



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 320 101**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 38/32 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01970285 .1**

(96) Fecha de presentación : **28.09.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1333036**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2003**

(54) Título: **Eritropoyetina conjugada con mono-PEG.**

(30) Prioridad: **16.10.2000 JP 2000-315421**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2009

(73) Titular/es: **CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA**
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku, Tokyo, 115-8543, JP

(72) Inventor/es: **Nakamura, Teruo;**
Sekimori, Yasuo;
Machida, Minoru;
Kawata, Hiromitsu y
Miyamoto, Hajime

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 320 101 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

Eritropoyetina conjugada con mono-PEG.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a eritropoyetina conjugada con mono-PEG que tiene una molécula de PEG unida al radical lisina en la posición 52, que se obtiene por reacción de eritropoyetina derivada de orina humana o eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) que tiene las mismas cadenas de azúcar como la eritropoyetina de origen humano producida en células huésped animales con un derivado reactivo animal de PEG, teniendo dicho PEG un peso molecular de 10 a 30 kDa y siendo el peso molecular aparente de dicha EPO conjugada con monoPEG en un medio acuoso de 150 a 650 kDa por molécula, tal como se mide por cromatografía de columna de gel y excluyéndose la mezcla de diferentes EPO conjugadas con mono-PEG; una composición que comprende el conjugado y una formulación de eritropoyetina de acción sostenida que comprende el conjugado o una composición del mismo como ingrediente activo.

15 **Antecedentes en la técnica**

La eritropoyetina (EPO) es un polipéptido rico en cadenas de azúcar que se produce predominantemente en los riñones y actúa sobre células precursoras de tejido hematopoyético para estimular su diferenciación y proliferación en eritrocitos. La EPO está disponible actualmente en el comercio como EPO humana producida por recombinación en células huésped animales, y su uso principal es como agente terapéutico en diferentes tipos de anemias, incluyendo la anemia renal causada por la infraproducción de EPO como resultado de una nefropatía.

Tal como se utiliza aquí, el término “EPO nativa” pretende abarcar la EPO derivada de orina humana, como por ejemplo la que se extrae, aísla y purifica a través de diversas técnicas, así como EPO humana recombinante (rhEPO) que tiene las mismas cadenas de azúcar que la EPO de origen humano, como por ejemplo las que se producen por recombinación en células huésped animales (v.g., células CHO, células COS), así como sus variantes modificadas para incluir sustitución o supresión de uno o más aminoácidos que constituyen dichas EPO o modificadas para incluir adición de uno o más aminoácidos.

La EPO que se utiliza actualmente se administra, v.g., por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. El porcentaje de reticulocitos (precursores de eritrocito) en el total de eritrocitos puede utilizarse como indicador de la actividad de EPO. La actividad de EPO nativa observada como el porcentaje de reticulocitos alcanza un pico de 3 a 5 días después de la administración a través de cualquiera de las rutas que se han mencionado, seguido de un rápido descenso. Por lo tanto, la EPO nativa deberá inyectarse dos o tres veces a la semana para asegurar unos efectos terapéuticos suficientes en los pacientes con anemia. Esto no solamente causa dolor en los pacientes, sino que también supone una sobrecarga para los médicos y otros miembros del personal médico que están ya sobrecargados de trabajo. Por otra parte, el menor número de inyecciones que se requiere dentro de un período de tiempo fijo supondrá un ahorro de los costes médicos.

Por otra parte, existen informes sobre proteínas o glucoproteínas conjugadas con polímeros hidrosolubles (v.g., PEG) que tienen una fracción hidrazida u oxilamina que puede unirse covalentemente a través de la reacción química con un grupo funcional oxidable como polialcohol, lactol, amina, ácido carboxílico o derivado de ácido carboxílico en las proteínas o glucoproteínas (ver, v.g., JP-7-196925 A). De acuerdo con este informe, se puede unir un polímero hidrosoluble, como PEG, a varios radicales libres en aminoácidos o radicales de azúcar que constituyen una proteína o una glucoproteína para dar lugar a un producto de acoplado con 6 a 34 moléculas PEG (peso molecular: 2000 a 12000) por molécula de proteína. En dicha proteína conjugada con PEG o glucoproteína con muchas moléculas PEG, es difícil controlar las posiciones y el número de moléculas PEG unidas a la proteína o glucoproteína y resulta difícil obtener una proteína o glucoproteína conjugada con PEG uniforme. Por consiguiente, existe un problema cuando la proteína o glucoproteína conjugada con PEG así preparada se formula en productos farmacéuticos.

Existe también un informe en el que se describe un polímero activado con éster de sulfonato (v.g., PEG activado con éster de sulfonato) y que propone un método en el que se hace reaccionar dicho polímero activado con éster de sulfonato con un material diana (v.g., una proteína o una glucoproteína) para preparar un material diana conjugado con polímero (ver JP 9-504515 A). Entre los ejemplos de grupo reactivo en un material diana, que reacciona con este polímero activado con éster de sulfonato se incluyen un grupo amino primario o secundario, un grupo tiol y un grupo hidroxilo aromático. En dicho polímero activado con éster de sulfonato capaz de reaccionar con diversos grupos reactivos, se considera por tanto difícil de controlar el número y las posiciones de moléculas de polímero que se pueden conjugar que se introducen. Por otra parte, dicho polímero tiene claramente la posibilidad de formar amida de sulfonato, que da cabida a una heterogeneidad mucho más alta para los productos.

Asimismo, existe un informe sobre un polímero ramificado (v.g., PEG ramificado) que se une al material diana (v.g., una proteína o glucoproteína) para dar un conjugado de polímero ramificado del material diana (ver JP 9-504299 A). A pesar de que este material diana conjugado con polímero ramificado también sostiene con éxito su eficacia, ha sido deseable desarrollar EPOs conjugadas con polímero con una eficacia más firme.

Asimismo, se creía que la conjugación con PEG de peso molecular más alto tendría como resultado una eficacia más firme.

La conjugación con PEG de peso molecular más alto causará un gran descenso de la actividad *in vitro* de EPO. No obstante, se cree que EPO conjugada con PEG de peso molecular más alto podría presentar una retención en plasma significativamente mejorada y, por lo tanto, una actividad *in vivo* sostenida, con el resultado de una actividad mayor y más sostenida con un aumento del peso molecular de PEG (proteínas farmacéuticas conjugadas con polietilén glicol; PSTT vol., 1, Nº 8, 1998, 352-356). Por ejemplo, en el caso de un conjugado con PEG de G-CSF mutalina, se sabe que su actividad *in vivo* aumenta en proporción con el peso molecular de PEG calculado en el intervalo comprendido entre aproximadamente 10 kDa (WO 00/44875).

En US 4.904.584 se describe una proteína modificada de forma homogénea que tiene uno o más radicales lisina seleccionados que se dan de forma natural, reemplazados por un aminoácido adecuado, o que tiene uno o más radicales lisina sustituidos por otros aminoácidos o insertados en una secuencia de polipéptido, dejando radicales de lisina seleccionados que tienen grupos ε -amina en la proteína y acoplando compuestos reactivos de amina con radicales lisina seleccionados.

Se han designado conjugados de PEG convencionales de EPO para que tengan muchas moléculas PEG con un peso molecular relativamente bajo de entorno a 5 kDa con el fin de sostener su eficacia. No obstante, en EPO rica en cadenas de azúcar, la conjugación está limitada exclusivamente a radicales de aminoácido no glucosilados que participan en la unión de receptor, haciendo imposible evitar el descenso de la actividad *in vivo* y difícil encontrar el equilibrio entre una eficacia sostenida y un descenso de la actividad *in vivo*. Asimismo, incluso en el caso de que se conjuguen grupos amino o cadenas de azúcar con PEG de más de 10 kDa, tal como se ha señalado antes, se ha topado con la dificultad en la práctica de formular EPO conjugada con PEG en fármacos, ya que sigue pendiente el problema de controlar el número de moléculas PEG.

Descripción de la invención

Por estas razones, para conseguir una eficacia más sostenida sin perder la actividad fisiológica de EPO, una glucoproteína rica en cadenas de azúcar, es necesario desarrollar una EPO conjugada con PEG con una eficacia significativamente sostenida introduciendo un número controlado de moléculas PEG en las posiciones controladas.

Tal como se ha señalado anteriormente, se ha reconocido de manera general la relación entre el peso molecular de PEG utilizado para la conjugación y la actividad *in vivo* de EPO de modo que EPO conjugada con un PEG de peso molecular más alto presenta una mejor retención en plasma y, por lo tanto, una eficacia mayor y más sostenida. No obstante, los autores de la presente invención han aclarado que este hecho reconocido de manera general no se aplica a la conjugación de PEG para EPO nativa (recombinante) con cadenas de azúcar ya que la conjugación con PEG de peso molecular extremadamente alto también reduce la actividad *in vivo* de EPO. Como resultado, han observado que el PEG de peso molecular más alto no siempre produce un mejor resultado, sino que, más bien, existe un intervalo óptimo para el peso molecular de PEG para alcanzar un equilibrio entre la eficacia sostenida y la actividad *in vivo*, y además han llegado a la conclusión de que un número de moléculas PEG en particular supone la eficacia sostenida máxima. Estas conclusiones han llevado a completar la presente invención.

Los autores de la presente invención han preparado ahora una EPO conjugada con PEG haciendo reaccionar EPO humana recombinante que tiene las mismas cadenas de azúcar que la eritropoyetina derivada del ser humano con un derivado de polietilén glicol (PEG) que tiene un éster activo en uno de los extremos, como por ejemplo éster de ácido graso inferior de metoxi-PEG-succinimidilo. Dicha EPO conjugada con PEG comprende una composición de conjugados que tiene 1 molécula PEG lineal por cada molécula de rhEPO. Un conjugado mono-metoxi PEG-EPO (mono-mPEG-EPO) tiene una molécula PEG lineal por cada molécula rhEPO, que se une al grupo ε -amino del radical lisina en la posición 52 de rhEPO. Tal como se describirá más adelante, los autores de la presente invención han confirmado por primera vez que la EPO conjugada con PEG de la presente invención presentaba una eficacia significativamente sostenida en comparación con la EPO nativa sin conjugar.

Por otra parte, los autores de la presente invención han determinado el peso molecular aparente de EPO conjugada con PEG por cromatografía de columna de filtración de gel en un medio acuoso utilizando proteínas globulares como marcadores del peso molecular, tal como se describe en detalle en el ejemplo 2, con el fin de predecir el comportamiento del tamaño aparente *in vivo* de moléculas EPO conjugada con PEG. Como resultado, se ha observado de manera sorprendente que los conjugados de PEG de EPO nativa rica en cadenas de azúcar tenían un peso molecular aparente que excedía 100 kDa, y más específicamente que el conjugado de PEG de EPO nativa preparado utilizando PEG ramificado de 40 kDa tenía un peso molecular aparente de aproximadamente 800 kDa o más. En vista de este valor sorprendentemente alto del peso molecular aparente que es el punto de mira de la invención, junto con el hecho de que el receptor que se une a la EPO nativa se limitaba a las fracciones estructurales de la proteína expuesta como consecuencia de las abundantes cadenas de azúcar de EPO, los autores de la presente invención han llegado a la conclusión de que la conjugación de PEG con EPO nativa debería optimizarse para conseguir eficacia controlando el peso molecular y el número de moléculas PEG utilizadas para la conjugación.

Por consiguiente, los autores de la presente invención han preparado además un conjugado mono-metoxi PEG-EPO (mono-mPEG-EPO) que tiene una molécula PEG lineal de 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa o 30 kDa por cada molécula de EPO nativa, y un conjugado mono-metoxi PEG ramificado-EPO (mono-mPEG2-EPO) que tiene una molécula PEG ramificada doble de 10 kDa, 2 kDa por cada molécula EPO nativa. Tal como se describirá más adelante en los ejemplos a continuación, una comparación entre estos tres tipos de EPO conjugadas con PEG indicó que la retención en plasma

era más prolongada en los conjugados di-metoxi PEG-EPO (di-mPEG-EPO) y el mono-metoxi PEG ramificado-EPO (mono-mPEG2-EPO) que en el conjugado mono-metoxi PEG-EPO y, en cambio, el efecto eritropoyético *in vivo* era mayor en el conjugado mono-metoxi PEG-EPO. Esto corrobora el punto de vista de los autores de la invención antes mencionado de que hay un intervalo óptimo para la conjugación de PEG con EPO nativa.

Breve descripción de los gráficos

La figura 1 presenta un patrón SS-PAGE de las EPO conjugadas con PEG (mono-mPEG-EPO y di-mPEG-EPO) preparadas en la presente invención, EPO sin conjugar y otras.

