %) y B (A + etanol al 45 % + KCl 0,5 M); Gradiente A de 0—100 %, 45 min.

15 A partir del análisis del perfil de purificación de isómeros posicionales, se encontró que un pico para DA-exendina-4 Lys12-pegilada se eluyó antes, y luego un pico para Lys27-pegilada se eluyó en la última porción (Fig. 1).

Ejemplo 2: preparación y aislamiento de conjugado de CA-exendina-4 pegilada (Lys27)

Se repitió el procedimiento del ejemplo 1 excepto que se usó imidazo-acetil-exendina-4 (CA-exendina-4, Bachem, EE. UU.) en lugar de DA-exendina-4 del ejemplo 1 para obtener el conjugado de CA-exendina-4 pegilada (Lys27). A partir del análisis del perfil de purificación de isómeros posicionales, se encontró que un pico para CA-exendina-4 Lys12-pegilada se eluyó antes, y luego un pico para Lys27-pegilada se eluyó en la última porción (Fig. 2).

Ejemplo 3: cambio en la proporción de conjugado de CA-exendina-4 pegilada (Lys27) de acuerdo con el pH del medio de reacción

Para investigar el cambio en la proporción de un polipéptido pegilado en un sitio específico por el pH, CA-exendina-4 y 3,4 K PropionALD (2) PEG se sometieron a pegilación haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4 °C durante 12 horas en una proporción molar de 1:30, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En este momento, se usaron tampones ácido cítrico 100 mM (pH 3,0), NaOAc 100 mM (pH 4,5), Na-P 100 mM (pH 7,5), Na-P 100 mM (pH 8,5), HEPES 100 mM (pH 8,0) y Na-borato 100 mM (pH 9,2) como medio de reacción, respectivamente, y se le añadieron a los mismos NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Cada mezcla de reacción se purificó por el procedimiento descrito en el ejemplo 1, seguido por el análisis de la proporción del conjugado Lys27-pegilado. Como se muestra en la Fig. 3, la proporción del conjugado Lys27-pegilado se aumentó basado en el aumento de pH, y se confirmó que el pH óptimo era de 7,0 a 10,0.

Ejemplo 4: cambio en la proporción de conjugado de CA-exendina-4 pegilada (Lys27) de acuerdo con el pH del medio de reacción que contiene etanol

Para investigar el cambio en la proporción de un polipéptido pegilado en un sitio específico por etanol y el pH, CA-exendina-4 y 3,4 K PropionALD (2) PEG se sometieron a pegilación haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4 °C durante 12 horas en una proporción molar de 1:30, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En este momento, se usaron tampones ácido cítrico 100 mM (pH 3,0)/etanol al 45 %, NaOAc 100 mM (pH 4,5)/etanol al 45 %, Na-P 100 mM (pH 7,5)/etanol al 45 %, HEPES 100 mM (pH 8,0)/etanol al 45 %, y Na-P 100 mM (pH 8,5)/etanol al 45 % como medio de reacción, respectivamente, y se le añadieron a los mismos NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Cada mezcla de reacción se purificó por el procedimiento descrito en el ejemplo 1, seguido por el análisis de la proporción del conjugado Lys27-pegilado. Como se muestra en la Fig. 4, la proporción del conjugado Lys27-pegilado se aumentó basado en el aumento de pH en un medio de reacción que contenía EtOH al 45 %, y se confirmó que el pH óptimo era de 7,0 a 9,0.

Ejemplo 5: cambio en la proporción de conjugado de CA-exendina-4 pegilada (Lys27) de acuerdo con la concentración de etanol en el medio de reacción

Para investigar el cambio en la proporción de un polipéptido pegilado en un sitio específico por la concentración de etanol en el medio de reacción, CA-exendina-4 y 3,4 K PropionALD (2) PEG se sometieron a pegilación haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4 °C durante 12 horas en una proporción molar de 1:30, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En este momento, se usaron como tampones HEPES 100 mM (pH 7,5)/etanol al 0 %, HEPES 100 mM (pH 7,5)/etanol al 25 %, HEPES 100 mM (pH 7,5) /etanol al 35 %, HEPES 100 mM (pH 7,5) /etanol al 45 %, HEPES 100 mM (pH 7,5)/etanol al 55 %, HEPES 100 mM (pH 1,5)/etanol al 75 % y HEPES 100 mM (pH 7,5)/etanol al 90 % como medio de reacción, respectivamente, y se le añadieron a los mismos NaCNBH₃ 20 mM como agente

reductor. Cada mezcla de reacción se purificó por el procedimiento descrito en el ejemplo 1, seguido por el análisis de la proporción del conjugado Lys27-pegilado. Como se muestra en la Fig. 5, la proporción del conjugado Lys27-pegilado se aumentó hasta que la cantidad de etanol alcanza aproximadamente un 50 %, mientras que disminuyó en más de un 50 % de etanol, y se confirmó que la cantidad óptima de etanol era de un 35 % a un 60 %.

5 **Ejemplo 6: cambio en la proporción de conjugado de CA-exendina-4 pegilada (Lys27) de acuerdo con la concentración de isopropanol en el medio de reacción**

Para investigar el cambio en la proporción de un polipéptido pegilado en un sitio específico por el uso de isopropanol, en lugar de etanol, en el medio de reacción, CA-exendina-4 y 3,4 K PropionALD (2) PEG se sometieron a pegilación haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4 °C durante 12 horas en una proporción molar de 1:30, con una
10 concentración de péptido de 3 mg/ml. En este momento, se usaron tampones HEPES 100 mM (pH 7,5)/isopropanol al 0 %, HEPES 100 mM (pH 7,5)/isopropanol al 30 %, HEPES 100 mM (pH 7,5)/isopropanol al 45 % y HEPES 100 mM (pH 7,5)/isopropanol al 60 % como medio de reacción, respectivamente, y se le añadieron a los mismos NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Cada mezcla de reacción se purificó por el procedimiento descrito en el ejemplo 1,
15 seguido por el análisis de la proporción del conjugado Lys27-pegilado. Como se muestra en la Fig. 6, la proporción del conjugado Lys27-pegilado se aumentó hasta que la cantidad de etanol alcanza aproximadamente un 50 %, mientras que disminuyó en más de un 50 % de etanol, y se confirmó que la cantidad óptima de etanol era de un 35 % a un 60 %.

Ejemplo 7: preparación de un conjugado de CA-exendina-4 (Lys27)-PEG y Fc de inmunoglobulina

Se acopló conjugado de CA-exendina-4 (Lys27)-PEG con un fragmento Fc de inmunoglobulina (Hanmi Pharm. Co. Ltd., Corea), sometiendo a una reacción el conjugado y el fragmento a 4 °C durante 16 horas en una proporción molar
20 de 1:8, con una concentración de péptido de 20 mg/ml. En este momento, se usó tampón K-P 100 mM (pH 6,0) como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Después de la reacción de acoplamiento, se realizó la purificación en dos etapas usando columnas SOURCE Phe y SOURCE Q, en las siguientes condiciones.

25 Columna: SOURCE Phe (XK 16 ml, Amersham Biosciences)

Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (Tris 20 mM, pH 7,5) y B (A + NaCl 1,5 M); Gradiente A de 0—40 %, 80 min

Columna: SOURCE Q (XK 16 ml, GE Healthcare)

Caudal: 2,0 ml/min

30 Solución de elución: A (Tris 20 mM, pH 7,5) y B (A + NaCl 1 M); Gradiente A de 0—40 %, 80 min

El conjugado preparado anteriormente se analizó usando SDS-PAGE. Como se muestra en la Fig. 7, se observó una única banda con 60 K en una condición no reductora, mientras que se observaron dos bandas con 35 K y 25 K en una condición reductora.

Ejemplo 8: identificación del sitio pegilado del conjugado de exendina-CA-4 (Lys27)-PEG

35 Para identificar el sitio de unión de PEG a CA-exendina-4, los conjugados de CA-exendina-4 (Lys27)-PEG se digirieron con una enzima proteasa, lisina-C, y se analizaron usando una cromatografía inversa.

Específicamente, se analizaron isómeros de CA-exendina-4-PEG por SDS-PAGE (Fig. 8), y luego se disolvieron un conjugado purificado de CA-exendina-4-PEG y CA-exendina-4 en tampón trietilamina-ácido clorhídrico (10 mmol/l; pH 7,5), se les añadieron 10 µl de enzima (0,1 mg/ml), y se hicieron reaccionar a 37 °C durante 4 horas. Después de que
40 se terminara la reacción, la mezcla de reacción se analizó por cromatografía inversa (HPLC (Agilent), Jupiter C18 (Phenomenex)). Los resultados del análisis se muestran en las Fig. 9 y 10. Se confirmó un isómero de CA-exendina-4 Lys12-pegilado por la desaparición simultánea de n.º 1 y n.º 2 como se muestra en la Fig. 9, y se confirmó un isómero de CA-exendina-4 Lys27-pegilado por la desaparición simultánea de n.º 2 y n.º 3, como se muestra en la Fig. 10.

45 **Ejemplo 9: identificación del rendimiento de pegilación por la concentración de isopropanol en pegilación N-terminal**

Para pegar metoxipoli-etilenglicol 5 K ALD (NOF Inc, Japón) al extremo N de calcitonina de salmón (Bachem, EE. UU.), una calcitonina de salmón y PEG se sometieron a pegilación haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4 °C durante 1 hora en una proporción molar de 1:1, con una concentración de péptido de 1 mg/ml. En este momento,
50 se usaron tampones NaAc 100 mM pH 5,2/isopropanol al 0 %, NaAc 100 mM pH 5,2/isopropanol al 45 % como medio de reacción, respectivamente, y se les añadieron a los mismos NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Se purificó un péptido monopegilado a partir de cada una de las mezclas de reacción por columna SOURCE S (XK 16 ml, GE Healthcare, Corea) en las siguientes condiciones. Los resultados se muestran en la tabla 1 que se expone a continuación.

Columna: SOURCE S

Caudal: 2,5 ml/min

Solución de elución: A (acetato 20 mM, pH 5,2) y B (A + NaCl 1 M); Gradiente A de 0—40 %, 60 min

<Tabla 1>

Solución de tampón de reacción	Rendimiento de calcitonina-5 K monopegilada (%)
NaAc 0,1 M pH 5,2	36
NaAc 0,1 M pH 5,2/IPA al 45 %	51,3

5

Como se muestra en la tabla 1, el rendimiento de una calcitonina pegilado aumentó mediante la adición de isopropanol.

Ejemplo 10: medición de la actividad in vitro de exendina-4 por pegilación y el sitio pegilado

10 Para medir la eficacia de la preparación de acción prolongada de exendina-4 por pegilación y el sitio de pegilación, se usó un procedimiento para medir la actividad in vitro. La medición de la actividad in vitro de GLP-1 es un procedimiento para medir si el AMPc en la célula estaba aumentado después del tratamiento de GLP-1 para líneas celulares CHO en las que se clonaron los receptores de GLP-1.

15 Específicamente, se trató CHO/GLP-1R, una línea celular en la que se clona GLP-1, con GLP-1, exendina-4 y los materiales de prueba descritos en la tabla 1 a concentraciones variables. Se midió la aparición de AMPc y, por tanto, se compararon entre sí los valores de CE50. Como control, se usó Byetta disponible comercialmente (Eli Lilly). Las actividades in vitro (%) de acuerdo con el tratamiento de los materiales de ensayo se mostraron en la tabla 2.

<Tabla 2>

Material de prueba	Actividad in vitro (%)
Byetta	100
CA-exendina-4	77
CA-exendina-4-PEG (Lys12)	2,1
CA-exendina-4-PEG (Lys27)	8,5

20 Como se muestra en la tabla 2, la actividad fisiológica del péptido estaba relativamente menos afectada cuando se modifica PEG en Lys27, en comparación con Lys12.

Ejemplo 11: preparación y aislamiento de conjugado de oxintomodulina pegilada (Lys30)

<11-1> Preparación de conjugado de oxintomodulina pegilada (Lys30)

25 Para preparar un conjugado de oxintomodulina pegilada, 3,4 K PropionALD (2) PEG y oxintomodulina (Anygen, Corea) se sometieron a pegilación haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4 °C durante 4,5 horas en una proporción molar de 1:15, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En este momento, se usó tampón Na-borato 100 mM (pH 9,0) que contenía isopropanol al 45 % como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor.

<11-2> Aislamiento de isómero posicional

30 Los isómeros posicionales Lys30-pegilados se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 11).

Columna: SOURCE S

Caudal: 2,0 ml/min

35 Solución de elución: A (Na-citrato 20 mM, pH 3,0 + etanol al 45 %) y B (A + KCl 1 M); Gradiente A de 0—3 %, 1 min, Gradiente B de 0—40 %, 222 min

Ejemplo 12: preparación y aislamiento de conjugado de imidazo-acetiloxintomodulina pegilada (Lys30)

Se repitió el procedimiento del ejemplo 11 excepto por el uso imidazo-acetil-oxintomodulina (Anygen, Corea) en vez de oxintomodulina y usando tampón HEPES 100 mM (pH 7,5) que contenía isopropanol al 45 % del ejemplo 11 para obtener el conjugado de imidazo-acetiloxintomodulina pegilada (Lys30).

- 5 Los isómeros purificados usando columna SOURCE Q se muestran en la Fig. 12, y la identificación genética usando una proteasa Asp-N se muestra en la Fig. 13. Como se muestra Fig. 13, una parte de n.º 4: Asp (22)-(37) desapareció por modificación con PEG en Lys30.

Ejemplo 13: preparación de un conjugado de imidazo-acetiloxintomodulina (Lys30)-PEG y Fc de inmunoglobulina

- 10 El conjugado de imidazo-acetiloxintomodulina-PEG (Lys30) y un Fc de inmunoglobulina (Hanmi Pharm. Co. Ltd., Corea) se sometieron a una reacción a 4 °C durante 16 horas en una proporción molar de 1:10, con una concentración de proteína total de 20 mg/ml. En este momento, se usó fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Después de que se terminara la reacción, la mezcla de reacción se purificó mediante el uso de la columna SOURCE 15Q, en las siguientes condiciones.

- 15 Columna: SOURCE Q

Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) y B (A + NaCl 1 M); Gradiente A de 0—20 %, 100 min

- 20 El cromatograma que se consigue mediante la unión de CA-oxintomodulina Lys30-pegilada con un Fc de inmunoglobulina y la purificación del conjugado usando SOURCE Q se muestra en la Fig. 14, y los resultados de SDS-PAGE de un conjugado de CA-oxintomodulina (Lys30)-PEG y Fc de inmunoglobulina se muestran en la Fig. 15. Como se muestra en la Fig. 15, se observó una única banda con 60 K en una condición no reductora, y se observaron dos bandas con 35 K y 25 K en una condición reductora.

Ejemplo 14: preparación y aislamiento de conjugado de análogo de oxintomodulina pegilado (Lys27)

<14-1> Preparación de conjugado de análogo de oxintomodulina pegilado (Lys27)

- 25 Para pegar 3,4 K PropionALD (2) PEG a una lisina de un análogo de oxintomodulina ([20Asp, 24Ala, 28Ser]-oxintomodulina-[Eliminación30-37]), el PEG y el análogo de oxintomodulina (Anygen, Corea) se sometieron a una reacción a 4 °C durante 3,5 horas en una proporción molar de 1:15, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En este momento, se usó tampón Na-borato 100 mM (pH 9,0) que contenía isopropanol al 45 % como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor.

- 30 **<14-2> Aislamiento de isómero posicional**

- 35 Los isómeros posicionales Lys27-pegilados se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). Las condiciones de purificación y aislamiento fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 11. En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 16). Las selectividades de lisina de los análogos de oxintomodulina monopegilados purificados se confirmaron mediante el procedimiento de identificación genética usando la proteasa Lys-C (Fig. 17). Como se muestra en la Fig. 17, una parte n.º 2 desapareció por modificación con PEG en Lys27.

Ejemplo 15: preparación y aislamiento de conjugado de análogo de imidazo-acetiloxintomodulina pegilado (Lys27)

<15-1> Preparación de conjugado de análogo de imidazo-acetiloxintomodulina pegilado (Lys27)

- 40 Para pegar 3,4 K PropionALD (2) PEG a la Lys27 de un análogo de imidazo-acetiloxintomodulina ([20Asp, 24Ala, 28Ser]-oxintomodulina-[Eliminación30-37]), el análogo de imidazo-acetiloxintomodulina (Anygen, Corea) y el PEG se sometieron a una reacción a 4 °C durante 2,5 horas en una proporción molar de 1:10, con una concentración de proteína total de 3 mg/ml. En este momento, se usó HEPES 100 mM (pH 7,5) que contenía isopropanol al 45 % como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor.

- 45 **<15-2> Aislamiento de isómero posicional**

- 50 Los isómeros posicionales Lys27-pegilados se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). Las condiciones de purificación y aislamiento fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 11. En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 18). Las selectividades de lisina de los análogos de oxintomodulina monopegilados purificados se confirmaron mediante el procedimiento de identificación genética usando la proteasa Lys-C (Fig. 19). Como se muestra en la Fig. 19, una parte n.º 2 desapareció por modificación con PEG en Lys27.

