



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 298**

51 Int. Cl.:
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04720540 .6**
96 Fecha de presentación : **13.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1601698**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Polipéptido conjugado fisiológicamente activo que posee una vida media *in vivo* prolongada.**

30 Prioridad: **13.03.2003 KR 10-2003-0015744**
05.06.2003 KR 10-2003-0036408

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.08.2009

73 Titular/es: **Hanmi Pharm. Co., Ltd.**
893-5 Hajeo-Ri, Paltan-Myeon
Hwaseong-gun, Kyungki-do 445-910, KR

72 Inventor/es: **Kim, Young-Min;**
Kim, Dae-Jin;
Bae, Sung-Min;
Lim, Chang-Ki;
Kwon, Se-Chang y
Lee, Gwan-Sun

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 324 298 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

Polipéptido conjugado fisiológicamente activo que posee una vida media *in vivo* prolongada.

5 Sector técnico al que pertenece la invención

La presente invención hace referencia a una proteína de acción prolongada que posee una vida media *in vivo* prolongada y a una preparación de la misma.

10 Antecedentes de la invención

Los polipéptidos son susceptibles a la desnaturalización o degradación enzimática en sangre, hígado o riñón. Dada la baja estabilidad de los polipéptidos, en la administración de fármacos polipeptídicos a pacientes ha sido necesaria la utilización de una frecuencia sostenida de administración para mantener una concentración plasmática efectiva de la sustancia activa. Además, dado que los fármacos polipeptídicos se administran habitualmente mediante infusión, las inyecciones frecuentes de fármacos polipeptídicos provocan molestias considerables a los pacientes. Por ello, se han realizado diversos estudios para desarrollar un fármaco polipeptídico que posea una vida media circulante en sangre más prolongada, manteniendo una eficacia farmacológica elevada del mismo. Dichos fármacos polipeptídicos deseables deben también cumplir los requisitos de estabilidad aumentada en suero, actividad elevada, aplicabilidad a diversos polipéptidos y baja probabilidad de inducir una respuesta inmune no deseada al ser inyectados en un paciente.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados para mejorar la estabilidad de las proteínas es la modificación química de un polipéptido con macromoléculas de solubilidad elevada tales como el polietilenglicol ("PEG"), el cual evita que los polipéptidos entren en contacto con proteasas. También es bien conocido que, cuando se une a fármacos polipeptídicos de forma específica o no específica, el PEG aumenta la solubilidad del fármaco polipeptídico y evita la hidrólisis del mismo, incrementando de este modo la estabilidad en suero del fármaco polipeptídico sin provocar respuesta inmune alguna debido a su baja antigenicidad (Sada y otros, *J. Fermentation Bioengineering*, 1991, 71: 137-139). Sin embargo, dichos polipéptidos pegilados poseen la desventaja de disminuir tanto la actividad como el rendimiento productivo de sustancia activa a medida que aumenta el peso molecular del PEG. En la patente U.S. nº 5.738.846 y en la Publicación de patente internacional nº WO92/16221, se dan a conocer, respectivamente, un interferón conjugado a dos PEG activados y un separador de PEG que está unido a dos polipéptidos que poseen actividades diferentes; sin embargo, no muestran ningún efecto distintivo en términos de actividad prolongada de los polipéptidos fisiológicamente activos *in vivo*.

También se ha dado a conocer que puede prolongarse la vida media circulante de un factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") humano recombinante uniéndolo covalentemente a albúmina mediante un PEG heterobifuncional (Kinstler y otros, *Pharmaceutical Research*, 1995, 12(12): 1883-1888). Sin embargo, la estabilidad del G-CSF-PEG-albúmina modificado es solamente 4 veces superior a la del G-CSF auténtico y, por ello, todavía no se ha introducido en la práctica.

En otro enfoque para incrementar la estabilidad *in vivo* de polipéptidos fisiológicamente activos, se produce un polipéptido activo fusionado con una proteína estable en un transformante utilizando técnicas recombinantes. Por ejemplo, se sabe que la albúmina es una de las proteínas más efectivas para incrementar la estabilidad de polipéptidos fusionados a la misma y se han dado a conocer diversas proteínas fusionadas de este tipo (Publicaciones de patente internacional números WO93/15199 y WO93/15200, y Publicación de patente europea nº 413.622). Sin embargo, una proteína de fusión unida a la albúmina todavía presenta el problema de una actividad reducida.

La Patente U.S nº 5.045.312 da a conocer un método para conjugar hormona de crecimiento con albúmina sérica bovina o inmunoglobulina de ratón utilizando un agente reticulante tal como carbodiimida, glutaraldehído, ácido clorhídrico etc., para incrementar la actividad de la hormona de crecimiento. Sin embargo, este método está dirigido exclusivamente a incrementar la actividad de una hormona de crecimiento diana. Además, la utilización de compuestos químicos tales como la carbodiimida, glutaraldehído, ácido clorhídrico etc. como agentes reticulantes es desventajosa debido a su potencial toxicidad e inespecificidad de reacción.

Se ha dado a conocer que las inmunoglobulinas son capaces de actuar como anticuerpos mostrando citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), y que las cadenas de azúcares juegan un papel importante en la ADCC y la CDC (Burton D., *Molec. Immun.* 22, 161-206, 1985). A pesar de la ausencia de cadenas de azúcares, las inmunoglobulinas aglicosiladas poseen una vida media similar a la de las inmunoglobulinas glicosiladas, sin embargo, su afinidad para un complemento o receptor disminuye entre 10 y 1000 veces debido a la deglicosilación (Waldmann H., *Eur. J. Immunol.* 23, 403-411, 1993; Morrison S., *J. Immunol.* 143, 2595-2601, 1989).

Aunque ha habido diversos intentos de combinar un polipéptido fisiológicamente activo con diversas macromoléculas, todos han fracasado en cuanto a aumentar simultáneamente la estabilidad y la actividad.

Como método mejorado para incrementar la estabilidad de un polipéptido activo manteniendo simultáneamente la actividad *in vivo* del mismo, la presente invención da a conocer un conjugado de proteína que comprende un polipéptido fisiológicamente activo, polietilenglicol e inmunoglobulina, los cuales se entrelazan covalentemente entre sí.

Características de la invención

Por consiguiente, un objetivo principal de la presente invención es dar a conocer un conjugado de proteína que posee una vida media *in vivo* prolongada, de un polipéptido fisiológicamente activo, sin inducir respuesta inmune en un paciente, a la vez que se minimiza la reducción de la actividad del polipéptido.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un método para preparar un conjugado de proteína que comprende un polipéptido fisiológicamente activo, un polietilenglicol y una inmunoglobulina, los cuales se entrelazan covalentemente.

Un objetivo adicional de la presente invención es dar a conocer una composición farmacéutica que comprende dichos polipéptidos fisiológicamente activos que poseen una vida media *in vivo* prolongada.

Otro objetivo adicional de la presente invención es dar a conocer un método para aumentar la estabilidad *in vivo* y prolongar la vida media circulante de un polipéptido fisiológicamente activo, sin sacrificar la actividad del mismo.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetivos y características de la presente invención serán más evidentes a partir de la descripción siguiente de la presente invención, en conjunción con los dibujos acompañantes, que muestran respectivamente:

Figura 1: Cromatograma de conjugados hGH-PEG-IgG;

Figura 2: Resultados de la SDS-PAGE (“electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato sódico)”) de los conjugados hGH-PEG-IgG;

Figura 3: Resultados de la SDS-PAGE de los conjugados Interferón-PEG-IgG;

Figura 4: Resultados de la SDS-PAGE de los conjugados hGH-PEG-IgG antes y después del tratamiento con DDT;

Figura 5: Cromatograma HPLC (“cromatografía líquida de alta eficacia”) de fase inversa de un conjugado IFN α -PEG-IgG;

Figura 6: Espectro de masas de conjugados hGH-PEG-IgG;

Figura 7: Gráfico farmacocinético que muestra que los conjugados hGH-PEG-IgG poseen estabilidades en suero superiores al complejo PEG-hGH;

Figura 8: Gráfico farmacocinético que muestra que los conjugados eritropoyetina-PEG-IgG poseen una vida media circulante aumentada en comparación con la eritropoyetina libre o la eritropoyetina estabilizada mediante hiper-glicosilación;

Figura 9: Espectro de masas de la IgG aglicosilada (AG IgG);

Figura 10: Gráfico farmacocinético que muestra que el conjugado IFN α -PEG-AG IgG posee una estabilidad en sangre aumentada en comparación con el IFN α natural y mantiene su actividad a pesar de la ausencia de la cadena de azúcar;

Figura 11: Gráfico farmacocinético que muestra que el conjugado EPO-PEG-AG IgG posee una estabilidad en sangre aumentada en comparación con la EPO natural o de tipo salvaje y mantiene su actividad a pesar de la ausencia de la cadena de azúcar;

Figura 12: Gráfico farmacocinético que muestra que los conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG y Fab'-N-PEG-N-IgG poseen una vida media circulante aumentada en comparación con el Fab' natural y el complejo Fab'-S-PEG40K;

Figura 13: Gráfico que muestra las actividades *in vivo* de Fab', del complejo Fab'-S-PEG 40K, del conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG y del conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG;

Figura 14: Actividad *in vivo* de los conjugados hGH-PEG-IgG basada en el cambio de peso dependiente del tiempo de ratas tras la inyección de vehículo solo (30 μ g/día; grupo 1), hGH natural (30 μ g/día; grupo 2), hGH-PEG (30 μ g/día; grupo 3), conjugado hGH-PEG-IgG (30 μ g/día; grupo 4), y conjugado hGH-PEG-IgG (10 μ g/día; grupo 5);

Figura 15: Actividad *in vivo* de los conjugados G-CSF-PEG-IgG basada en el cambio dependiente del tiempo en el número de neutrófilos: no tratamiento (grupo 1), inyección de vehículo solo (grupo 2), G-CSF natural (grupo 3), PEG 20kDa-G-CSF (grupo 4) y tratamiento con conjugado ¹⁷S-G-CSF-PEG-IgG (grupo 5); y

Figura 16: Actividad *in vivo* de los conjugados EPO-PEG-IgG, basada en el cambio dependiente del tiempo, en el valor de hematocrito: inyección de disolvente solo (grupo 1), EPO natural (grupo 2), EPO altamente glicosilada (grupo 3) y tratamiento con conjugado EPO-PEG-IgG (grupo 4).

5 Descripción detallada de la presente invención

El término “polipéptido fisiológicamente activo” tal como se utiliza en la presente invención hace referencia a cualquier polipéptido o proteína que posee una actividad biológica útil cuando se administra a un mamífero incluyendo el hombre, siendo intercambiable con el término “proteína activa fisiológicamente”, “proteína activa”, “polipéptido activo” o “fármaco peptídico”.

El término “conjugado de proteína” o “conjugado” hace referencia a un compuesto que comprende un polipéptido fisiológicamente activo, un polímero no peptídico y una inmunoglobulina los cuales están entrelazados covalentemente entre sí de acuerdo con la presente invención.

El término “complejo”, a diferencia del término “conjugado”, se utiliza en la presente invención para referirse a aquellos compuestos que comprenden solo dos componentes seleccionados entre polipéptido fisiológicamente activo, inmunoglobulina y polímero no peptídico.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se da a conocer un conjugado de proteína que comprende i) un polipéptido fisiológicamente activo, ii) un polietilenglicol, y iii) una inmunoglobulina, los cuales se enlazan covalentemente entre sí, y que posee una vida media *in vivo* prolongada del polipéptido fisiológicamente activo.

Por ejemplo, el conjugado de proteína de la presente invención puede comprender al menos una unidad estructural de [polipéptido activo/polietilenglicol/inmunoglobulina], en la cual todos los componentes están entrelazados covalentemente entre sí de forma lineal. El polietilenglicol puede poseer dos grupos reactivos en ambos extremos, a través de los cuales el polímero se enlaza covalentemente al polipéptido fisiológicamente activo y a la inmunoglobulina, respectivamente. En una realización preferente, pueden enlazarse covalentemente dos complejos del polipéptido fisiológicamente activo y polietilenglicol a una inmunoglobulina.

La relación molar entre polipéptido fisiológicamente activo e inmunoglobulina puede oscilar entre 1:1 y 10:1, preferentemente entre 1:1 y 4:1.

Como polietilenglicol puede utilizarse un solo tipo de polímero así como una combinación de diferentes tipos de polímeros.

En el conjugado de proteína de la presente invención, los lugares de unión adecuados de la inmunoglobulina pueden incluir un grupo funcional libre de un residuo de aminoácido en la región variable o la región constante de la inmunoglobulina. Los lugares adecuados de la inmunoglobulina para la unión covalente con el polietilenglicol o el polipéptido activo pueden incluir un grupo aminoterminal dentro de la región variable, grupo amino de un residuo lisina o de un residuo histidina, y un grupo SH libre de cisteína, y el lugar adecuado del polietilenglicol es un grupo reactivo terminal.

La inmunoglobulina puede ser seleccionada del grupo formado por IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, una combinación de las mismas y todos los subtipos de IgG tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Para no inducir respuesta inmune en un paciente, la inmunoglobulina es preferentemente una inmunoglobulina humana.

Como componente que constituye el conjugado de proteína de la presente invención, la inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina natural aislada a partir de la sangre o una inmunoglobulina recombinante preparada mediante ingeniería genética. También puede utilizarse en la presente invención cualquier inmunoglobulina modificada con sustitución, delección o adición de residuos de aminoácido en diversos lugares de la misma, así como cualquier derivado hiperglicosilado, hipoglicosilado o aglicosilado de la misma, en tanto en cuanto dicha inmunoglobulina o derivado sea substancialmente equivalente a una inmunoglobulina natural en términos de función, estructura y estabilidad de la misma. El incremento o disminución del grado de glicosilación o deglicosilación puede realizarse mediante cualquiera de los métodos convencionales tales como métodos químicos, enzimáticos o biotecnológicos. Los residuos de aminoácido números 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 y 327 a 331 de una inmunoglobulina G, que son conocidos como lugares importantes para la unión, pueden utilizarse como lugares adecuados para la modificación.

Un polietilenglicol adecuado posee un grupo reactivo seleccionado del grupo formado por derivados aldehído, aldehído propiónico, butil aldehído, maleimida y succinimida. El derivado succinimida puede seleccionarse del grupo formado por succinimidil propionato, succinimidil carboximetilo, hidroxisuccinimidilo y succinimidil carbonato. Un polietilenglicol que posea grupos aldehído en ambos extremos es efectivo para minimizar la unión no específica, de tal modo que se une el polietilenglicol con un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina en cada uno de los extremos del polímero, respectivamente. Un conjugado de proteína producido mediante la alquilación reductiva de un grupo aldehído es más estable que el unido a través de un enlace amida.

Los grupos reactivos en ambos extremos del polietilenglicol pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Por ejemplo, un polietilenglicol puede poseer un grupo maleimida en un extremo y un grupo maleimida, un grupo aldehído o un

grupo aldehído propiónico en el otro extremo. Para preparar el conjugado de proteína de la presente invención pueden utilizarse productos disponibles comercialmente o pueden convertirse adicionalmente los grupos hidroxilo terminales del PEG comercial a otros grupos reactivos antes de la reacción de enlace.

5 El polietilenglicol puede servir como separador que enlaza covalentemente terminal amino, el residuo lisina, residuo histidina o residuo cisteína respectivamente de la inmunoglobulina y uno de los grupos reactivos del polipéptido fisiológicamente activo.

10 Agentes reticulantes previamente dados a conocer para combinar dos polipéptidos mediante clonación genética, tales como los oligopéptidos, incrementan la posibilidad de una respuesta inmune no deseada y limitan el lugar de unión al extremo N-terminal o C-terminal de los polipéptidos. Por tanto, una ventaja de la utilización de un polietilenglicol sobre los oligopéptidos reside en la reducción de la toxicidad y la inmunogenicidad. Otra ventaja es su amplia aplicabilidad debida a la diversidad de lugares de unión.

15 Cuando se utilizan como agente reticulante, compuestos químicos pequeños tales como la carbodiimida y el glutaraldehído pueden dar lugar a la desnaturalización de los polipéptidos unidos a través de ellos, o pueden obstruir una unión y purificación controladas del compuesto resultante. Contrariamente a dichos compuestos químicos, el conjugado de proteína de la presente invención, que comprende un polietilenglicol, es ventajoso en términos de facilidad de control de la unión, purificación de los conjugados resultantes y minimización de la reacción de enlace inespecífica.

20 El conjugado de proteína de la presente invención muestra una vida media *in vivo* prolongada y una actividad marcablemente superior a la de un complejo polipéptido-PEG o un conjugado polipéptido-PEG-albúmina. De acuerdo con el análisis farmacocinético, la vida media de un conjugado hGH-PEG-IgG de la presente invención fue aproximadamente trece veces superior a la de la hGH natural, mientras que el complejo hGH-PEG y el conjugado hGH-PEG-albúmina muestran vidas medias siete y cinco veces superiores a la proteína natural, respectivamente (ver Ejemplo de prueba 2, Tabla 3). Se obtuvieron resultados similares en pruebas utilizando G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, interferones o EPO en lugar de hGH. En comparación con complejos polipeptídicos activos modificados sólo con PEG o con complejos PEG-albúmina, el conjugado de proteína de la presente invención muestra un incremento considerable tanto en el tiempo medio de retención ("MRT") como en la vida media sérica, los cuales multiplican por un factor de 2~70 a los de los complejos convencionales (ver Ejemplo de prueba 2, Tablas 4 a 7). Además, los conjugados Fab'-PEG-IgG de la presente invención, es decir los conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG y Fab'-N-PEG-N-IgG en los que se enlaza un complejo IgG-PEG a un grupo-SH adyacente al extremo C-terminal de Fab' o al extremo N-terminal de Fab', respectivamente, muestran vidas medias de dos a tres veces superiores a la del complejo Fab'-S-PEG 40K (ver Ejemplo de prueba 3 y Figura 12).

35 Además, los conjugados de proteínas preparados empleando una inmunoglobulina aglicosilada muestran vidas medias en sangre y actividades *in vitro* similares a las de los conjugados de proteínas correspondientes que comprenden inmunoglobulinas glicosiladas (ver Tablas 4, 7 y 9 y Figuras 10 y 11).

40 Los resultados de los análisis farmacocinéticos muestran que los conjugados de proteínas de la presente invención aplicados a diversos polipéptidos incluyendo hGH, interferón, EPO, G-CSF o su derivado, y un fragmento de antígeno muestran unas características de comportamiento excelentes en términos de vida media en sangre y MRT y, por tanto, pueden utilizarse ventajosamente en la preparación de una formulación de fármaco polipeptídico que posee una vida media *in vivo* prolongada.

45 Además, de acuerdo con los pruebas *in vivo* utilizando modelos animales, el conjugado hGH-PEG-IgG de la presente invención muestra una excelente actividad *in vivo*. Específicamente, el efecto generado administrando el conjugado hGH-PEG-IgG una vez cada 6 días en una cantidad correspondiente a una tercera parte de la dosis de péptido natural es igual o mejor que la administración diaria del péptido natural, lo cual significa que la actividad *in vivo* del conjugado hGH-PEG-IgG es más de 3 veces superior a la del péptido natural (ver Figura 14).