La figura 2 presenta un patrón cromático del conjugado mono-mPEG-EPO con arreglo a la presente invención, que se digiere con endoproteasa Lys-C y que se realizó el mapeo por cromatografía de líquidos.

La figura 3 presenta gráficamente la actividad de crecimiento celular de células dependientes de EPO en presencia de EPOs conjugadas con PEG incluyendo el conjugado mono-mPEG-EPO con arreglo a la presente invención.

La figura 4 presenta gráficamente el transcurso de tiempo de los recuentos de reticulocitos periféricos tras la administración de EPOs conjugadas con PEG incluyendo el conjugado mono-mPEG-EPO con arreglo a la presente invención.

La figura 5 presenta gráficamente el transcurso de tiempo de los niveles de hemoglobina tras la administración de EPOs conjugadas con PEG incluyendo el conjugado mono-mPEG-EPO con arreglo a la presente invención.

La figura 6 presenta gráficamente el transcurso de tiempo de recuentos de reticulocitos periféricos tras la administración de EPOs conjugadas con PEG incluyendo los conjugados mono-mPEG-EPO y mPEG mono-ramificado-EPO con arreglo a la presente invención.

La figura 7 presenta gráficamente el transcurso de tiempo de los niveles de hemoglobina tras la administración de EPOs conjugadas con PEG incluyendo los conjugados mono-mPEG-EPO y mPEG mono-ramificado-EPO con arreglo a la presente invención.

La figura 8 presenta gráficamente la dependencia de dosis de conjugado mono-mPEG-EPO (PEG(1)-EPO) con arreglo a la presente invención, tal como se determina según su nivel de hemoglobina.

La figura 9 presenta gráficamente la comparación entre la inyección continua durante 5 días de EPO y una inyección única de conjugado mono-mPEG-EPO (PEG(1)-EPO) con arreglo a la presente invención.

La figura 10 presenta gráficamente la actividad del crecimiento celular sobre células dependientes de EPO en presencia de EPO conjugadas con PEG incluyendo los conjugados mono-mPEG10K-EPO, mono-mPEG15-EPO, y mono-mPEG20K con arreglo a la presente invención.

La figura 11 presenta gráficamente la actividad del crecimiento celular en células dependientes de EPO en presencia de EPOs conjugadas con PEG incluyendo conjugados mono-mPEG5K-EPO, mono-mPEG20k-EPO y mono-mPEG30K-EPO con arreglo a la presente invención.

La figura 12 representa gráficamente el transcurso del tiempo de los recuentos de reticulocitos tras la administración de EPOs conjugadas con PEG incluyendo conjugados mono-mPEG5K-EPO, mono-mPEG10K-EPO, mono-mPEG15K-EPO, mono-mPEG20k-EPO y mono-mPEG30K-EPO con arreglo a la presente invención.

La figura 13 representa gráficamente el transcurso del tiempo de los niveles de hemoglobina tras la administración de EPOs conjugadas con PEG incluyendo conjugados mono-mPEG5K-EPO, mono-mPEG10K-EPO, mono-mPEG15K-EPO, mono-mPEG20k-EPO y mono-mPEG30K-EPO con arreglo a la presente invención.

La figura 14 presenta gráficamente el área bajo la curva de los recuentos de reticulocitos periféricos tras la administración de EPOs conjugadas con PEG incluyendo conjugados mono-mPEG5k-EPO, mono-mPEG10-EPO, mono-mPEG15-EPO, mono-mPEG20-EPO y mono-mPEG30k-EPO según la presente invención.

Modo preferible para llevar a cabo la invención

Teniendo en cuenta lo anterior, por ejemplo, un conjugado mono-metoxiPEG-EPO altamente purificado (mono-mPEG-EPO) que tiene una molécula PEG unida principalmente al grupo amino del radical lisina en la posición 52 de la EPO nativa, es deseable para su uso en la formulación de la EPO conjugada con PEG de la presente invención para dar lugar a productos farmacéuticos. La presente solicitud describe asimismo, mono-metoxi PEG-EPO (mono-mPEG-EPO) como principal componente, junto con sus productos secundarios de actividad relacionada generados durante la conjugación (v.g., conjugado di-metoxi PEG-EPO (di-mPEG-EPO)).

Se pretende que EPO disponible para su uso en la conjugación de PEG de la presente invención abarque EPOs humanas recombinantes disponibles en el comercio producidas en células huésped animales que tienen las mismas cadenas de azúcar que la eritropoyetina derivada del ser humano.

En la presente invención, se puede utilizar cualquier derivado de PEG que tenga un extremo metoxilado para la conjugación con PEG. Por otra parte, el otro extremo sin metoxilar de dicho derivado de PEG puede convertirse en un éster de ácido graso inferior de succinimidilo, preferiblemente propionato de succinimidilo o butirato de succinimidilo (SPA-PEG o SBA-PEG, respectivamente) para la reacción con un grupo amino de EPO. Estos derivados PEG pueden proporcionar conjugados de PEG estables ya que no tienen ninguna fracción éster en su cadena principal, a excepción de su extremo activado para la reacción.

Para que EPO nativa se una a los receptores de EPO en las células precursoras de eritrocito y transmita señal que llevan diferenciación a las células para convertirse en eritrocitos, se deberán exponer las regiones estructurales de proteína esenciales para este propósito. No obstante, en EPO nativa, las regiones esenciales para la unión de receptor y la transducción de señal están localizadas en pequeñas fracciones de proteína expuestas ya que la EPO nativa tiene un contenido en azúcar mucho más alto que las otras proteínas farmacéuticas recombinantes. Por lo tanto, cuando tiene lugar la conjugación, en particular con un compuesto de polímero, en dichas fracciones de proteína expuestas limitadas, la conjugación reduce la actividad de EPO y, en último término, no se consigue el objetivo inicial de desarrollar fármacos de acción sostenida.

En la presente invención, sus autores completaron la misma determinando el peso molecular deseado y el sitio para la conjugación en PEG con el fin de proporcionar EPO nativa en condiciones particulares, tal como se ha mencionado anteriormente, con una mayor eficacia *in vivo* y más sostenida que las conseguidas con EPO nativa, si bien se vio afectada ligeramente la actividad de EPO al nivel de unión al receptor.

Aunque EPO nativa contiene varios radicales lisina como radicales de aminoácido con capacidad de conjugación con PEG, se prefiere en particular una EPO conjugada con PEG en la que tiene lugar la conjugación con PEG en el grupo amino del radical de lisina en la posición 52. Uno de los aspectos de la presente invención abarca una composición de EPOs conjugadas con PEG teniendo lugar la conjugación con PEG en el grupo amino del radical lisina en posición 52.

En este caso, la composición de EPO conjugada con PEG comprende una EPO conjugada con mono-PEG teniendo lugar la conjugación de PEG en el grupo amino del radical lisina en la posición 52.

La EPO conjugada con PEG contenida en esta composición tiene preferiblemente una molécula de PEG por cada molécula de EPO. Dicha composición de EPO conjugada con PEG comprende preferiblemente una EPO conjugada con mono-PEG teniendo lugar la conjugación de PEG en el grupo amino del radical de lisina en la posición 52.

El peso molecular de PEG utilizado para la conjugación puede cambiarse según sea apropiado según el grado de eficacia requerido de la EPO conjugada con PEG resultante, el grado de disminución de la actividad de EPO, etc. El peso molecular de una molécula de PEG es de 10 a 30 kDa, preferiblemente de 20 a 30 kDa y es preferible PEG lineal frente al PEG, si tienen el mismo peso molecular. El peso molecular aparente de EPO conjugada con PEG en un medio acuoso es de 150 a 650 kDa, preferiblemente de 400 a 650 kDa, según se mide por cromatografía de columna de filtración de gel en las mismas condiciones que las que se han descrito en el ejemplo 2.

Las moléculas PEG utilizadas para la conjugación tienen preferiblemente la forma lineal, pero es posible utilizar moléculas PEG en forma de estrella o ramificadas siempre y cuando el peso molecular aparente de la EPO conjugada con PEG resultante se encuentre dentro del intervalo mencionado. En el caso de PEG en forma de estrella o ramificado, la conjugación con PEG tiene lugar también en los mismos radicales de aminoácido que se han mencionado antes.

Las técnicas para la purificación de EPO conjugada con PEG incluyen el reparto en dos fases PEG/dextrano, la cromatografía de filtración de gel, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía en fase inversa y la cromatografía de afinidad.

En lo que se refiere a las actividades fisiológicas y la eficacia sostenida de las EPOs conjugadas con PEG preparadas en la presente invención, se llevó a cabo una prueba comparativa de los puntos que se exponen a continuación, entre el vehículo y las EPOs conjugadas con PEG, incluyendo EPO nativa sin conjugar, di-metoxi PEG-EPO y PEG mono ramificado-EPO lo que confirmó que las EPO conjugadas con PEG de la presente invención tenían una eficacia mayor y más sostenida *in vivo* en comparación con la EPO nativa sin conjugar. Por otra parte, se confirmó la eficacia mayor y más sostenida *in vivo* en un conjugado mono-metoxi PEG-EPO con un peso molecular aparente de 400 a 650 kDa (ver ejemplos 2 y 9) produciéndose la conjugación de PEG principalmente en el grupo amino del radical lisina en la posición 52 utilizando PEG lineal de 20 a 30 kDa.

Más específicamente, se sometieron a ensayo EPO nativa sin conjugar y EPOs conjugadas con PEG según la presente invención para determinar su retención en plasma en ratas tras una inyección única en la vena de la cola, lo que indicó que se obtenía una retención en plasma más prolongada con EPO conjugada con PEG que tenía un mayor número de moléculas PEG de peso molecular más alto y que tenía un peso molecular aparente más alto, según lo normalmente esperado.

Por otra parte, se sometieron a ensayo las EPO conjugadas con PEG para determinar su actividad de crecimiento celular *in vitro* en células dependientes de EPO (células BaF/EpoR), lo que indicó que las EPOs conjugadas con PEG de la presente invención seguían reteniendo la actividad de crecimiento celular *in vitro* si bien presentaron cierto descenso en la actividad en comparación con la EPO nativa sin conjugar. Esto sugiere que la conjugación con PEG afecta a la afinidad de unión con el receptor, pero no bloquea completamente la región que se une directamente con el receptor. Entre las EPOs conjugadas con PEG de la presente invención, EPO conjugada con mono-metoxi PEG presentó una actividad mucho más alta que otras EPOs conjugadas con PEG (ver ejemplo 4).

Por otra parte, se realizó una prueba *in vivo* en ratas para llevar un seguimiento de los cambios en los recuentos de reticulocitos y los niveles de hemoglobina tras una inyección única en la vena de la cola de EPO nativa sin conjugar o cada una de las EPO conjugadas con PEG de la presente invención, lo que confirmó que las EPO conjugadas con PEG de la presente invención producían buenos resultados tanto en los recuentos de reticulocitos como en los niveles de hemoglobina. Se ha confirmado que, al contrario que las proteínas conjugadas con PEG comunes, la EPO conjugada con PEG de la presente invención produce unos resultados extremadamente buenos, en particular, cuando la conjugación con PEG tiene lugar principalmente en el grupo amino del radical lisina en la posición 52 utilizando PEG de 10-30 kDa para dar un conjugado de EPO con mono-metoxi PEG con un peso molecular aparente de 150 a 650 kDa, tal como lo demuestran los datos de los recuentos de reticulocitos y los niveles de hemoglobina (ver los ejemplos 5 y 11).

El uso de EPOs conjugadas con PEG (preferiblemente, mono-metoxi PEG-EPO) con arreglo a la presente invención permite un extendido intervalo para la administración de eritropoyetina. Por ejemplo, el intervalo se puede extender a una vez a la semana desde 2-3 veces a la semana, o se puede extender a una vez cada 10 días o una vez cada 2 semanas desde una vez cada semana. Por consiguiente, no solamente es posible facilitar la carga física y de tiempo para los pacientes al reducir el número de visitas al hospital y las inyecciones dolorosas, sino que también es posible ahorrar gastos médicos reduciendo también la tarea de los miembros del personal médico.

La dosis variará dependiendo de distintos factores y deberá ajustarse según sea apropiado según la causa y la gravedad de la anemia, la edad y la sensibilidad a eritropoyetina de cada paciente en particular, etc. Por ejemplo, para una inyección intravenosa una vez a la semana, la dosis estará comprendida entre 1 y 100 μg , preferiblemente entre 5 y 50 μg por adulto.