Ejemplo 16: preparación y aislamiento de un conjugado de análogo de imidazo-acetiloxintomodulina pegilado (Lys27) y Fc de inmunoglobulina

El análogo de imidazo-acetiloxintomodulina-PEG Lys27-pegilado preparado en el ejemplo 15 y un Fc de inmunoglobulina se sometieron a una reacción a 4 °C durante 16 horas en una proporción molar de 1:10, con una concentración de péptido de 20 mg/ml. En este momento, se usó fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Después de que se terminara la reacción, la mezcla de reacción se purificó mediante el uso de la columna SOURCE 15Q, en las siguientes condiciones.

Columna: SOURCE Q

Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) y B (A + NaCl 1 M); Gradiente A de 0–20 %, 100 min

El cromatograma que se consigue mediante la unión de análogo de CA-oxintomodulina Lys27-pegilado con un Fc de inmunoglobulina y la purificación del conjugado usando SOURCE Q se muestra en la Fig. 20, y los resultados de SDS-PAGE de un conjugado de análogo de CA-oxintomodulina (Lys27)-PEG y Fc de inmunoglobulina se muestran en la Fig. 21. Como se muestra en la Fig. 21, se observó una única banda con 60 K en una condición no reductora, y se observaron dos bandas con 35 K y 25 K en una condición reductora.

Ejemplo 17: preparación y aislamiento de conjugado de GLP-1 pegilado (Lys34)**<17-1> Preparación de conjugado de GLP-1 pegilado (Lys34)**

Para pegar 3,4 K PropionALD (2) PEG al residuo de lisina de GLP-1, el GLP-1 y el PEG se sometieron a una reacción a 4 °C durante 3,5 horas en una proporción molar de 1:15, con una concentración de proteína total de 3 mg/ml. En este momento, se usó Na-borato 100 mM (pH 9,0) que contenía isopropanol al 45 % como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor.

<17-2> Aislamiento de isómero posicional

Los isómeros posicionales Lys34-pegilados se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 22). Las selectividades de lisina de los análogos de oxintomodulina monopegilados purificados se confirmaron mediante el procedimiento de identificación genética usando la proteasa Lys-C (Fig. 23).

Columna: SOURCE S

Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (Na-citrato 20 mM, pH 3,0 + etanol al 45 %) y B (A + KCl 1 M); Gradiente A de 0–3 %, 1 min, Gradiente B de 3–40 %, 150 min

Como se muestra en la Fig. 23, una parte n.º 2 desapareció por modificación con PEG en Lys34.

Ejemplo 18: preparación y aislamiento de conjugado de imidazo-acetil GLP-1 pegilado (Lys34)**<18-1> Preparación de conjugado de imidazo-acetil GLP-1 pegilado (Lys34)**

Para pegar 3,4 K PropionALD (2) PEG al residuo de lisina de imidazo-acetil GLP-1, el imidazo-acetil GLP-1 y el PEG se sometieron a una reacción a 4 °C durante 4 horas en una proporción molar de 1:10, con una concentración de proteína total de 3 mg/ml. En este momento, se usó HEPES 100 mM (pH 7,5) que contenía isopropanol al 45 % como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor.

<18-2> Aislamiento de isómero posicional

Los isómeros posicionales Lys34-pegilados se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 24). Las selectividades de lisina de los análogos de oxintomodulina monopegilados purificados se confirmaron mediante el procedimiento de identificación genética usando la proteasa Glu-C (Fig. 25).

Columna: SOURCE S

Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (Na-citrato 20 mM, pH 3,0 + etanol al 45 %) y B (A + KCl 1 M); Gradiente A de 0–3 %, 1 min, Gradiente B de 3–40 %, 150 min

Como se muestra en la Fig. 25, una parte n.º 4 desapareció por modificación con PEG en Lys34.

Ejemplo 19: preparación y aislamiento de un conjugado de imidazo-acetil GLP-1 pegilado (Lys34) y Fc de inmunoglobulina

- 5 El imidazo-acetil GLP-1-PEG Lys34-pegilado preparado en el ejemplo 18 y un Fc de inmunoglobulina se sometieron a una reacción a 4 °C durante 17 horas en una proporción molar de 1:8, con una concentración de péptido de 50 mg/ml. En este momento, se usó fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Después de que se terminara la reacción, la mezcla de reacción se purificó mediante el uso de la columna SOURCE Phe, en las siguientes condiciones.

Columna: SOURCE Phe

- 10 Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) y B (A + NaCl 2 M); Gradiente A de 100→0 %, 100 min

- 15 El cromatograma que se consigue mediante la unión de un isómero de CA-GLP-1 Lys34-pegilado con un Fc de inmunoglobulina y la purificación del conjugado usando SOURCE Phe se muestra en la Fig. 26, y los resultados de SDS-PAGE de un conjugado de CA-GLP-1 (Lys34)-PEG y Fc de inmunoglobulina se muestran en la Fig. 27. Como se muestra en la Fig. 27, se observó una única banda con 60 K en una condición no reductora, y se observaron dos bandas con 35 K y 25 K en una condición reductora.

Ejemplo 20: preparación y aislamiento de conjugado de GLP-2 pegilado (Lys30)

<20-1> Preparación de conjugado de GLP-2 pegilado (Lys30)

- 20 Para pegar 3,4 K PropionALD (2) PEG al residuo de lisina de GLP-2 (Anygen, corea), el GLP-2 y el PEG se sometieron a una reacción a 4 °C durante 3 horas en una proporción molar de 1:12, con una concentración de proteína total de 5 mg/ml. En este momento, se usó Na-borato 100 mM (pH 9,0) que contenía isopropanol al 45 % como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor.

<20-2> Aislamiento de isómero posicional

- 25 Los isómeros posicionales Lys30-pegilados se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 28). Las selectividades de lisina se confirmaron mediante el procedimiento de identificación genética usando la proteasa tripsina (Fig. 29).

Columna: SOURCE S

Caudal: 2,0 ml/min

- 30 Solución de elución: A (Na-citrato 20 mM, pH 3,0 + etanol al 45 %) y B (A + KCl 1 M); Gradiente A de 0→3 %, 1 min, Gradiente B de 3→40 %, 150 min

Como se muestra en la Fig. 29, una parte n.º 2 desapareció por modificación con PEG en Lys30.

Ejemplo 21: preparación y aislamiento de conjugado de imidazo-acetil GLP-2 pegilado (Lys30)

<21-1> Preparación de conjugado de imidazo-acetil GLP-2 pegilado (Lys30)

- 35 Para pegar 3,4 K PropionALD (2) PEG al residuo de lisina₃₀ de imidazo-acetil GLP-2 (Anygen, corea), el imidazo-acetil GLP-2 y el PEG se sometieron a una reacción a 4 °C durante 6 horas en una proporción molar de 1:20, con una concentración de proteína total de 3 mg/ml. En este momento, se usó HEPES 100 mM (pH 7,5) que contenía isopropanol al 45 % como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor.

<21-2> Aislamiento de isómero posicional

- 40 Los isómeros posicionales Lys30-pegilados se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 30).

Columna: SOURCE S

Caudal: 2,0 ml/min

- 45 Solución de elución: A (Na-citrato 20 mM, pH 3,0 + etanol al 45 %) y B (A + KCl 1 M); Gradiente A de 0→3 %, 1 min, Gradiente B de 3→40 %, 150 min

Ejemplo 22: preparación y aislamiento de un conjugado de imidazo-acetil GLP-2 pegilado (Lys30) y Fc de inmunoglobulina

El imidazo-acetil GLP-2-PEG Lys30-pegilado preparado en el ejemplo 21 y un Fc de inmunoglobulina se sometieron a una reacción a 4 °C durante 16 horas en una proporción molar de 1:15, con una concentración de péptido de 20 mg/ml. En este momento, se usó fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Después de que se terminara la reacción, la mezcla de reacción se purificó mediante el uso de la columna SOURCE Phe, en las siguientes condiciones.

Columna: SOURCE Phe

Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) y B (A + NaCl 2 M); Gradiente A de 100→0 %, 100 min

El cromatograma que se consigue mediante la unión de un isómero de CA-GLP-2 Lys30-pegilado con un Fc de inmunoglobulina y la purificación del conjugado usando SOURCE Phe se muestra en la Fig. 31, y los resultados de SDS-PAGE de un conjugado de CA-GLP-2 (Lys30)-PEG y Fc de inmunoglobulina se muestran en la Fig. 32. Como se muestra en la Fig. 32, se observó una única banda con 60 K en una condición no reductora, y se observaron dos bandas con 35 K y 25 K en una condición reductora.

Ejemplo 23: preparación y aislamiento de conjugado de insulina humana pegilada (B1Phe)**<23-1> Preparación de conjugado de insulina humana pegilada (B1Phe)**

Para pegar 5 K PropionALD (1) metoxiPEG (PEG que tiene un grupo propionaldehído, NOF., Japón) a un extremo N de fenilalanina, que es un primer aminoácido de la cadena B de la insulina humana (Sigma), el PEG y la insulina humana se sometieron a una reacción a 4 °C durante 12 horas en una proporción molar de 1:2, con una concentración de péptido de 2,3 mg/ml. En este momento, se usó tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) como medio de reacción, y se le añadió al mismo NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor.

<23-2> Aislamiento de isómero posicional

Los isómeros posicionales se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 33). Las monoPEGilaciones de los picos eluidos se confirmaron por análisis de SDS-PAGE, y las selectividades de lisina se confirmaron mediante el procedimiento de identificación genética con la proteasa Glu-C (Fig. 36).

Columna: SOURCE S

Caudal: 2,0 ml/min

Solución de elución: A (Na-citrato 20 mM, pH 2,0 + etanol al 60 %) y B (A + KCl 0,5 M); Gradiente A de 0→3 %, 1 min, Gradiente B de 0→50 %, 80 min

Como se muestra en la Fig. 36, una parte n.º 2 desapareció por modificación con PEG en B1F.

Ejemplo 24: preparación y aislamiento de conjugado de insulina humana pegilada (A1Gly)**<24-1> Preparación de conjugado de insulina humana pegilada (A1Gly)**

Para pegar 5 K metoxiPEG-butanoato de succinimidilo (1) (PEG que tiene un grupo reactivo SBA, NOF., Japón) a un extremo N de glicina, que es un primer aminoácido de la cadena A de la insulina humana (Sigma), el PEG y la insulina humana se sometieron a una reacción a 25 °C durante 3 horas en una proporción molar de 1:4, con una concentración de péptido de 2 mg/ml. En este momento, se usó tampón Na-borato 100 mM (pH 9,0) que contenía isopropanol al 35 % como medio de reacción.

<24-2> Aislamiento de isómero posicional

Los isómeros posicionales se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). El procedimiento de purificación fue el mismo que el descrito en el ejemplo 23. En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 34). Las monoPEGilaciones de los picos eluidos se confirmaron por análisis de SDS-PAGE, y las selectividades de lisina se confirmaron mediante el procedimiento de identificación genética con la proteasa Glu-C (Fig. 36).

Como se muestra en la Fig. 36, una parte n.º 1 desapareció por modificación con PEG en A1G.

Ejemplo 25: preparación y aislamiento de conjugado de insulina humana pegilada (B29Lys)

<25-1> Preparación de conjugado de insulina humana pegilada (B29Lys)

Para pegar 5 K metoxiPEG-butanoato de succinimidilo (1) a un residuo de lisina que es un 29.º aminoácido de la cadena B de la insulina humana (Sigma), el PEG y la insulina humana se sometieron a una reacción a 25 °C durante 1 hora en una proporción molar de 1:2, con una concentración de péptido de 2 mg/ml. En este momento, se usó tampón Na-borato 100 mM (pH 9,0) que contenía isopropanol al 45% como medio de reacción.

<25-2> Aislamiento de isómero posicional

Los isómeros posicionales se purificaron a partir de la mezcla de reacción mediante el uso de columna SOURCE 15S (XK 16 ml, Amersham Bioscience). El procedimiento de purificación fue el mismo que el descrito en el ejemplo 23. En este procedimiento, se usó etanol en la solución de purificación para facilitar el aislamiento de los isómeros (Fig. 35). Las monoPEGilaciones de los picos eluidos se confirmaron por análisis de SDS-PAGE, y las selectividades de lisina se confirmaron mediante el procedimiento de identificación genética con la proteasa Glu-C (Fig. 36).

Como se muestra en la Fig. 36, una parte n.º 4 desapareció por modificación con PEG en B29K.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a los modos de realización específicos anteriores, se debe reconocer que los expertos en la técnica pueden hacer varias modificaciones y cambios a la invención que también entran dentro del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

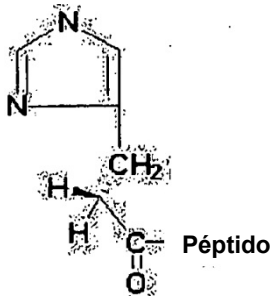
1. Un procedimiento para preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo específico de sitio, que comprende las etapas de:

- 5 i) tratar un polipéptido fisiológicamente activo con un polímero no peptídico en un medio de reacción que contiene una cantidad específica de un alcohol y tiene un pH específico para posibilitar que el polímero no peptídico se una a un sitio diana del polipéptido fisiológicamente activo;

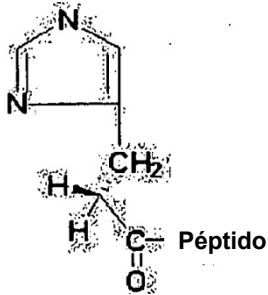
y

ii) aislar y purificar el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo a partir de la mezcla de reacción de la etapa i) por cromatografía de intercambio iónico usando un alcohol,

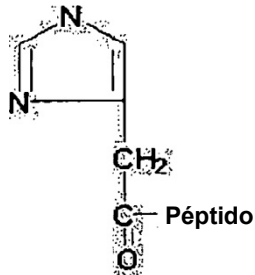
- 10 en el que el polipéptido fisiológicamente activo es una exendina, insulina, oxintomodulina, GLP-1, GLP-2, grelina, calcitonina o uno de los derivados de los mismos que tiene una estructura seleccionada de las fórmulas (I) a (IV):



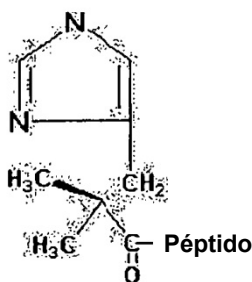
Fórmula I



- 15 Fórmula II



Fórmula III



Fórmula IV

en el que el alcohol es etanol o isopropanol;

5 en el que el alcohol está presente en el medio de reacción en una cantidad de un 25 % a un 90 % en volumen, basado en el volumen total del medio de reacción;

en el que el pH empleado en la etapa i) es de 7,0 a 10,0, cuando el polipéptido fisiológicamente activo es una exendina, oxintomodulina, GLP-1, GLP-2 o uno de los derivados de los mismos, y

en el que el pH empleado en la etapa i) es de 4,0 a 10,0 cuando el polipéptido fisiológicamente activo es insulina humana o un derivado de la misma.

10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico es polietilenglicol.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el alcohol está presente en el medio de reacción, en una cantidad de un 35 % a un 60 % en volumen, basado en la cantidad total del medio de reacción.

15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo específico de sitio es un conjugado de exendina-4 en el que está unido PEG a Lys27, un conjugado de calcitonina en el que está unido PEG al extremo N, un conjugado de oxintomodulina en el que está unido PEG a Lys27 o Lys30, un conjugado de insulina humana en el que está unido PEG al extremo N de Gly1 en la cadena A o está unido a Lys29 en la cadena B, o un conjugado de GLP-1 o GLP-2 en el que está unido PEG a Lys34 o Lys30.