50 El conjugado derivado de ¹⁷S-G-CSF-PEG-IgG de la presente invención muestra una actividad *in vivo* 3 veces superior a la del complejo G-CSF-PEG 20kDa, y, cuando se administra una vez cada 5 días, genera un efecto 2 veces superior en la recuperación de neutrófilos que la misma cantidad de G-CSF natural administrado diariamente (figura 15). Además, el conjugado EPO-PEG-IgG de la presente invención induce un incremento mayor y más rápido del nivel de hematocrito que la EPO natural y la EPO altamente glicosilada, y mantiene dicha actividad *in vivo* elevada durante un largo período de tiempo (Figura 16).

60 Estos resultados muestran que el conjugado de proteína de la presente invención incrementa significativamente la vida media en sangre y la actividad *in vivo* de un polipéptido fisiológicamente activo a la vez que supera el problema de los péptidos naturales que requieren una administración frecuente.

65 Como clases, a título de ejemplo, de polipéptidos fisiológicamente activos se incluyen los siguientes polipéptidos, mutéinas y otros análogos de los mismos: hormona, citoquina, enzima, anticuerpo, factor de crecimiento, factor regulador de la transcripción, factor sanguíneo, vacuna, proteína estructural, proteína ligando y receptor.

Como ejemplos específicos de polipéptidos fisiológicamente activos adecuados para preparar el conjugado de proteína de la presente invención se incluyen hormona de crecimiento humana, hormona liberadora de hormona de

ES 2 324 298 T3

crecimiento, péptido liberador de hormona de crecimiento, interferones (por ejemplo interferones α , β , y γ), factor estimulador de colonias, interleuquinas (por ejemplo interleuquina-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29 y -30), glucocerebrosidasa, factor activador de macrófagos, péptido macrofágico, factor celular B, factor celular T, proteína A, factor supresor de alergia, glicoproteína de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, factor inhibidor tumoral, factor transformador del crecimiento, alfa-1 antitripsina, albúmina, apolipoproteína E, eritropoyetina, eritropoyetina hiperglicosilada, factor VII, factor VIII, factor IX, activador del plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de la renina, inhibidor de la colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento osteogénico, proteína estimuladora de la osteogénesis, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, proteína activadora del tejido conectivo, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, hormona liberadora de FSH, factor de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento insulinoide, hormona adrenocorticotrófica, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimuladora de la tiroides (tirotropina), receptor (por ejemplo TNFR(P75) y TNFR (P55)), antagonista de receptor (por ejemplo IL1-Ra), antígeno de superficie celular (por ejemplo CD2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45 y 69), anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, fragmento de anticuerpo y antígeno de vacuna derivada de virus.

El fragmento de anticuerpo hace referencia a un fragmento de un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno específico, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y scFv, de los cuales es preferente Fab'. El fragmento Fab está formado por el dominio variable y el primer dominio constante (dominio C_H1) de las cadenas corta y larga de un anticuerpo; el fragmento Fab' es un fragmento Fab más varios residuos de aminoácido que contienen uno o más residuos cisteína a partir de la región bisagra, unidos al extremo C del dominio C_H1; el fragmento F(ab')₂, son dos fragmentos Fab' unidos entre sí mediante un puente disulfuro o por una reacción química; y el fragmento Fd es la región variable y el primer dominio constante (C_H1) de una cadena larga. El fragmento scFv es una cadena polipeptídica simple formada por las regiones variables de una cadena larga y una cadena corta unidas entre sí mediante un enlazador peptídico.

Un polipéptido particularmente preferente es uno seleccionado del grupo formado por hormona de crecimiento humana, interferones (por ejemplo interferón α , β y γ), factor estimulador de colonias de granulocitos y eritropoyetina dado que estos polipéptidos requieren una administración más frecuente que otros para tratar o prevenir enfermedades relevantes.

El listado de polipéptidos fisiológicamente activos, a los cuales puede aplicarse la presente invención, no se limita a los citados en los párrafos anteriores sino que incluye cualquier muteína o derivado de los mismos en tanto en cuanto pueda reconocerse la función, estructura, actividad y estabilidad de la muteína o derivado como equivalente o superior a la de los polipéptidos naturales.

Otro aspecto de la presente invención es dar a conocer un método para preparar dicho conjugado de proteína, el cual comprende las etapas de:

(a) unir covalentemente al menos un polipéptido fisiológicamente activo a al menos una inmunoglobulina con al menos un polietilenglicol que posee grupos reactivos en ambos extremos; y

(b) aislar un conjugado de proteína que comprende esencialmente el polipéptido fisiológicamente activo, la inmunoglobulina y el polietilenglicol, que están entrelazados covalentemente.

En la etapa (a) del método anterior, los polipéptidos, inmunoglobulinas y polietilenglicoles puede unirse covalentemente mediante una reacción en dos etapas o mediante una reacción simultánea. La reacción en dos etapas (por ejemplo se une covalentemente un polietilenglicol a un polipéptido activo o a una inmunoglobulina y, a continuación, el complejo resultante se une covalentemente a un polipéptido activo o a una inmunoglobulina dando lugar a un conjugado de los mismos, en el cual el polipéptido activo y la inmunoglobulina está unidos entre sí a través del polietilenglicol) es ventajosa al reducir la producción de subproductos no deseados.

Por consiguiente, la etapa (a) del método anterior puede comprender:

(a1) unir covalentemente un extremo del polietilenglicol con una inmunoglobulina o con un polipéptido fisiológicamente activo;

(a2) aislar de la mezcla de reacción un complejo que comprende el polietilenglicol unido con la inmunoglobulina o el polipéptido fisiológicamente activo; y

(a3) unir covalentemente el extremo libre del polietilenglicol del complejo con la inmunoglobulina o el polipéptido fisiológicamente activo, para producir un conjugado de proteína en el cual el polietilenglicol entrelaza covalentemente el polipéptido fisiológicamente activo y la inmunoglobulina.

La relación molar de polipéptido fisiológicamente activo respecto a polietilenglicol en la etapa (a1) puede oscilar preferentemente entre 1:2,5 y 1:5 y la relación molar de la inmunoglobulina respecto al polietilenglicol en la etapa (a1) preferentemente entre 1:5 y 1:10. La relación molar del complejo obtenido en la etapa (a2) respecto al polipéptido

fisiológicamente activo o la inmunoglobulina en la etapa (a3) puede oscilar entre 1:0,5 y 1:20, preferentemente entre 1:1 y 1:5.

Las etapas (a1) y (a3) pueden preferentemente realizarse en presencia de un agente reductor, que puede seleccionarse del grupo formado por cianoborohidruro de sodio, borohidruro de sodio, borato de dimetilamina y borato de piridina.

Los procedimientos para llevar a cabo las etapas (a2) y (b) pueden basarse en métodos convencionales utilizados para purificar proteínas, tales como cromatografía de exclusión dimensional, cromatografía de intercambio iónico, etc. y una combinación de los mismos, de acuerdo con el grado de pureza requerido y las propiedades del conjugado resultante incluyendo su peso molecular y carga eléctrica.

Aún otro aspecto de la presente invención es dar a conocer una composición farmacéutica de un polipéptido fisiológicamente activo que posee una vida media *in vivo* prolongada en comparación con los polipéptidos no modificados, la cual comprende el conjugado de proteína de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable (excipiente).

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por diferentes vías incluyendo la introducción oral, transdérmica, subcutánea, intravenosa e intramuscular, siendo más preferida la inyección. La composición de la presente invención puede formularse de manera que proporcione una liberación rápida, mantenida o retrasada del principio activo tras ser administrado a los pacientes, empleando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica. La formulación puede ser en forma de comprimido, píldora, polvo, sobre, elixir, suspensión, emulsión, solución, jarabe, aerosol, cápsula de gelatina blanda y dura, solución inyectable estéril, polvo envasado estéril y similares. Son ejemplos de vehículos, excipientes y disolventes adecuados: lactosa, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, alginatos, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, polivinilpirrolidona, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, agua, metilhidroxibenzoatos, propilhidroxibenzoatos, talco, estearato magnésico y aceite mineral. La formulación puede incluir adicionalmente, cargas, agentes antiaglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsificadores, conservantes y similares.

La cantidad de principio activo a administrar debe determinarse teniendo en cuenta varios factores relevantes incluyendo el trastorno a tratar, la vía de administración escogida, la edad, sexo y peso corporal del paciente en concreto, y la gravedad de los síntomas del paciente, y especialmente el tipo de principio activo. Debido a la estabilidad aumentada de un conjugado de proteína de la presente invención, el número total y la frecuencia de administración de la formulación de fármaco polipeptídico que comprende el conjugado de proteína pueden reducirse considerablemente.

La presente invención se define de forma adicional en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos Ejemplos, que ilustran las realizaciones preferentes de la presente invención, se proporcionan solamente a modo ilustrativo y no están pensados para limitar el ámbito de la invención.

Ejemplo 1

Preparación del conjugado I de hGH-PEG-IgG

Etapa 1

Preparación del complejo hGH-PEG

Se disolvió hormona de crecimiento humana (hGH, peso molecular 22 kDa) en solución de tampón fosfato 100 mM a una concentración de 5 mg/mL y se añadió a la solución tampón resultante polietilenglicol conteniendo grupos aldehído en ambos extremos (ALD-PEG-ALD, Shearwater Inc., EE.UU.) que posee un peso molecular de 3,4 kDa, en una cantidad correspondiente a una relación molar hGH:PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 o 1:20. Se añadió a la mezcla cianoborohidruro sódico (NaCNBH₃, Sigma) a una concentración final de 20 mM como agente reductor y se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 3 horas. Para separar el complejo hGH-PEG en el cual el PEG está selectivamente unido al residuo amino terminal de la hGH en una relación molar 1:1, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión dimensional Superdex^R (Pharmacia, EE.UU.). El complejo hGH-PEG se eluyó y purificó de la columna con tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 6,0) para eliminar contaminantes tales como hGH no modificada, PEG no reaccionado y subproductos diméricos que poseen dos moléculas de hGH unidas a ambos extremos del PEG. El complejo hGH-PEG purificado se concentró a 5 mg/mL. Se ha hallado que la relación molar de hGH:PEG óptima para obtener el mejor resultado se encuentra entre 1:2,5 y 1:5.

Etapa 2

Formación del conjugado entre complejo hGH-PEG e IgG

Se disolvió inmunoglobulina G (IgG, Green Cross, Corea) con un peso molecular de 150 kDa en solución tampón fosfato 100 mM. Para conjugar la IgG con el grupo aldehído del complejo hGH-PEG purificado en el Ejemplo 1, se añadió el complejo hGH-PEG a una solución tampón conteniendo IgG en una cantidad correspondiente a una relación molar complejo hGH-PEG:IgG de 1:1, 1:2, 1:4 o 1:8. Se añadió NaCNBH₃ a la mezcla a una concentración final de

ES 2 324 298 T3

20 mM como agente reductor, y se agitó suavemente la mezcla a 4°C durante 20 horas. Para purificar el conjugado hGH-PEG-IgG de contaminantes tras la reacción de conjugación, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna DEAE (Pharmacia, EE.UU.) equilibrada con solución tampón Tris 20 mM (pH 7,5). La fase móvil se cambió de Tampón A (tampón Tris 20 mM, pH 7,5) a Tampón B (tampón Tris 20 mM con NaCl 1,0 M, pH 7,5) con un gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl: 0 M → 0,5 M). Para eliminar cantidades pequeñas de IgG no reaccionada y hGH no modificada del conjugado hGH-PEG-IgG eluido, se sometió la solución de elución a cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna polyCAT (PolyLC, EE.UU.) equilibrada con acetato sódico 10 mM (pH 4,5). La fase móvil se cambió de Tampón A (acetato sódico 10 mM, pH 4,5) a Tampón B (acetato sódico 10 mM con NaCl 1,0 M, pH 7,5) de forma lineal (concentración de NaCl: 0 M → 0,5 M), lo cual dio lugar a la purificación del conjugado hGH-PEG-IgG (Figura 1).

Se ha hallado que la relación molar óptima complejo hGH-PEG:IgG para obtener el mejor resultado es 1:4.

15 Ejemplo 2

Preparación del conjugado II de hGH-PEG-IgG

Etapa 1

Preparación del complejo IgG-PEG

Se disolvió IgG (Green Cross, Corea) en tampón fosfato 100 mM a una concentración de 15 mg/mL y se añadió a la solución tampón resultante ALD-PEG-ALD 3,4 kDa (Shearwater Inc., EE.UU.) en una cantidad correspondiente a una relación molar IgG:PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 o 1:20. Se añadió a la mezcla NaCNBH₃ a una concentración final de 20 mM como agente reductor y se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 3 horas. Para separar el complejo IgG-PEG en el cual el PEG está selectivamente unido al residuo amino terminal de la IgG en una relación molar 1:1, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión dimensional Superdex^R (Pharmacia, EE.UU.). El complejo IgG-PEG se eluyó y purificó de la columna con tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 6,0) para eliminar contaminantes tales como IgG no modificada, PEG no reaccionado y subproductos diméricos que poseen dos moléculas de IgG unidas a ambos extremos del PEG. El complejo IgG-PEG purificado se concentró a 15 mg/mL. Se ha hallado que la relación molar IgG:PEG óptima para obtener el mejor resultado se encuentra entre 1:5 y 1:10.

Etapa 2

Formación del conjugado entre el complejo IgG-PEG y hGH

Para conjugar hGH (peso molecular 22 kDa) al complejo IgG-PEG purificado en el Ejemplo 2, se hizo reaccionar hGH disuelta en tampón fosfato 100 mM con el complejo IgG-PEG en una relación molar de 1:1, 1:1,5, 1:3 o 1:6. Se añadió a la mezcla NaCNBH₃ a una concentración final de 20 mM como agente reductor y se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 20 horas. La mezcla de reacción se sometió a purificación según el mismo método descrito en la etapa 2 del Ejemplo 1 para eliminar sustancias no reaccionadas y subproductos, y se purificó el conjugado IgG-PEG-hGH a partir de la misma.

45 Ejemplo 3

Preparación de conjugado IFN α -PEG-IgG

Se preparó y purificó un conjugado IFN α -PEG-IgG según el mismo método descrito en el ejemplo 1, a excepción de que se utilizó interferón alfa 2b (IFN α 2b, peso molecular 20 kDa) en lugar de hGH y que la relación molar IFN α 2b:ALD-PEG-ALD (peso molecular 3,4 kDa) fue de 1:5.

55 Ejemplo 4

Preparación de conjugado G-CSF-PEG-IgG humano

Se preparó y purificó un conjugado G-CSF-PEG-IgG según el mismo método descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que se utilizó factor estimulador de colonias de granulocitos humano (G-CSF, peso molecular 18,7 kDa) en lugar de hGH y que la relación molar G-CSF:ALD-PEG-ALD (peso molecular 3,4 kDa) fue de 1:5.

Además se preparó y purificó un conjugado derivado de G-CSF-PEG-IgG según el mismo método descrito anteriormente utilizando un derivado de G-CSF (¹⁷S-G-CSF) que se obtuvo sustituyendo el aminoácido n° 17 del G-CSF natural por serina.

Ejemplo 5

Preparación de conjugado EPO-PEG-IgG

- 5 Se preparó y purificó un conjugado EPO-PEG-IgG según el mismo método descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que se utilizó eritropoyetina humana (EPO, peso molecular 35 kDa) en lugar de hGH y que la relación molar EPO:ALD-PEG-ALD (peso molecular 3,4 kDa) fue de 1:5.

Ejemplo 6

10

Preparación de conjugado de proteína utilizando PEG con grupos funcionales diferentes

- Los conjugados hGH-PEG-IgG se prepararon del modo siguiente, utilizando un PEG con grupos funcionales diferentes a los grupos aldehído en ambos extremos del mismo. Se hicieron reaccionar 10 mg de hGH disuelta en tampón fosfato 100 mM con una PEG con grupos succinimidil propionato (SPA) en ambos extremos (SPA-PEG-SPA, Shearwater Inc, EE.UU., peso molecular 3,4 kDa) en una cantidad correspondiente a una relación molar hGH:PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 o 1:20. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Para obtener el complejo hGH-PEG, en el cual PEG está unido selectivamente al residuo lisina de hGH con una relación molar 1:1, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión dimensional con Superdex^R (Pharmacia, EE.UU.). Se eluyó y purificó el complejo hGH-PEG de la columna con tampón fosfato potásico 10 mM (pH 6,0) para eliminar contaminantes tales como hGH no modificada, PEG no reaccionado y subproductos diméricos que poseen dos moléculas de hGH unidas a ambos extremos de PEG. Se concentró el complejo hGH-PEG purificado a una concentración de 5 mg/mL. Se preparó un complejo hGH-PEG-IgG utilizando el complejo hGH-PEG concentrado según el mismo método descrito en el Ejemplo 1. Se ha hallado que la relación molar hGH-PEG óptima para obtener el mejor resultado se encuentra entre 1:2,5 y 1:5.

- Se preparó y purificó otro conjugado hGH-PEG-IgG según el mismo método descrito anteriormente, a excepción de que se utilizó PEG con grupos N-hidroxisuccinimidilo (NHS) en ambos extremos (NHS-PEG-NHS, Shearwater Inc., EE.UU.) en lugar de SPA-PEG-SPA.

30

Ejemplo 7

Preparación de conjugado de proteína utilizando PEG de pesos moleculares diferentes

- 35 Se preparó y purificó un complejo hGH-PEG según el mismo método descrito en la etapa 1 del Ejemplo 1, a excepción de que se utilizó PEG con grupos aldehído en ambos extremos con un peso molecular de 10.000 dalton (ALD-PEG-ALD, Shearwater Inc., EE.UU.). En esta ocasión, se ha hallado que la relación molar óptima de hGH:PEG para obtener el mejor resultado se encuentra entre 1:2,5 y 1:5. El complejo hGH-PEG purificado se concentró a una concentración de 5 mg/mL. Se preparó un conjugado hGH-PEG-IgG utilizando el complejo hGH-PEG concentrado según el mismo método descrito en la etapa 2 del Ejemplo 1.

40

Ejemplo 8

Preparación de conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG (grupo -SH)

45

Etapa 1

Expresión y purificación de Fab'

- 50 Se inoculó *Escherichia coli* BL21/poDLHF (n° de depósito: KCCM 10511) que expresa Fab' anti-TNF α en 100 mL de medio LB y se cultivó durante la noche con agitación. El caldo de cultivo LB cultivado se transfirió a un fermentador de 5L (Marubishi) y se cultivó bajo condiciones de temperatura de 30°C, índice de aireación 20 vvm, velocidad de agitación 500 rpm. A medida que progresaba la fermentación, se añadieron cantidades adecuadas de glucosa y extracto de levadura al cultivo para suplementar la escasez de fuentes de energía provocada por el crecimiento de los microorganismos. Cuando la absorbancia a 600 nm del caldo de cultivo cultivado alcanzó el valor de 80, se añadió IPTG al cultivo para inducir la expresión proteica. Se continuó el cultivo durante 40 a 45 horas adicionales hasta que la absorbancia a 600 nm del caldo de cultivo cultivado alcanzó un valor entre 120 y 140. El caldo de cultivo cultivado resultante se centrifugó a 20.000 x g durante 30 minutos para obtener el sobrenadante.