La EPO conjugada con PEG de la presente invención se puede administrar a los pacientes a través de diversas rutas como por ejemplo inyección intravenosa, infusión por goteo intravenoso, inyección subcutánea, aplicación transmucosa (v.g., transpulmonar, transnasal) y aplicación percutánea.

Dependiendo de la ruta de administración empleada, la EPO conjugada con PEG de la presente invención puede formularse en la forma de dosis deseada como, por ejemplo soluciones, preparaciones liofilizadas, jeringuilla precargada, aguja indolora y sistemas sin aguja para administración subcutánea, o preparaciones de liberación sostenida para implantación intracutánea (v.g., microcápsulas, micelos poliméricos, preparaciones gelatinosas a base de polímero, liposomas), que tienen como resultado formulaciones de EPO más estables que la eritropoyetina nativa. Las preparaciones de liberación sostenida de EPO conjugada con PEG son más ventajosas que las de eritropoyetina nativa, ya que la conjugación con PEG estabiliza la actividad de eritropoyetina en las preparaciones de liberación sostenida y porque la eritropoyetina conjugada con PEG presenta una retención en plasma más prolongada que la eritropoyetina nativa.

Ejemplos

La presente invención quedará descrita con mayor detalle con los siguientes ejemplos, no pretendiéndose que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de EPOs conjugadas con PEG (1)

Preparación de mono-mPEG-EPO y di-mPEG-EPO

Se añadió a una solución de rhEPO (en tampón fosfato 100 mM, pH 8,0), propionato de metoxi PEG-succinimidilo (PEG Mw: aproximadamente 20 kDa, Shearwater Polymers, Inc) (en adelante denominado mPEG-SPA) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 1/10 volúmenes de una solución de glicina 100 mM y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos más para desactivar el éster activo. Se llevaron a cabo cuatro reacciones de esta misma manera. En la tabla 1 se muestra la concentración y el volumen de la solución de rhEPO y la relación molar de mPEG-SPA añadido a la rhEPO en cada reacción. Se concentró cada una de las soluciones de reacción a través de un Centricon-50 (Millipore) simultáneamente con el reemplazamiento del disolvente con tampón fosfato 20 mM-NaCl 150 mM (pH 7,4).

TABLA 1

Reacciones de EPO conjugada con PEG

	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4
Concentración EPO (mg/mL)	2,94	1,75	2,81	2,45
Volumen EPO (mL)	0,50	2,31	2,50	2,04
Relación molar de mPEG-SPA (por mol de EPO)	3,97	5,00	5,08	5,03

Se purificó cada una de las soluciones concentradas por filtración de gel sobre Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech) para recoger fracciones tanto de mono-mPEG-EPO como de di-mPEG-EPO, siempre y cuando se usara la solución concentrada de la reacción 1 en la tabla 1 como tal para la purificación, al mismo tiempo que las otras se purificaron con 2 a 4 porciones divididas. En el caso de las reacciones 2 y 4, se recogió una fracción intermedia que incluía mono-mPEG-EPO y di-mPEG-EPO que se eluyó como una mezcla de ambos conjugados, por separado, y se purificó de nuevo sobre Superdex 200 HR 10/30 para separar las fracciones de mono-mPEG-EPO y di-mPEG-EPO. Se combinaron respectivamente las fracciones obtenidas a través de una serie de etapas de purificación para cada conjugado para recoger mono-mPEG-EPO (3,8 mg) y di-mPEG-EPO (1,6 mg). Se filtraron la mono-mPEG-EPO y la di-mPEG-EPO recogidas a través de un filtro Millex de 0,22 μm (Millipore) para dar di-mPEG-EPO esterilizado (1,6 mg) y mono-mPEG-EPO (3,8 mg). Se sometieron a electroforesis SDS-PAGE cada una de estas muestras (aproximadamente 0,75 mg/mL, 1 μL de cada una cargado en un pocillo de muestra de un gel electroforético) en un Gradiente 4-15 PastGel (Pharmacia Biotech) y se mancharon con Azul R PhastGel (Pharmacia Biotech) (ver figura 1, en la que se pretende que cada EPO signifique rhEPO).

En este ejemplo, se cuantificaron las EPOs conjugadas con PEG y rhEPO en cuanto a su absorbancia a una longitud de onda de 279 nm, dado que un 1 mg/mL de solución de rhEPO tenía una absorbancia de 0,93 a una longitud de onda de 279 nm (encontrado en el Biochemical Data Book). En otros ejemplos, se llevó a cabo la cuantificación, dado que 1 mg/mL de solución de rhEPO tenía una absorbancia de 1,31 a 281 nm.

Ejemplo 2

*Determinación del peso molecular de EPOs conjugadas con PEG (1)**Determinación del peso molecular de EPOs conjugadas con PEG lineales*

Se añadió a una solución de rhEPO (960 μL , 0,49 mg/mL en tampón fosfato 100 mM, Ph 8,0), mPEG-SPA (5,32 mg, PEG Mw: aproximadamente 20 kDa, mPEG-SPA/rhEPO = 10,2 (mol/mol)) y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la adición de una solución de glicina 1M (100 μL), se diluyó la solución de reacción en PBS (500 μL) y se concentró a 390 μL a través de un Centricon-50. Se aplicó la solución concentrada a dos columnas Superose 6 HR 10/30 (1,0 x 30 cm, volumen del lecho: 24 mL, Pharmacia Biotech) en serie y se eluyó con PBS para recoger fracciones tanto de di como de mono-mPEG-EPO.

Se concentró cada una de las fracciones di- y mono-mPEG-EPO resultantes a través de Centricon-50 simultáneamente con el reemplazamiento del disolvente por agua Milli-Q. A continuación, se calibró el peso molecular de cada uno de los conjugados a partir de patrones BSA en análisis ToF-MS utilizando ácido sinapínico/MeCN 50% (4,05 mg/405 μL) como matriz y a una relación de muestra/matriz de 5 μL /5 μL .

Para su uso en la determinación del peso molecular por filtración de gel, se diluyó cada una de las soluciones de muestra proporcionadas para el análisis ToF-MS (30-35 μL) en PBS (200 μL), se aplicó a dos columnas Superose 6 HR 10/30 (1,0 x 30 cm, volumen de lecho: 24 mL, Pharmacia Biotech) en serie y a continuación se eluyó con PBS para medir los tiempos de elución correspondientes de rhEPO sin conjugar y di- y mono-mPEG-EPOs. Se utilizó un equipo de calibración del peso molecular para filtración de gel (Amersham Pharmacia Biotech) para preparar las siguientes soluciones patrón mixtas: (i) Tiroglobulina (Mw 669000), Aldolasa (Mw 158000) y quimotripsinogeno A (Mw 25000) y (ii) Ferritina (Mw 440000) y ovalbúmina (Mw 43000), que fueron sometidas a filtración de gel en las mismas condiciones. Se preparó una curva de calibración a partir de los tiempos de elución de cada patrón individual y se utilizaron para determinar los pesos moleculares correspondientes de rhEPO y di- y mono-mPEG-EPOs (Preparación y determinación de peso molecular de EPOs conjugadas con PEG ramificado).

Se añadió a una solución de rhEPO (500 μL , 2,27 mg/mL en tampón fosfato 100 mM, pH 8,0), mPEG2-NHS ramificado (5,32 mg, PEG Mw: aproximadamente 40 kDa (20 kDa x 2), mPEG2-NHS/rhEPO ramificado = 2,99 (mol/mol)) y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la adición de una solución de

ES 2 320 101 T3

glicina 1 M (50 μ L, en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) se continuó agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos más. Se reemplazó el disolvente por Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) a través de un Centricon-50 y se ajustó a un volumen final de 750 μ L. Se aplicó la solución resultante a cromatografía de intercambio de iones en Resource Q (1 mL, Pharmacia Biotech) y se eluyó con un gradiente de 0-50% eluyente B (pH 8,0, Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M) en eluyente A (pH 8,0, Tris-HCl 20 mM) para recoger fracciones que contenían EPOs conjugadas con PEG ramificadas que, se concentraron a continuación a 375 μ L a través de Centricon-50. Tras la adición de PBS (25 μ L), se aplicó la solución a dos columnas Superose 6 HR 10/30 (1,0 x 30 cm, volumen de lecho: 24 mL, Pharmacia Biotech) en serie y después se eluyeron con PBS para recoger fracciones de di-mPEG2-EPO (di-mPEG-EPO ramificada) y tri-mPEG2-EPO (tri-mPEG-EPO ramificada) así como una fracción de mono-mPEG2-EPO (mono-mPEG-EPO ramificada). Se concentró cada una de las dos fracciones resultantes a través de Centricon-50 simultáneamente con el reemplazamiento del disolvente por agua Mill-Q. A continuación, se calibró el peso molecular de cada conjugado a partir de patrones BSA en análisis ToF-MS utilizando ácido sinapínico/50% MeCN (4,05 mg/405 μ L) como matriz y a una relación de muestra/matriz de 5 μ L/5 μ L.

Para su uso en la determinación del peso molecular por cromatografía de filtración de gel, se diluyó cada una de las soluciones de muestras proporcionadas para el análisis ToF-MS en PBS (200 μ L, para di-/tri-, 150 μ L para mono-) aplicado a dos columnas Superose 6 HR 10/30 (1,0 x 30 cm, volumen de lecho: 24 mL, Pharmacia Biotech) en serie y después se eluyeron con PBS para medir los tiempos de elución correspondientes de rhEPO sin conjugar y di- y mono-mPEG-EPOs. Se utilizó un equipo de calibración del peso molecular para filtración de gel (Amersham Pharmacia Biotech) para preparar las siguientes soluciones patrón mixtas: (i) Tiroglobulina (Mw 669000), Aldolasa (Mw 158000) y quimotripsinogeno A (Mw 25000) y (ii) Ferritina (Mw 440000) y ovalbúmina (Mw 43000), que fueron sometidas después a filtración de gel en las mismas condiciones. Se preparó una curva de calibración a partir de los tiempos de elución de cada patrón individual y se utilizaron para determinar los pesos moleculares correspondientes de mono-mPEG2-EPO (mono-mPEG ramificado-EPO).

En la tabla 2 se muestran los pesos moleculares de rhEPO, di- y mono-mPEG-EPO y mono-mPEG2-EPO (mono-mPEG-EPO ramificado) (en la tabla, se pretende que EPO, lineal y ramificado signifiquen rhEPO, lineal y ramificado respectivamente).

TABLA 1

Pesos moleculares de EPOs conjugadas con PEG

		Mw Calculado (Da)	Mw medido (DA)	
			ToF-MS	Filtración de gel
	EPO	29000 ¹⁾	28400	70000
PEG lineal	mono-mPEG-EPO	50000	49800	402000
	di-mPEG-EPO	71000	71300	914000
PEG ramificado	mono-mPEG2-EPO	71000	71200	823000
	di-mPEG2-EPO	113000	113000	(2080000) ²⁾

1) Peso molecular putativo de EPOCH (análisis químico) encontrado en la publicación Journal of Clinical Therapeutics & Medicine, vol 6, Supl. 2 (mayo) 1990), p. 24

2) fuera del intervalo de calibración (mostrado como referencia)

Ejemplo 3

Identificación de sitios para conjugación con PEG

Se analizó la EPO conjugada con PEG (mono-mPEG-EPO) del ejemplo 1 para identificar su sitio para la conjugación con PEG.

ES 2 320 101 T3

Se digirieron mono-mPEG-EPO (representada como PEG(1)-EPO en la figura 2) y rhEPO sin conjugar (representada como EPO intacta en la figura 2) con endoproteasa Lys-C, seguido del mapeo de péptido en columna RP/C18.

Método experimental

Se utilizaron mono-mPEG-EPO (786 µg/mL, PEG Mw: aproximadamente 20 kDa) y rhEPO (1 mg/mL) como muestras.

a) Carboximetilación reducida (RCM) y digestión con Lys-C

La solución de desnaturalización consistió en tampón fosfato 300 mM (pH 8,0)/hidrocloruro de guanadina 6M/ EDTA 6 mM. Se añadieron cinco volúmenes de solución de desnaturalización a cada una de las muestras (50 µg como EPO) para desnaturalizar y reducir EPO durante toda la noche a temperatura ambiente en presencia de DTT (1,5 µmoles, 50 veces más que Cys). Tras la adición de ácido monoyodoacético (3,15 µmoles, 2,1 veces más que DTT), se carboximetiló la mezcla de reacción en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 minutos y después se dializó contra Tris-HCl 50 mM (pH 8,5). Se llevó a cabo la digestión durante toda la noche a 37°C en presencia de Lys-C (1 µg, sustrato: enzima = 50:1), seguido de la adición de 1/10 volúmenes de TFA 10% para el mapeo con péptido.

b) Mapeo con péptido

Se utilizó una columna Vydac C18 (218TP52, 2,1 mm x 250 mm) como columna y un sistema SMART (Pharmacia) para LC. Se estableció la velocidad de flujo en 100 µL/minuto y se llevó a cabo la detección a 220 nm y 280 nm. Se ajustaron el disolvente y el gradiente para elución del siguiente modo:

Disolvente A: 0,1% de TFA

Disolvente B: 90% MeCN/0,1% TFA

Gradiente: 5% B/15 min, 5-100%, B/85 min, 100% B/10 min.