FIG. 1

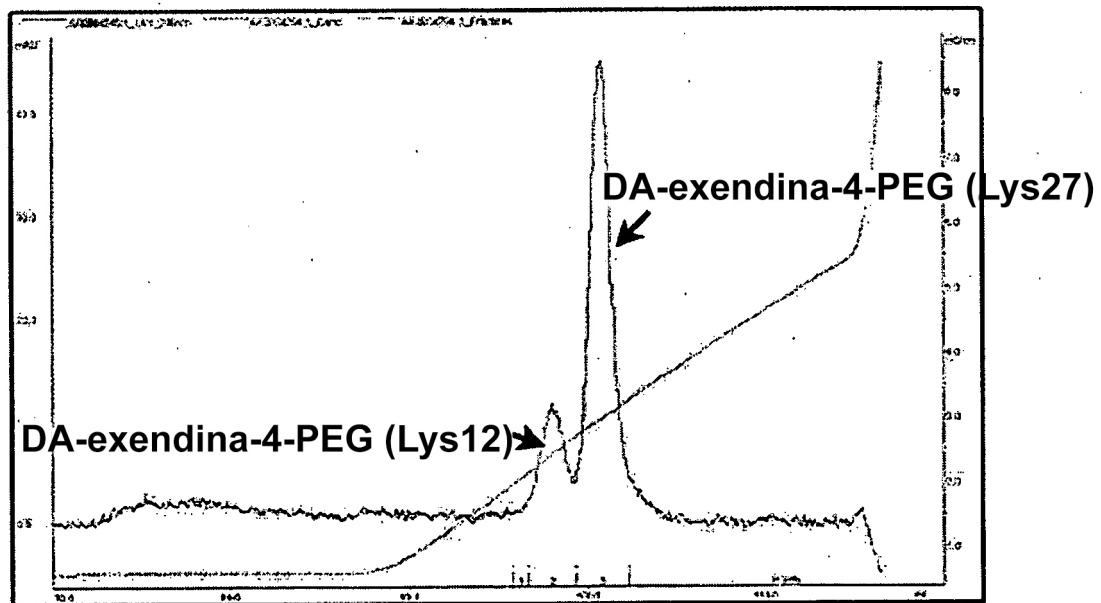


FIG. 2

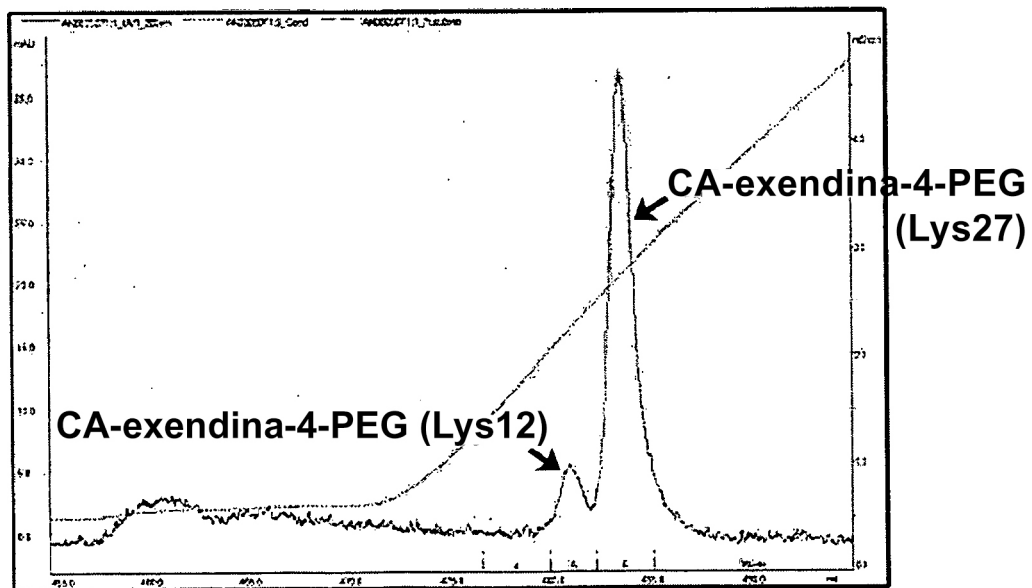


FIG. 3

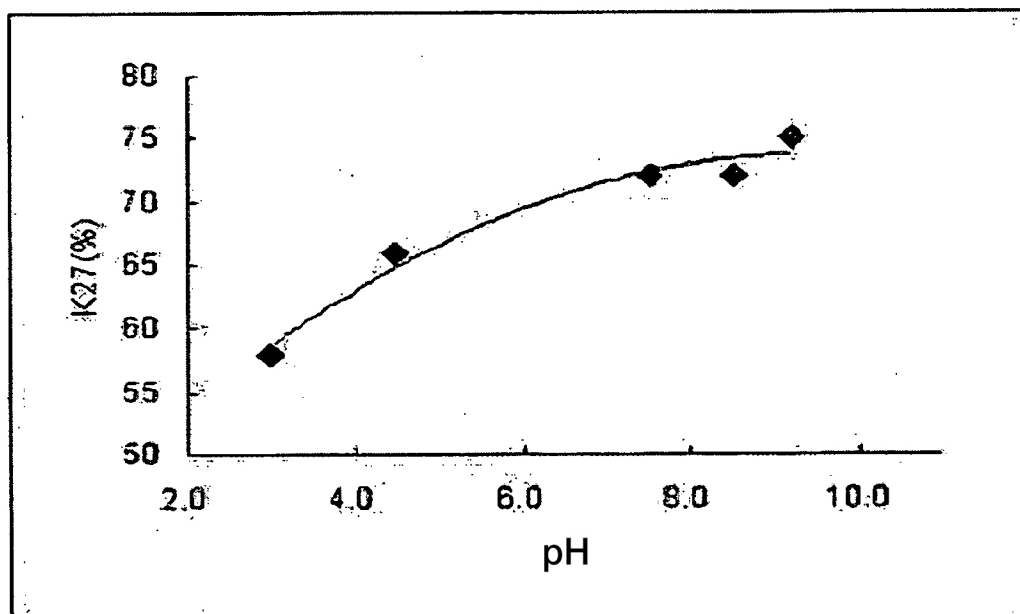


FIG. 4

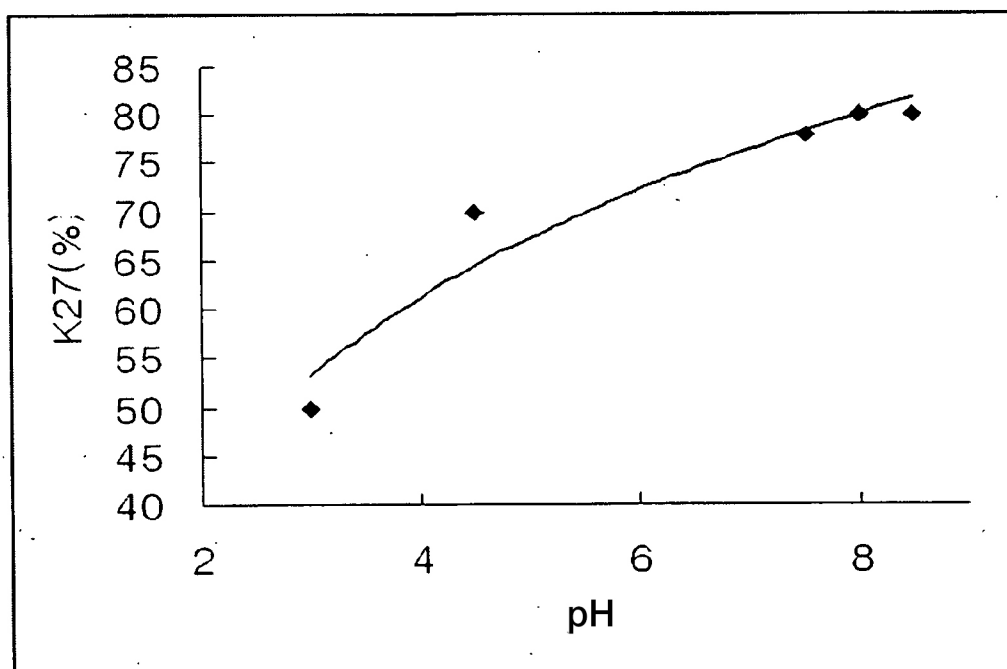


FIG. 5

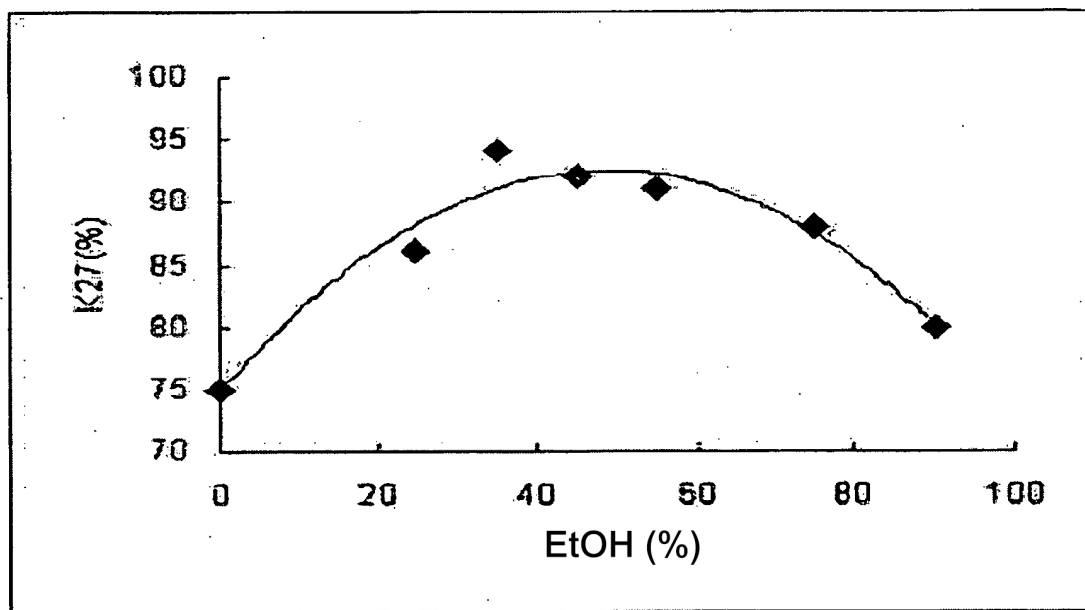


FIG. 6

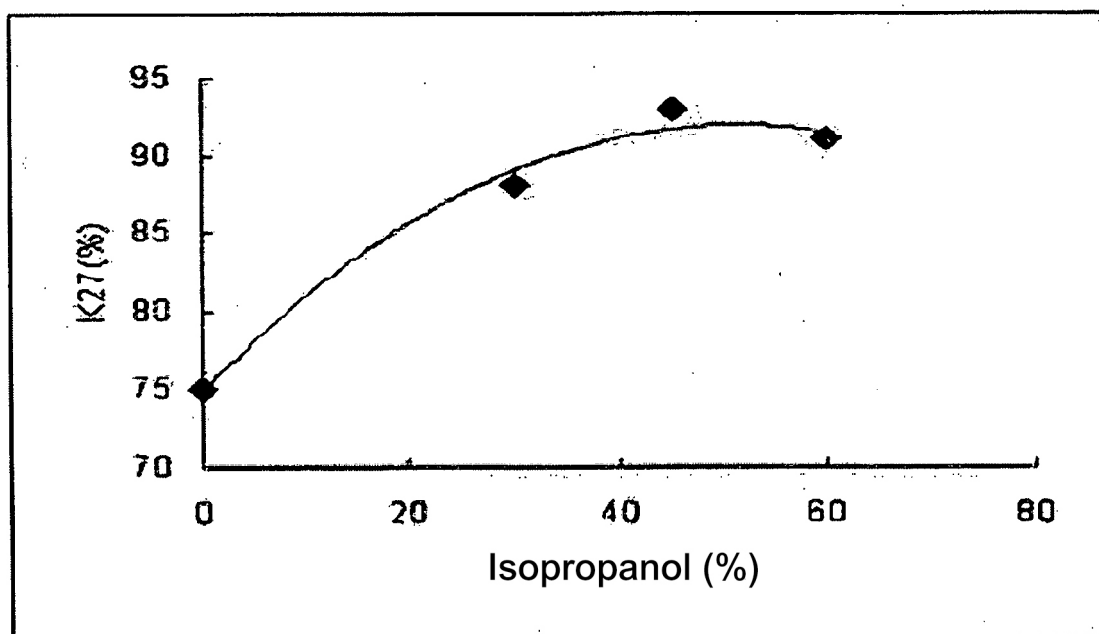


FIG. 7

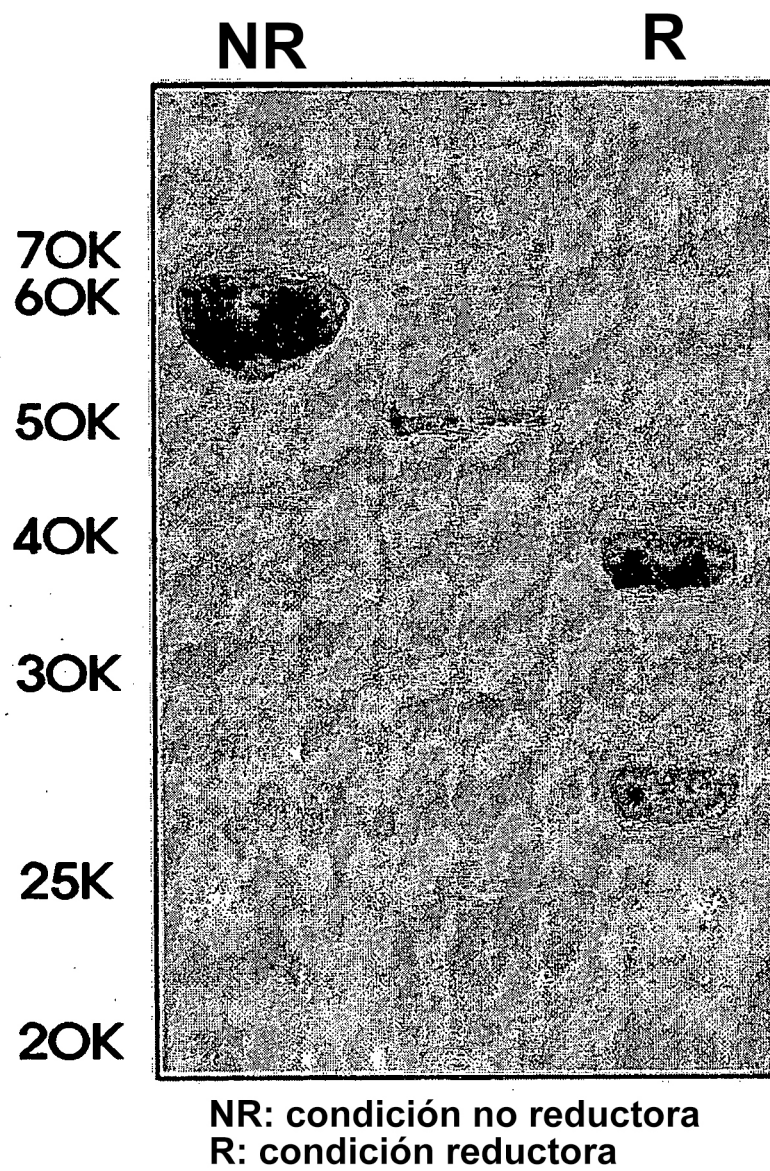
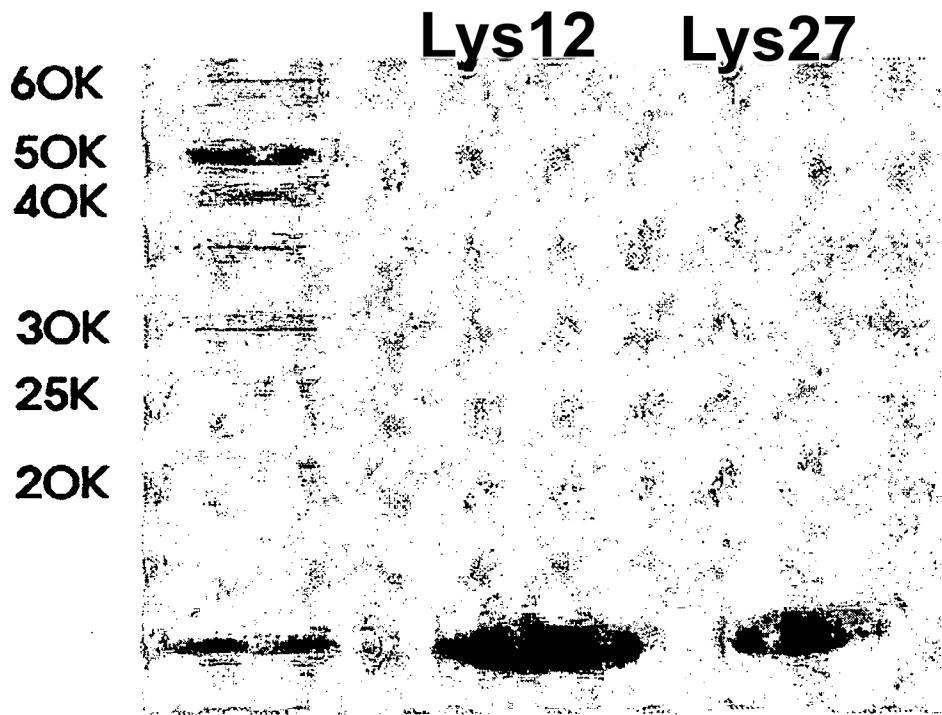


FIG. 8



Lys12: CA-exendina-4-PEG (Lys12)
Lys27: CA-exendina-4-PEG (Lys27)