55

- 60 Se sometió el sobrenadante al siguiente proceso de purificación cromatográfica en tres etapas para purificar el Fab' anti-TNF α . Se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap Protein G (5 mL, Pharmacia, Alemania) equilibrada con tampón fosfato 20 mM (pH 7,0), y se eluyó con tampón glicina 100 mM (pH 3,0). La fracción Fab' eluida se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia, Alemania) equilibrada con solución salina tampón fosfato 10 mM (PBS, pH 7,3), y se eluyó con el mismo tampón. La fracción Fab' eluida se cargó en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC Inc. EE.UU.) y se eluyó con tampón acetato 10 mM (pH 4,5) bajo una gradiente de concentración lineal de NaCl (0,15 M \rightarrow 0,4 M) obteniendo una fracción Fab' anti-TNF α pura.

65

ES 2 324 298 T3

Etapa 2

Preparación del complejo IgG-PEG

5 Se disolvieron 150 mg de inmunoglobulina G (IgG, peso molecular 150 kDa, Green Cross Inc., Corea) en 100 mM de PBS (pH 6,0) a una concentración de 5 mg/mL y se añadió a la solución resultante NHS-PEG-MAL (peso molecular 3400 Da, Shearwater Inc., EE.UU.) en una cantidad correspondiente a una relación molar IgG:PEG de 1:10. Se agitó suavemente la mezcla de reacción a 4°C durante 12 horas.

10 Tras completarse la reacción, se cambió el tampón de reacción a PBS 20 mM (pH 6,0) para eliminar el NHS-PEG-MAL no reaccionado. A continuación se cargó la mezcla de reacción en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC Inc. EE.UU.) y se eluyó con PBS 20 mM (pH 6,0) utilizando un método de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl 0,15 M → 0,5 M) obteniendo un complejo IgG-PEG. La IgG no reaccionada se eluyó más tarde que el complejo IgG-PEG y se desechó.

15 Etapa 3

Preparación de conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG (grupo -SH)

20 Se disolvió el Fab' purificado obtenido en la etapa 1 en PBS 100 mM (pH 7,3) a una concentración de 2 mg/mL, y se añadió el complejo IgG-PEG preparado en la etapa 2 a la solución resultante en una cantidad correspondiente a una relación molar Fab':complejo de 1:5. La mezcla de reacción se concentró hasta una concentración de proteína de 50 mg/mL y se agitó suavemente el concentrado a 4°C durante 24 horas.

25 Tras completarse la reacción de enlazado, se cargó la mezcla de reacción en una columna Superdex 200 (Pharmacia, EE.UU.) equilibrada con PBS 10 mM (pH 7,3) y se eluyó con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 1 mL/min, obteniendo una fracción de conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG. El conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG con un peso molecular elevado se eluyó tempranamente y el complejo IgG-PEG y el Fab' no reaccionados se eluyeron más tarde que el conjugado y se desecharon. Con el objeto de eliminar el complejo IgG-PEG no reaccionado remanente, se cargó la
30 fracción de conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC Inc., EE.UU.) y se eluyó con PBS 20 mM (pH 6,0) utilizando un método de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl 0,15 M → 0,5 M). Consiguientemente, se obtuvo una fracción que contenía conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG puro, en el que el complejo IgG-PEG estaba unido al grupo -SH adyacente al extremo C-terminal de Fab'.

35 Ejemplo 9

Preparación del conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG (N-terminal)

Etapa 1

40 *Preparación del complejo Fab'-PEG (N-terminal)*

Se disolvieron 40 mg del Fab' purificado obtenido en la etapa 1 del Ejemplo 8 en PBS 100 mM (pH 6,0) a una concentración de 5 mg/mL, y se añadió, a la solución resultante, ButilALD-PEG-ButilALD (peso molecular 3400 Da, Shearwater Inc., EE.UU.) en una cantidad correspondiente a una relación molar Fab':PEG de 1:5. Se añadió a la solución NaCNBH₃ a una concentración final de 20 mM como agente reductor y se agitó suavemente la mezcla de reacción a 4°C durante 2 horas.

45 Tras finalizar la reacción, se cambió el tampón a PBS 20 mM (pH 6,0). Tras cambiar el tampón, se cargó la mezcla en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC Inc., EE.UU.) y se eluyó con PBS 20 mM (pH 4,5) utilizando un método de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl 0,15 M → 0,4 M) obteniendo una fracción que contenía el complejo Fab'-PEG. El Fab' no reaccionado se eluyó más tarde que el complejo y se desechó.

Etapa 2

55 *Preparación del conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG (N-terminal)*

Se disolvió el complejo Fab'-PEG purificado en la etapa 1 en PBS 100 mM (pH 6,0) a una concentración de 10 mg/mL, y se añadió IgG (peso molecular 150 kDa, Green Cross Inc. Corea) a la solución resultante en una cantidad correspondiente a una relación molar complejo:IgG de 1:5. La mezcla de reacción se concentró hasta una concentración de proteína de 50 mg/mL. Se añadió a la solución NaCNBH₃ hasta una concentración final de 20 mM como agente reductor y se agitó suavemente la mezcla de reacción a 4°C durante 24 horas.

65 Tras completarse la reacción de enlazado, se cargó la mezcla de reacción en una columna Superdex 200 (Pharmacia, EE.UU.) equilibrada con PBS 10 mM (pH 7,3) y se eluyó con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 1 mL/min obteniendo una fracción que contenía el conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG. El conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG con un peso molecular elevado se eluyó tempranamente y la inmunoglobulina y el complejo Fab'-PEG no reaccionados se eluyeron más tarde que el conjugado y se desecharon. Con el objeto de eliminar la inmunoglobulina no reaccionada

ES 2 324 298 T3

remanente, se cargó la fracción de conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC Inc., EE.UU.) y se eluyó con PBS 20 mM (pH 6,0) utilizando un método de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl: 0,15 M → 0,5 M). Consiguientemente, se obtuvo una fracción que contenía conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG puro, en el que el complejo IgG-PEG estaba unido al extremo N-terminal de Fab'.

5

Ejemplo 10

Preparación de IgG aglicosilada (AG IgG)

10 Se disolvieron 200 mg de inmunoglobulina G (Green Cross Inc., Corea) en tampón fosfato 100 mM (pH 7,5) a una concentración de 2 mg/mL, y se añadieron a la misma 300 U/mg de una aglicosilasa, PNGasa F (NEB Inc., Reino Unido). Se hizo reaccionar la mezcla a 37°C durante 24 horas con agitación suave. Al finalizar la reacción, se cargó la mezcla de reacción en una columna SP sefarosa FF (Pharmacia, Alemania) y se eluyó con tampón acetato 10 mM (pH 4,5) utilizando un método de gradiente de concentración lineal de NaCl 1M (concentración de NaCl: 0,1 M → 0,6 M) obteniendo una fracción de IgG aglicosilada que se eluyó más tarde que la IgG natural.

15

Ejemplo 11

Preparación de conjugado IFN α -PEG-AG IgG

20

El conjugado IFN α -PEG-AG IgG se preparó del modo siguiente, conjugando la IgG aglicosilada (AG IgG) preparada en el Ejemplo 10 con un complejo IFN α -PEG preparado en el Ejemplo 3.

25

Se disolvió AG IgG (peso molecular aproximadamente 147 kDa) en tampón fosfato 10 mM. Se añadió el complejo IFN α -PEG al tampón con AG IgG en una cantidad correspondiente a una relación molar complejo IFN α -PEG:AG IgG de 1:1, 1:2, 1:4 o 1:8. La mezcla resultante se ajustó con tampón fosfato 100 mM y se añadió a la solución NaCNBH₃ hasta una concentración final de 20 mM como agente reductor. Se agitó suavemente la mezcla de reacción a 4°C durante 20 horas. Se ha hallado que la relación molar complejo IFN α -PEG:AG IgG óptima para obtener el mejor resultado es 1:2.

30

Para purificar el conjugado IFN α -PEG-AG IgG de contaminantes tras la reacción de conjugación, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión dimensional. Se cargó la mezcla de reacción en una columna Superdex^R (Pharmacia, EE.UU.) y se eluyó con PBS 10 mM (pH 7,3) a una velocidad de flujo de 2,5 mL/min obteniendo una fracción de conjugado IFN α -PEG-AG IgG y eliminando también contaminantes tales como AG IgG y complejo IFN α -PEG no reaccionados. La fracción de conjugado IFN α -PEG-AG IgG obtenida de este modo se sometió adicionalmente a cromatografía de intercambio catiónico para eliminar pequeñas cantidades de AG IgG y complejo IFN α -PEG no reaccionados. Se cargó la fracción en una columna PolyCAT LP (PolyLC, EE.UU.) equilibrada con tampón acetato sódico 10 mM (pH 4,5) y se eluyó con tampón acetato sódico 10 mM (pH 4,5) con NaCl 1,0 M utilizando un método de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl: 0 M → 0,6 M) obteniendo una fracción de conjugado IFN α -PEG-AG IgG. La fracción así obtenida se sometió adicionalmente a una cromatografía de intercambio aniónico. Se cargó la fracción en una columna PolyWax LP (PolyLC Inc., EE.UU.) equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y se eluyó con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo NaCl 1,0 M mediante un método de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl: 0 M → 0,3 M) obteniendo un conjugado IFN α -PEG-AG IgG puro.

35

40

45

Ejemplo 12

Preparación de conjugado EPO-PEG-AG IgG

50 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 11 empleando el complejo EPO-PEG preparado en el Ejemplo 5 y la IgG aglicosilada preparada en el ejemplo 10 obteniendo un conjugado EPO-PEG-AG IgG.

Ejemplo comparativo 1

Preparación del complejo PEG-hGH

55

Se disolvieron 5 mg de hGH en tampón fosfato potásico 100 mM (pH 6,0) obteniendo 5 ml de solución y se añadió a la solución un metoxi-PEG-ALD activado que posee un peso molecular de PEG de 40 kDa en una cantidad correspondiente a una relación molar hGH:PEG de 1:4. Se añadió a la mezcla NaCNBH₃ a una concentración final de 20 mM como agente reductor y se agitó gradualmente la mezcla de reacción a 4°C durante 18 horas. A continuación se añadió a la misma etanolamina a una concentración final de 50 mM para inactivar el PEG no reaccionado.

60

Para eliminar adicionalmente el PEG no reaccionado, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía en columna Sephadex^R G-25 (Pharmacia, EEUU). La columna se equilibró con 2 volúmenes de columna (VC) de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) antes de cargar la mezcla de reacción. Se analizaron las fracciones de elución según su absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro UV. La hGH modificada con PEG que posee un peso molecular elevado se eluyó primero, antes que el PEG no reaccionado.

65

ES 2 324 298 T3

La hGH modificada con PEG se purificó adicionalmente a partir de la fracción de elución del modo siguiente. Se equilibró una columna empaquetada con 3 mL de PolyWAX LP (Polywax Inc., EEUU) con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Se cargó en la columna la fracción de elución que contenía la hGH modificada con PEG a una velocidad de flujo de 1 mL/min, y se lavó la columna con 15 mL del tampón de equilibrado. Se fraccionaron las tri- di- y mono-hGHs unidas a PEG por orden mediante un método de gradiente de concentración salina (concentración de NaCl: 0% → 100%) utilizando tampón NaCl 1M durante 30 minutos.

Para purificar adicionalmente el complejo mono-hGH unida a PEG de la mezcla, se sometió el efluente de la columna a cromatografía de exclusión dimensional. Se cargó el efluente concentrado en una columna Superdex 200 (Pharmacia, EEUU) equilibrada con tampón fosfato sódico 10 mM y se eluyó con la misma solución tampón a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se eliminaron los complejos tri- y di-hGH unidas a PEG, que se eluyeron más tempranamente que el complejo mono-hGH unida a PEG, obteniéndose un complejo mono-hGH unida a PEG purificado.

Se prepararon y purificaron según el mismo método descrito anteriormente PEG-IFN, PEG-derivado ¹⁷S-G-CSF y PEG-G-CSF en los cuales PEG 40 kDa se une a los residuos amino terminales de IFN α y G-CSF respectivamente.

Ejemplo comparativo 2

Preparación de complejo albúmina hGH

Para conjugar albúmina con el complejo hGH-PEG obtenido en el Ejemplo 1, se hizo reaccionar albúmina sérica humana (HSA, peso molecular aproximadamente 67 kDa) (Green Cross, Corea) disuelta en solución tampón fosfato 10 mM con complejo hGH-PEG en una cantidad correspondiente a una relación molar complejo hGH-PEG:HSA de 1:1, 1:2, 1:4 o 1:8. Se concentró la mezcla de reacción a 100 mM en tampón fosfato y se añadió a la solución NaCNBH₃ hasta una concentración final de 20 mM como agente reductor. Se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 20 horas. Se ha hallado que una relación molar complejo hGH-PEG:albúmina óptima para obtener el mejor resultado es 1:2.

Tras la reacción de conjugación, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión dimensional Superdex para eliminar los materiales de partida no reaccionados y los subproductos. Se concentró y cargó la mezcla de reacción en la columna a una velocidad de flujo de 2,5 mL/min utilizando acetato sódico 10 mM (pH 4,5) obteniendo conjugado hGH-PEG-albúmina purificado. Dado que el conjugado hGH-PEG-albúmina purificado aún estaba contaminado con pequeñas cantidades de albúmina no reaccionada y dímero de hGH, se realizó adicionalmente una cromatografía de intercambio catiónico para eliminar dichos contaminantes. Se cargó el efluente de hGH-PEG-albúmina en una columna SP5PW (Waters, EE.UU.) equilibrada con acetato sódico 10 mM (pH 4,5) y se fraccionó con acetato sódico 10 mM (pH 4,5) conteniendo NaCl 1,0M con un gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl: 0M → 0,5M) recuperando hGH-PEG-albúmina puro.

Se prepararon y purificaron según el mismo método descrito anteriormente IFN α -PEG-albúmina, G-CSF-PEG-albúmina y derivado ¹⁷S-G-CSF-PEG-albúmina en los cuales la albúmina se une a IFN α , ¹⁷S-G-CSF y G-CSF respectivamente.

Ejemplo comparativo 3

Preparación del complejo Fab'-S-PEG 40K

El Fab' purificado obtenido en la etapa 1 del ejemplo 8 fue colocado en un tampón de activación (20 mM PBS (pH 4,0) y 0,2 mM DTT) durante una hora para activar los grupos libres -SH del mismo. El tampón fue cambiado a un tampón de PEGilación (fosfato potásico 50 mM (pH 6,5)). Se añadió Maleimida-PEG (peso molecular 40 kDa, Shearwater Inc., USA) a la solución resultante en una cantidad que corresponde a la proporción molar Fab': PEG de 1:10. La mezcla de reacción fue agitada suavemente a 4°C durante 24 horas.

Después de terminar la reacción, la mezcla de reacción fue dispuesta en una columna Superdex 200 (Pharmacia, USA) equilibrada con 10 mM PBS (pH 7,3), y eluida con el mismo tampón con un caudal de 1 ml/minuto para obtener una fracción que contiene un complejo Fab'-S-PEG 40K. El Fab' sin reaccionar fue eluido más tarde que el complejo y descartado. A efectos de eliminar el Fab' sin reaccionar, la fracción de complejo Fab'-S-PEG 40K fue dispuesta en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC Inc., USA), y eluida con 20 mM PBS (pH 4,5) utilizando un método de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl: 0,15 M → 0,5 M). Como consecuencia, se obtuvo una fracción que contenía complejo Fab'-S-PEG 40K puro en el que 40 kDa PEG estaba enlazado al grupo -SH adyacente al C-terminal de Fab'.

Ejemplo de Prueba 1

*Confirmación y cuantificación de conjugados de proteína*5 (1) *Confirmación de conjugados de proteína*

Los conjugados de proteína preparados en los ejemplos anteriores fueron analizados en cuanto a su estado de modificación mediante SDS-PAGE utilizando un gel que tenía un gradiente de concentración de 4 a 20% y ELISA (R & D System, USA).

10 Se desarrollaron cada uno de hGH, hGH-PEG, IFN e IFN-PEG sobre SDS-PAGE y una mezcla con 50 mM DTT (ditiotreitól), mientras que IgG, hGH-PEG-IgG e IFN-PEG-IgG lo fueron sin DTT.

15 Las figuras 2 y 3 muestran los resultados SDS-PAGE obtenidos para los conjugados hGH-PEG-IgG e IFN-PEG-IgG, respectivamente. Los numerales indicados en el margen izquierdo son marcadores de peso molecular (kDa).

Tal como se ha mostrado en la figura 2, el peso molecular aparente del conjugado hGH-PEG-IgG es aproximadamente de 170 kDa. No obstante, dado que es difícil discriminar la diferencia en peso molecular entre los conjugados de la proteína IgG e IgG de tipo salvaje en SDS-PAGE, el conjugado hGH-PEG-IgG e IgG fueron reducidos por tratamiento DTT, separados en cadenas largas y cortas y confirmado en su estado conjugado por SDS-PAGE, respectivamente (Figura 4).

20 Cuando IgG fue tratado con DTT, la cadena corta de IgG fue separada, en primer lugar, y la cadena larga de IgG más adelante con su peso molecular. Aparecieron bandas de conjugado hGH-PEG-IgG tratadas con DTT en posiciones correspondientes a pesos moleculares calculados por adición del peso molecular de hGH-PEG (3,4 kDa) al peso molecular de los fragmentos de cadena corta y cadena larga respectivamente. El conjugado de cadena corta de hGH-PEG-IgG formó una banda en una posición más baja (peso molecular más reducido) que la cadena larga del conjugado hGH-PEG-IgG cuya banda se encontró en una posición correspondiente, a aproximadamente, 80 kDa. De los resultados anteriores, se ha descubierto que hGH se acopló con cadenas cortas y largas con igual probabilidad y que IgG reacciona con hGH en una proporción molar de 1:1.

30 (2) *Análisis cuantitativo de conjugados de proteína*

La cantidad de cada conjugado de proteína preparado en los ejemplos anteriores fue determinada calculando el área pico del conjugado observada en cromatografía de exclusión dimensional (columna: Superdex, solución de elución: fosfato potásico tampón 10 mM (pH 6,0)) y comparándola con la del control. Después de realizar cromatografía de exclusión dimensional utilizando hGH, IFN, G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, EPO e IgG, precuantificados, respectivamente, se determinaron los factores de respuesta relativa de las áreas pico. La cromatografía de exclusión dimensional fue llevada a cabo utilizando una cantidad constante de cada conjugado de proteína con igual situación y se determinó el valor cuantitativo de la proteína biológicamente activa existente en cada conjugado de proteína al restar el área pico correspondiente a IgG del área pico de cada conjugado de proteína obtenida, tal como se ha indicado en lo anterior.