La figura 2 presenta el patrón cromático obtenido.

Una comparación entre mono-mPEG-EPO (representado como PEG(1)-EPO en la figura 2) y rhEPO sin conjugar (representado como EPO intacto en la figura 2) indica una pérdida sustancial de L4 y una disminución significativa de L3 (pico L3 & L6 en la figura 2). Esto sugiere que es más probable que tenga lugar la conjugación con PEG en Lys52 en la frontera entre L3 y L4. Por otra parte, aparece un nuevo pico entre L5 y L4, que puede ser relevante para el péptido conjugado con PEG. Por otra parte, teniendo en cuenta el hecho de que L4 no desaparece completamente y L1 disminuye ligeramente, existe una especie molecular potencial en la que tiene lugar la conjugación con PEG en el N-terminal (Ala 1) indicado por L1. El patrón cromático sugiere que tiene lugar entre 70% y 80% de conjugación con PEG en Lys52.

Ejemplo 4

Ensayo para determinar la actividad de crecimiento de células de EPOs conjugadas con PEG en células dependientes de EPO (1)

Se lavaron células BaF/EpoR que presentaban crecimiento dependiente de EPO (Blood, 90, 1867- 1997, PNAS, 93, 9471-1996) repitiendo 4 ciclos de resuspensión en RPMI que contenía FCS al 2% y centrifugado. A continuación, se suspendieron las células en RPMI que contenía FCS al 10% a una densidad de 1×10^6 células/10 mL y se dispensaron en cada uno de los pocillos de placas de 96 pocillos en un volumen de 50 µL por pocillo. Al mismo tiempo, se prepararon muestras de ensayo utilizando RPMI que contenía FCS al 10% como diluyente para dar la serie de dilución de EPO correspondiente así como mono-mPEG-EP, di-mPEG-EPO y mono-mPEG ramificado-EPO preparadas en los ejemplos 1 y 2. Se añadió cada solución de muestra (50 µL/pocillo, n=3) y se mezcló con células BaF/EpoR en placas de 96 pocillos, seguido de incubación a 37°C bajo una atmósfera humificada de CO₂ al 5% durante 24 horas. Se suplementó cada pocillo con 10 µL de Reactivo de recuento de células SF (Nacalai Tesque, Inc.) y se midió para determinar su absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 620 nm, que se definió como el valor en el tiempo 0. Se dejaron en reposo las muestras a temperatura ambiente durante 6 horas más, seguido de la medida de la absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 620 nm para hacer el gráfico de los datos en un formato de gráfico (ver figura 3, en el que se pretende que mono-, di- ramificado y EPO signifiquen mono-mPEG-EPO, di-mPEG-EPO, mono-mPEG ramificado-EPO y rhEPO, respectivamente). Entre los datos obtenidos, se analizaron 3 puntos que presentaban la relación de respuesta a dosis lineal por regresión lineal para determinar ED₅₀ para cada muestra y su intervalo de confianza al 95% utilizando un programa SAS. En la tabla 3 se resumen los resultados (en la que m-PEG-EPO ramificada representa mPEG-EPO ramificada).

ES 2 320 101 T3

TABLA 3

Actividad de crecimiento celular en células dependientes e EPO

	ED ₅₀ (ng/mL)	Intervalo de confianza 95%	Actividad específica
rhEPO	0,12	0,10-0,14	1,0
mono-mPEG-EPO	0,94	0,73-1,2	0,13
di-mPEG-EPO	15	13-18	0,0079
mPEG-EPO ramificado	3,0	2,4-3,8	0,040

Ejemplo 5

Ensayo para determinar la eficacia sostenida de mono-mPEG-EPO, di-mPEG-EPO y rhEPO

Se utilizaron mono-mPEG-EPO (786 µg/mL, que tenía una molécula mPEG por cada molécula rhEPO) y di-mPEG-EPO (640 µg/mL; que tenía dos moléculas mPEG por molécula rhEPO) preparados en el ejemplo 1 como materiales de ensayo. Cada uno de ellos fue PEGlicolado añadiendo aproximadamente 20 mDa de mPEG, que había sido activado con éster en uno de los extremos, en un grupo amino en rhEPO, seguido de la purificación por cromatografía de filtración de gel.

Se diluyó cada EPO conjugada con PEG o rhEPO a 12,5 µg/mL en solución salina fisiológica que contenía 0,05% de albúmina de suero de rata y 0,05% de Tween 20. La administración de medio (vehículo) en solitario fue definida como control negativo. Se prepararon estas soluciones de administración el primer día de administración. En este ejemplo, se proporcionaron ratas macho Slc:SD (Japan SLC; Inc) para el experimento cuando tenían 7 semanas de vida. El día de la administración del material de ensayo se dividió a las ratas en 4 grupos de 4 ratas de manera que todos los grupos tuvieran sustancialmente el mismo recuento de eritrocitos.

Estos 4 grupos de 4 ratas fueron establecidos del siguiente modo: grupo de vehículo, grupo rhEPO, grupo mono-mPEG-EPO y grupo di-mPEG-EPO. Cada rata recibió una sola inyección en la vena de la cola de 2 mL/kg (concentración de muestra: 25 µg/kg).

El primer día de la administración, y 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 25, 29, 32, 35 y 39 días después de la administración, se fijó a cada una de las ratas en un retenedor anestesiadas y se extrajeron muestras de sangre de una herida realizada con un pinchazo con una aguja de inyección en la vena de la cola. Se ensayó cada muestra de sangre para determinar el recuento de reticulocitos y el nivel de hemoglobina. Se determinó el nivel de hemoglobina utilizando un micro contador de células (Sysmex F-800, Toa Medical Electronics Co., Ltd.).

En puntos de tiempo individuales, se compararon el nivel de hemoglobina y el recuento de reticulocitos entre el grupo de vehículo y el grupo rhEPO, mono-mPEG-EPO o di-mPEG-EPO según el ensayo de comparación múltiple de Dunnett a un nivel de importancia de 5% para verificar la importancia de las diferencias en los valores medios.

En la figura 4 se muestran los resultados (curso de tiempo del recuento de reticulocitos periféricos) y en la figura 5 (el curso de tiempo de los niveles de hemoglobina). Por otra parte, en la tabla 4 se muestra el período sostenido de estimulación de eritropoyesis.

TABLA 4

Período efectivo de estimulación de eritropoyesis inducida por EPOs conjugadas con PEG

Grupo de ensayo	Período efectivo (días) según se determina por el nivel de hemoglobina, >vehículo ^a
rhEPO	1 (día 4)
mono-mPEG-EPO	22 (día 4-25)
di-mPEG-EPO	18 (día 4-21)

^a diferencia significativa desde el control de vehículo (P<0,05)

El día 2 tras la administración, todos los grupos de ensayo presentaron un significativo aumento de los recuentos de reticulocitos en comparación con el grupo vehículo. En el grupo rhEPO, el recuento de reticulocitos alcanzó un pico el día 4 tras la administración, y disminuyó por debajo del grupo vehículo el día 7 tras la administración. En contraste, los grupos mono-mPEG-EPO y di-mPEG-EPO presentaron un valor significativamente más alto que el grupo vehículo el día 10 y el día 7 tras la administración, respectivamente.

El nivel de hemoglobina del grupo rhEPO alcanzó un pico el día 4 tras la administración y disminuyó sustancialmente al mismo nivel que el grupo de vehículo el día 7 tras la administración. En contraste, los grupos mono-mPEG-EPO y di-mPEG-EPO presentaron un pico el día 14 y el día 10 tras la administración, respectivamente. Estos grupos también presentaron un nivel significativamente más alto que el grupo de vehículo el día 25 y el día 21 tras la administración, respectivamente. El período, durante el cual el grupo de ensayo presentó un nivel más alto significativamente que el grupo de control fue solamente un día (día 4) en el grupo rhEPO, mientras que fue 22 días (días 4-25) y 18 días (día 4-21) en los grupos mono-mPEG-EPO y di-mPEG-EPO, respectivamente (tabla 4).

Ejemplo 6

Ensayo para determinar la eficacia sostenida de mono-mPEG-EPO, mono-mPEG-EPO ramificada y rhEPO

Se repitió el mismo experimento comparativo que el que se ha mostrado en el ejemplo 5, a excepción del punto que se señala a continuación. Se comparó el efecto eritropoyético entre los siguientes conjugados cuando las ratas recibieron una única inyección en la vena de la cola de 5 ó 1 $\mu\text{g/kg}$: mono-PEG ramificado-EPO (br-mPEG-EPO, que tenía una molécula PEG ramificada) preparado a través de la reacción entre un derivado activado con éster (Metoxi PEG 20000)₂ de aproximadamente 40 kDa ((mPEG)2-propionato de succinimidilo) y un grupo amino en rhEPO; y mono-PEG-EPO lineal (mono-mPEG-EPO, que tenía una molécula PEG lineal) preparada a través de la reacción de un derivado de mPEG activado con éster de aproximadamente 20 kDa (mPEG-propionato de succinimidilo) y un grupo amino en rhEPO. El día de la administración del material de ensayo, se dividió a las ratas en grupos de cinco de manera que todos los grupos tuvieran sustancialmente el mismo nivel de hemoglobina.

El primer día de administración y los días 2, 4, 7, 10, 14, 21, 28 y 35 tras la administración, se fijó cada una de las ratas anestesiadas y se extrajeron muestras de sangre de una herida hecha con un pinchazo con una aguja de inyección en la vena de la cola.

Los resultados se muestran en la tabla 6 (curso de tiempo de recuento de reticulocitos periféricos) y en la figura 7 (curso de tiempo de los niveles de hemoglobina). Por otra parte, en la tabla 5 se resume el período sostenido de estimulación de eritropoyesis. En las figuras 6, 7 y en la tabla 5, br-mPEG-EPO representa mono-mPEG ramificado-EPO.

TABLA 5

Dosis y efecto eritropoyético sostenido de EPOs conjugadas con PEG

Grupo de ensayo	Período efectivo (días) según se determina por el nivel de hemoglobina, >vehículo ^a
mono-mPEG-EPO, 5 $\mu\text{g/kg}$	13 (día 2-14)
mono-mPEG-EPO, 1 $\mu\text{g/kg}$	8 (día 7-14)
br-mPEG-EPO; 5 $\mu\text{g/kg}$	11 (día 4-14)
br-mPEG-EPO; 1 $\mu\text{g/kg}$	

^a diferencia significativa desde el control de vehículo ($P < 0,05$)

^b no hay diferencia significativa con el control de vehículo.

El día 2 tras la administración, todos los grupos de ensayo presentaron recuentos de reticulocitos significativamente mayores en comparación con el grupo de vehículo, y se observó un pico el día 4 tras la administración en cada grupo. Cuando se comparó el recuento de reticulocitos pico entre los tres grupos, el grupo mono-mPEG-EPO (5 $\mu\text{g/kg}$) fue el más alto de todos, el grupo mono-mPEG ramificado-EPO (5 $\mu\text{g/kg}$) y el grupo mono-mPEG-EPO (1 $\mu\text{g/kg}$) fueron del mismo nivel, y el grupo mono-mPEG-EPO (1 $\mu\text{g/kg}$) fue el más bajo. El período, durante el cual el grupo de ensayo presentó recuentos de reticulocitos significativamente más altos que el grupo vehículo, fue 6 días (días 2-7) en los grupos 5 $\mu\text{g/kg}$ tanto para mono-mPEG-EPO como para mono-mPEG ramificado-EPO, mientras que fue 3 días (días 2-4) en los grupos 1 $\mu\text{g/kg}$ (figura 6).

El nivel de hemoglobina del grupo mono-mPEG-EPO (5 $\mu\text{g/kg}$) alcanzó un pico el día 7 tras la administración, y el período durante el cual el grupo presentó un significativo aumento con respecto al grupo de vehículo fue 13 días (días 2-14). El grupo mono-mPEG ramificado-EPO (5 $\mu\text{g/kg}$) y el grupo mono-mPEG-EPO (1 $\mu\text{g/kg}$) presentaron ambos un pico el día 4 después de la administración, y el período durante el cual los grupos presentaron un aumento significativo con respecto al grupo de vehículo fue 11 días (días 4-14) y 8 días (día 7-14), respectivamente. En contraste, el grupo mono-mPEG ramificado-EPO (1 $\mu\text{g/kg}$) no presentó ninguna diferencia significativa con respecto al grupo de vehículo a lo largo del período del experimento. (Figura 7, Tabla 5).