FIG. 9

	#1	#2	#3
Exendina-4	HGEGTFTSDL	SKQMEEAAVR	LFIEWLKNKG PSSGAPPPS

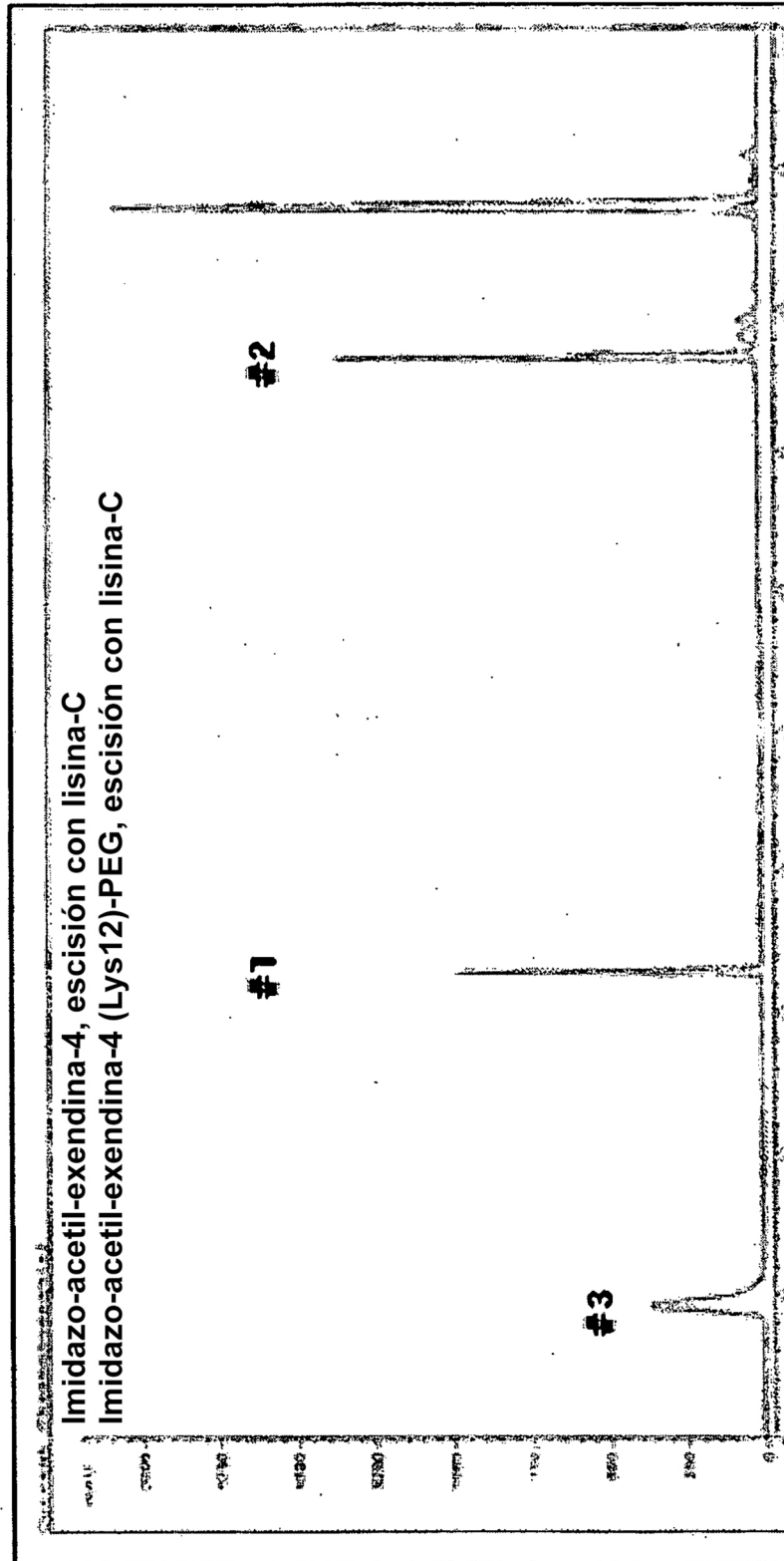


FIG. 10

	#1	#2	#3
Exendina-4	HGEGTFTSDL	SKQMEEEEAVR	LFIWLKNGG PSSGAPPPS

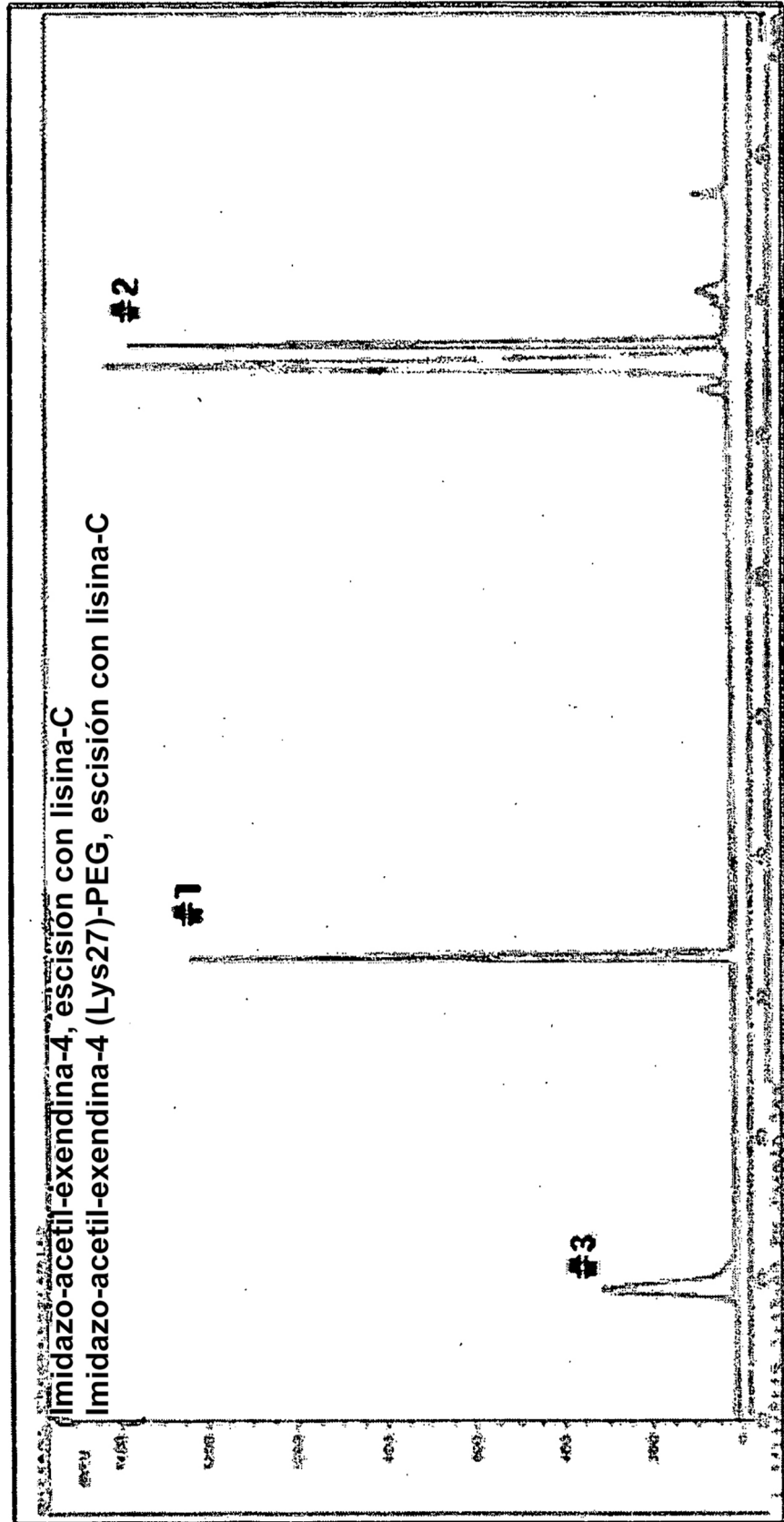


FIG. 11

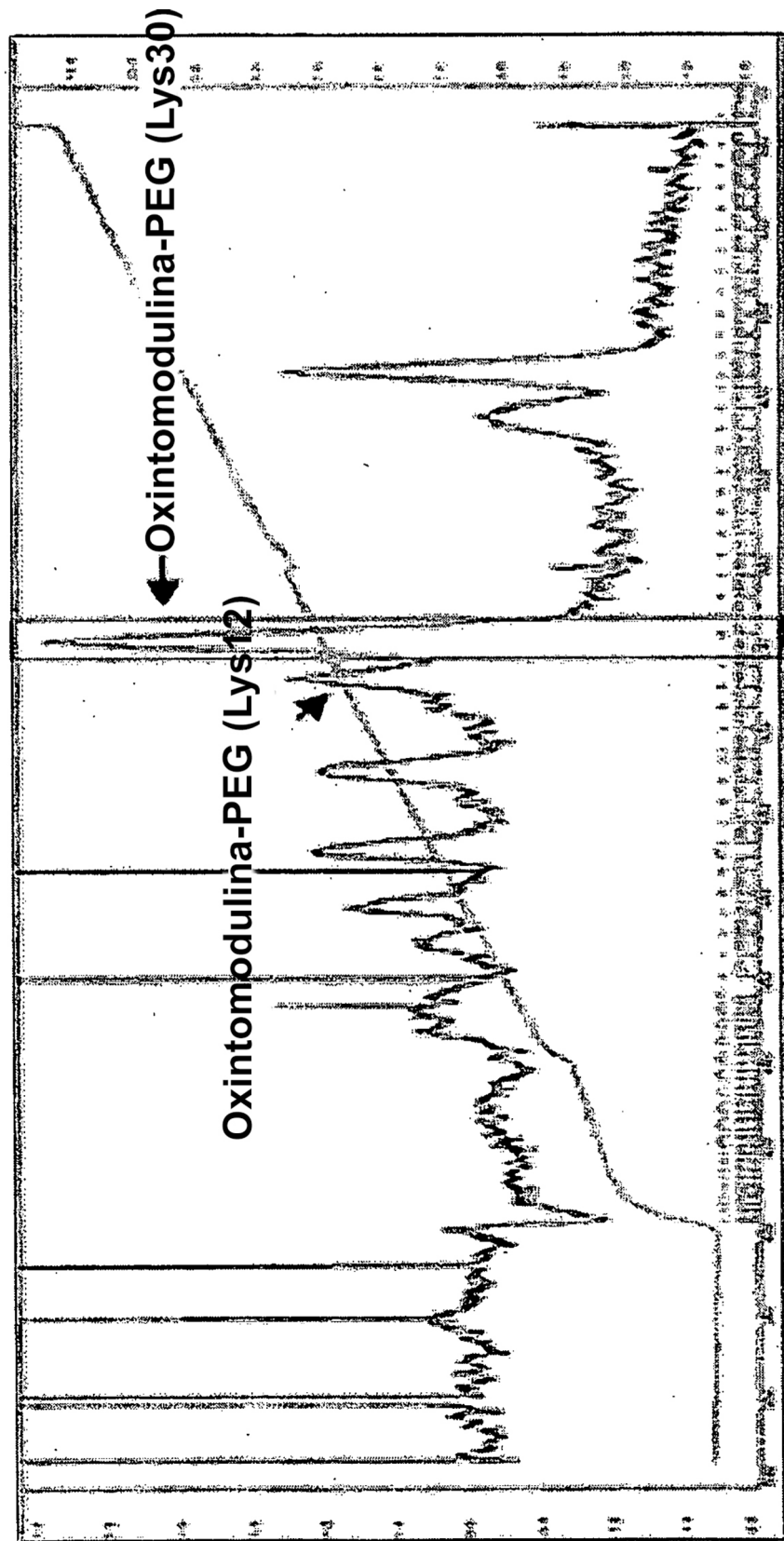


FIG. 12

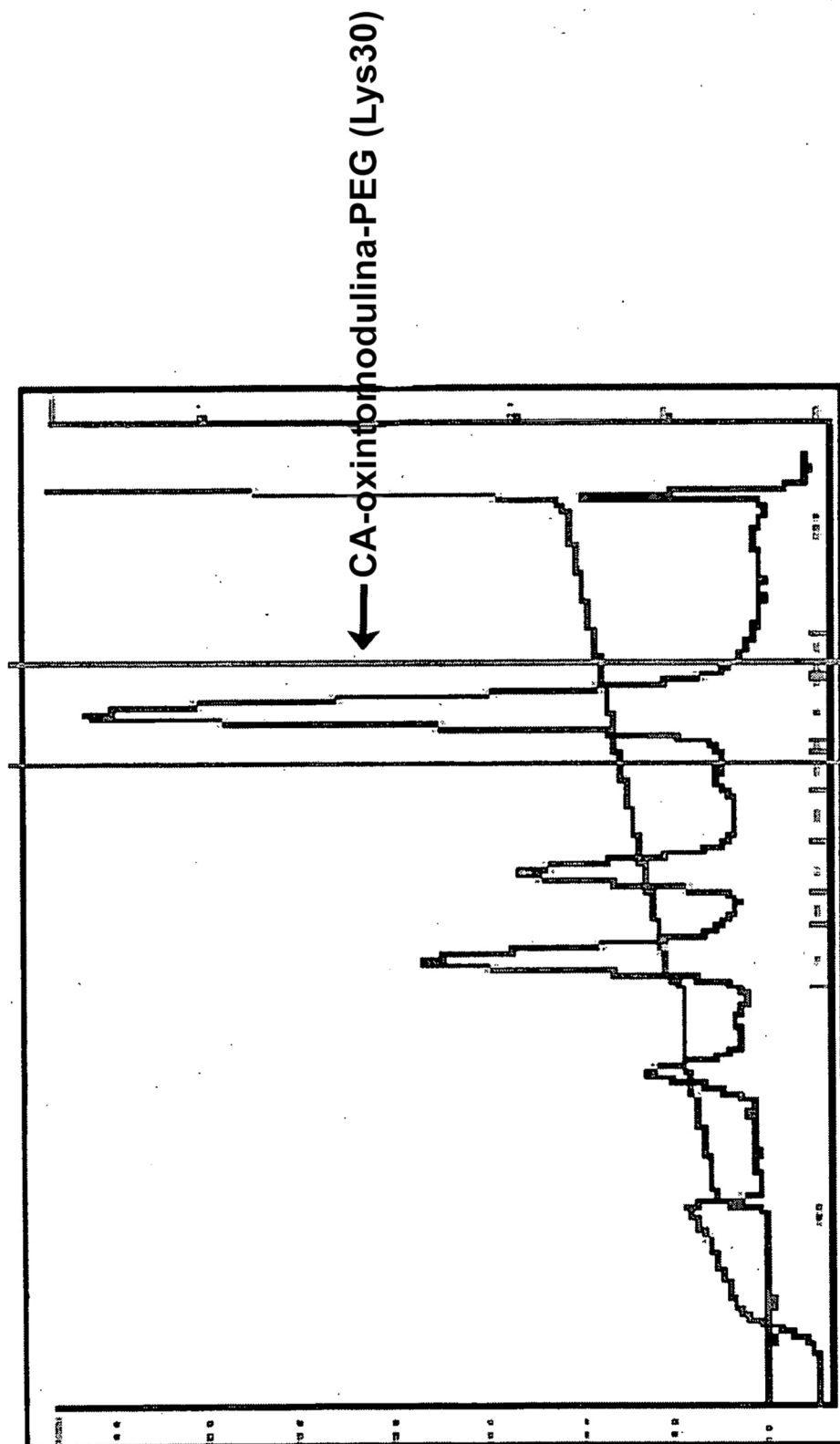
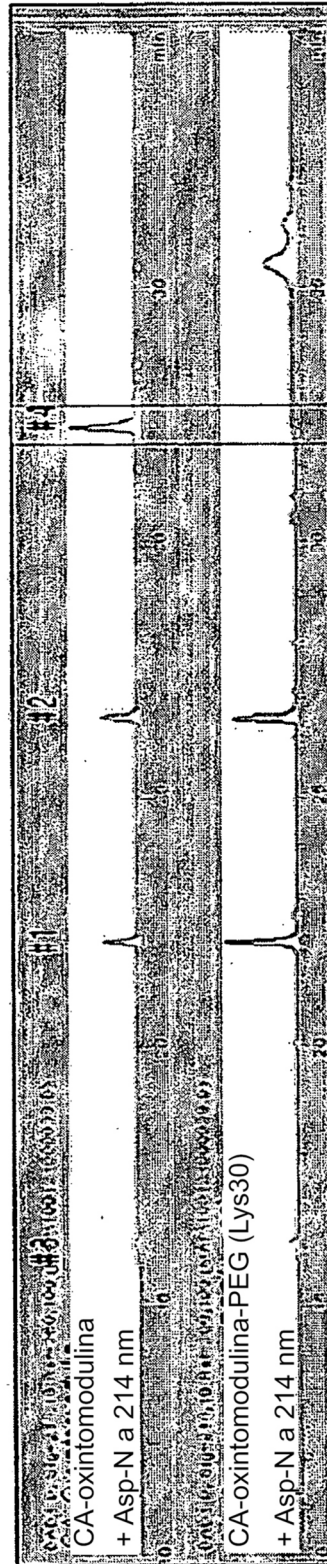


FIG. 13



- n.º 1: His(1)-Ser(8)
- n.º 2: Asp(9)-Leu(14)
- n.º 3: Asp(16)-Gln(20)
- n.º 4: Asp(22)-(37)