45 Se llevó a cabo también análisis ELISA (R & D System, USA) además de cromatografía. Si una parte de IgG es conjugada de un sitio biológicamente activo de un polipéptido, el valor obtenido por ELISA utilizando un anticuerpo específico para el lugar biológicamente activo sería más bajo que el valor calculado por cromatografía. En el caso del conjugado hGH-PEG-IgG, se ha descubierto que el valor medido por ELISA era solamente aproximadamente 30% del valor determinado por cromatografía.

50 (3) *Confirmación de pureza y masa de los conjugados de proteína*

A efectos de examinar la pureza del complejo INF α -PEG-IgG obtenido en el ejemplo 3, se llevó a cabo un HPLC de fase inversa utilizando una columna de fase inversa (columna 259 VHP54, Vydac Inc., USA). El complejo fue eluido con acetonitrilo mediante un método de gradiente de concentración lineal (concentración de acetonitrilo: 40% \rightarrow 100%) bajo la presencia de 0,5% TFA y detectado en 280 nm. Tal como se puede apreciar en la figura 5, la pureza del complejo es superior a 95%.

60 El conjugado de proteína obtenido en cada ejemplo fue analizado en cuanto a su valor de absorbancia a 280 nm durante la cromatografía de exclusión dimensional y se encontró que cada uno de los hGH-PEG-IgG, IFN-PEG-IgG, G-CSF y ¹⁷S-G-CSF-PEG-IgG mostraban un pico único correspondiente a un peso molecular de 170.000 a 180.000 daltons. El pico de EPO-PEG-IgG fue observado en una posición correspondiente a un peso molecular de 200.000 daltons.

65 Para determinar el peso molecular exacto de cada conjugado de proteína, las muestras purificadas fueron analizadas utilizando espectrometría de masas de gran velocidad MALDI-TOF (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, USA). Se utilizó como matriz ácido sinapínico. Se extendieron 0,5 μ l de cada muestra sobre una placa de cristal y se secó en el aire. Después de verter un volumen igual de la matriz sobre la placa de vidrio, ésta fue secada en el aire y montada en una fuente de iones. La detección fue llevada a cabo mediante un equipo TOF de modalidad lineal utilizando un método positivo y se efectuó la aceleración de los iones por diferencia de potencial total de unos 2,5 kV en una fuente

ES 2 324 298 T3

de suministro de extracción dividida utilizando un extractor retardado de iones con un tiempo de extracción retardado de 750 nseg/1500 nseg. Los resultados de los análisis de espectrometría de masas del conjugado hGH-PEG-IgG se muestran en la tabla 1 y en la figura 6.

TABLA 1

Análisis de espectrometría de masas de los conjugados de proteínas de IgG

	Valor teórico (kDa)	Valor medido (kDa)
HGH-PEG-IgG (Ej. 1)	175,4	176,8
IFN α -PEG-IgG (Ej. 3)	172,6	172,6
G-CSF-PEG-IgG (Ej. 4)	172,1	173,0
¹⁷ S-G-CSF derivado-PEG-IgG (Ej. 4)	171,9	172,2
EPO-PEG-IgG (Ej. 5)	185,4	183,0

Los resultados han mostrado que la pureza del conjugado hGH-PEG-IgG era de 90% o superior y que el peso molecular medido era casi igual al valor teórico. Además, el conjugado hGH-PEG-IgG se encontraba en forma de IgG unido al complejo hGH-PEG en una proporción molar de 1:1.

Además, el peso molecular del AG IgG preparado en el ejemplo 10 medido por el método MALDI-TOF era de 147 kDa, que es inferior en 3.000 Da al de IgG de tipo salvaje (Figura 9). Este reducido peso molecular de 3.000 Da corresponde a la dimensión teórica de la cadena de azúcar y, de acuerdo con ello, se llegó a la conclusión de que se había eliminado de IgG la cadena de azúcar por completo.

La tabla 2 muestra los pesos moleculares de los conjugados IFN α -PEG-AG IgG y EPO-PEG-AG IgG preparados en los ejemplos 11 y 12.

TABLA 2

Análisis de espectrometría de masas de los conjugados AG y la proteína IgG

	Valor teórico (kDa)	Valor medido (kDa)
IFN α -PEG-AG IgG (Ej. 11)	169,6	170,0
EPO-PEG-AG IgG (Ej. 12)	182,4	180,0

Ejemplo de prueba 2

Análisis farmacocinético I

Se compararon las estabildades *in vivo* y los coeficientes farmacocinéticos de los conjugados de la proteína IgG, proteína PEG y complejos albúmina-proteína (grupo de pruebas) preparados en los ejemplos y los ejemplos comparativos con los de la proteína biológicamente activa de tipo salvaje (grupo de control). Se utilizaron 5 ratas Sprague-Dawley (SD) para cada grupo en los experimentos siguientes. Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas de 100 μ l/kg del control, complejo PEG, conjugado albúmina-proteína y conjugado IgG-proteína, respectivamente. Se tomaron muestras de sangre del grupo de control a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 y 96 horas después de la inyección y las muestras de los grupos de prueba a las 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 y 320 horas después de la inyección. Se recogieron muestras de sangre en un tubo dotado de recubrimiento de heparina para impedir la coagulación de la sangre y se sometió a micro-centrifugación de alta velocidad a 4°C, 3.000 x g durante 30 minutos para retirar las células. La concentración de proteína en los sueros fue medida por el método ELISA utilizando el anticuerpo respectivo específico para cada proteína biológicamente activa.

ES 2 324 298 T3

Los valores farmacocinéticos de hGH de tipo salvaje, IFN, G-CSF y EPO, y conjugados de proteínas, así como sus complejos, se muestran en las tablas 2 a 6, en las que T_{max} significa el tiempo para alcanzar la concentración máxima del fármaco, $T_{1/2}$ la vida media del fármaco en sangre y MRT (tiempo medio de permanencia), el tiempo de retención promedio en el cuerpo.

TABLA 3

Valores farmacocinéticos de hGH

	hGH tipo salvaje	hGH-PEG 40K (Ej. Comp.1)	HGH-PEG-albúmina (Ej. Comp.2)	hGH-PEG-IgG (Ej. 1)
T_{max} (horas)	1,0	12	12	12
$T_{1/2}$ (horas)	1,1	7,7	5,9	13,9
MRT (horas)	2,1	18,2	13,0	19,0

TABLA 4

Valores farmacocinéticos de IFN α

	IFN α tipo salvaje	IFN α -PEG 40K (Ej. Comp. 1)	IFN α -PEG albúmina (Ej. Comp 2)	IFN α -PEG-IgG (Ej. 3)	IFN α -PEG-AG-IgG (Ej. 11)
T_{max} (hora)	1,0	30	12	30	24,0
$T_{1/2}$ (hora)	1,7	35,8	17,1	76,7	59,7
MRT (hora)	2,1	71,5	32,5	121,0	98,2

TABLA 5

Valores farmacocinéticos de G-CSF

	G-CSF tipo salvaje	G-CSF-PEG 40K (Ej. Comp. 1)	G-CSF-PEG-albúmina (Ej. Comp. 2)	G-CSF-PEG-IgG (Ej. 4)
T_{max} (hora)	2.0	12	12	12
$T_{1/2}$ (hora)	2.8	4.8	5.2	8.4
MRT (hora)	5.2	24.5	25.0	35.7

ES 2 324 298 T3

TABLA 6

Valores farmacocinéticos de ¹⁷S-G-CSF

	Derivado de ¹⁷ S-G-CSF de tipo salvaje	PEG derivado-40K de ¹⁷ S-G-CSF (Ej. Comp. 1)	PEG- albúmina derivada de ¹⁷ S-G-CSF (Ej. Comp. 2)	PEG-IgG derivado de ¹⁷ S-G-CSF (Ej. 4)
T _{max} (hora)	2,0	24	24	48
T _½ (hora)	2,9	4,3	6,4	7,2
MRT (hora)	5,8	24,4	25,1	42,6

TABLA 7

Valores farmacocinéticos de EPO

	EPO de tipo salvaje	EPO altamente glicosilado (Darbepetin-α)	EPO-PEG-IgG (Ej. 5)	EPO-PEG-AG IgG (Ej. 12)
T _{max} (hora)	6,0	12	48,0	48,0
T _½ (hora)	9,4	14,9	67,5	47,8
MRT (hora)	21,7	30,7	121,7	89,5

Tal como se puede apreciar en la tabla 3 y en la figura 7, la vida media del conjugado hGH-PEG-IgG era de 13,9 horas lo cual significa 13 veces superior a la de hGH de tipo salvaje y aproximadamente el doble que la del complejo hGH-PEG 40K (7,7 horas) preparado en el ejemplo comparativo 1. La vida media del conjugado hGH-PEG-albúmina en el que la albúmina está enlazada a un extremo de PEG, no directamente a hGH, era de 5,9 horas. Este resultado confirma que el conjugado de la proteína de la invención muestra una duración muy superior *in vivo*.

Además, en la tabla 4 y en la figura 10 los resultados para IFN α fueron similares a los de hGH, pero el efecto de incrementar la vida media de la sangre observado en el conjugado de proteína de la invención era mucho más elevado. Si bien la vida media de IFN α de tipo salvaje era de 1,7 horas, la vida media del complejo 40 kDa PEG-IFN α aumentó hasta 35,8 horas y la vida media de un conjugado de IFN α-PEG-albúmina aumento a 17,1 horas. En comparación con estos valores, la vida media del conjugado IFN α-PEG-IgG aumentó notablemente hasta 76,7 horas. Además, la vida media del conjugado IFN α-PEG-AG IgG era de 59,7 horas que es casi igual a la del conjugado IFN α-PEG-IgG. De este resultado, se puede apreciar que la ausencia de la cadena de azúcar no afecta la estabilidad *in vivo* del conjugado.

Tal como se ha mostrado en las tablas 5 y 6, la duración *in vivo* de G-CSF y sus derivados *mostró* una tendencia similar a la de hGH e IFN. La vida media de los complejos de proteína modificada 40 kDa PEG y conjugados de albúmina fueron más largas que las de G-CSF de tipo salvaje y sus derivados. No obstante, el conjugado de proteína IgG de la invención *mostró* una vida media mucho más larga. Esta capacidad de IgG conjugado en incrementar la estabilidad del medicamento en la sangre se observó también para derivados modificados de aminoácidos. De estos resultados se puede anticipar que el conjugado de proteína de la invención aplicado a otras proteínas ejercería también el efecto deseado que se ha descrito en lo anterior.

La tabla 7 y las figuras 8 y 11 muestran que el efecto de incrementar la vida media en sangre del conjugado de proteína de la invención es evidente para EPO que tiene una fracción glicosilada. Es decir, la vida media en sangre de EPO de tipo salvaje era de 9,4 horas y la de EPO altamente glicosilada con una elevada estabilidad en sangre, es decir,

ES 2 324 298 T3

Darbepoetin- α (Aranesp, Amgen, USA), era de 14,9 horas. En el caso del conjugado EPO-PEG-IgG, la vida media en sangre aumentó notablemente hasta 67,5 horas y la del conjugado EPO-PEG-AG IgG aumento también hasta 47,8 horas.

5 Tal como se puede apreciar por los resultados anteriores, los conjugados de proteínas de la invención, en los que un polipéptido fisiológico es unido de forma covalente a un polímero no peptídico e inmunoglobulina, tiene una vida media en sangre que es doce veces superior a la de la proteína de tipo salvaje. Además, el efecto de incremento de la vida media en sangre del conjugado de la proteína se mantiene todavía a un nivel similar incluso en el caso de utilizar una inmunoglobulina aglicosilada.

10 Especialmente, en comparación con el complejo de proteína modificada 40 kDa PEG que tiene la mayor duración en sangre entre las formulaciones PEG anteriormente indicada, el conjugado de proteína IgG de la invención muestra una duración mucho mejor. Además, con respecto al conjugado de la proteína acoplado con albúmina en vez de IgG, el conjugado de proteína de la invención mostró una duración notablemente más elevada. Estos resultados sugieren que el
15 conjugado de proteína de la invención puede ser utilizado de manera efectiva para preparar una formulación mantenida de un medicamento de proteína. Los presentes descubrimientos de que los conjugados de proteínas de la invención muestran una estabilidad notablemente más elevada en sangre y mayor MRT que los anteriormente conocidos proteína con capacidad de unión PEG o conjugado de proteína de albúmina para una amplia gama de proteínas incluyendo el derivado G-CSF con un punto bajo de mutación, sugieren claramente que dicho efecto de incrementar la estabilidad
20 en sangre y la duración observado para el conjugado de la proteína de la invención también se conseguiría para cualesquiera otros péptidos biológicamente activos.

La vida media del conjugado hGH-PEG-IgG (ejemplo 7) preparado utilizando 10 kDa de PEG como polímero no péptido se midió por el mismo método descrito en 9,5 horas, que es ligeramente menor que la del conjugado hGH-PEG-IgG utilizando 3,4 kDa PEG (13,9 horas). Los pesos moleculares aparentes y medias vidas en sangre observados para estos preparados utilizando PEG con diferentes grupos funcionales, por ejemplo propionato de succinimidilo, N-hidroxisuccinimidilo y grupos butil aldehído, eran similares a los preparados utilizando PEG con grupos aldehído.

30 Ejemplo de prueba 3

Análisis farmacocinético II

35 A efectos de medir las medias vidas en sangre de los conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG y Fab'-N-PEG-N-IgG preparados en los ejemplos 8 y 9, respectivamente, y del complejo Fab'-S-PEG 40K preparado en el ejemplo comparativo 3, se llevó a cabo un análisis farmacocinético de acuerdo con el método del ejemplo de pruebas 2 utilizando los conjugados, el complejo y Fab' como control. El resultado se muestra en la Figura 12.

40 Tal como se puede apreciar en la figura 12, los conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG y Fab'-N-PEG-N-IgG mostraron medias vidas en sangre prolongadas que eran de dos a tres veces más largas que las del complejo Fab' y Fab'-S-PEG 40K.

Ejemplo de prueba 4

45 *Medición de la actividad in vitro*

(1) Comparación de la actividad in vitro de conjugados de proteína hGH

50 Las actividades *in vitro* del conjugado hGH-PEG-IgG (ejemplo 1), complejo 40 kD PEG-hGH (ejemplo comparativo 1) y conjugado hGH-PEG-albúmina (ejemplo comparativo 2) fueron medidas utilizando la línea celular del linfoma de nodo de rata Nb2 (European Collection of Cell Cultures, ECCC #97041101) que sufre mitosis dependiente de hGH tal como se indica a continuación.

55 Las células Nb2 fueron cultivadas en medio de Fisher's suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 0,075% NaCO₃, 0,05 mM 2-mercaptoetanol y 2 mM de glutamina. Las células fueron incubadas durante otras 24 horas en el mismo medio sin 10% FBS. Después se añadieron aproximadamente 2X 10⁴ células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, varias diluciones de hGH-PEG-IgG, 40 kDa PEG-hGH, hGH-PEG-albúmina y un control (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) y las placas fueron incubadas durante 48 horas a
60 37°C en un incubador de CO₂. Para medir la extensión de crecimiento celular (números de células existentes en cada pocillo) se añadieron 25 μ l de titulación celular 96 Aqueous One Solution (Promega, USA) a cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37°C. Se midió la absorbancia a 490 nm para calcular el título de cada muestra y los títulos calculados se muestran en la Tabla 8.

65

TABLA 8

Análisis de la actividad *in vitro* de hGH

	Conc (nk/ml)	Actividad específica* (U/mg)	Actividad relativa con respecto a hGH de tipo salvaje (%)
hGH tipo salvaje	100	2,71E+06	100
Control (NIBSC)	100	2,58E+06	95,2
hGH-PEG 40K	100	0,206E+06	7,6
hGH-PEG-albúmina	100	0,141E+06	5,2
hGH-PEG-IgG	100	0,86E+06	31,7
*Actividad específica = $1/ED_{50} \times 10^6$ (ED_{50} : representando la cantidad de proteína el 50% del crecimiento celular máximo)			

Tal como se puede apreciar en la tabla 8, todas las muestras utilizadas en los experimentos tienen actividad *in vitro*. Además, la actividad *in vitro* de hGH modificado por PEG era menor que la de hGH no modificado. En el caso de interferón, se informó que conjugados 12 kDa PEG y 40 kDa PEG con IFN mostraron actividades que eran solamente 25% y 7% aproximadamente del tipo salvaje, respectivamente, (P. Bailon y otros, Bioconjugate Chem. 12 : 196-202, 2001). Cuanto mayor es el incremento de peso molecular de PEG, menor es la disminución de la actividad *in vitro* del complejo PEG. La actividad *in vitro* del complejo hGH modificado por 40 kDa PEG era solamente de 7,6% aproximadamente de hGH de tipo salvaje y el conjugado de hGH-PEG-albúmina también mostró una actividad *in vitro* muy baja de 5,2% del tipo salvaje aproximadamente. No obstante, en el caso de conjugar IgG con el complejo hGH-PEG, su actividad relativa quedaba incrementada significativamente a 30% o más del tipo salvaje. Estos resultados sugieren que los conjugados de proteína de la invención tienen una actividad *in vivo* más elevada y también una vida media en sangre prolongada. En el caso de conjugados de proteína IgG de la presente invención, la actividad incrementada de la proteína se cree que es debida a la estabilidad en sangre incrementada provocada por conjugación con IgG que juega el papel de conservar la afinidad de unión a un receptor y el polímero no peptídico que proporciona espacio. Este efecto se espera que tenga lugar para conjugados de proteína IgG de cualesquiera otras proteínas biológicamente activas.

(2) Comparación de la actividad *in vitro* de conjugados de proteína IFN α

Para comparar la actividad *in vitro* de conjugados de proteína IFN α , se midieron la actividad antivírica del complejo IFN α -PEG-IgG (ejemplo 3), conjugado 40 kDa PEG-IFN α (ejemplo comparativo 1) y el conjugado IFN α -PEG-albúmina (ejemplo comparativo 2) por un método de biopsia de cultivo celular utilizando células de riñón bovino Madin-Darby (células MDBK; ATCC CCL-22) saturadas con virus de estomatitis vesicular (VSV). Se utilizó como control IFN α 2b que no tenía modificación PEG (NIBSC IFN).

Las células MDBK fueron cultivadas en medio MEM (medio mínimo esencial, JBI) suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomomicina a 37°C en un incubador al 5% de CO₂. Las muestras y un control (NIBSC IFN) fueron diluidos con el mismo medio de cultivo a una concentración constante y se añadieron a una placa de 96 pocillos 100 μ l de cada dilución. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de la solución celular cultivada y las células fueron incubadas a 37°C durante 1 hora aproximadamente en un incubador al 5% de CO₂. Después de una hora se añadieron a cada pocillo 50 μ l de VSV con una concentración vírica de 5-7X10 PFU y se incubó adicionalmente durante 16 a 20 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Los pocillos que contenían solamente células y virus sin muestras o el control fueron utilizados como control negativo y los pocillos que contenían solamente células sin virus añadidos, como control positivo.