Ejemplo 7

Eficacia dependiente de dosis de rhEPO y EPO conjugada con PEG y eficacia sostenida de EPO conjugada con PEG

Se verifica la eficacia de mono-mPEG-EPO preparada en el ejemplo 1 a dosis de 25 $\mu\text{g/kg}$ o menos, en combinación con una comparación entre una sola inyección en la vena de la cola de mono-mPEG-EPO y una inyección continua en la vena de la cola de EPO sin conjugar.

Eficacia dependiente de dosis de EPO conjugada con PEG

Se examinó la eficacia de mono-mPEG-EPO según el tiempo y la dependencia de dosis de su efecto eritropoyético cuando se administró a ratas macho de ocho semanas de vida ($n = 5$) una única inyección en la vena de la cola del conjugado a dosis de 25 $\mu\text{g/kg}$, 5 $\mu\text{g/kg}$, 1 $\mu\text{g/kg}$ y 0,2 $\mu\text{g/kg}$.

En la figura 8 se muestran los cambios de los niveles de hemoglobina de las ratas que recibieron una única inyección en la vena de la cola de mono-mPEG-EPO a dosis de 25 $\mu\text{g/kg}$, 5 $\mu\text{g/kg}$, 1 $\mu\text{g/kg}$ y 0,2 $\mu\text{g/kg}$ (en la figura, mono-mPEG-EPO se representa como PEG(1)-EPO). Cuando se observó el día 28 después de la administración, se observó que mono-mPEG-EPO proporcionaba sustancialmente el mismo nivel de hemoglobina pico y una eficacia sostenida en los grupos de 25 $\mu\text{g/kg}$ y 5 $\mu\text{g/kg}$, mientras que los grupos 1 $\mu\text{g/kg}$ y 0,2 $\mu\text{g/kg}$ presentaron disminuciones dependientes de la dosis en el nivel de hemoglobina y una eficacia sostenida pico.

Comparación de la eficacia entre una única inyección en la vena de la cola de mono-mPEG-EPO y la inyección continua en la vena de la cola durante 5 días de rhEPO

Se realizó una comparación de la eficacia entre una única inyección en la vena de la cola de mono-mPEG-EPO y una inyección continua en la vena de la cola durante 5 días de rhEPO. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos (en la figura, mono-mPEG-EPO se representa como PEG(1)-EPO). Una comparación entre una sola inyección de mono-mPEG-EPO (5 $\mu\text{g/kg}$) y la inyección continua de 5 días de EPO (1 $\mu\text{g/kg}$ por día, 5 $\mu\text{g/kg}$ en total) indicó que el grupo mono-mPEG-EPO (5 $\mu\text{g/kg}$, inyección única) presentaba un pico del nivel de hemoglobina más alto y una eficacia más sostenida. En contraste, una comparación entre una inyección única de mono-mPEG-EPO (1 $\mu\text{g/kg}$) y la inyección continua de EPO durante 5 días (0,2 $\mu\text{g/kg}$ al día, 1 $\mu\text{g/kg}$ en total) indicó que ambos grupos presentaban sustancialmente los mismos cambios en los niveles de hemoglobina. Esto sugiere firmemente que mono-mPEG-EPO podría administrarse con menos frecuencia que rhEPO.

Ejemplo 8

Preparación de EPOs conjugadas con PEG (2)

Preparación de mPEG5K-EPO

Se añade EPO (1,3 mL, 2,27 mg/mL en tampón fosfato 100 mM, pH 8,0) a mPEG5K-SPA (3,38 mg, PEG/EPO = 4,09 (mol/mol) y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la adición de una solución de glicina 1 M en agua (130 μL), se continuó agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos más para desactivar el éster activo. Se diluyó la solución de reacción en PBS (550 μL) y se concentró a 325 μL a través de Centricon-50. Tras la adición de PBS (150 μL), se purificó la solución por filtración de gel en dos columnas Superdex 200 HR 10/30 en serie para recoger tres fracciones potenciales predominantemente ricas en mono-mPEG5K-EPO, di-mPEG5K-EPO y una mezcla de ellas. Se concentró cada una de las fracciones a través de Centricon-50 y se volvieron a someter a filtración de gel en las mismas condiciones para separar las fracciones de mono-mPEG5K-EPO y di-mPEG5K-EPO, que se combinaron después respectivamente para cada uno de los conjugados para dar mono-mPEG5K-EPO (210 μg) y di-mPEG5K-EPO (218 μg). Se llevó a cabo SDS-PAGE para confirmar que se correspondía el peso molecular entre los productos de reacción y las muestras recogidas.

Preparación de mPEG10K-EPO, mPEG15KEPO, mPEG30K-EPO, br-mPEG10K-EPO y br-mPEG20K-EPO

A continuación, se describen los procedimientos para la preparación, resumiéndose los detalles de las condiciones de reacción ((i) a (iv)) en la tabla 6.

Se añadió el volumen (ii) indicado de una solución EPO (en un tampón fosfato 100 mM, pH 8,0) en la concentración indicada (i) al volumen indicado (iii) de mPEG-SPA (lineal) o br-mPEG-NHS (ramificado) en la relación PEG/EPO indicada (iv) y se agitaron suavemente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la adición de vo-

lúmenes 1/10 (en función de la solución de EPO proporcionada para la reacción) de solución de glicina 1M en agua, se continuó agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos más para desactivar el éster activo. Se reemplazó el disolvente por Tris 20 mM (pH 8,0) a través de Centricon-50. Se aplicó la solución resultante a cromatografía de intercambio iónico en RESOURCE Q (1 mL) y se eluyó con un gradiente de 0-100% del mismo eluyente B que el utilizado en el ejemplo 2 para recoger las fracciones correspondientes que contenían EPO conjugada con PEG y EPO, seguido del reemplazamiento del disolvente por PBS a través de Centricon-50. Se sometió cada una de las soluciones a filtración de gel en las mismas condiciones que las que se han descrito para la preparación de mPEG5K-EPO, a excepción de que se utilizaron dos columnas Superose 6 HR 10/30 (1,0 cm x 30 cm, Pharmacia Biotech) en serie esta vez en la preparación de mPEG-15K-EPO, mPEG30K-EPO y br-mPEG20K-EPO. Se recogieron las fracciones que según las previsiones tuvieran contenido en EPO conjugada con una o dos moléculas de mPEG o br-mPEG y se concentraron. Las fracciones que contenían mPEG-EPO mixto con diferentes patrones de conjugación con PEG fueron concentradas de nuevo y sometidas después a filtración de gel para recoger mono-mPEG-EPO y di-mPEG-EPO.

Se realizó SDS-PAGE para confirmar que se correspondía el peso molecular entre los productos de reacción y las muestras recogidas. Estos rendimientos de las muestras resultantes fueron los que se muestran en la tabla 7.

TABLA 6

Condiciones de reacción para EPOs conjugadas con PEG

Peso molecular mPEG-SPA o br-mPEG-NHS	Concentración EPO (i) (mg/mL)	Volumen EPO (ii) (mL)	mPEG-SPA o mPEG-NHS (iii) (mg)	Relación PEG/EPO (iv) (mol/mol)
lineal 10kDa	1,75	1,0	2,91	3,12
lineal 15kDa	1,75	1,0	4,43	2,97
Lineal 30kDa	1,82	1,1	10,95	3,16
Ramificado (br) 10 kDa	2,43	0,7	5,07	4,93
Ramificado (br) 20kDa	2,43	0,7	9,67	4,93

TABLA 7

Rendimientos de EPOs conjugadas con PEG

Tipo de PEG	Rendimiento (µg EPO)	
	mono-PEGlicolado	di-PEGlicolado
mPEG10K	257	146
mPEG15K	277	135
mPEG30K	300	167
br-mPEG10K	247	138
br-mPEG20K	265	150

Ejemplo 9

Determinación del peso molecular de EPOs conjugadas con PEG (2)

Se concentraron varias soluciones de EPO conjugada con PEG preparadas como se ha descrito en el ejemplo 8 (Preparación de EPOs conjugadas con PEG) a través de Centricon-50 simultáneamente con el reemplazamiento del disolvente por agua Milli-Q. Se llevó a cabo el análisis MALDI-ToF-MS en las mismas condiciones que las que se han señalado en el ejemplo 2. Asimismo, se diluyó en PBS cada residuo de muestra proporcionado para el análisis ToF-

ES 2 320 101 T3

MS y se sometió a filtración de gel en las mismas condiciones que las que se han descrito para el ejemplo 2. En las mismas condiciones que las descritas para mPEG 10K y mPEG 15K en el ejemplo 8, se llevó a cabo la cromatografía de columna de filtración de gel (GPC) en cada muestra para medir el tiempo de elución.

- 5 En el caso de mPEG30K-EPO, se dividió su solución concentrada en dos partes alícuotas, una de las cuales sirvió para el análisis ToF-MS y la otra para GPC. En el caso de las br-mPEG 10K-EPO y br-mPEG20K-EPOs, se recogió la fracción en el tiempo de elución en GPC y sirvió para el análisis MALDI-ToF-MS tras el reemplazamiento del disolvente por agua Milli-Q. En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos.

TABLA 8

Pesos moleculares de EPOs conjugadas con PEG

PEG	Muestra	Peso molecular (Da)		
		Calculado	ToF-MS	GPC
	EPO	29000 ¹	28400	70000
PEG lineal	mono-mPEG5000-EPO	34100	33800	114000
	di-mPEG5000-EPO	39200	38900	161000
	mono-mPEG20000-EPO	50000	49800	402000
	di-mPEG20000-EPO	71000	71300	914000
	mono-mPEG30000-EPO	60500	59900	606000
	di-mPEG30000-EPO	92000	93000	(1620000) ²
PEG ramif.	mono-ancho-mPEG 10000-EPO	39600	39600	161000
	di-br-mPEG 10000-EPO	50200	50300	267000
	mono-br-mPEG20000-EPO	50000	49700	316000
	di-br-mPEG20000-EPO	71000	71500	649000
	mono-br-mPEG40000-EPO	71000	71200	823000
	di-br-mPEG40000-EPO	113000	113000	(2080000) ²

1) peso molecular putativo de EPOCH (análisis químico) encontrado en el Journal of clinical therapeutics & medicine, vol. 6, supl. 2 (mayo) 1990, p. 24

2) fuera del intervalo de calibración (mostrado para la referencia).

Ejemplo 10

- 55 *Ensayo para determinar la actividad del crecimiento celular de EPOs conjugadas con PEG en células dependientes de EPO (2)*

Se lavaron células BaF/EpoR que presentaban crecimiento dependiente de EPO (Blood, 90, 1867-, 1997, PNAS, 93, 9471-1996) repitiendo 2 ciclos de resuspensión de RPMI que contenía FCS al 1% y centrifugado. A continuación, se suspendieron las células en RPMI que contenía FCS al 10% a una densidad de 1×10^5 células/20 mL y se dispensaron en cada uno de los pocillos de placas de 96 pocillos en un volumen de 50 μ L por pocillo. Al mismo tiempo se prepararon muestras de ensayo utilizando RPMI que contenía FCS al 10% y un diluyente para dar la serie de diluciones correspondiente de EPO y mono-mPEG-EPOs. Se añadió cada una de las soluciones de muestra (50 μ L/pocillo, n = 3) y se mezcló con las células BaF/EpoR en placas de 96 pocillos, seguido de incubación a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% durante 24 horas. Se suplementó cada pocillo con 10 μ L de reactivo de recuento de células SF (Nacalai Tesque, Inc.) y se midió para determinar su absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 620 nm, que se definió como el valor en el tiempo 0. Se dejó en reposo las placas a temperatura ambiente durante 5 horas

ES 2 320 101 T3

más, seguido de la medida de la absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 620 nm para representar los datos en formato gráfico (ver figuras 10 y 11, en las que se pretende que mono y EPO signifiquen mono-mPEG-EPO y rhEPO, respectivamente). Entre los datos obtenidos, se analizaron 2 puntos que emparedaban el punto de 50% de actividad en la relación de respuesta a dosis por regresión lineal para determinar la ED50 para cada una de las muestras. En las

TABLA 9

	ED50 (ng/mL)	vs EPO (%)
EPO	0,134	100,0
mono-mPEG10000	0,255	52,5
mono-mPEG15000	0,240	55,6
mono-mPEG20000	0,557	24,0

TABLA 10

	ED50 (ng/mL)
mono-mPEG5000	0,158
mono-mPEG30000	0,348
mono-mPEG20000	0,374
EPO	0,072

Ejemplo 11

Ensayo para determinar la eficacia sostenida de mono-mPEG-EPOs con diferentes pesos moleculares

Se diluyó cada EPO conjugada con PEG o rhEPO a 2,5 µg/mL en solución salina fisiológica que contenía 0,05% de albúmina de suero de rata y 0,05% de Tween 20. La administración del medio (vehículo) en solitario se definió como el control negativo. Se prepararon estas soluciones de administración el primer día de la administración. En este ejemplo, se proporcionaron para el experimento ratas macho Slc:SD (Japan SLC; Inc.) de 7-8 semanas de vida. El día de la administración del material, se dividió a las ratas en 7 grupos de 5 ratas de manera que todos los grupos tuvieran sustancialmente el mismo recuento de eritrocitos.