FIG. 14

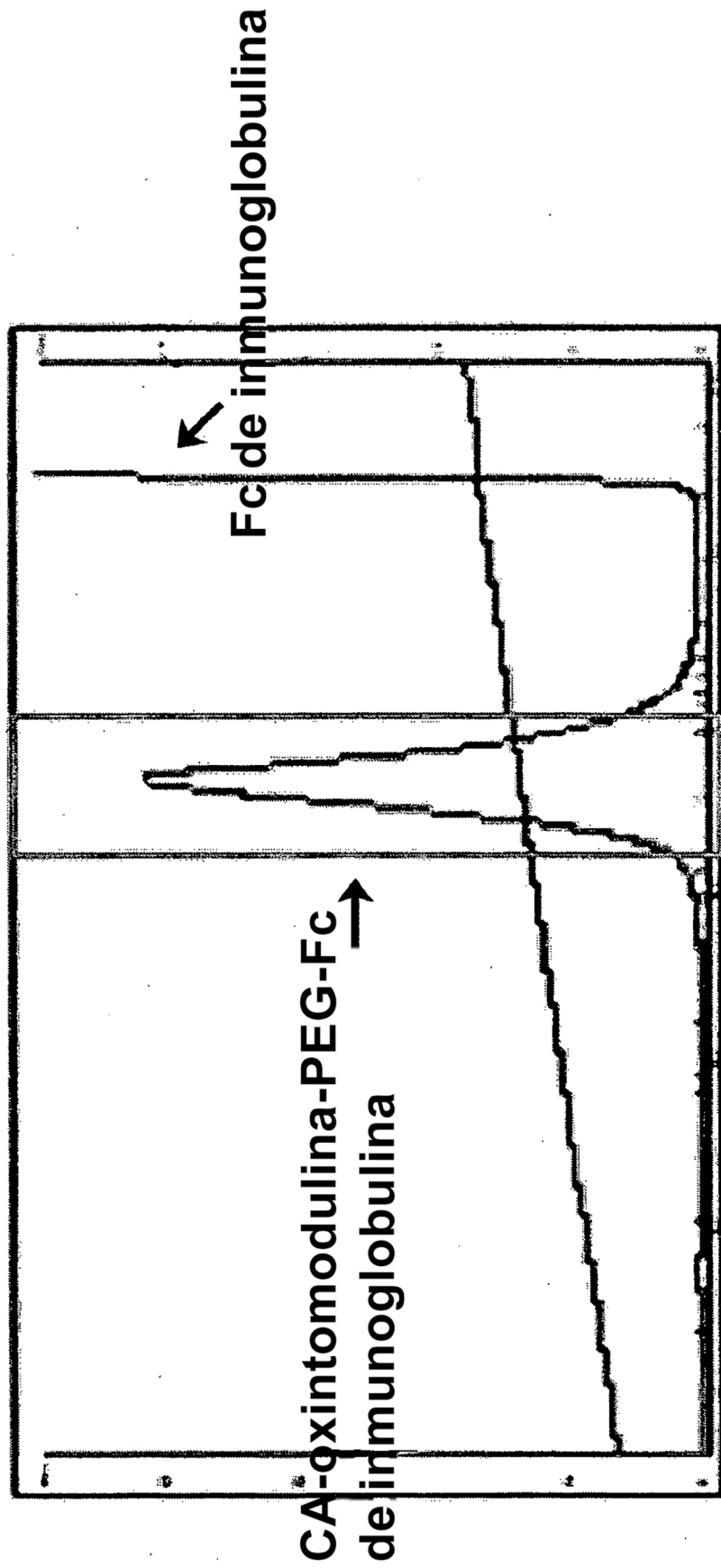
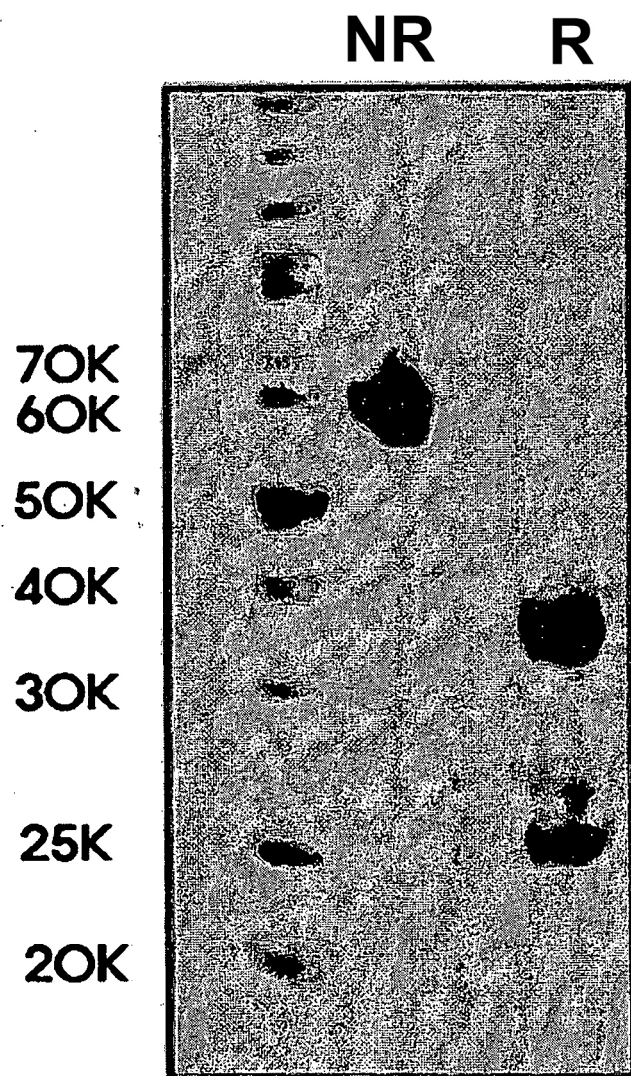