Para eliminar el medio de cultivo y efectuar tinción de células vivas se añadieron a cada pocillo 100 μ l de una solución roja neutra y se incubó adicionalmente a 37°C durante 2 horas en un incubador con 5% de CO₂. Después de retirar el sobrenadante por aspiración, la solución de extracción (100 μ l de una mezcla de 100% de etanol y 1% de acetato (1: 1)) fue añadida a cada pocillo. Las células con tinción fueron resuspendidas en la solución de extracción con agitación y se midió la absorbancia a 540 nm. Se calculó ED₅₀ representando 50% del crecimiento celular máximo considerando el crecimiento celular del control positivo como 100% con respecto al crecimiento celular del control negativo.

ES 2 324 298 T3

TABLA 9

Análisis de la actividad in vitro de IFN α

	Concentración (ng/ml)	ED ₅₀ (IU/mg)	Actividad relativa de IFN con respecto a tipo salvaje (%)
IFN α tipo salvaje	100	4,24E+08	100
IFN α -PEG 40K	100	2,04E+07	4,8
IFN α -PEG-albúmina	100	2,21E+07	5,2
IFN α -PEG-IgG	100	4,75E+07	11,2
IFN α -PEG-AG IgG	100	4,32E+07	10,2

Tal como se ha mostrado en la tabla 9, la actividad de IFN α modificada por PEG era más baja que la de IFN α no modificada. En especial la estabilidad de la sangre aumentó al incrementarse el peso molecular de la fracción de PEG, pero la actividad relativa disminuyó gradualmente. Un complejo de IFN α modificado por 40 kDa PEG mostró una actividad *in vitro* muy baja correspondiente aproximadamente a 4,8% de la actividad del tipo salvaje. Tal como se ha mencionado en lo anterior, se conoce un informe anterior según el cual las IFN conjugadas con 12 kDa PEG y 40 kDa PEG mostraron aproximadamente 25% y 7% de actividad *in vitro* del tipo salvaje respectivamente (P. Bailon y otros, *Bioconjugate Chem.* 12:196-202,2001). Es decir, dado que si aumenta el peso molecular de PEG, aumenta la vida media en sangre pero su efecto farmacéutico disminuye bruscamente, se ha producido la necesidad de desarrollar una sustancia con actividad farmacéutica mejorada y vida media prolongada. El conjugado IFN α -PEG-albúmina mostró también una actividad *in vitro* muy baja correspondiente solamente a 5,2% del tipo salvaje aproximadamente. No obstante, en el caso de modificar IFN α con IgG (conjugado IFN α -PEG-IgG), la actividad relativa aumentó hasta 11,2% del tipo salvaje. Además, el conjugado IFN α -PEG-AG IgG mostró actividad *in vitro* correspondiente a 10,2% del tipo salvaje y de acuerdo con ello, se llegó a la conclusión de que la ausencia de la cadena de azúcar no tenía efecto significativo en la actividad de un conjugado de la proteína.

Estos resultados muestran que el conjugado de la proteína IgG de la invención muestra elevada actividad *in vivo* junto con una prolongada vida media.

(3) Comparación de la actividad *in vitro* de conjugados de proteína G-CSF

Se midieron la actividades *in vitro* de G-CSF (Filgrastim) tipo salvaje, derivado ¹⁷Ser-G-CSF, complejo 20 kDa PEG-G-CSF (Neulasta, USA), complejo derivado 40 kDa PEG-¹⁷S-G-CSF, conjugado de derivado ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-albúmina y conjugado de derivado ¹⁷S-G-CSF-PEG-IgG.

En primer lugar, células de origen mielógeno humano, células HL-60 (ATCC CCL-240, paciente de 36 años, hembra, de raza blanca, con leucemia promielocítica) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, y se ajustó el número de células aproximadamente a $2,2 \times 10^5$ células/ml. Se añadió DMSO (dimetilsulfóxido, calidad de cultivo/SIGMA), a las células con una concentración de 1,25% (v/v). Se añadieron 90 μ l de la solución de cultivo tratada con DMSO con unas 2×10^4 células suspendidas por pocillo a una placa de 96 pocillos (placa Corning/baja evaporación de 96 pocillos) y se incubó a 37°C durante 72 horas en un incubador a 5% de CO₂.

La concentración de cada muestra fue determinada utilizando un equipo G-CSF ELISA (R & D Systems, USA), y cada muestra fue diluida con medio RPMI 1640 a la proporción apropiada hasta una concentración de 10 μ l/ml. La solución resultante fue sometida a 19 ciclos de dilución media secuencial con medio RPMI 1640.

Se añadieron 10 μ l de cada una de las muestras preparadas según lo anterior a cada uno de los pocillos con células HL-60 en cultivo y la concentración fue reducida a la mitad desde 1.000 ng/ml. Las microplacas tratadas con muestras de proteínas fueron incubadas adicionalmente a 37°C durante 72 horas.

Para examinar la extensión de crecimiento celular después de la incubación, el número de células fue determinado por medición de la absorbancia a 670 nm utilizando CellTiter96™ (Promega, USA).

ES 2 324 298 T3

TABLA 10

Análisis de la actividad in vitro del derivado G-CSF

	ED ₅₀ (IU/ml)	Actividad relativa con respecto a tipo salvaje de G-CSF (%)
G-CSF de tipo salvaje (Filgrastim)	0,30	100
Derivado de ¹⁷ Ser-G-CSF	0,26	115
20K PEG-G-CSF (Neulasta)	1,20	25
Derivado de ¹⁷ Ser-G-CSF-PEG 40K	10,0	<10,0
Derivado de ¹⁷ Ser-G-CSF-PEG-albúmina	1,30	23,0
Derivado de ¹⁷ Ser-G-CSF-PEG-IgG	0,43	69,0

Tal como se puede apreciar de la tabla 10, el conjugado de la proteína IgG del derivado de ¹⁷Ser-G-CSF que tiene una modificación del amino ácido mostró un efecto similar al observado para el conjugado de proteína de tipo salvaje. Se ha confirmado que el derivado de ¹⁷Ser-G-CSF modificado con PEG muestra una vida media más larga pero una menor actividad que el derivado sin modificar (Solicitud de Patente de Corea No. 2003-17867). En especial, si bien la estabilidad en sangre del derivado de ¹⁷Ser-G-CSF modificado con PEG incrementó al aumentar el peso molecular de la fracción PEG, su actividad relativa disminuyó gradualmente. 40 kDa de complejo derivado de ¹⁷Ser-G-CSF modificado por PEG mostró una actividad *in vitro* muy baja correspondiente aproximadamente a 10% del tipo salvaje. Es decir, al aumentar el peso molecular de PEG, la vida media en sangre aumenta pero su efecto farmacéutico disminuye de forma repentina, por lo que se ha presentado la necesidad de desarrollar una sustancia que tiene actividad farmacéutica mejorada y vida media prolongada. Mientras tanto, el derivado de ¹⁷Ser-G-CSF modificado con albúmina mostró una actividad *in vitro* relativamente baja correspondiente aproximadamente a 23% solamente del tipo salvaje. No obstante, en el caso de modificar el derivado de ¹⁷Ser-G-CSF con IgG (conjugado de ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-IgG), su actividad relativa aumentó en un nivel de 69% o más del tipo salvaje. Estos resultados muestran que el conjugado de proteína IgG de la invención muestra elevada actividad *in vivo* junto con una prolongada vida media.

(4) Comparación de actividad *in vitro* de conjugados de proteínas EPO

Se midieron las actividades *in vitro* de EPO (BRP, UK), EPO (Aranesp, USA) altamente glicosilado y conjugado EPO-PEG-IgG, de tipo salvaje.

En primer lugar, células originadas en tuétano de hueso humano, células TF-1 (ATCC CRL-2003, eritroleucemia), fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS y 12 ng/ml de GM-CSF, y, a continuación, del mismo medio RPMI 1640 sin GM-CSF durante un día. Se añadieron 50 μ l de la solución de cultivo con unas 2×10^4 células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (placa de 96 pocillos Corning/baja evaporación) y se incubó a 37°C durante 72 horas en un incubador con 5% de CO₂.

Se determinó la concentración de cada una de las muestras utilizando un equipo EPO ELISA (R & D Systems, USA), y cada una de las muestras fue diluida con medio RPMI 1640 a una proporción apropiada hasta una concentración de 10 μ g/ml. La solución resultante fue sometida a 19 ciclos de doble dilución en serie con medio RPMI 1640.

Se añadieron 50 μ l de cada una de las muestras preparadas tal como se ha indicado a cada uno de los pocillos con células TF-1 en cultivo y la concentración fue reducida a la mitad de 5 μ g/ml. Las microplacas tratadas con muestra de proteína fueron incubadas adicionalmente a 37°C con 5% de CO₂ durante 72 horas.

Para examinar la extensión del crecimiento celular después de la incubación, el número de células fue determinado midiendo la absorbancia a 490 nm utilizando CellTiter96™ Aqueous One (Cat. No. G3581, Promega, USA).

TABLA 11

Análisis de la actividad in vitro de EPO

	Actividad específica (U/mg)	Actividad relativa a EPO tipo salvaje (%)
EPO tipo salvaje (BRP)	$8,9 \times 10^5$	100
EPO altamente glicosilado (Aranesp)	$6,8 \times 10^4$	7,6
EPO-PEG-IgG	$3,7 \times 10^4$	4,2

Tal como se puede apreciar en la tabla 11, todas las muestras utilizadas en los experimentos tienen actividad *in vitro* tal como se prueba por su promoción del crecimiento de las células originadas de tuétano de hueso humano. Además, en las actividades *in vitro* de EPO altamente glicosilada y EPO modificada por el complejo PEG-IgG eran más bajas que las de la EPO no modificada. No obstante, el conjugado de proteína EPO según la invención se espera que tenga una actividad *in vivo* superior al EPO sin modificar debido a su significativamente prolongada vida media en sangre. En el caso de conjugados de proteína EPO según la presente invención, la actividad incrementada de la proteína se cree que es debida a la incrementada estabilidad en sangre provocada por la conjugación con IgG que desempeña el papel de conservación de la afinidad de unión a un receptor, proporcionando espacio el polímero no peptídico.

(5) *Neutralización de la citotoxicidad por conjugados Fab' de la proteína*

Se examinaron las actividades *in vitro* de los conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG y Fab'-N-PEG-N-IgG preparados en los ejemplos 8 y 9, respectivamente, y complejo Fab'-S-PEG 40K preparado en el ejemplo comparativo 3, por medición de su capacidad de neutralización de la citotoxicidad de TNF- α en la línea celular de fibroblastos de ratón L929 (ATCC CRL-2148), del modo siguiente.

Cada uno de los conjugados Fab' y el complejo fueron sometidos a diluciones dobles en serie y cada una de las partes alícuotas de 100 μ l de las diluciones fue añadida a un pocillo de una placa de 96 pocillos. Se añadieron a los pocillos, respectivamente, hasta concentraciones de 10 ng/ml y 1 μ g/ml, RhTNF- α (R & D Systems) y actinomicina D (Sigma), un inhibidor de la síntesis de ARN. A continuación, la mezcla se hizo reaccionar a 37°C con 5% de CO₂ durante 30 minutos y se transfirieron a una microplaca de análisis. Se añadieron a cada pocillo 50 μ l de cada uno de los cultivos de la línea celular L929 hasta una concentración de 5×10^4 células/pocillo. Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. La solución de cultivo en el pocillo fue retirada y se añadieron 50 μ l de cada uno de 5 mg/ml MTT (sigma) en PBS. Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante 4 horas. Se añadieron 150 μ l de DMSO a cada pocillo y se disolvieron. Se midió la absorbancia a 540 nm para determinar la extensión de neutralización de la citotoxicidad de rhTNF- α por la prueba de los conjugados Fab' y complejo. Se utilizó como control el Fab' purificado obtenido en la etapa 1 del ejemplo 8.

Tal como se puede apreciar de los resultados de la figura 13, todos los conjugados de proteína y complejo mostraron absorbancias similares a las del Fab'. Este resultado muestra que los conjugados Fab'-PEG-IgG en los que la inmunoglobulina está enlazada al terminal-N o al grupo libre-SH adyacente al terminal-C de Fab' con intermedio de un separador PEG, mantiene la actividad biológica de Fab'.

Ejemplo de Prueba 5

Medición de la actividad in vivo en un modelo animal

(1) *Comparación de actividad in vivo de conjugados de proteína hGH*

10 ratas macho Sprague Dawley hipsectomizadas (5-semanas de edad, SLC, USA) fueron utilizadas para cada grupo en una prueba de aumento de peso corporal para medir las actividades *in vivo* del conjugado hGH-PEG-IgG, complejo hGH-PEG 40K y hGH de tipo salvaje. Un disolvente de control, hGH de tipo salvaje, conjugado hGH-PEG-IgG y complejo hGH-PEG 40K fueron inyectados por vía subcutánea en la espalda de la rata utilizando una jeringa 26G (1 ml, Korea Vaccine Co., Ltd.) de acuerdo con el programa de administración y dosis descrita en la tabla 12. Se midieron los pesos de las ratas antes de la inyección y 16 horas después de la inyección. Las ratas fueron sacrificadas con éter 24 horas después de la inyección final y se examinó la presencia de glándula pituitaria a ojo desnudo para excluir del resultado las ratas que tenían glándula pituitaria residual observable.

ES 2 324 298 T3

TABLA 12

Condiciones para la prueba de actividad *in vivo* de hGH en modelos animales

Grupo	Fármaco	Dosis diaria promedio (día)	Cantidad notable de administración	Programa de administración
1	Control del disolvente	-	PBS (0,5 ml)	Una vez al día, Administración diaria durante 12 días
2	hGH tipo salvaje	30 µg	360 mIU (30 µg/tiempo)	Una vez al día, Administración diaria durante 12 días
3	hGH-40K	30 µg	360 mIU (180 µg/tiempo)	Una vez cada 6 días, administración en dos veces
4	hGH-PEG-IgG	30 µg	360 mIU (180 µg/tiempo)	Una vez cada 6 días, administración en dos veces
5	hGH-PEG-IgG	10 µg	120 mIU (60 µg/tiempo)	Una vez cada 6 días, administración en dos veces

Se muestra en la figura 14 el cambio de peso después de la administración de cada muestra. Dado que el hGH de tipo salvaje utilizado como normal (control) debe ser administrado todos los días para mantener su actividad *in vivo*, fue administrado una vez al día durante 12 días y, de acuerdo con ello, las ratas del grupo 2 ganaron peso durante la administración. En ratas del grupo 3 administradas con complejo hGH-40 kDa PEG una vez cada 6 días, la ganancia de peso fue continua hasta 3 días después de la administración y la proporción de incremento disminuyó posteriormente. Estos resultados coincidieron con las expectativas basadas en los resultados de los ejemplos de prueba 1 y 2 de que el complejo hGH-PEG mostró una vida media más larga y mayor actividad *in vivo* que hGH de tipo salvaje. Especialmente, los efectos generados por la administración de conjugado hGH-PEG-IgG una vez cada 6 días en una cantidad correspondiente a un tercio de la dosis de tipo salvaje fue igual o menor que la administración diaria del tipo salvaje. Eso significa que la actividad *in vivo* del conjugado hGH-PEG-IgG es más de 3 veces superior a la del tipo salvaje.

ES 2 324 298 T3

(2) Comparación de actividad *in vivo* de conjugados de proteína del derivado G-CSF

Con el objetivo de examinar el efecto de los conjugados de proteína según la invención con ¹⁷Ser-G-CSF con sustitución del 17º aminoácido por serina, se compararon las actividades *in vivo* de G-CSF de tipo salvaje, un complejo de tipo comercial PEG-G-CSF de 20 kDa y conjugado ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-IgG. El conjugado ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-IgG de la presente invención fue disuelto en un disolvente que comprendía 20 mM de fosfato sódico, 1% de glicina y 0,25% de manitol (pH 7,0). El complejo de metionilo G-CSF de tipo salvaje (Filgrastim, Amgen, USA) y 20 kDa PEG G-CSF (Neulasta, Amgen, USA) modificado por PEG 20 kDa disuelto en el mismo disolvente se utilizaron como grupo comparativo. Se adquirieron ratones ICR de 7 semanas de edad de Samtaco Bio (Korea) y se sometieron a un periodo de aclimatación durante una semana antes del experimento. Al inicio del experimento, los pesos de ratones ICR se encontraban dentro de una gama de valores de 30-35 g. Se les permitió la ingestión libre de alimento (Samyang Corporation, Korea) y agua durante la aclimatación y experimento y se mantuvieron en una jaula en condiciones de 22 ± 3°C, 55 ± 5% de humedad relativa, ventilación 10-12 veces/hora, intensidad de iluminación 150-200 lux y ciclo de iluminación diario de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Cada uno de los grupos experimentales consistía en 5 ratones y se administró un agente anticanceroso complejo y cada una de las muestras a los ratones de acuerdo con el programa de administración y dosis indicado en la tabla 13. Se preparó un modelo animal de neutropenia por inyección en una sola vez de una mezcla de 130 mg/kg de ciclohexamida (CPA; Sigma, USA), 4,5 mg/kg de doxorubicina (DXR; Sigma, USA) y 1 mg/kg de vincristina (VCR, Sigma, USA) en la cavidad abdominal de ratones ICR. El grupo de tratamiento no recibió administración de agente anticáncer y no mostró reducción de neutrófilo. El control de disolvente es el grupo que recibió la administración del agente anticanceroso para reducir el número de neutrófilos y con coadyuvante solamente en vez de una muestra de fármaco. El G-CSF de tipo salvaje fue inyectado por vía subcutánea a una dosis de 100 µg/kg/por día alrededor de las 10 de la mañana todos los días desde el primer día hasta el quinto día después de la administración del agente anticanceroso. Los complejos ¹⁷S-G-CSF-IgG y 20 kDa PEG-G-CSF (Neulasta, Amgen, USA) fueron inyectados una vez en el primer día después de la administración del agente anticanceroso a una dosis de 1.000, µg/kg que corresponde a una dosis para cinco días cuando se consideró una cantidad doble de la dosis de tipo salvaje como dosis diaria (200, (µg/kg/por día). Se extrajeron 0,3-0,5 ml de sangre de la vena orbital de los ratones en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 después de la administración del agente anticanceroso. Se llevó a cabo la recogida de la sangre alrededor de las 4 de la tarde, 6 horas después de la inyección de una muestra de fármaco. Los números de células blancas en sangre (WBC), células rojas en sangre (RBC) y plaquetas se midieron utilizando un contador de hematocitos automático. Además, una muestra con aplicación de sangre fue preparada y sometida a tinción Giemsa. Cada uno de los hematocitos fue calculado de forma diferencial para obtener la proporción de neutrófilos y, a continuación, el número de neutrófilos fue calculado mediante la fórmula 1 basada en la proporción de neutrófilos.