Estos 7 grupos de 5 ratas fueron establecidos del siguiente modo: grupo de vehículo, grupo rhEPO, grupo mono-mPEG5K-EPO, grupo mono-mPEG10K-EPO, grupo mono-mPEG15K-EPO, grupo mono-mPEG20K-EPO y grupo mono-mPEG30K-EPO. Cada rata recibió una única inyección en la vena de la cola de 2 mL/kg (concentración de muestra: 5 µg/kg).

El primer día de administración y 2, 4, 5, 7, 10, 15, 21, 29 y 35 días después de la administración, se fijó a cada una de las ratas en un retenedor sin anestesiarse y se extrajeron muestras de sangre a partir de una herida hecha con un pinchazo con una aguja de inyección en la vena de la cola. Se sometió a ensayo cada una de las muestras de sangre para determinar el recuento de reticulocitos y el nivel de hemoglobina. Se determinó el nivel de hemoglobina utilizando un micro contador de células (Sysmex F-800, Toa Medical Electronics Co., Ltd.).

Asimismo, se calculó como indicador de la eficacia que reflejaba tanto un aumento del recuento de reticulocitos como un período durante el que se observó el aumento, la AUC de los recuentos de reticulocitos (Reti-AUC) el día 15 tras la administración utilizando la regla trapezoidal para cada grupo.

En la figura 12 se muestran los resultados (curso de tiempo de recuentos de reticulocitos periféricos), la figura 13 (curso de tiempo de niveles de hemoglobina) y en la figura 14 (recuento de reticulocitos).

Aplicación industrial

Para conseguir una eficacia más sostenida sin perder las actividad fisiologicas de EPO nativa, una glucoproteína rica en cadenas de azúcar, se desarrolló una EPO conjugada con PEG con una significativa eficacia sostenida, preparada por introducción de una molécula de PEG en el radical de lisina en la posición 52 de eritropoyetina derivada de orina humana o eritropoyetina humana recombinante que tiene las mismas cadenas de azúcar que la eritropoyetina de origen humano. La capacidad de esta EPO conjugada con EPO para proporcionar una eficacia más sostenida sin afectar al efecto eritropoyético inherente de la EPO nativa permite, por ejemplo, una disminución significativa del número de administraciones a los pacientes, una disminución del dolor asociado con la administración a los pacientes, una disminución de la sobrecarga física y de tiempo para los pacientes enfermos al reducirse el número de visitas al hospital, así como una disminución de la sobrecarga y las horas de trabajo para los miembros del personal médico, que incluye doctores, enfermeras y farmacéuticos, que trabajan en unas condiciones extremadamente duras. Por consiguiente, EPO conjugada con PEG supone un ahorro de los costes médicos en todos los sentidos.

REIVINDICACIONES

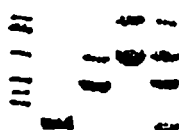
1. Una eritropoyetina conjugada con mono-PEG aislada (EPO) que comprende eritropoyetina derivada de orina humana o una eritropoyetina humana recombinante que tiene las mismas cadenas de azúcar que la eritropoyetina derivada de ser humano, conjugada químicamente con polietilen glicol (PEG) en el grupo amino del radical lisina en la posición 52, teniendo dicho PEG un peso molecular de 10 a 30 kDa, y un peso molecular aparente de dicha EPO conjugada con mono-PEG en un medio acuoso de 150 a 650 kDa por molécula, según se mide por cromatografía de columna de filtración de gel, y excluyéndose una emzcla de diferentes EPO conjugadas con mono-PEG.

2. La EPO conjugada con mono-PEG de la reivindicación 1 siendo el PEG, PEG lineal.

3. Una composición de EPO conjugada con mono-PEG que comprende la EPO conjugada con mono-PEG con arreglo a la reivindicación 1 ó 2.

4. Una formulación de eritropoyetina de acción sostenida, que comprende la composición de EPO conjugada con PEG con arreglo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como ingrediente activo.

Figura 1



M E 1 2 R

SDS-PAGE de EPOs conjugadas con PEG en gel gradiente 4-25% SDS-PAGE

M: MW marcador (53, 76, 116, 170, 212 (kDa))