FIG. 15



NR: condición no reductora
R: condición reductora

FIG. 16

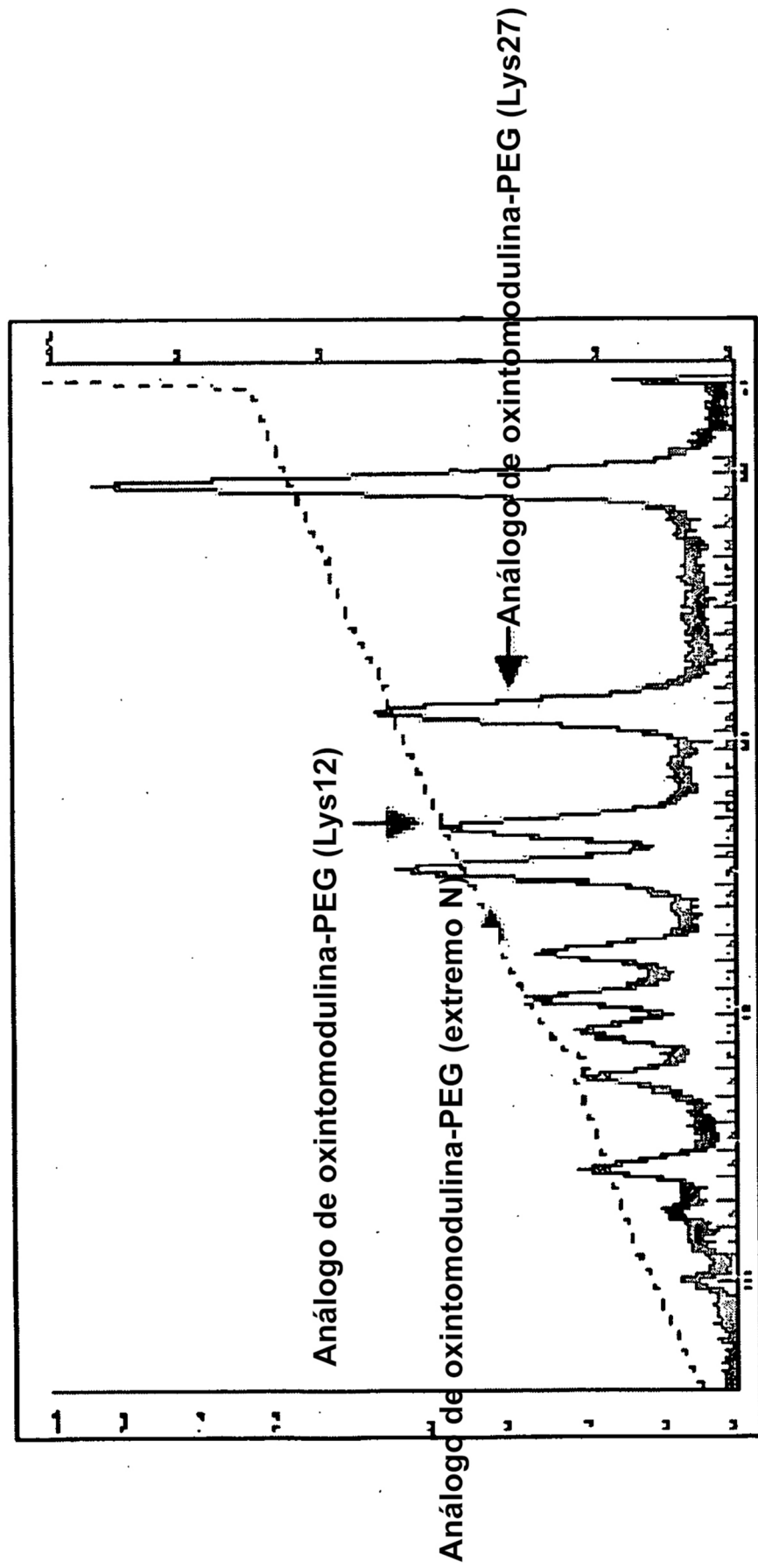


FIG. 17

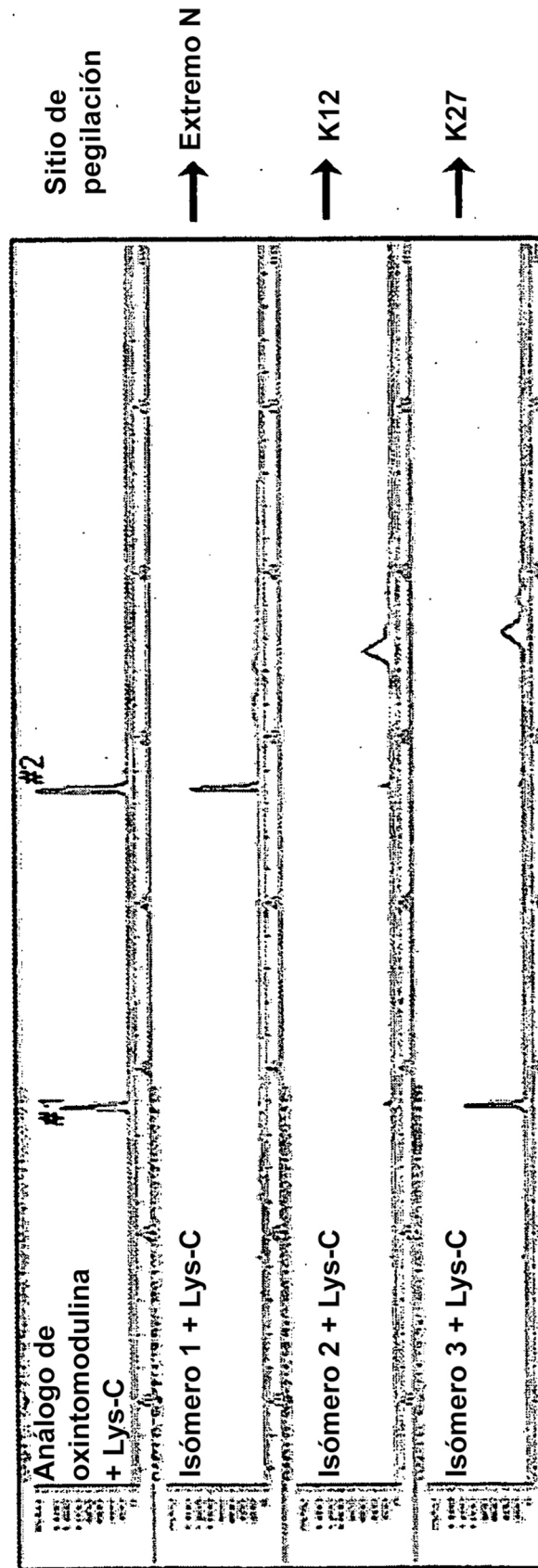


FIG. 18

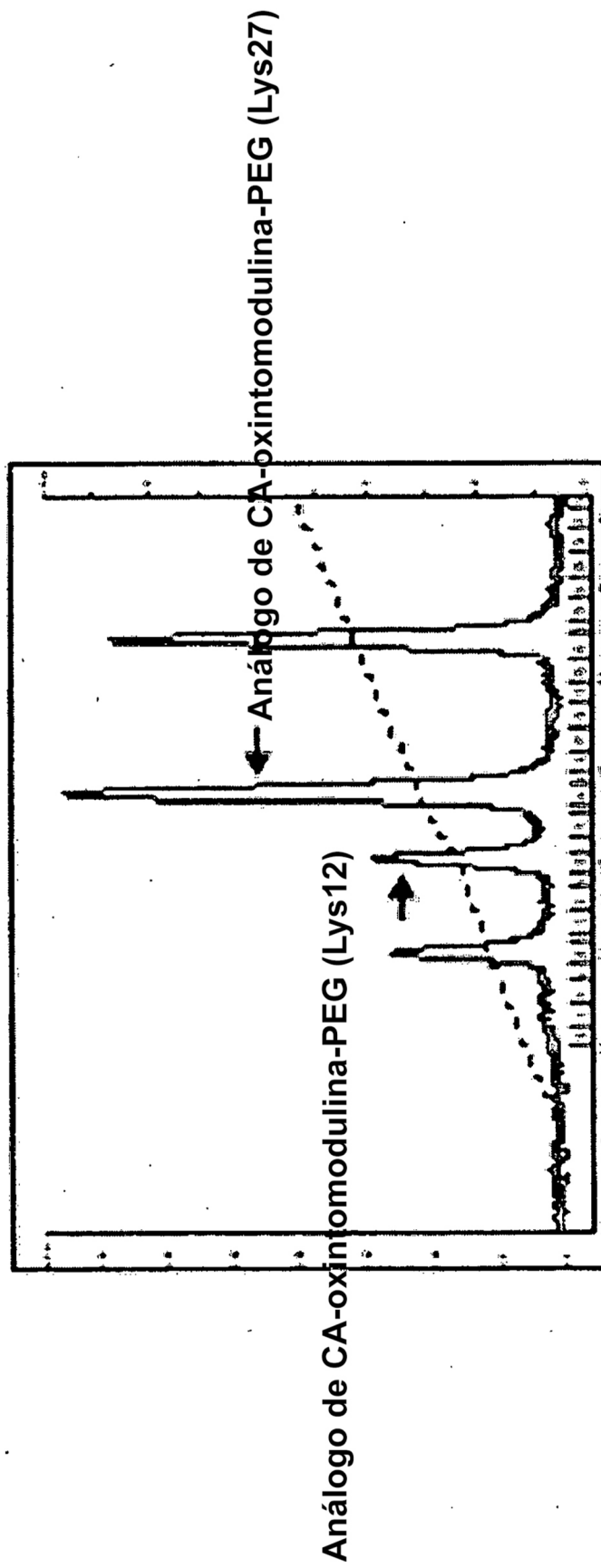


FIG. 19

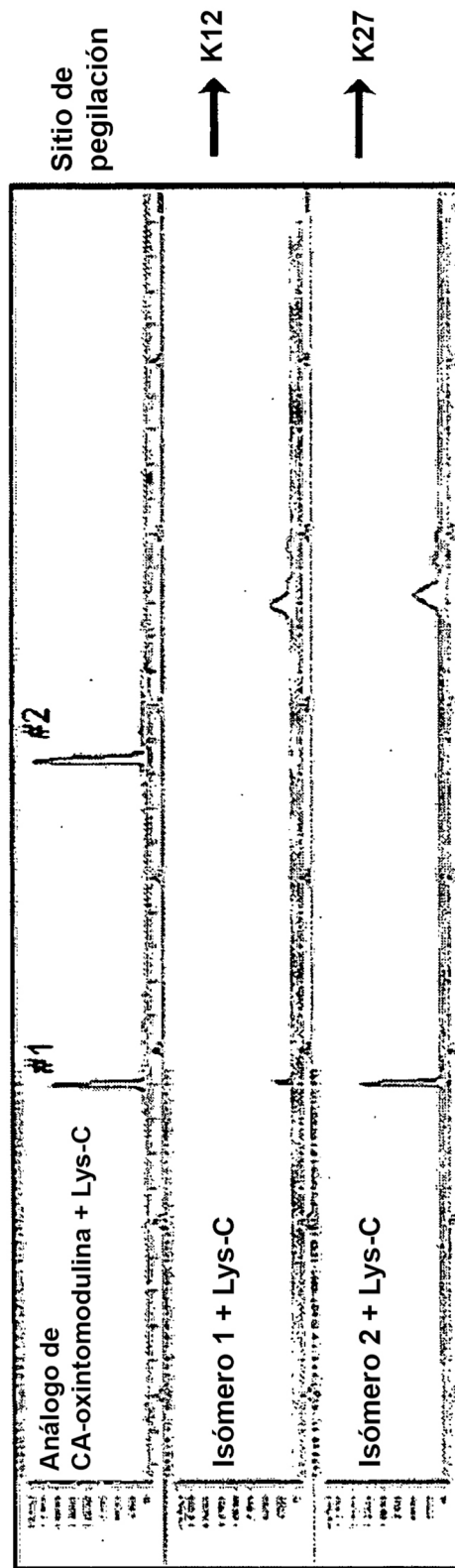


FIG. 20

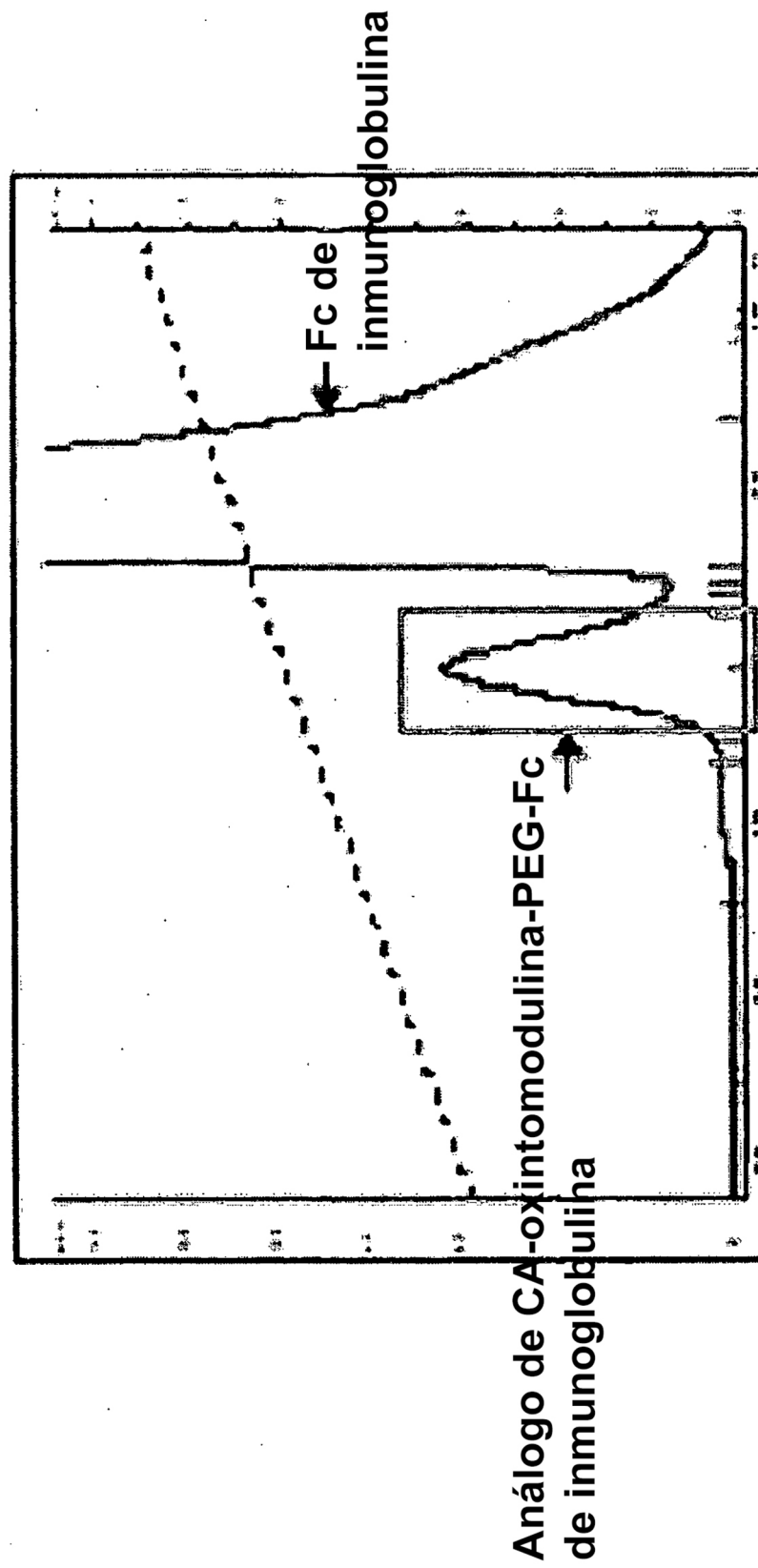
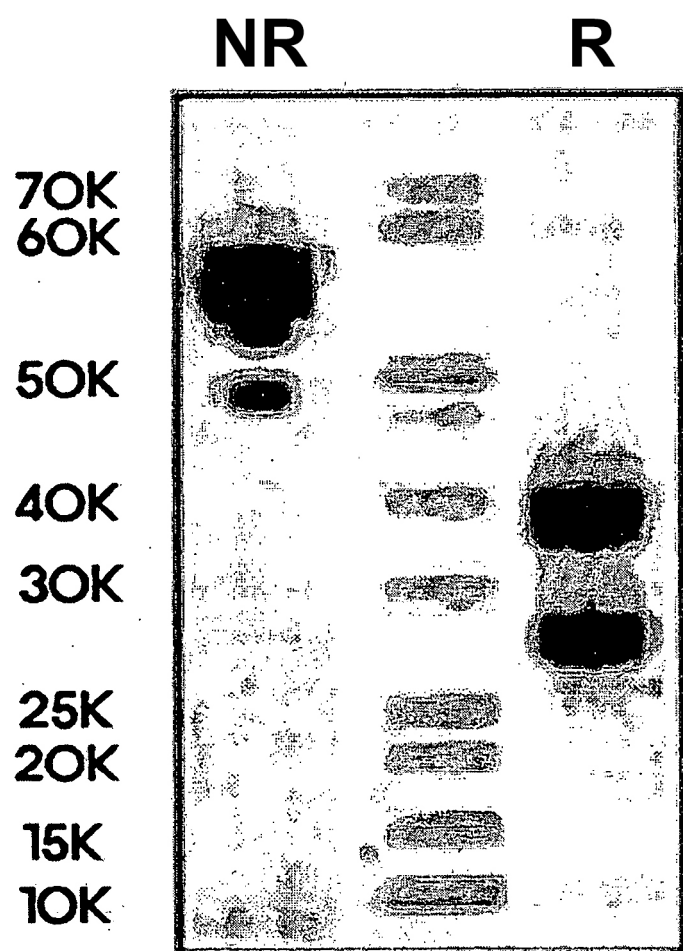