35 Fórmula 1

$$\text{Número de neutrófilos (células/mm}^2\text{)} = \text{número total de WBC (células/mm}^3\text{)} \times \text{proporción de los neutrófilos (\%)} \times 1/100.$$

40

Para examinar la significación estadística de los valores observados para los grupos sin, tratamiento el grupo de control de disolvente y el grupo PEG-IgG derivado de ¹⁷S-G-CSF se llevó a cabo análisis estadístico con respecto al número de hematocitos y peso de cada grupo utilizando la prueba de Student.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 324 298 T3

TABLA 13

Condiciones para la prueba de la actividad de una proteína en el incremento de número de neutrófilos en un modelo animal

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Grupo	fármaco	Dosis diaria promedio (kg/día)	Cantidad total de administración	Programa de administración
1	Sin tratamiento	-	PBS (0,5 ml)	Una vez al día, administración diaria durante 5 días
2	Control de disolvente	-	PBS (0,5 ml)	Una vez al día, administración diaria durante 5 días
3	G-CSF de tipo salvaje (Filgrastim)	100 µg	500 µg/kg/5 veces cada vez	Una vez al día, administración diaria durante 5 días
4	20K PEG-G-CSF (Neulasta)	200 µg	1.000 µg/kg/cada vez	Administración de una sola vez
5	PEG-IgG derivado de ¹⁷ S-G-CSF	200 µg	1.000 µg/kg/cada vez	Administración de una sola vez

50

55

60

65

La recuperación de neutrófilos después de la administración de cada muestra se ha mostrado en la figura 15. Cuando se inyectó G-CSF de tipo salvaje como norma cada día durante 5 días, el número de neutrófilos aumentó gradualmente durante la administración y alcanzó finalmente un máximo en el día 5. Mientras que el complejo PEG-G-CSF 20 kDa administrado una vez con una cantidad doble de la dosis diaria mostró solamente dos tercios de la actividad *in vivo* observada para la administración diaria de G-CSF de tipo salvaje, el conjugado PEG-IgG derivado de ¹⁷S-G-CSF mostró una actividad 3 veces superior a la de la actividad *in vivo* del complejo PEG-G-CSF 20 kDa. Además, el conjugado de proteína de la invención generó efecto dos veces superior para recuperar neutrófilos que la administración diaria de G-CSF, lo que coincidió con la expectativa basada en el resultado de que el conjugado derivado ¹⁷S-G-CSF-PEG-IgG tenía vida media en sangre significativamente más larga y actividad *in vivo* superior que el tipo salvaje. Estos resultados muestran que se puede esperar el mismo efecto del conjugado de proteína de la invención, provocado por la unión covalente de IgG a PEG, de un derivado de proteína que tenga una modificación de aminoácido como en el caso del tipo salvaje. De acuerdo con ello, el conjugado de proteína de la presente invención puede ser utilizado de manera efectiva como formulación de largo periodo de acción que satisface los objetivos de incrementar significativamente la vida media en sangre y la actividad *in vivo* de G-CSF superando simultáneamente el problema de que G-CSF de tipo salvaje requiere administraciones demasados frecuentes.

(3) Comparación de la actividad *in vivo* de conjugado de proteína EPO

Para comparar las actividades *in vivo* de EPO de tipo salvaje, EPO altamente glicosilado (Aranesp, USA) y conjugado EPO-PEG-IgG se examinaron cambios en los componentes de la sangre de ratas a las que se administraron

ES 2 324 298 T3

las muestras de pruebas anteriormente indicadas. El experimento fue llevado a cabo del modo siguiente con ligera modificación del método descrito por J. C. Egrie y Browne (British Journal of Cancer (2001) B4 (Suplemento 1), 3-10).

5 El conjugado EPO-PEG-IgG de la presente invención fue disuelto en un disolvente que comprendía 20 mM de fosfato sódico, 1% de glicina y 0,25% de manitol (pH 7,0). Se utilizaron como grupos de comparación EPO de tipo salvaje y EPO altamente glicosilado disuelto en el mismo disolvente. Se adquirieron ratas machos de 7 semanas de edad de Daehan Biolink Inc. (Korea) y se sometieron a aclimatación durante una semana antes del experimento. Al inicio del experimento, los pesos de los ratones ICR se encontraban en una gama de 200-250 g. Se les permitió
10 ingesta libre de un alimento formulado (Cheiljedang Co., Korea) y agua durante la aclimatación y el experimento y se mantuvieron en una jaula en condiciones de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ de humedad relativa; ventilación 10-12 veces/hora, iluminación con una intensidad de 150-200 lux y ciclo de iluminación diaria de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Cada uno de los grupos experimentales consistió en 5 ratas y cada muestra de prueba preparada tal como se ha indicado fue inyectada por vía subcutánea en la parte posterior del hombro de la rata utilizando una jeringa 26G (1 ml, Korea
15 Vaccine Co., Ltd.) de acuerdo con el programa de administración y dosis que se describen en la tabla 14.

Después de la administración, se tomaron muestras de sangre entera de la vena de la cola de la rata en un tubo que contenía un agente anticoagulante (EDTA), cada 3 días durante un mes. Se midió el hematocrito de las muestras de sangre con un contador de hematocrito automático (Vet ABC).

TABLA 14

Condiciones para probar la actividad de una proteína que incremente el hematocrito en modelos de animales

Grupo	Fármaco	Cantidad total de administración	Programa de administración
1	Control de disolvente	PBS (0,5 ml)	Administración una sola vez
2	EPO de tipo salvaje	8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /cada 5 veces	Una vez al día, administración diaria durante 5 días
3	EPO altamente glicosilada (Anaesp)	8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /cada vez	Administración una sola vez
4	EPO-PEG-IgG	8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /cada vez	Administración una sola vez

50 La recuperación de hematocrito después de la administración de cada muestra se ha indicado en la figura 16. Cuando la EPO de tipo salvaje utilizada como normal fue inyectada cada día durante 5 días, el hematocrito aumentó gradualmente durante la administración y finalmente alcanzó un máximo en el día 9. En las ratas del grupo 3 administradas con la EPO altamente glicosilada el hematocrito incrementó rápidamente durante 6 días después de la inyección, a continuación disminuyó con rapidez. Como contraste, el conjugado de la invención EPO-PEG-IgG mostró una velocidad mayor y más rápida de incremento inicial de hematocrito que la EPO altamente glicosilada y mantuvo una actividad *in vivo* más elevada que las otras proteínas de prueba durante más de dos semanas. Estos resultados coincidieron con la expectación basada en los resultados del ejemplo de prueba 2 de que el conjugado EPO-PEG-IgG mostró
55 una vida media en sangre más larga que la EPO de tipo salvaje y que la EPO altamente glicosilada. De acuerdo con ello, el conjugado de proteína de la presente invención puede ser utilizado de manera efectiva como formulación de largo periodo de acción que satisface objetivos de incrementar significativamente la vida media en sangre y la actividad *in vivo* de la EPO superando al mismo tiempo el problema de la EPO de tipo salvaje que requiere una administración demasiado frecuente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conjugado de proteína que comprende: i) un polipéptido fisiológicamente activo excluyendo una inmunoglobulina y un fragmento de la misma; ii) un poli(etilen glicol); y iii) una inmunoglobulina, que están enlazados covalentemente entre sí en este orden y teniendo una prolongada vida media *in vivo* del polipéptido fisiológicamente activo.
- 10 2. Conjugado de proteína según la reivindicación 1, en el que el poli(etilen glicol) tiene dos grupos reactivos en ambos extremos a través de los cuales el polímero está enlazado de forma covalente al polipéptido fisiológicamente activo y a la inmunoglobulina.
- 15 3. Conjugado de proteína según la reivindicación 2, en el que la inmunoglobulina está unida covalentemente como mínimo a dos complejos del polipéptido fisiológicamente activo y el poli(etilen glicol).
- 20 4. Conjugado de proteína según la reivindicación 1, en el que la inmunoglobulina es seleccionada entre el grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
- 5 5. Conjugado de proteína según la reivindicación 4, en el que la inmunoglobulina es seleccionada entre el grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 25 6. Conjugado de proteína según la reivindicación 4, en el que la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana.
7. Conjugado de proteína según la reivindicación 1, en el que la inmunoglobulina es seleccionada entre el grupo que consiste en una inmunoglobulina que tiene glicosilación de tipo salvaje, una inmunoglobulina que tiene un grado de glicosilación aumentado o disminuido y una inmunoglobulina aglicosilada.
- 30 8. Conjugado de proteína según la reivindicación 7, en el que el incremento o disminución del grado de glicosilación o aglicosilación de una inmunoglobulina es llevado a cabo por un método seleccionado del grupo que consiste en un método químico, método enzimático y método biotecnológico.
- 35 9. Conjugado de proteína según la reivindicación 2, en el que el grupo reactivo de poli(etilen glicol) es seleccionado del grupo que consiste en aldehído, propion aldehído, butil aldehído, maleimida y derivado de succinimida.
- 40 10. Conjugado de proteína según la reivindicación 9, en el que el derivado de succinimida es succinimidil propionato, succinimidil carboximetilo, hidroxil succinimidilo o succinimidil carbonato.
- 45 11. Conjugado de proteína según la reivindicación 9, en el que el poli(etilen glicol) tiene grupos aldehído en ambos extremos.
- 50 12. Conjugado de proteína según la reivindicación 1, en el que el poli(etilen glicol) está enlazado covalentemente en sus extremos al terminal amino, residuo de lisina, residuo de histidina o residuo de cisteína de la inmunoglobulina y el terminal amino, residuo de lisina, residuo de histidina o residuo de cisteína del polipéptido fisiológicamente activo, respectivamente.
- 55 13. Conjugado de proteína según la reivindicación 1, en el que el polipéptido fisiológicamente activo es seleccionado entre el grupo que consiste en hormonas, citoquinas, enzimas, factor de crecimiento, factor regulador de transcripción, factor sanguíneo, vacunas, proteínas estructurales, proteínas ligandos y receptores.
- 60 14. Conjugado de proteína según la reivindicación 13, en el que el polipéptido fisiológicamente activo es seleccionado del grupo que consiste en hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento, hormona liberadora, péptido liberador de hormona de crecimiento, interferones, factores estimulantes de colonias, interleuquinas, glucoce-rebrosidasa, factor activador de macrófagos, péptidos macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, factor de supresión de alergia, glicoproteína de necrosis celular, inmunotoxina, linfotoxina, factor de necrosis tumoral, factor inhibidor tumoral, factor de crecimiento de transformación, antitripsina alfa-1, albúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina hiperglicosilada, factor VII, factor VIII, factor IX, activador plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, proteína C, proteína C-reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenaza, dismutasa superóxido, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento osteogénico, proteína estimuladora de osteogénesis, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílagos, proteína activadora de tejidos conjuntivos, hormona estimuladora de folículos, hormona luteinizante, hormona liberadora de FSH, factor de crecimiento nervioso, hormona paratiroides, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento insulinoide, hormona adrenocorticotrófica, glucagon, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptidos liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, tirotropina, receptor, antagonista receptor, antígeno de superficie celular y antígeno de vacuna derivado de virus.
- 65 15. Conjugado de proteína según la reivindicación 14, en el que polipéptido fisiológicamente activo es hormona de crecimiento humano, interferón alfa, interferón beta, factor estimulador de colonias de granulocitos o eritropoyetina.

ES 2 324 298 T3

16. Método para la preparación del conjugado de la reivindicación 1, que comprende (a) unir covalentemente, como mínimo, un polipéptido fisiológicamente activo, como mínimo una inmunoglobulina con, como mínimo, un poli(etilen glicol) que tiene grupos reactivos en ambos extremos; y (b) aislar un conjugado de proteína que comprende esencialmente el polipéptido activo, la inmunoglobulina y el poli(etilen glicol) que están entrelazados covalentemente.

17. Método según la reivindicación 16, en el que la etapa (a) comprende además: (a1) acoplar covalentemente un extremo del poli(etilen glicol) con una inmunoglobulina o un polipéptido fisiológicamente activo; (a2) aislar de la mezcla de reacción resultante un complejo que comprende el poli(etilen glicol) acoplado con la inmunoglobulina o el polipéptido fisiológicamente activo; y (a3) acoplar covalentemente el extremo libre del poli(etilen glicol) del complejo con la inmunoglobulina o polipéptido fisiológicamente activo para producir un conjugado de proteína que comprende el polipéptido fisiológicamente activo, el poli(etilen glicol) y la inmunoglobulina que están entrelazadas covalentemente.

18. Método según la reivindicación 17, en el que la proporción molar del polipéptido fisiológicamente activo con respecto al poli(etilen glicol) en la etapa (a1) está comprendida entre 1:2,5 y 1:5.

19. Método según la reivindicación 17, en el que la relación molar de la inmunoglobulina con respecto a poli(etilen glicol) de la etapa (a1) está comprendida entre 1:5 y 1:10.

20. Método según la reivindicación 17, en el que la relación molar del complejo obtenido en la etapa (a2) con respecto al polipéptido fisiológicamente activo o la inmunoglobulina de la etapa (a3) está comprendida entre 1:1 y 1:3.

21. Método según la reivindicación 17, en el que las etapas (a1) y (a3) son realizadas en presencia de un agente reductor.

22. Método según la reivindicación 21, en el que el agente reductor es cianoborohidruro sódico, borohidruro sódico, borato de dimetilamina o borato de piridina.

23. Compuesto farmacéutico que tiene una prolongada vida media de un polipéptido fisiológicamente activo que comprende un conjugado de proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un portador farmacéuticamente aceptable.

24. Método para prolongar la vida media *in vivo* de un polipéptido fisiológicamente activo que comprende la etapa de unir covalentemente poli(etilen glicol) que tiene grupo reactivos en ambos extremos con un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina; de manera que el polipéptido fisiológicamente activo no es una inmunoglobulina ni un fragmento de la misma.

25. Método según la reivindicación 24, en el que la inmunoglobulina está unida covalentemente, como mínimo, a dos complejos del polipéptido fisiológicamente activo y el poli(etilen glicol).

26. Método según la reivindicación 24, en el que la inmunoglobulina es seleccionada entre el grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM.

27. Método según la reivindicación 26, en el que la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana.

28. Método según la reivindicación 24, en el que la inmunoglobulina es seleccionada entre el grupo que consiste en una inmunoglobulina que tiene glicosilación de tipo salvaje, una inmunoglobulina que tiene un grado incrementado o disminuido de glicosilación y una inmunoglobulina aglicosilada.

29. Método según la reivindicación 28, en el que el incremento o disminución del grado de glicosilación o aglicosilación de una inmunoglobulina es llevado a cabo por un método seleccionado entre el grupo que consiste en un método químico, método enzimático y método biotecnológico.

30. Método según la reivindicación 25, en el que el grupo reactivo del poli(etilen glicol) es seleccionado entre el grupo que consiste en aldehído, propion aldehído, maleimida y derivado de succinimida.

31. Método según la reivindicación 24, en el que el polipéptido fisiológicamente activo es seleccionado entre el grupo que consiste en hormonas, citoquinas, enzimas, factor de crecimiento, factor regulador de transcripción, factor sanguíneo, vacunas, proteínas estructurales, proteínas ligando y receptores.

32. Método según la reivindicación 31, en el que el polipéptido fisiológicamente activo es seleccionado del grupo que consiste en hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento, hormona liberadora, péptido liberador de hormona de crecimiento, interferones, factores estimulantes de colonias, interleuquinas, glucocerebrosidasa, factor activador de macrófagos, péptidos macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, factor de supresión de alergia, glicoproteína de necrosis celular, inmunotoxina, linfotoxina, factor de necrosis tumoral, factor inhibidor tumoral, factor de crecimiento de transformación, antitripsina alfa-1, albúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina hiperglicosilada, factor VII, factor VIII, factor IX, activador plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, proteína C, proteína C-reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenasa, dismutasa superóxido, leptina, factor

ES 2 324 298 T3

de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento osteogénico, proteína estimuladora de osteogénesis, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílagos, proteína activadora de tejidos conjuntivos, hormona estimuladora de folículos, hormona luteinizante, hormona liberadora de FSH, factor de crecimiento nervioso, hormona paratiroides, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento insulinoide, 5 hormona adrenocorticotrofica, glucagon, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptidos liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, tiotropina, receptor, antagonista receptor, antígeno de superficie celular y antígeno de vacuna derivado de virus.

33. Método según la reivindicación 32, en el que el polipéptido fisiológicamente activo es hormona de crecimiento humano, interferón alfa, interferón beta, factor estimulante de colonias de granulocitos o eritropoyetina. 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