E: EPO

1: mono-mPEG-EPO

2: di-mPEG-EPO

R: mezcla de reaccion de EPOs conjugadas con PEG

Figura 2

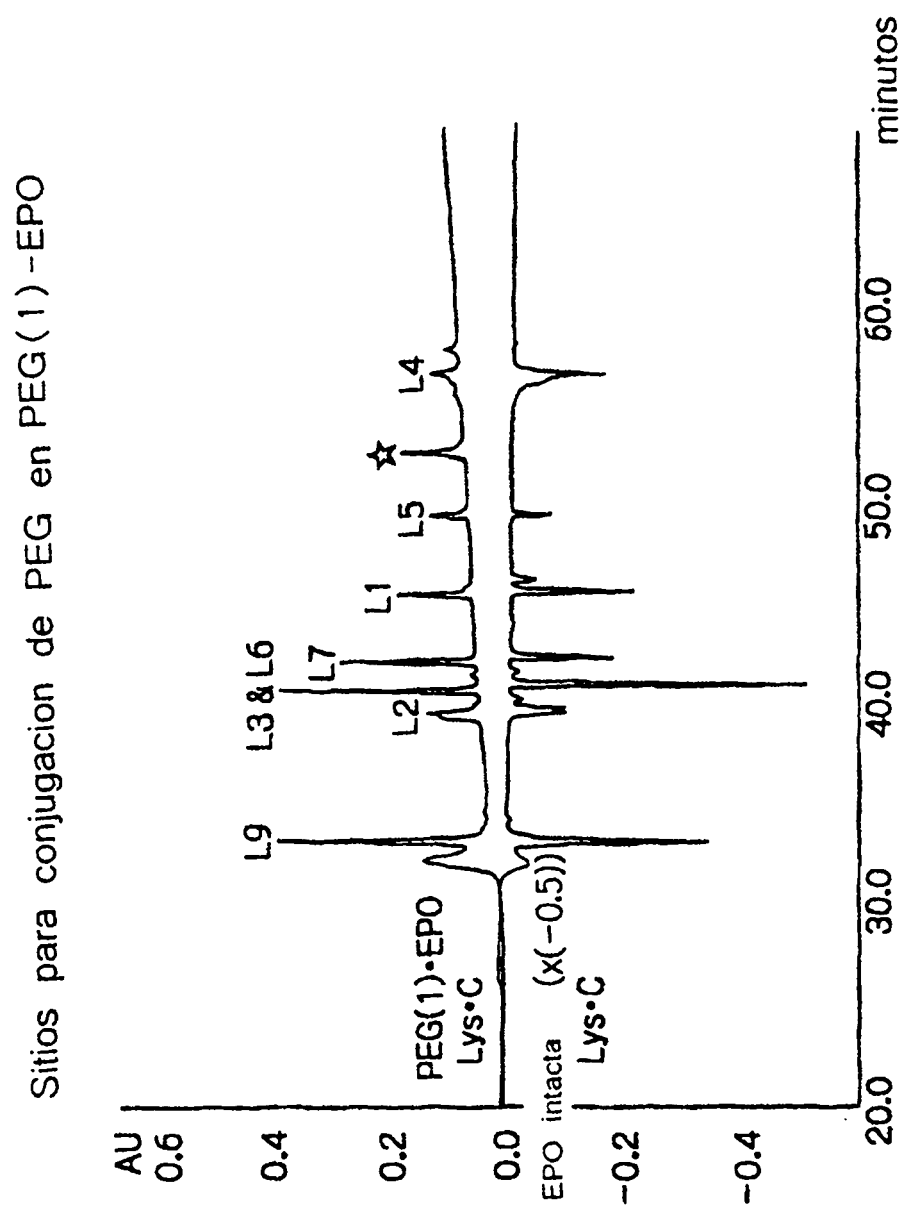


Figura 3

Actividad de crecimiento celular de PEG-EPOs
en células BaF/EpoR

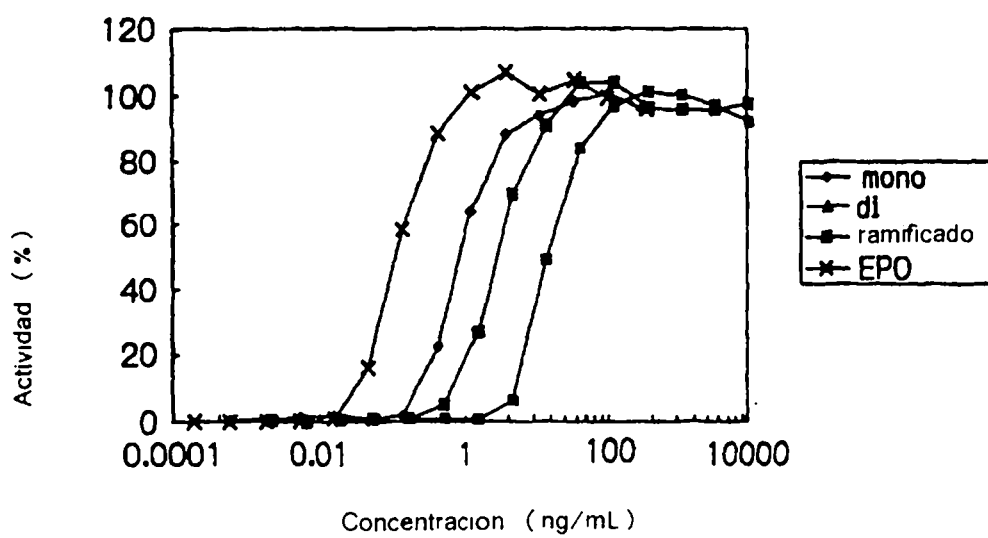


Figura 4

Curso de tiempo de recuentos de reticulocitos perifericos

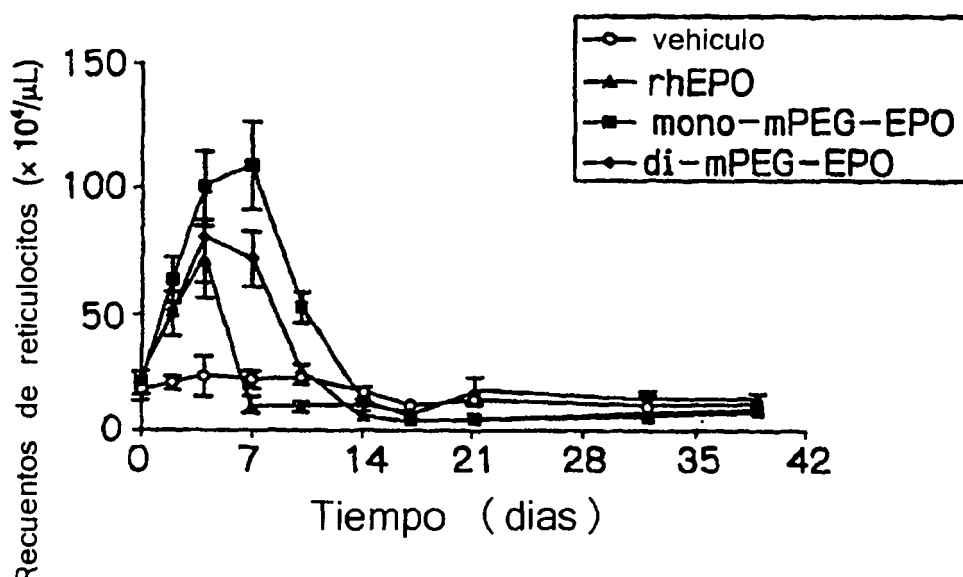


Figura 5

Curso de tiempo de niveles de hemoglobina

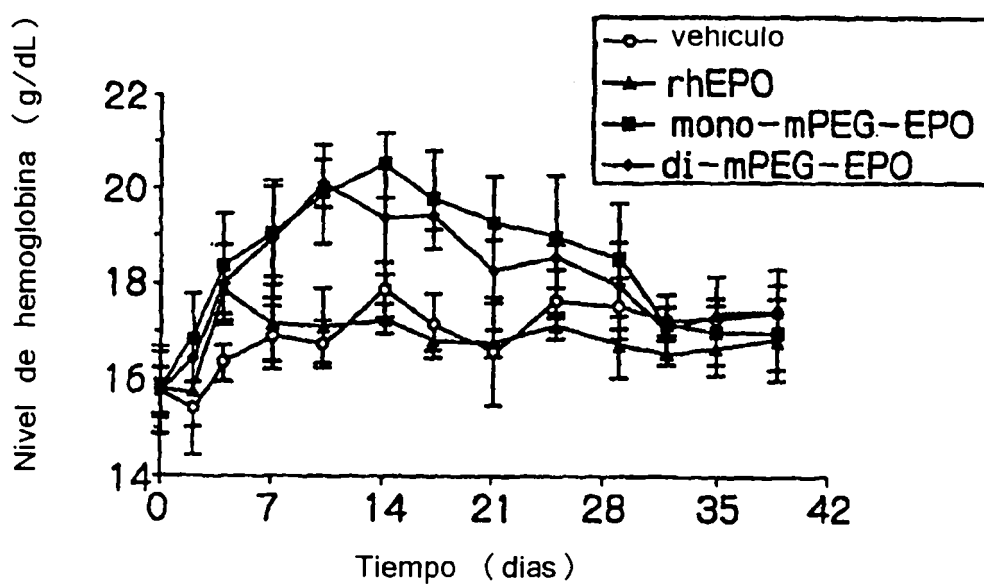


Figura 6 Curso de tiempo de recuento de reticulocitos perifericos

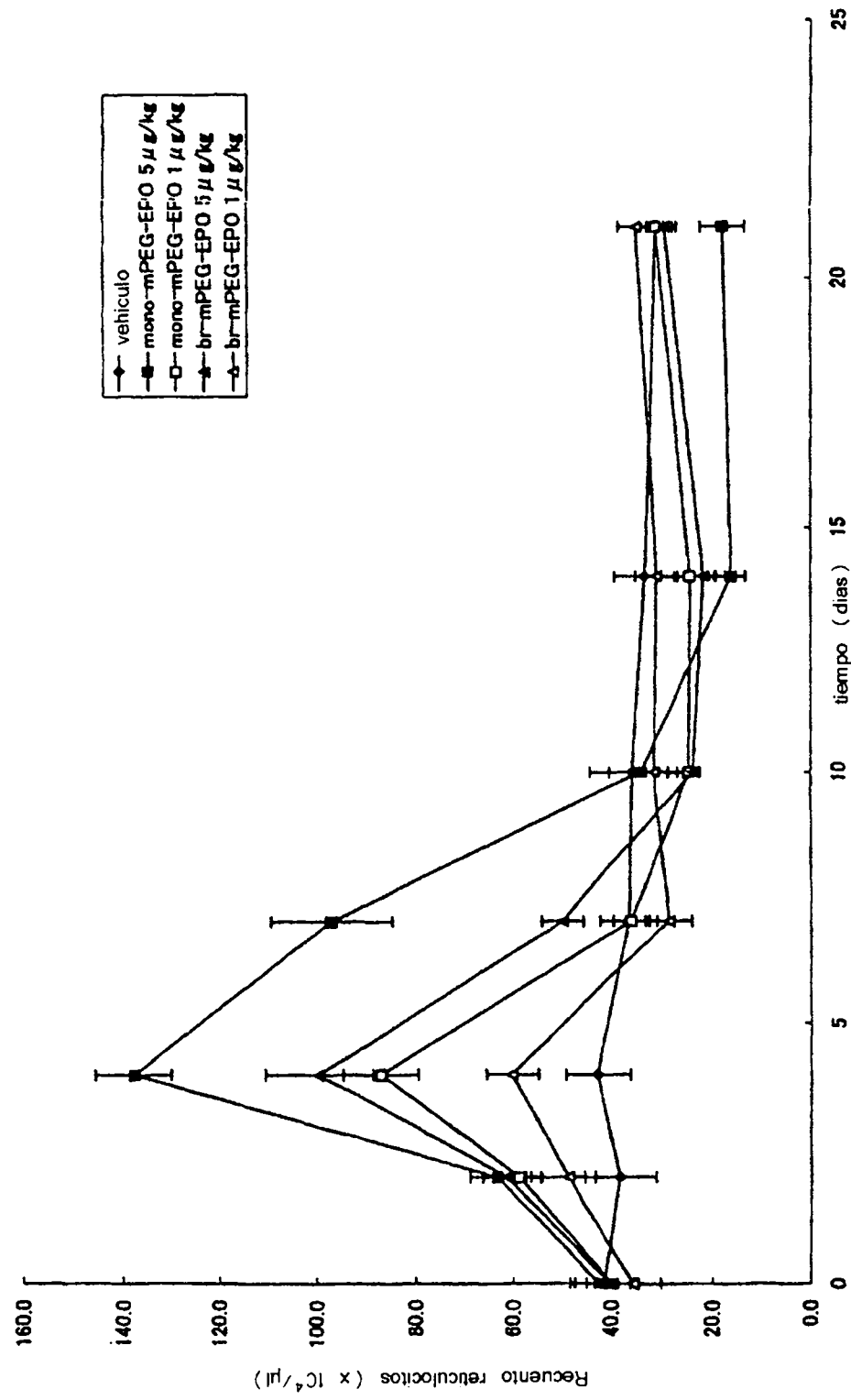


Figura 7

Curso de tiempo de niveles de

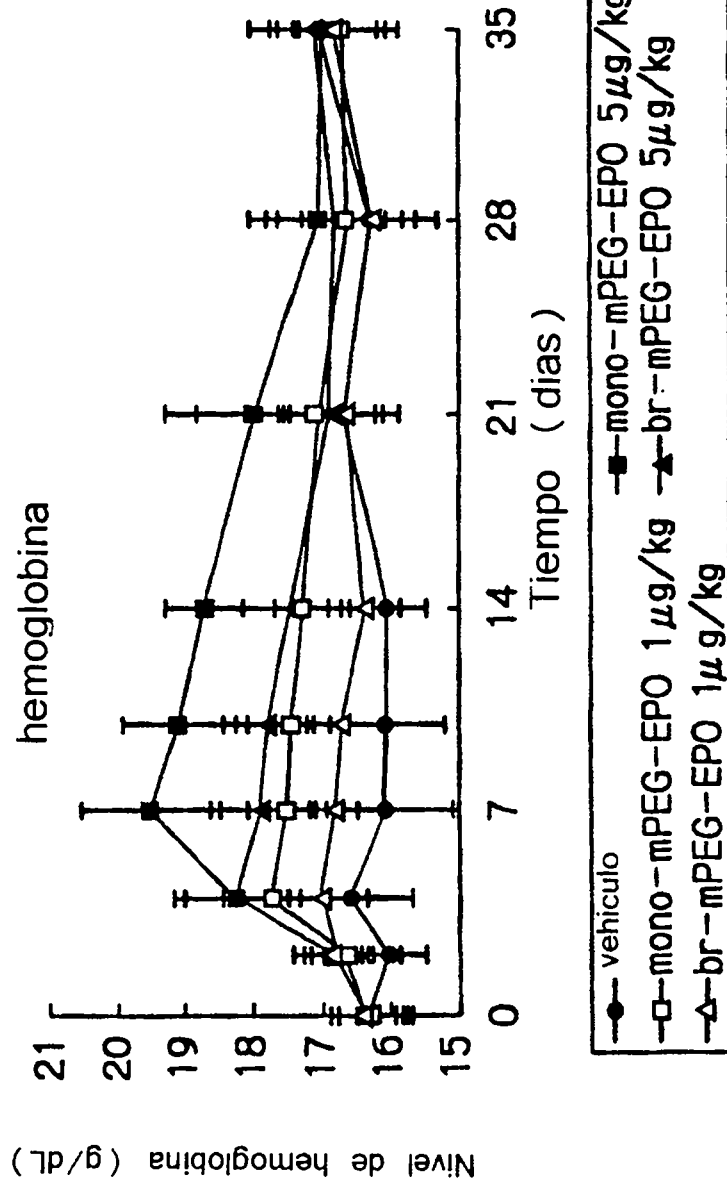


Figura 8

Dependencia de dosis de PEG(1)-EPO y EPO

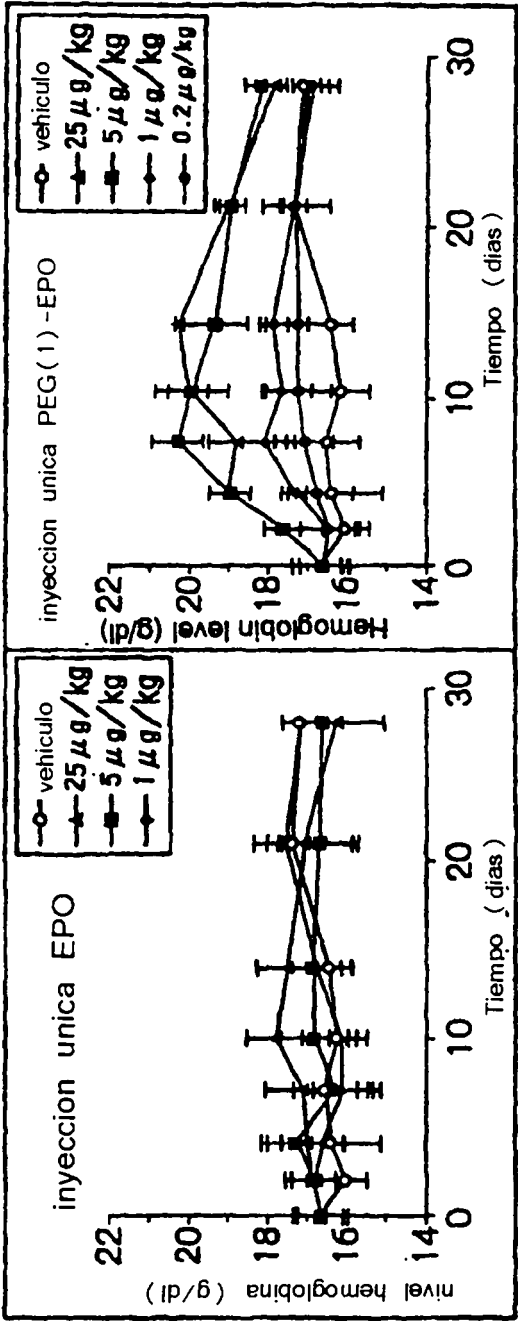
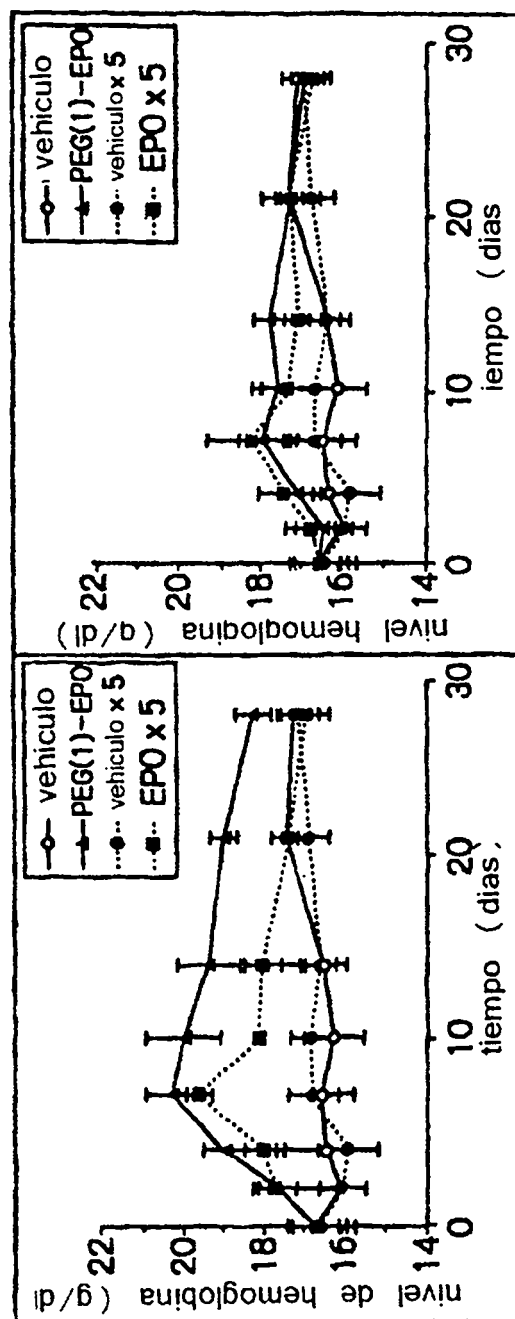