FIG. 21



NR: condición no reductora
R: condición reductora

FIG. 22

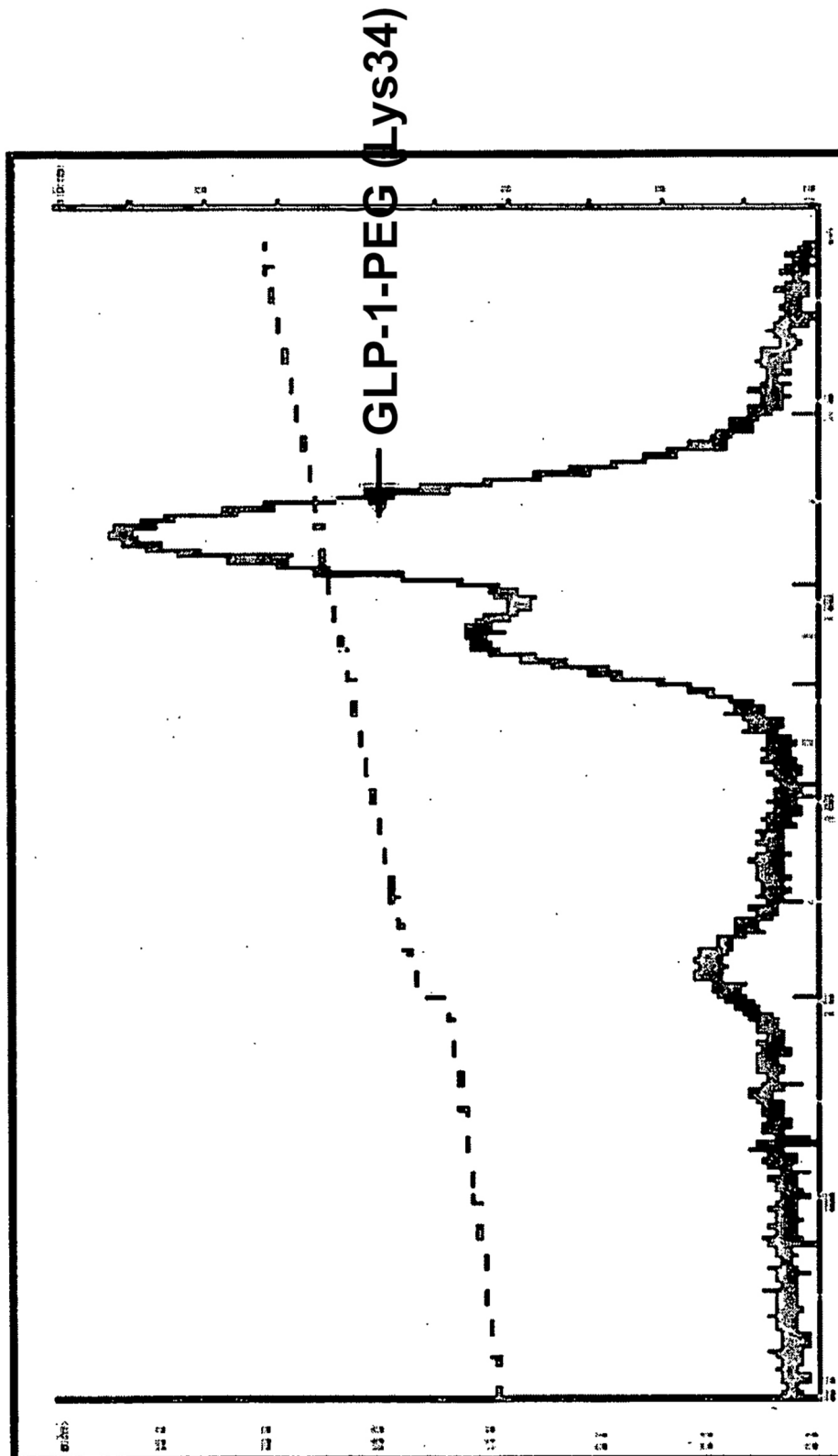


FIG. 23

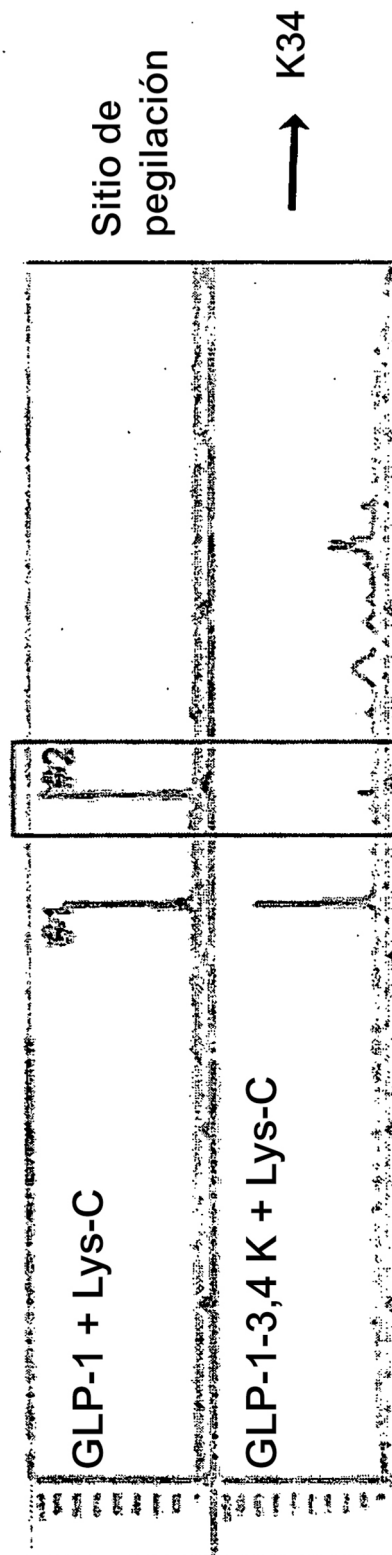


FIG. 24

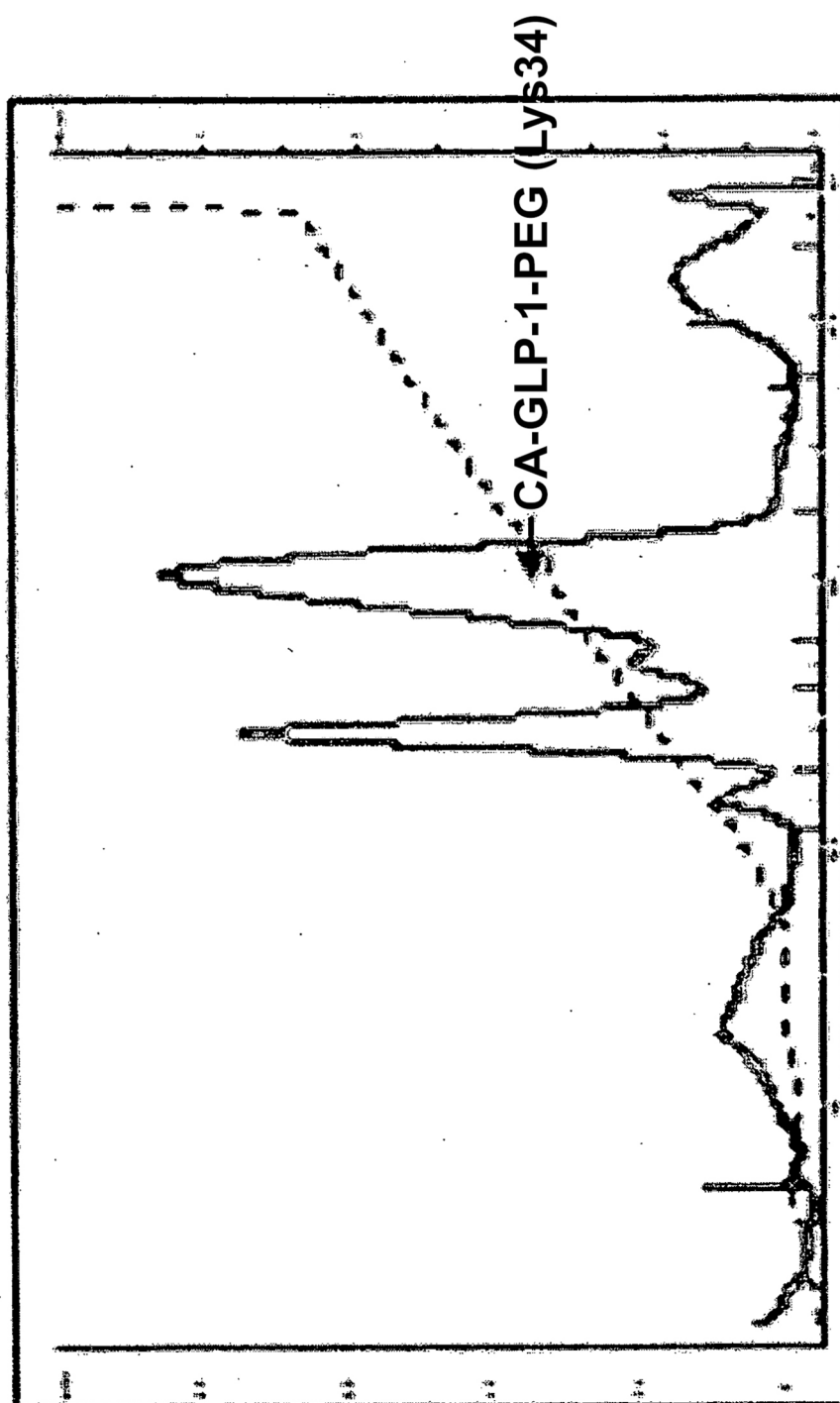


FIG. 25

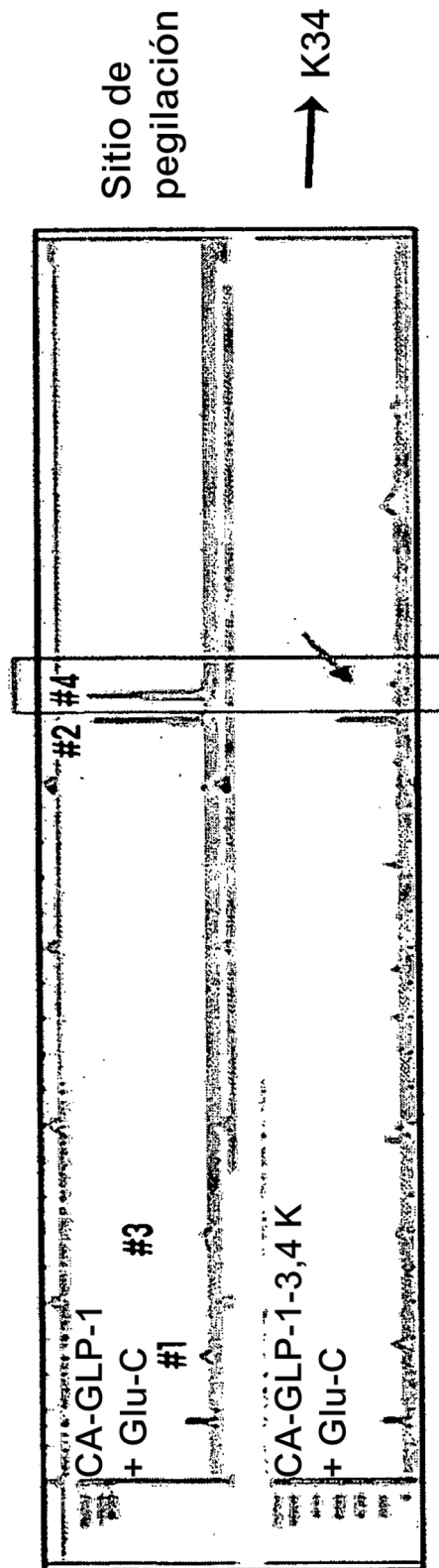


FIG. 26

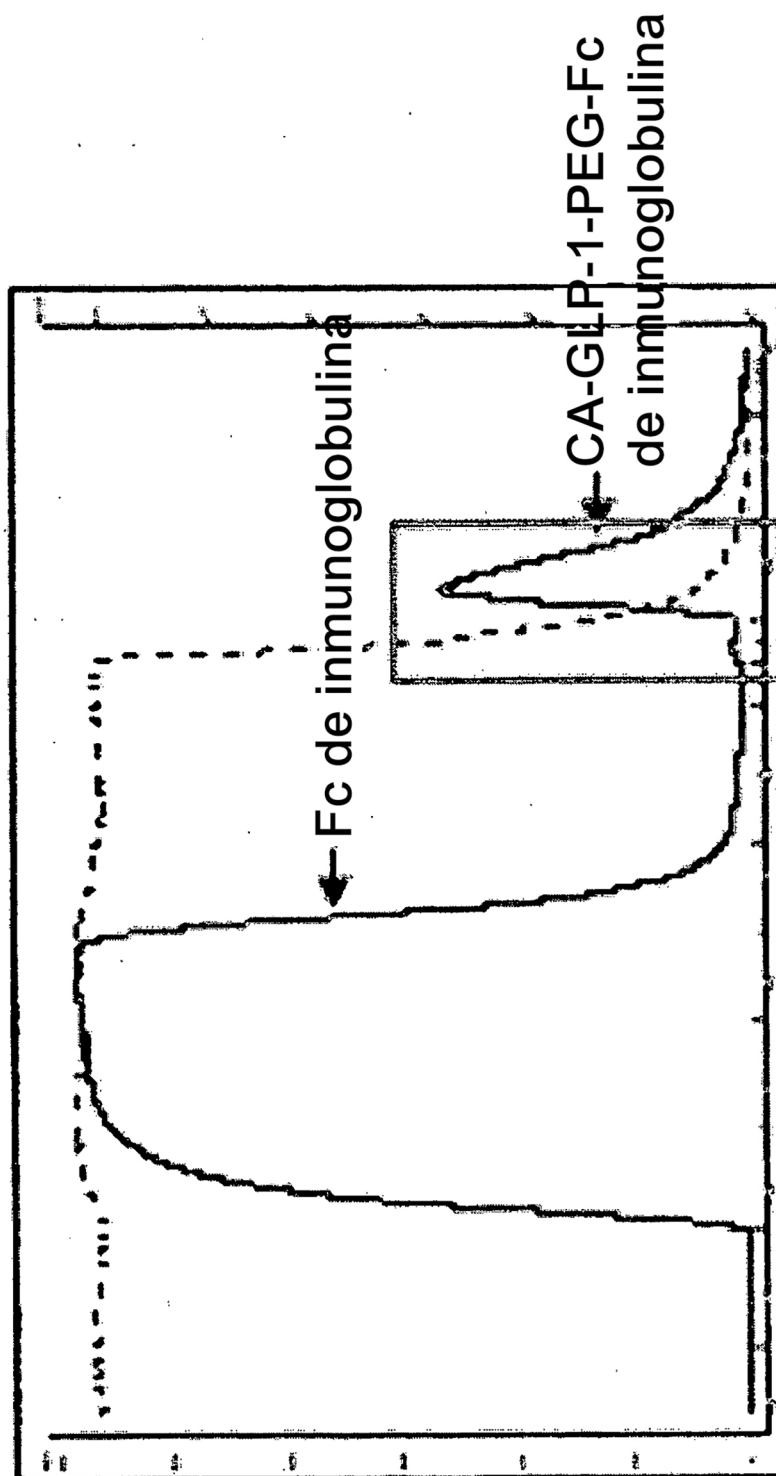
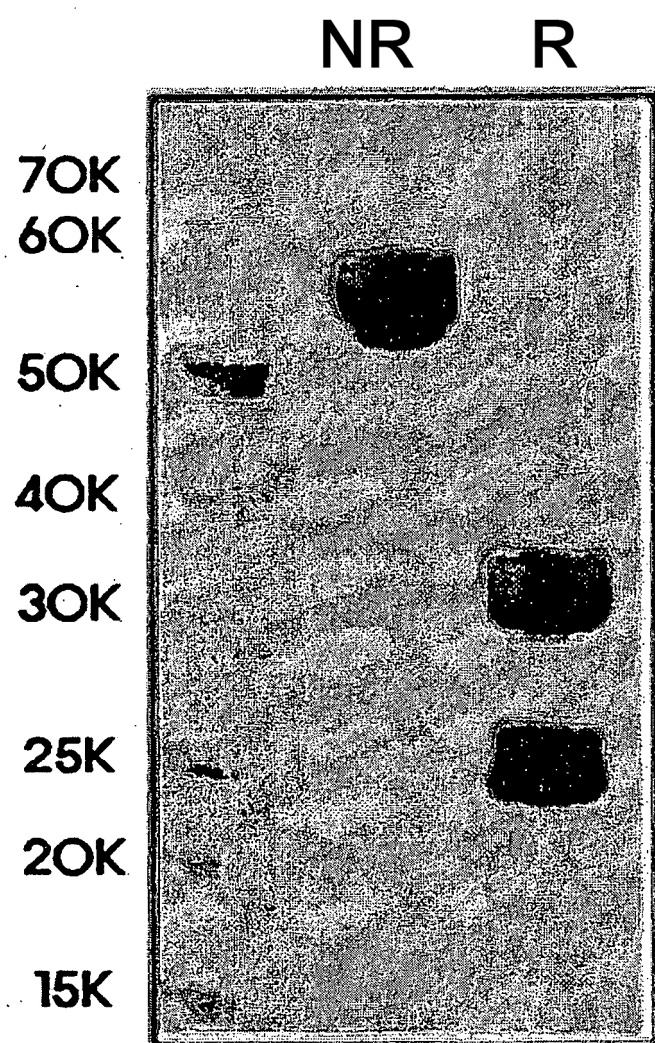