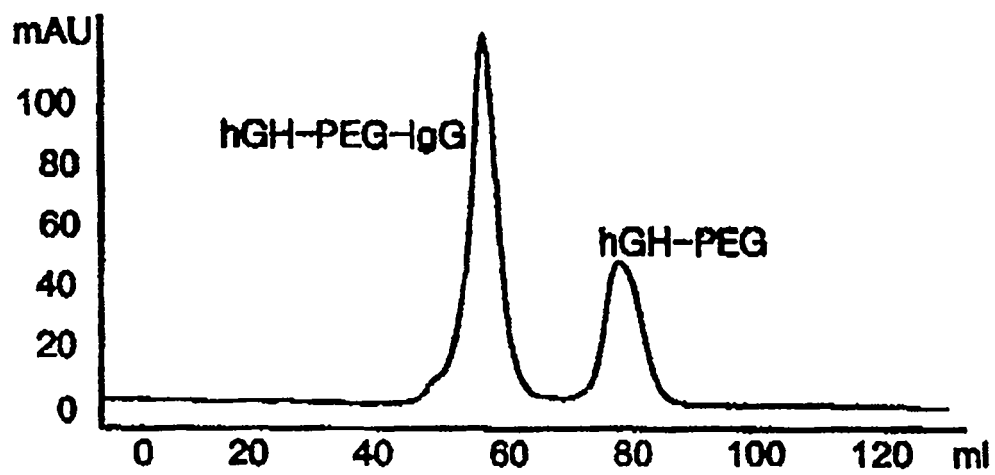


FIG. 2

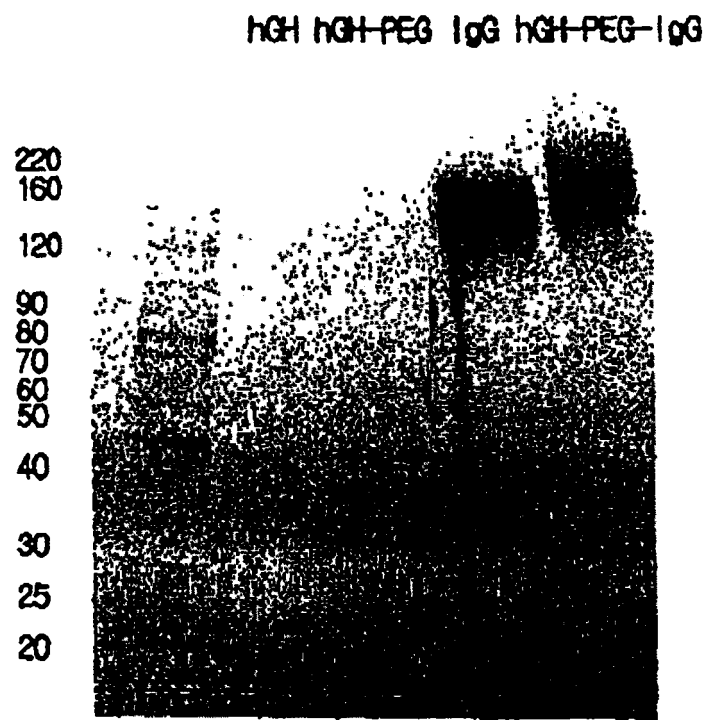


FIG. 3

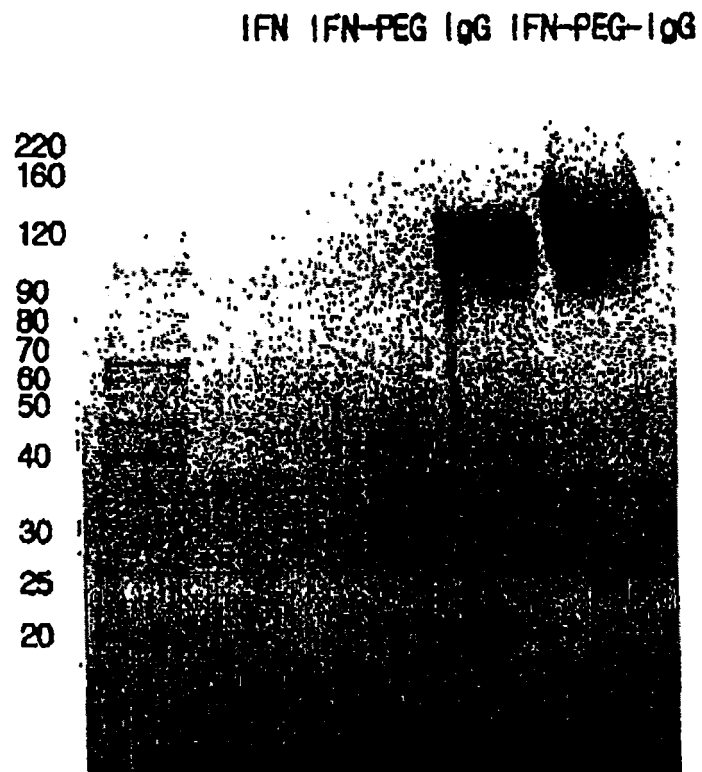


FIG. 4

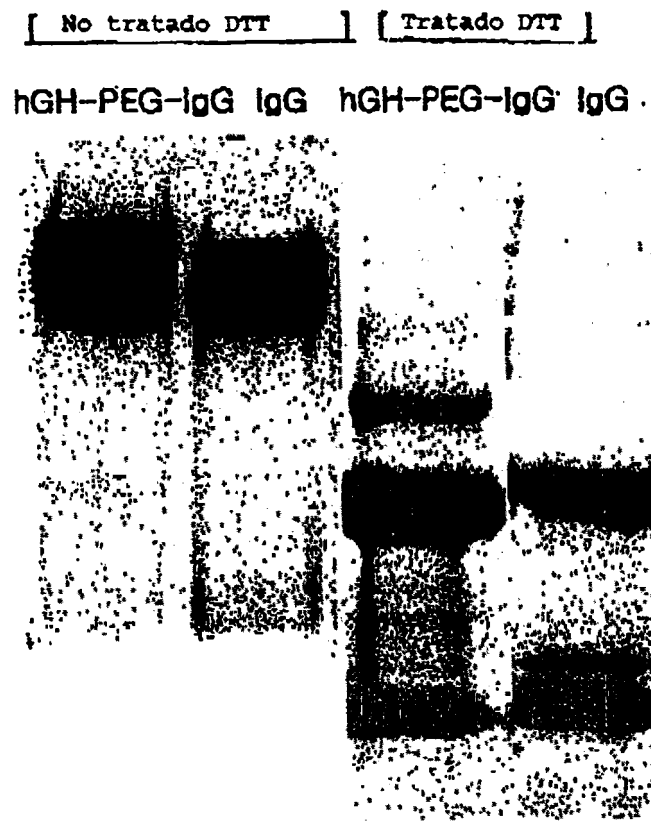


FIG. 5

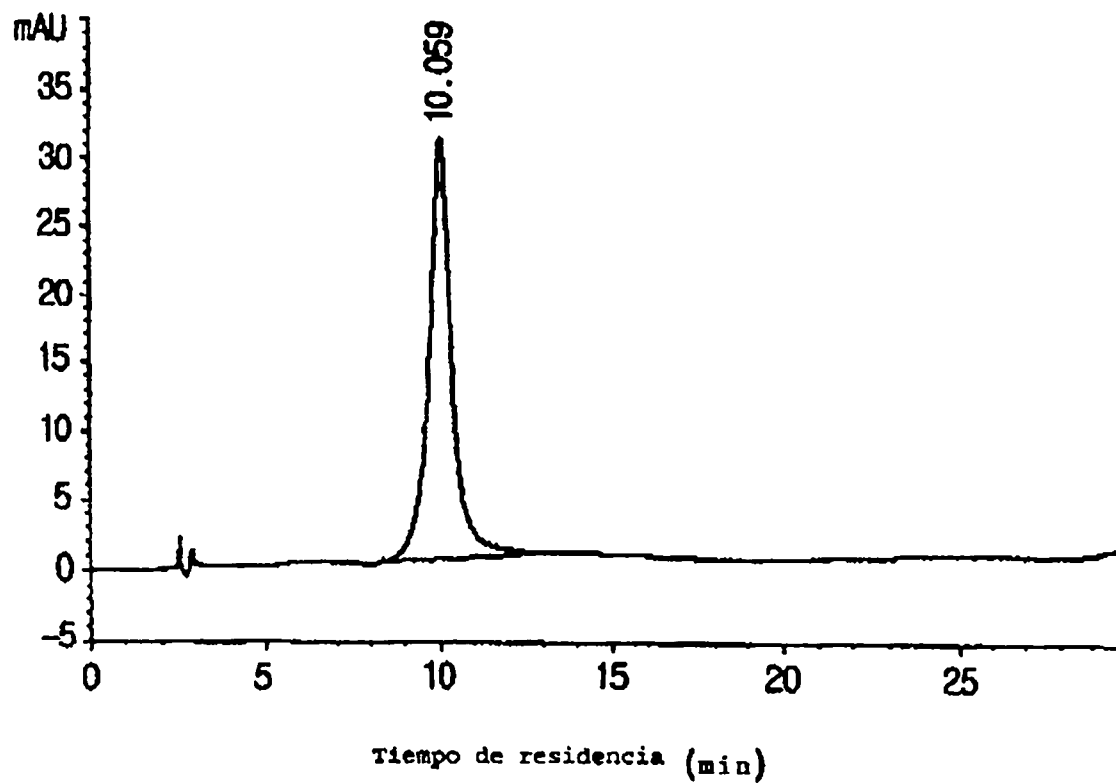


FIG. 6

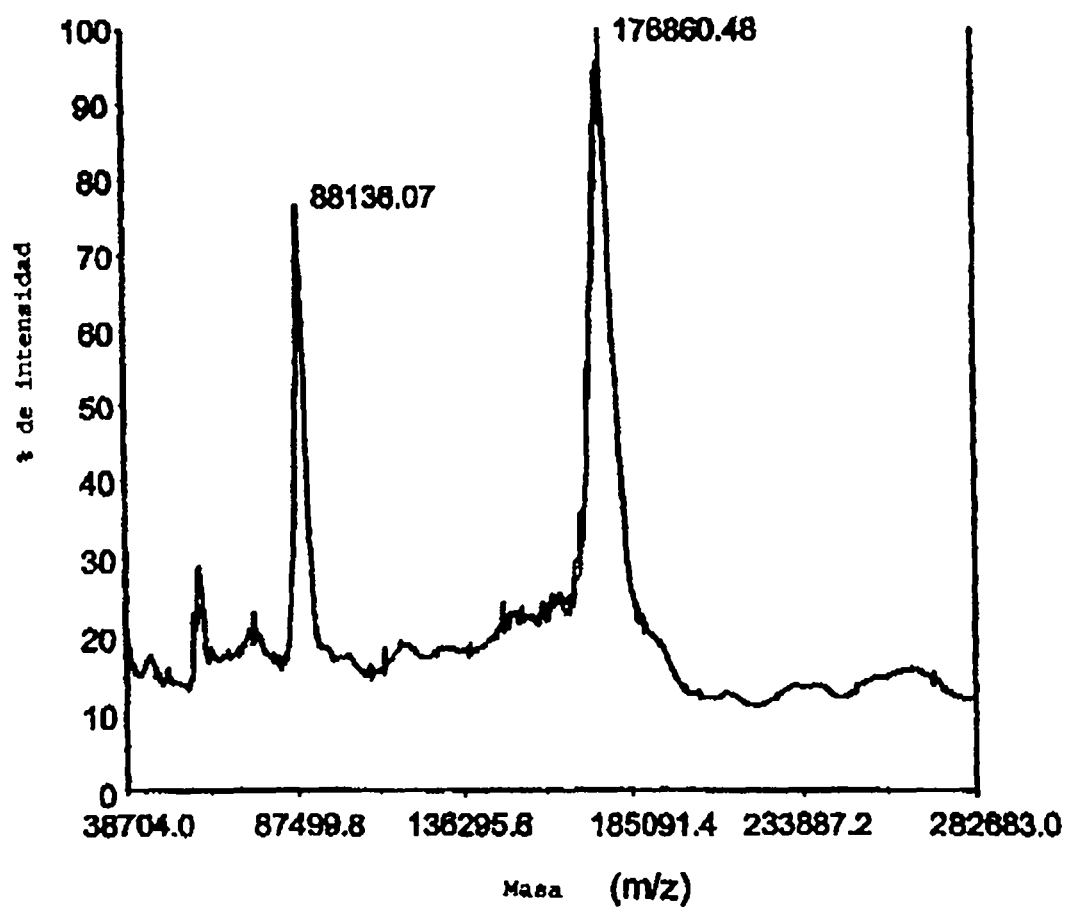


FIG. 7

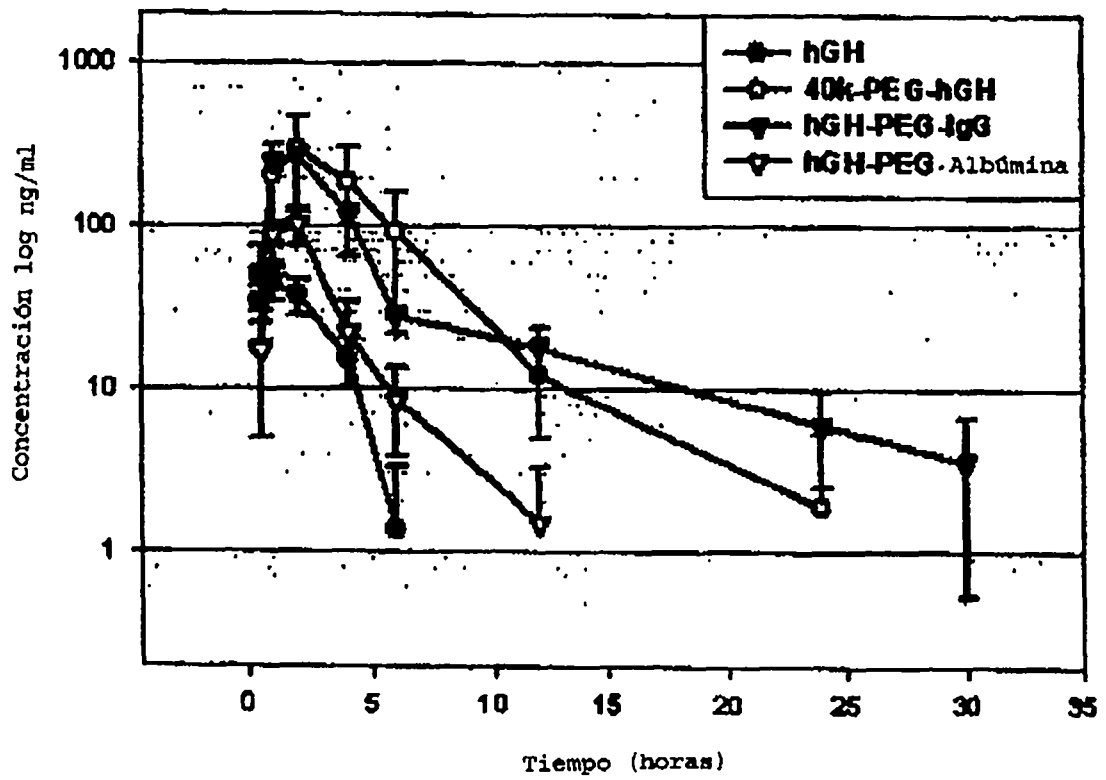


FIG. 8

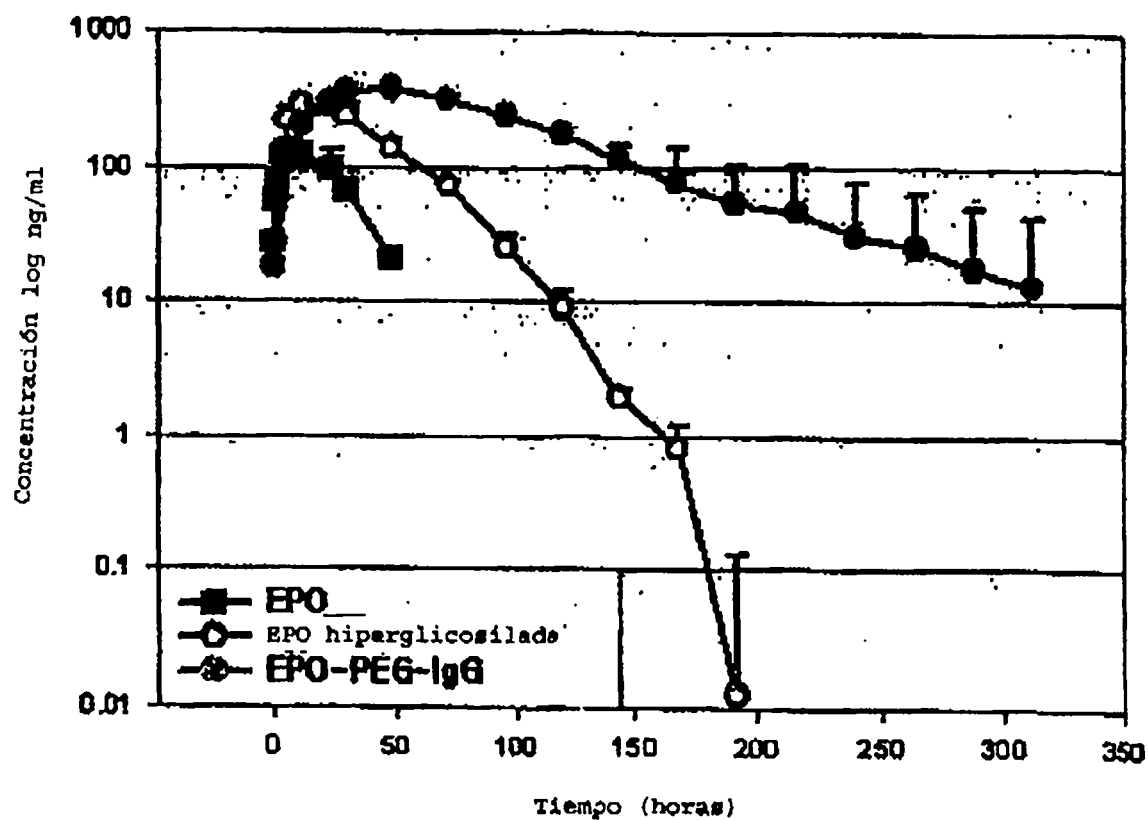


FIG. 9

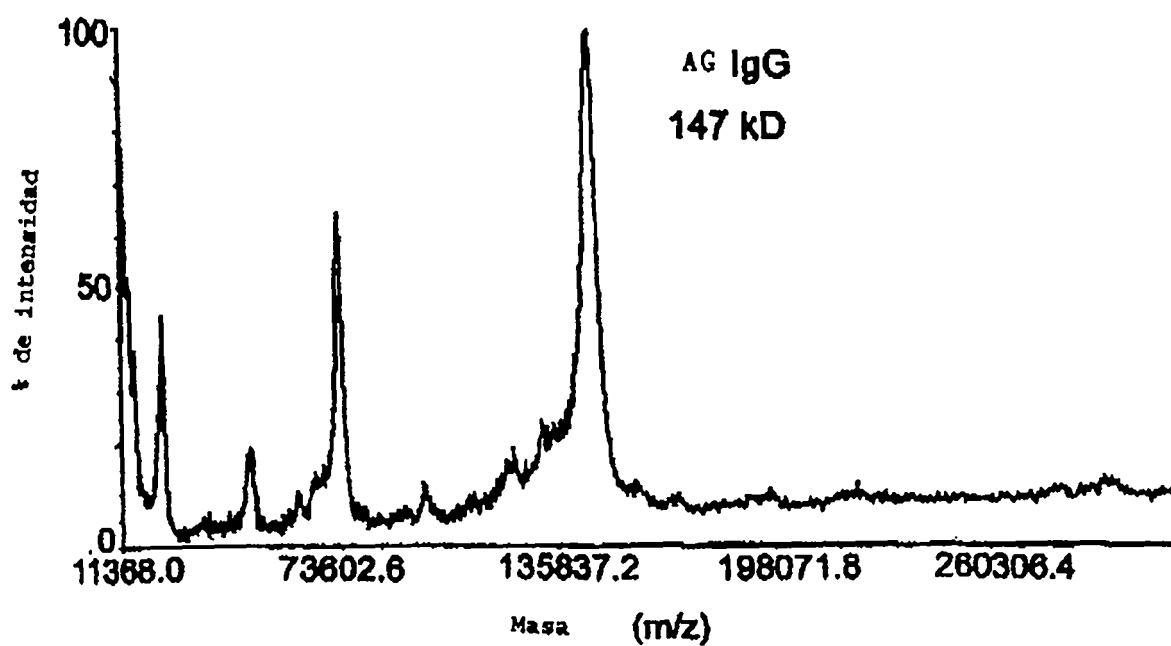
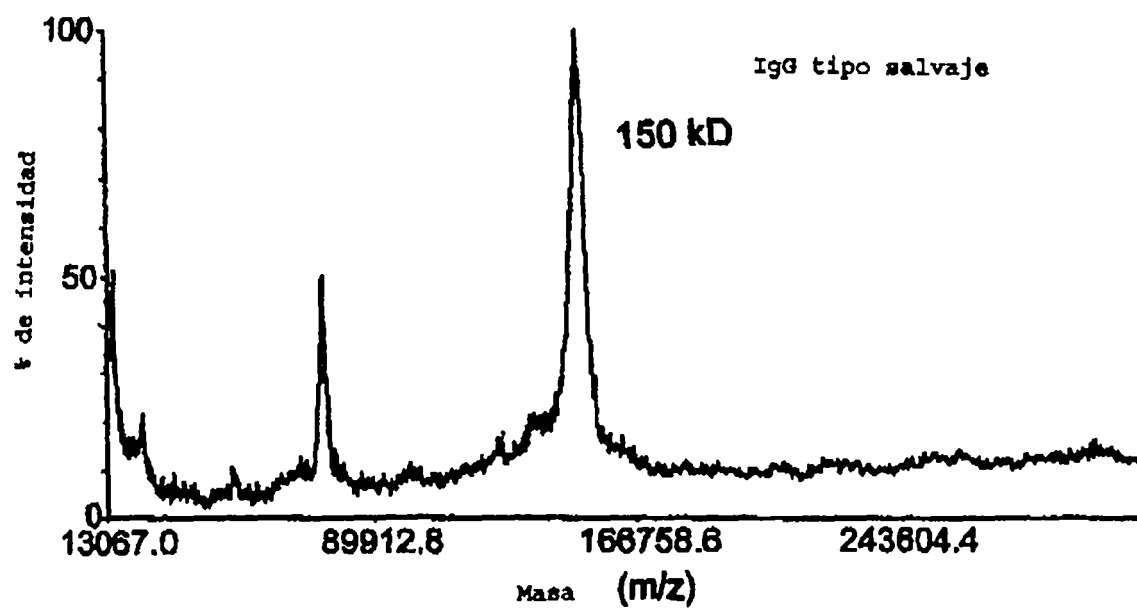