Figura 9

Comparacion entre inyeccion unica de PEG(1)-EPO
e inyeccion continua de EPO durante 5 dias



PEG(1)-EPO 5 $\mu\text{g/kg}$
EPO 1 $\mu\text{g/kg} \times 5$

PEG(1)-EPO 1 $\mu\text{g/kg}$
EPO 0.2 $\mu\text{g/kg} \times 5$

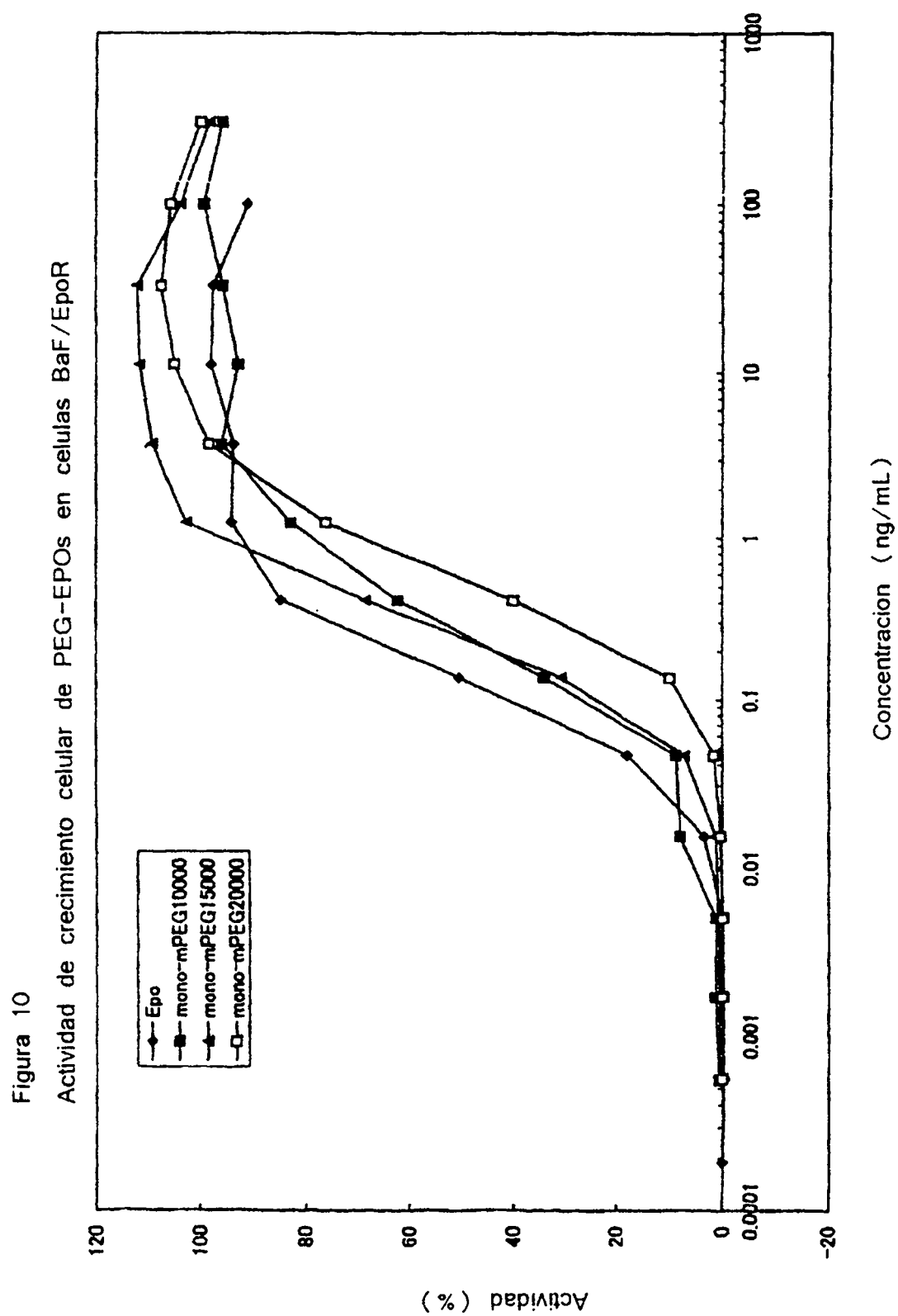


Figura 11 Actividad del crecimiento celular de PEG-EPOs en células BaF/EpoR

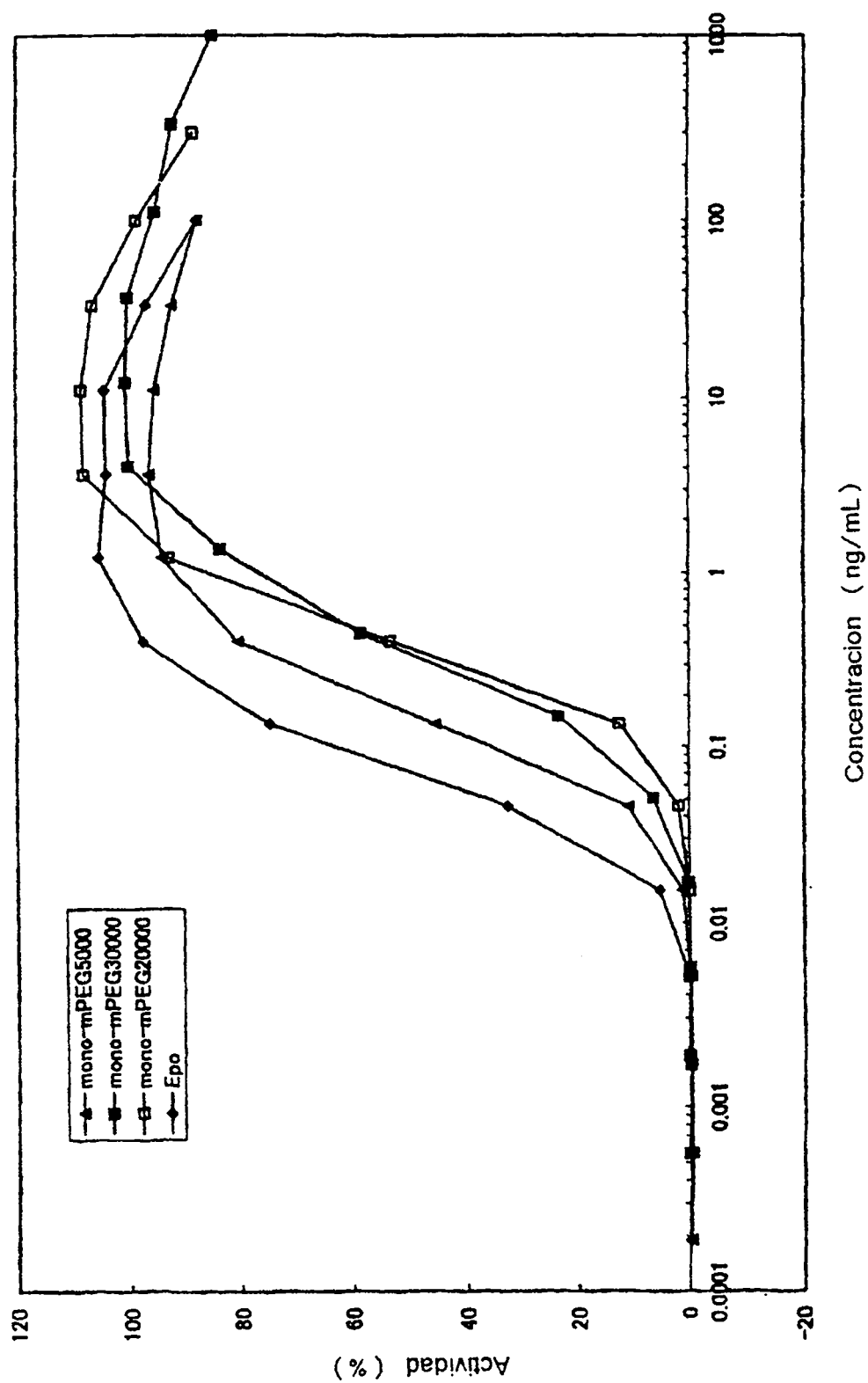


Figura 12 Curso de tiempo de recuento de reticulocitos

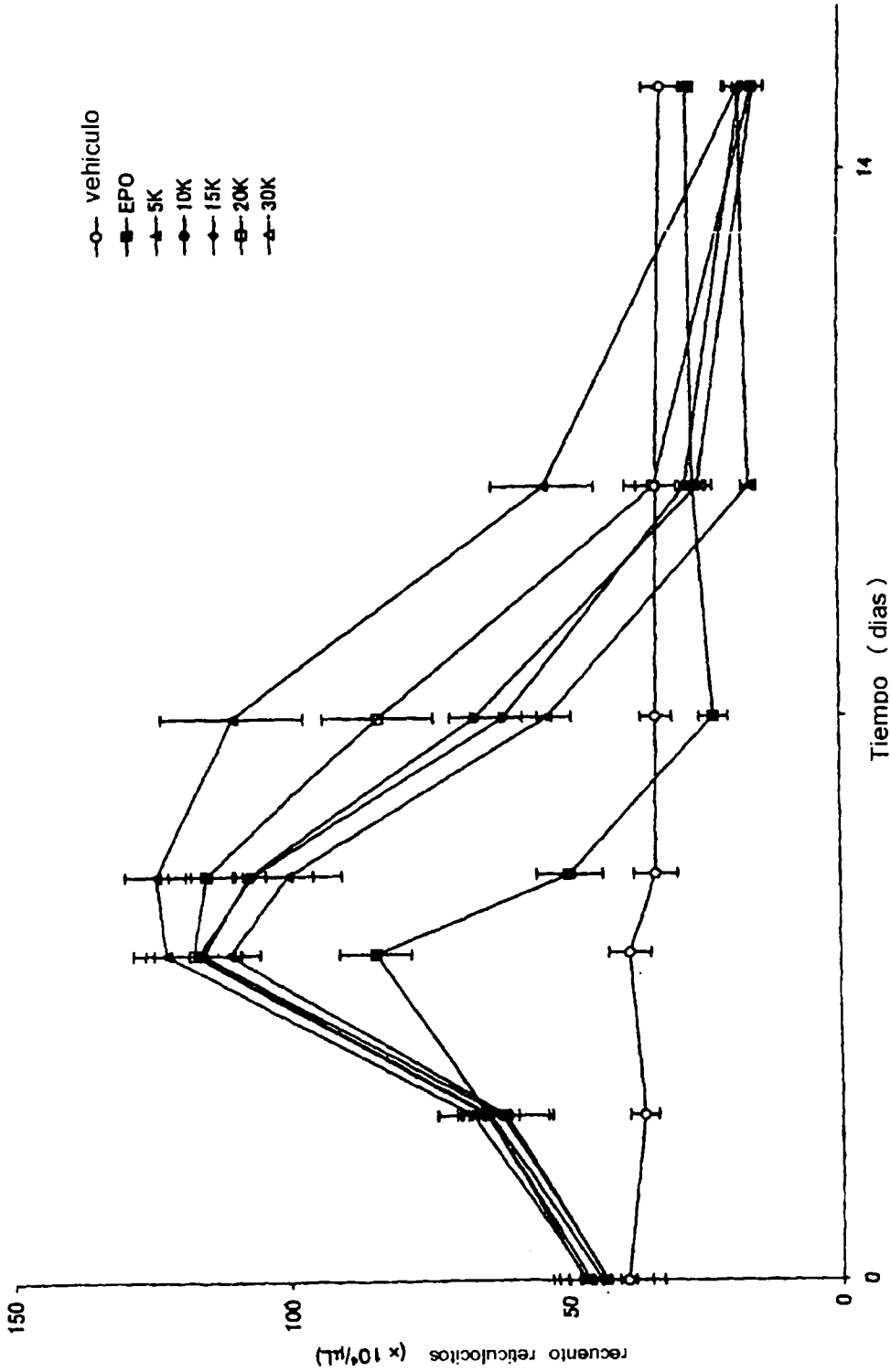


Figura 13 Curso de tiempo de niveles de hemoglobina