FIG. 27



NR: condición no reductora
R: condición reductora

FIG. 28

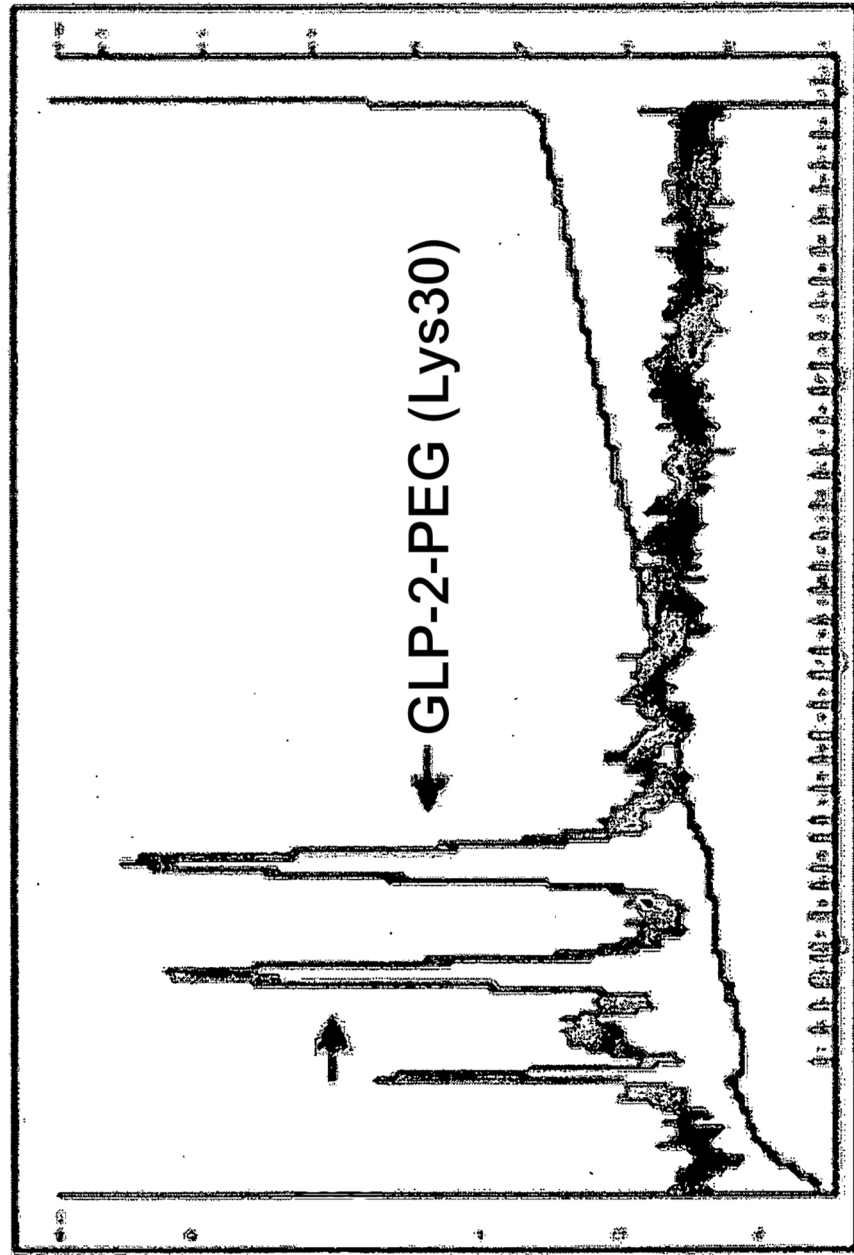


FIG. 29

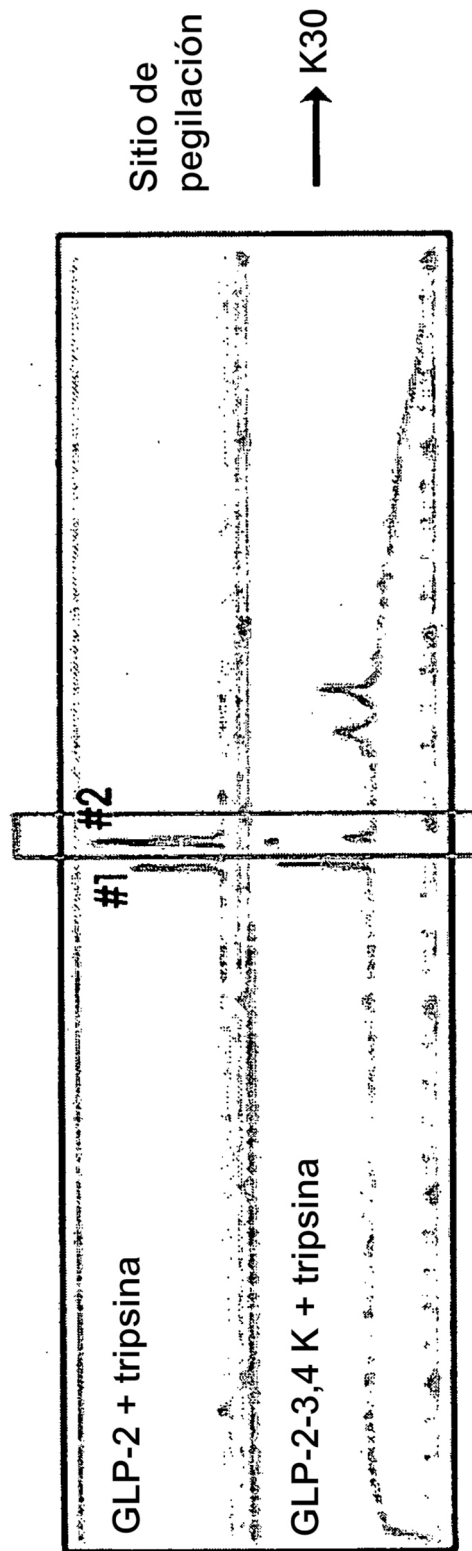


FIG. 30

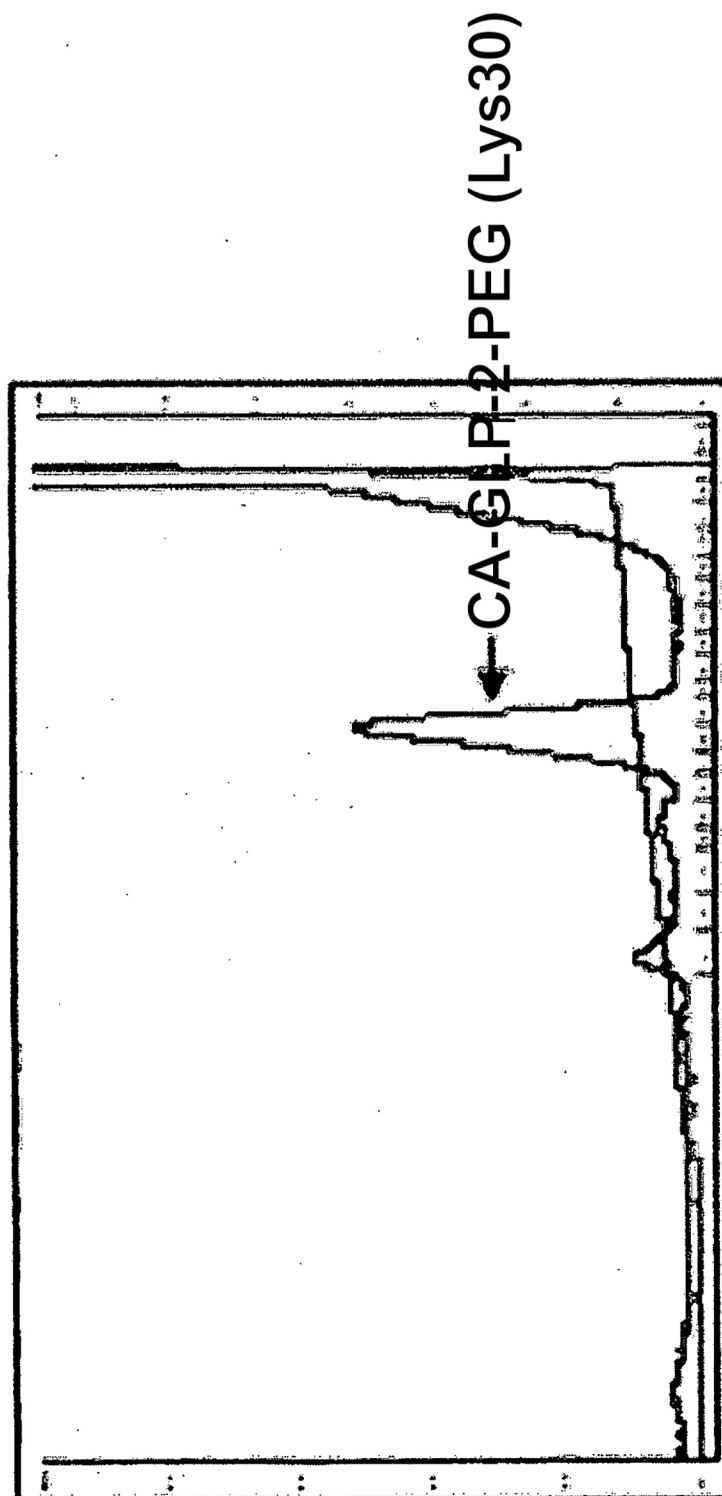


FIG. 31

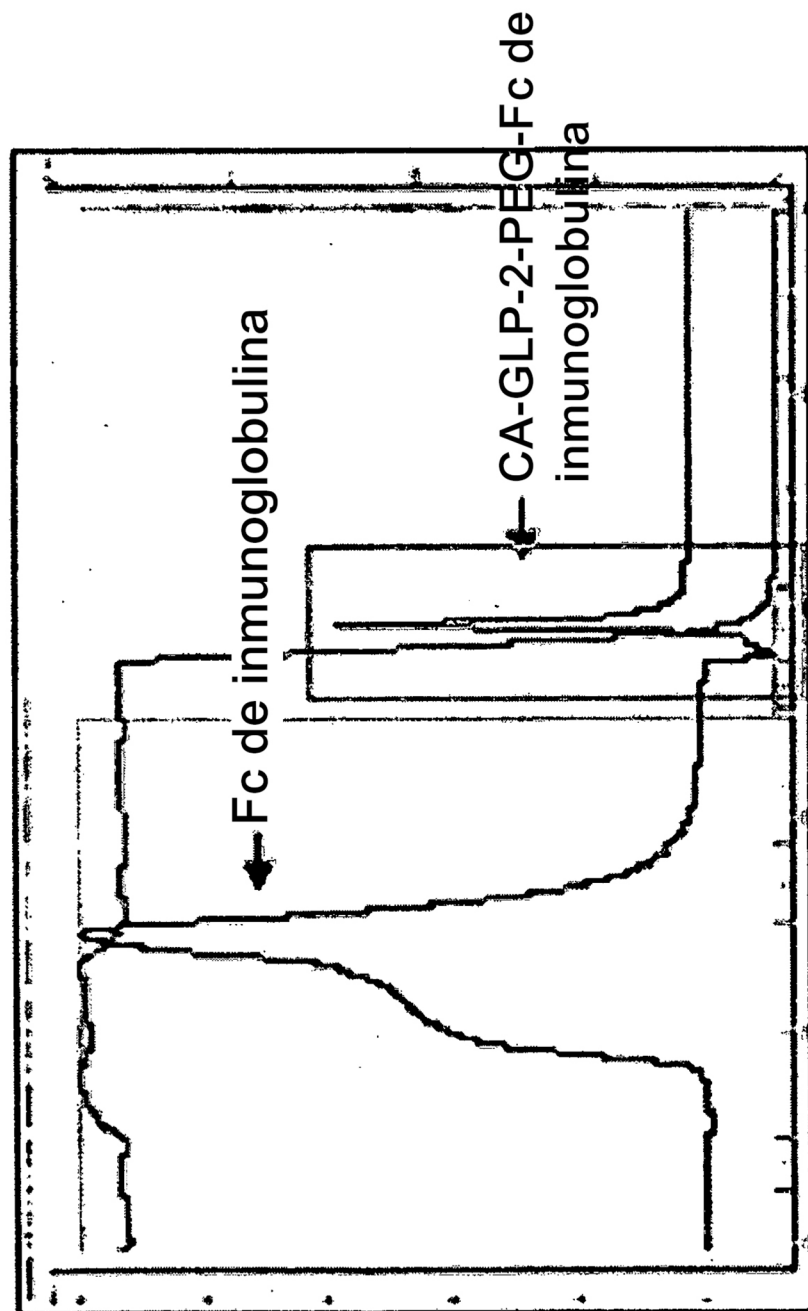
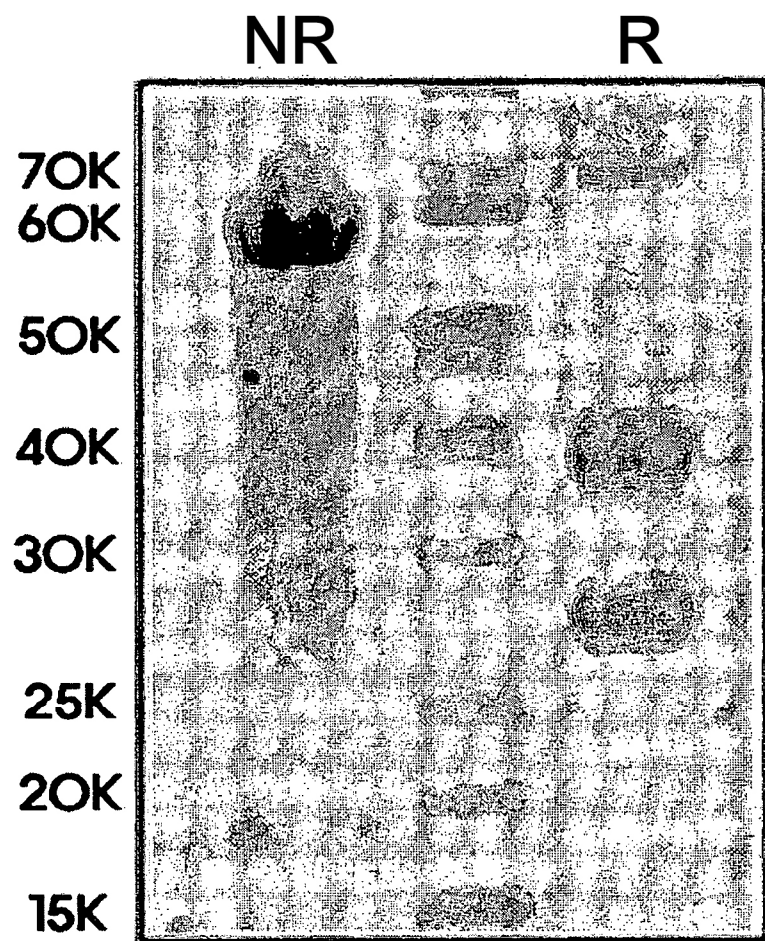


FIG. 32



NR: condición no reductora
R: condición reductora

FIG. 33

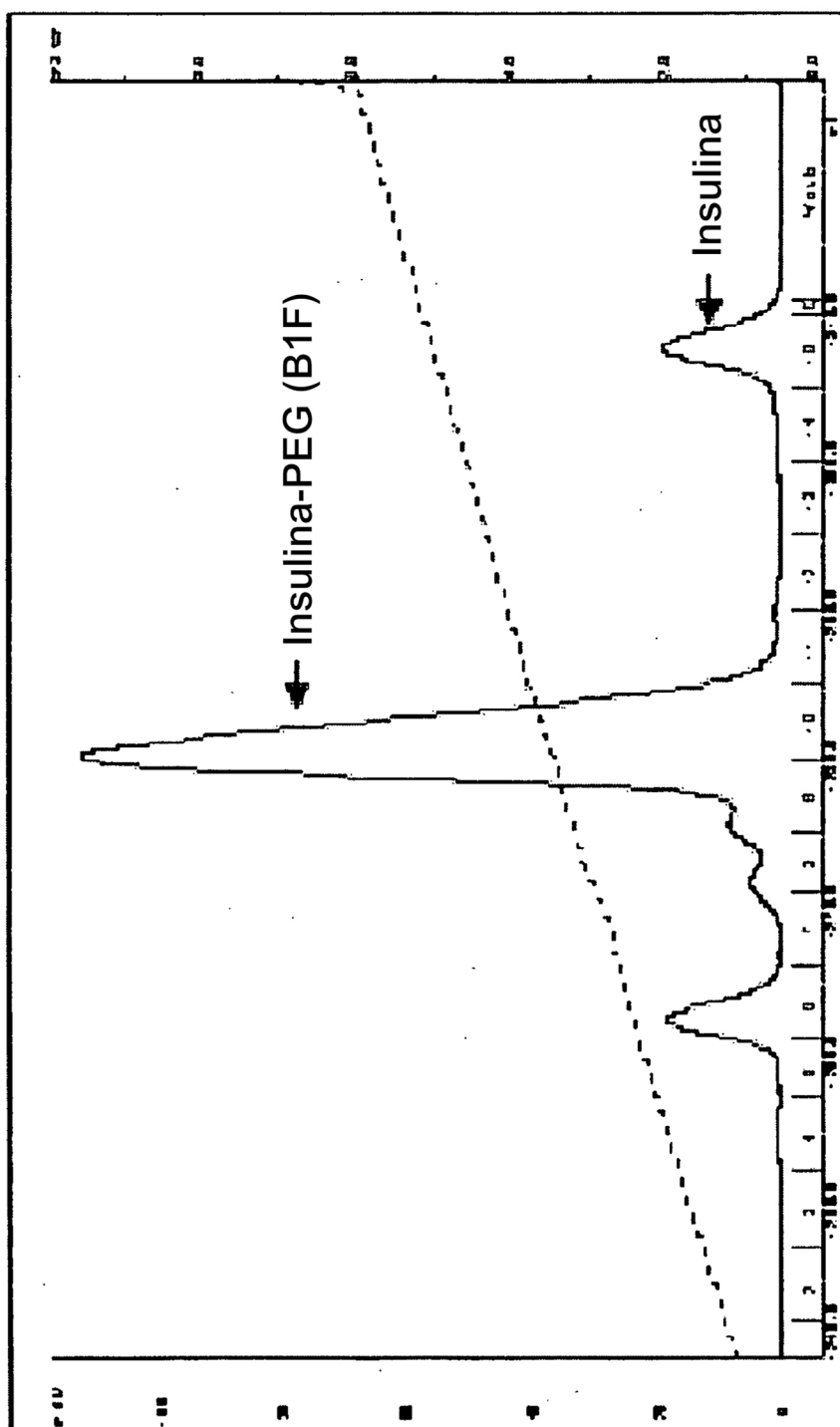


FIG. 34

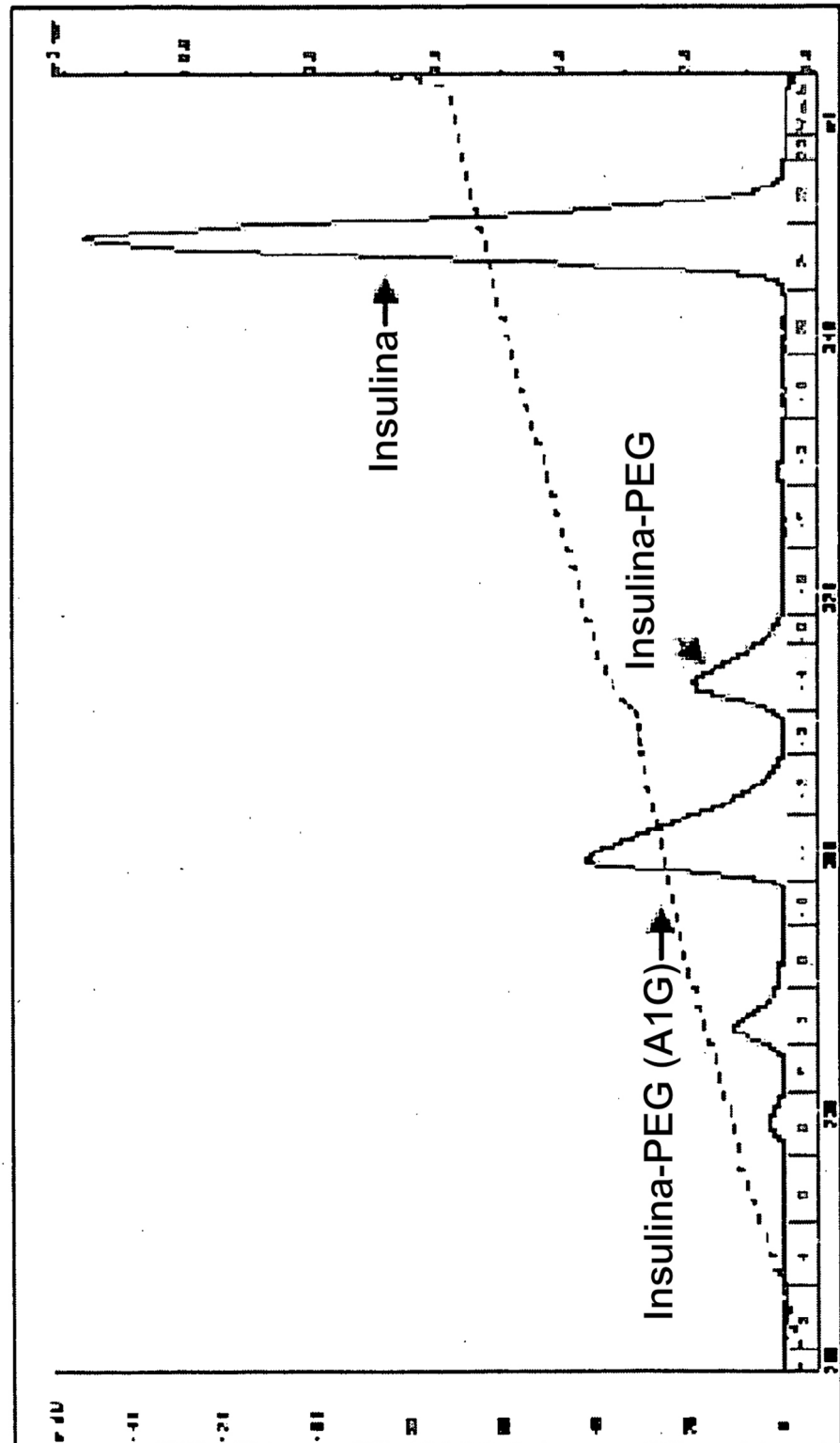


FIG. 35

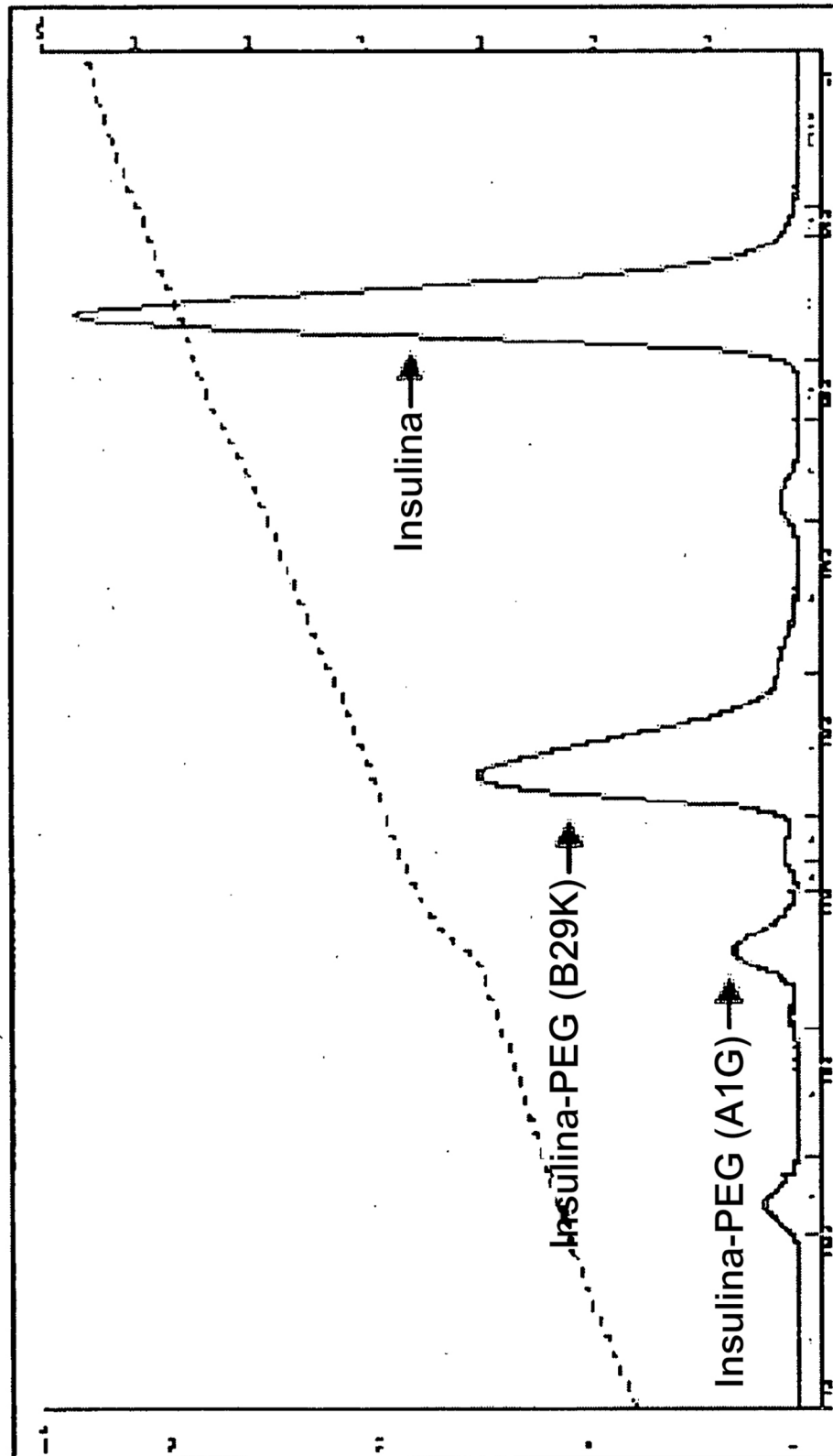


FIG. 36