FIG. 10

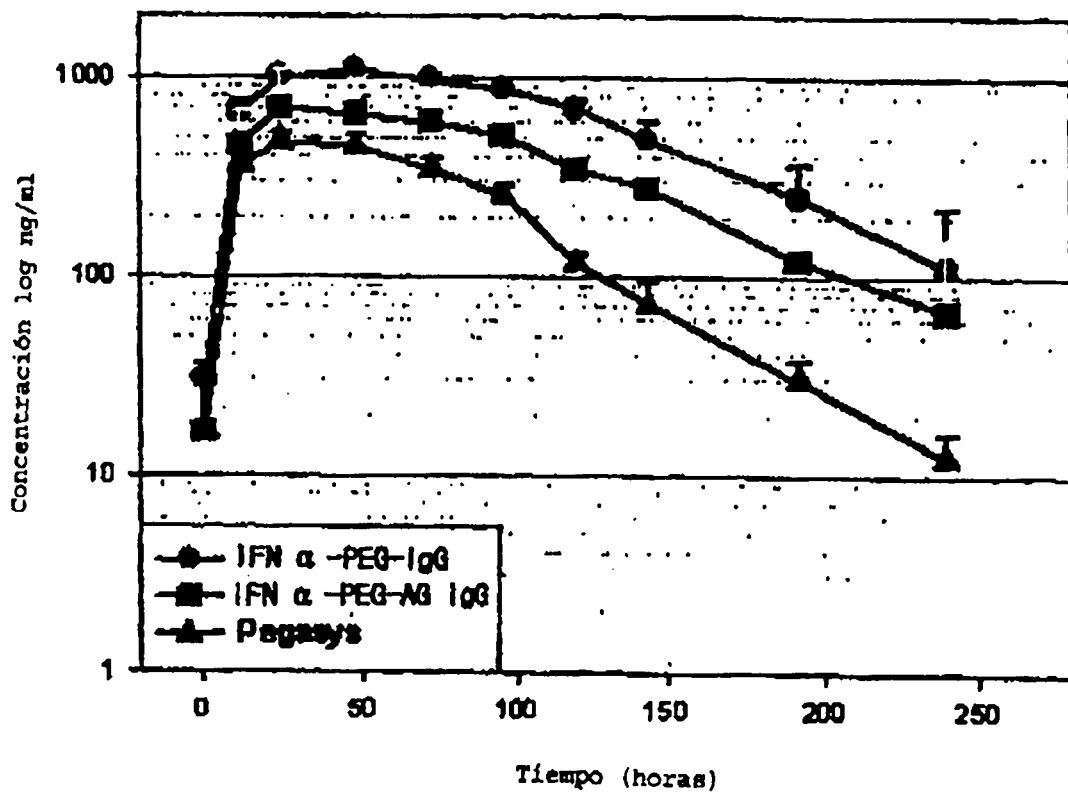


FIG. 11

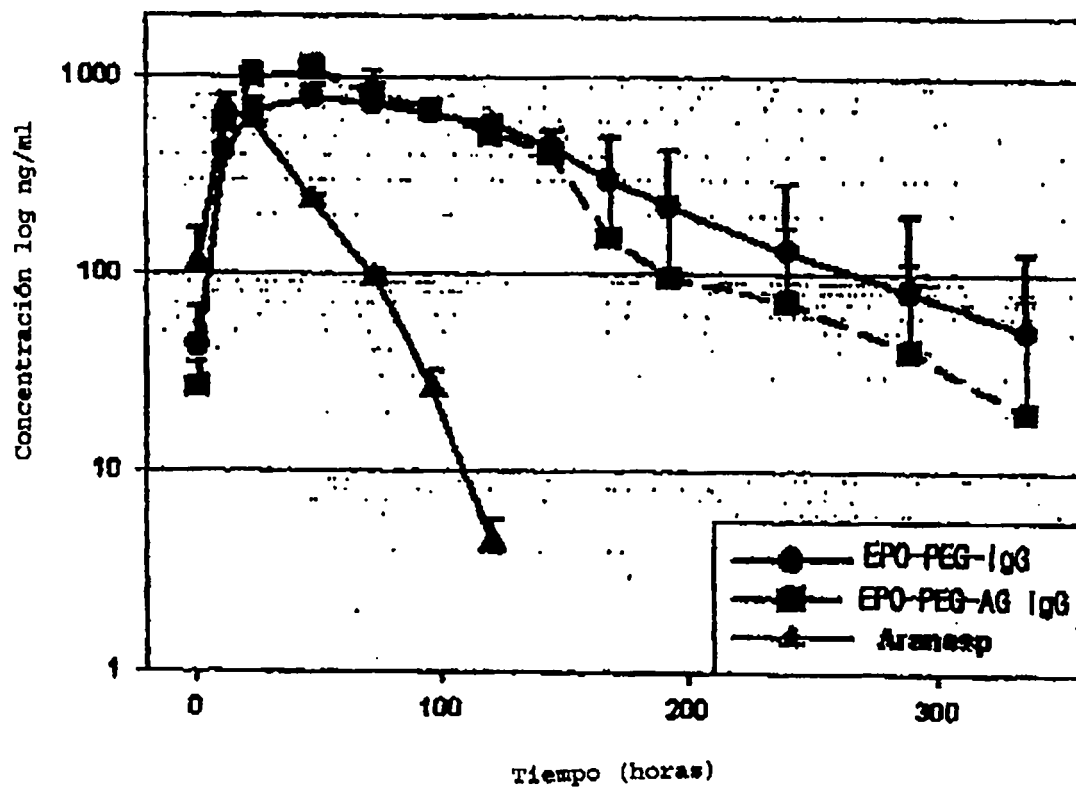


FIG. 12

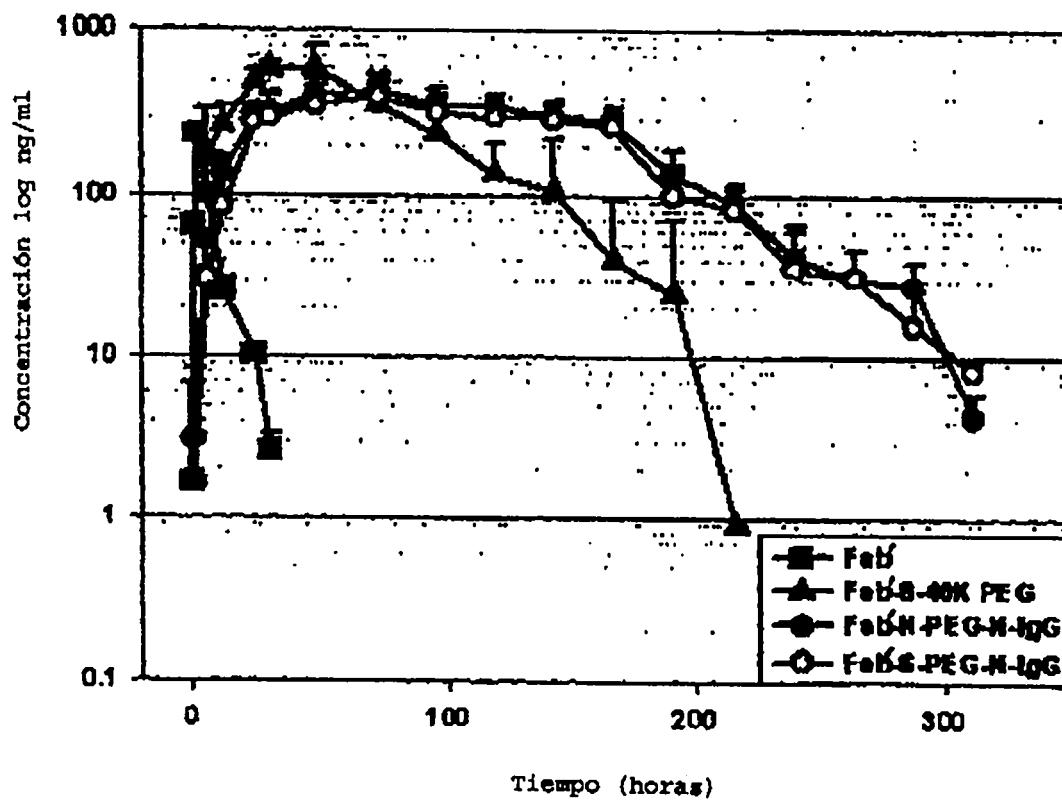


FIG. 13

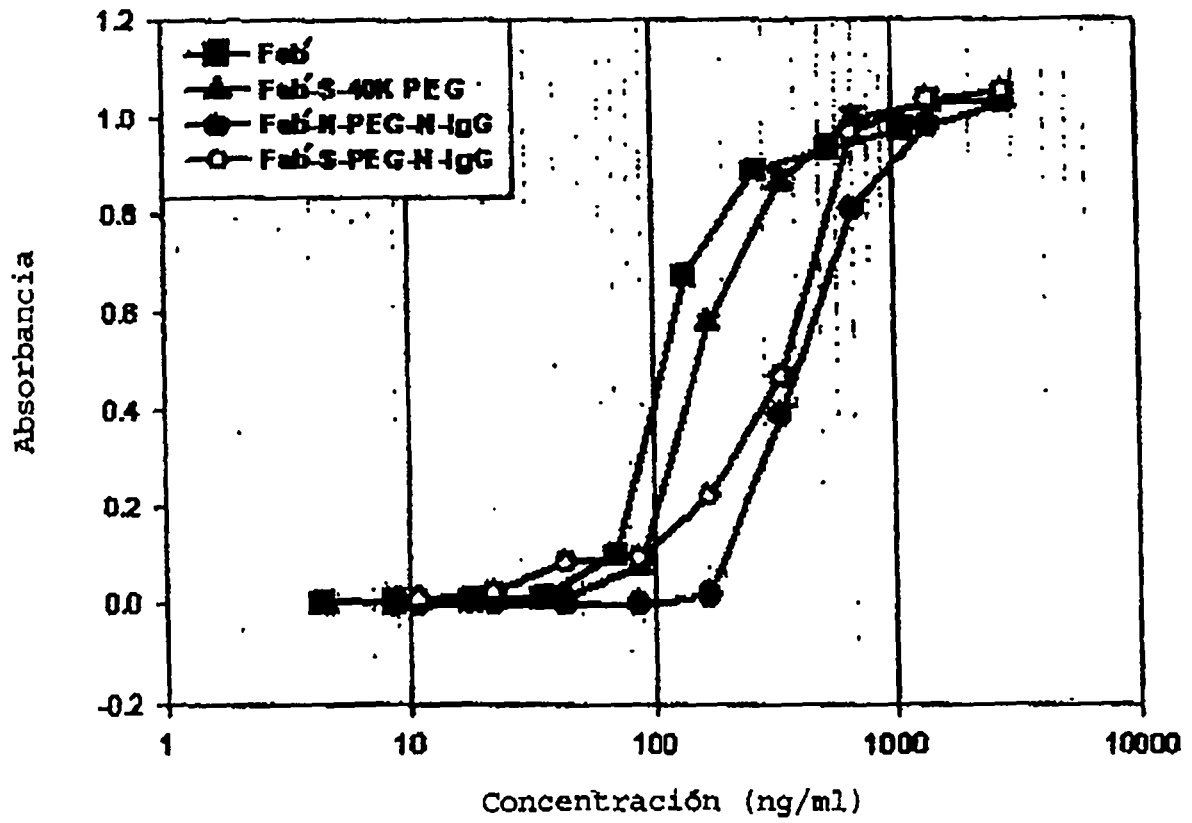


FIG. 14

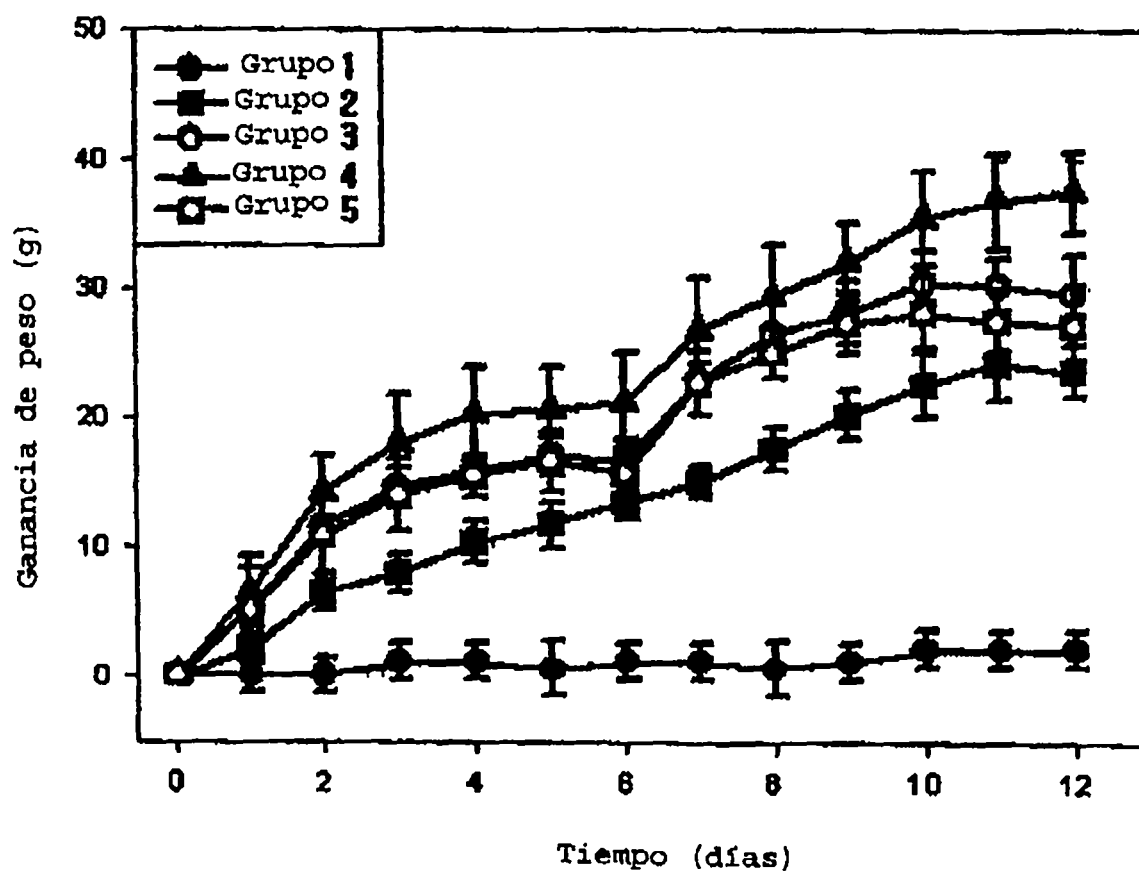


FIG. 15

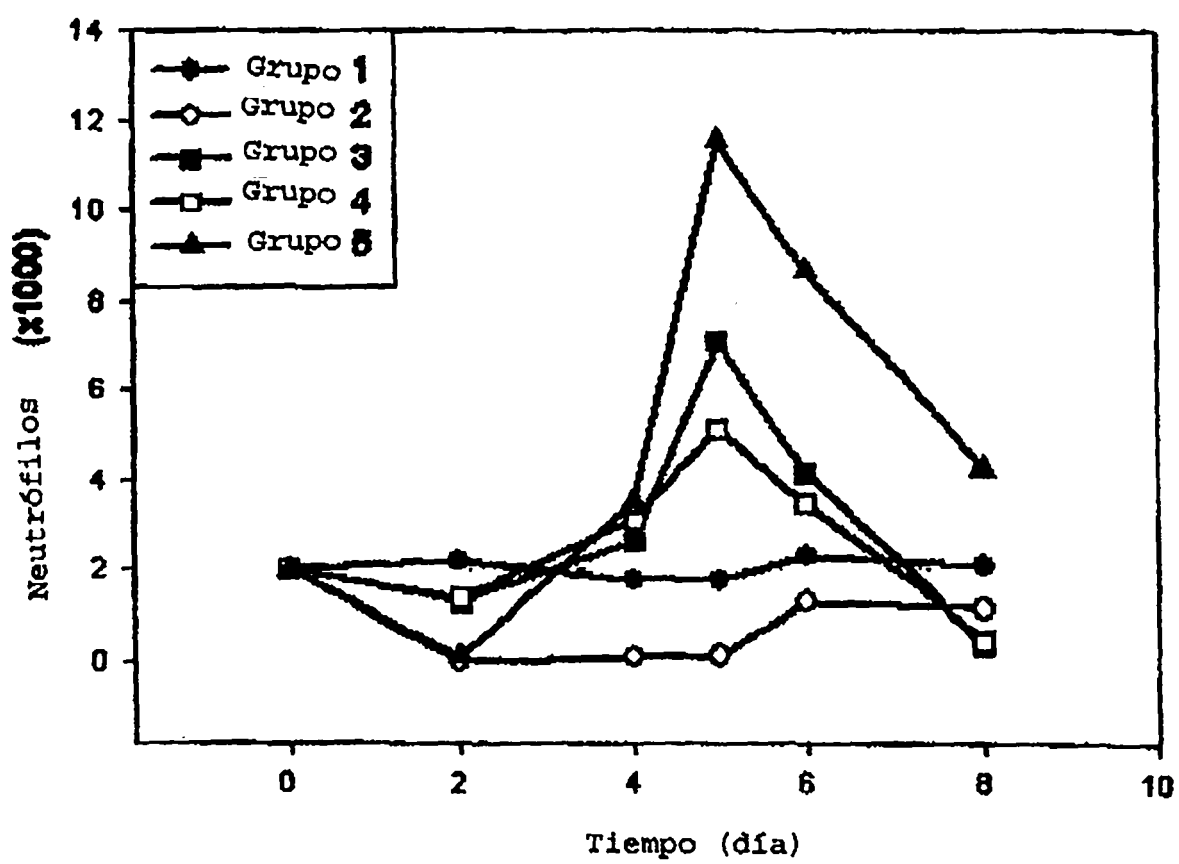


FIG. 16

