



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 215**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03778269 .5**

86 Fecha de presentación : **25.09.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1545623**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Conjugados de la proteína de fijación del factor de crecimiento de tipo insulina 4 y poli(etilenglicol).**

30 Prioridad: **27.09.2002 EP 02021844**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Lang, Kurt;**  
**Schaubmar, Andreas y**  
**Schumacher, Ralf**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 285 215 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conjugados de la proteína de fijación del factor de crecimiento de tipo insulina 4 y poli(etilenglicol)

Esta invención se refiere a conjugados de proteína de fijación de factor de crecimiento de tipo insulina 4 (IGFBP-4) con poli(etilenglicol) (PEG), a composiciones farmacéuticas que contienen tales conjugados y a métodos para la producción y uso de dichos conjugados.

## Antecedentes de la invención

Los factores de crecimiento de tipo insulina (IGF) son mitógenos que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celulares. Hay seis proteínas (IGFBP) de fijación de los IGF que influyen en las acciones de los IGF (Yu, H. y Rohan, T., J. Natl. Cancer Inst. 92, 1472-1489, 2000).

La IGFBP-4 humana madura se ha descrito en la bibliografía técnica como proteína monómera de 24 kDa y se compone de 237 aminoácidos. El peso molecular de la proteína, calculado a partir de su secuencia de aminoácidos es de 26 kDa. Su acción biológica ha sido descrita por Yu, H. y Rohan, T., en J. Natl. Cancer Inst. 92, 1472-1489, 2000. Conover, C.A. y col., han descrito en J. Biol. Chem. 270, 4395-4400, 1995, los mutantes resistentes a la proteasa de la IGFBP-4. Los cuatro mutantes de la IGFBP-4 alrededor del sitio de rotura supuesto de Met135-Lys136 y la proteína de tipo salvaje fijan a los IGF con afinidades equivalentes. La resistencia de la IGFBP-4 a la rotura proteolítica se logra también por delección de los aminoácidos 12-141, tal como describen Miyakoshi, N. y col. en Endocrinology 142, 2641-2648, 2001. Byun, D. y col., en J. Endocrinology 169, 135-143, 2001, han determinado diversas regiones que participan en la fijación del IGF realizada por la IGFBP-4. La delección de los segmentos Leu72-Ser91 o Leu72-His74 se traduce en una pérdida de la fijación del IGF. También la mutación de ciertos restos cisteína del dominio terminal N y C reduce de modo significativo la fijación de los IGF.

La IGFBP-4 se aisló por primera vez a partir del medio condicionado con células TE-89 de osteosarcoma humano (Mohan, S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8338-8342, 1989). Se sabe que la IGFBP-4 existe en estado natural en forma no glucosilada, con un peso molecular aparente de 24 kDa o en forma glucosilada, que pesa 28 kDa. Se produce la IGFBP-4 recombinante por expresión en varios sistemas eucariotas y procariotas. La IGFBP-4 humana se produce por expresión en *E. coli* como proteína de fusión con la glutatión-S-transferasa (Honda, Y. y col., J. Clin. Endocrinol. Metab. 81, 1389-1396, 1996) o como proteína de fusión con un marcador hexahistidina (Qin, X. y col., J. Biol. Chem. 273, 23509-23516, 1998) o por expresión en levadura en forma de proteína de fusión con ubiquitina (Kiefer, M.C. y col., J. Biol. Chem. 267, 12692-12699, 1992). Se describe con detalle la secuencia de la IGFBP-4 humana en la base de datos SwissProt (<http://www.expasy.ch>) y se identifica con el número de acceso P 22692. Las posiciones de los aminoácidos descritas a continuación se refieren a la secuencia de las formas maduras de la IGFBP-4 (la secuencia después de eliminar los péptidos de señalización comienza con el aminoácido de la posición 1) o se refieren a la numeración empleada en las referencias que se citan.

La IGFBP-4 inhibe la proliferación de células óseas estimulada por el IGF "in vitro" (Mohan, S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8338-8342, 1989), el crecimiento del cartílago de pollo mediado por el IGF (Schiltz, P.M. y col., J. Bone Mineral Res. 8, 391-396, 1993). y el crecimiento de las células HT-29 (Culouscou, J.M. y Shoyab, M., Cancer Res. 51, 2813-2819, 1991). La sobreexpresión de la IGFBP-4 en la línea celular epitelial de próstata M 12 maligna reduce la proliferación de las células inducida por el IGF, inhibe la formación de colonias en agar blando, incrementa la apoptosis en respuesta a la 6-hidroxiurea y retrasa la formación de tumores por acción de las células transformadas (Damon, S.E. y col., Endocrinology 139, 3456-3464, 1998). La sobreexpresión de la IGFBP-4 en células de carcinoma colorrectal humano reduce la proliferación de estas células y suprime la formación de colonias (Diehl, D. y col., J. Cancer Res. Clinical Oncol. 127, supl. 1, p. 54, 2001).

La modificación covalente de las proteínas con poli(etilenglicol) (PEG) ha demostrado ser un método útil para extender las vidas medias circulantes de las proteínas en el organismo (Hershfield, M.S. y col., New England Journal of Medicine 316, 589-596, 1987; y Meyers, F.J. y col., Clin. Pharmacol. Ther. 49, 307-313, 1991). Otras ventajas de la PEGilación son un aumento de la solubilidad y una disminución de la inmunogenicidad de las proteínas (Katre, N.V., J. Immunol. 144, 209-213, 1990). Un método habitual de PEGilación de proteínas consiste en el uso de poli(etilenglicol) activado con reactivos amino-reactivos, por ejemplo la N-hidroxisuccinimida (NHS). Con tales reactivos se inserta el poli(etilenglicol) sobre grupos amino primarios libres de las proteínas, por ejemplo sobre el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N y sobre los grupos  $\epsilon$ -amino de los restos lisina. Sin embargo, una limitación importante para esta estrategia estriba en que las proteínas contienen por ejemplo una cantidad considerable de restos lisina y, por ello, los grupos poli(etilenglicol) se fijan a la proteína de una manera no específica en todos los grupos  $\epsilon$ -amino libres, resultando de ello una mezcla de productos heterólogos de proteínas PEGiladas de forma aleatoria. Por lo tanto, muchas proteínas NHS-PEGiladas no son adecuadas para fines comerciales, porque su actividad específica es baja. La inactivación se produce por modificación covalente de uno o más restos lisina del resto amino del extremo N requerido para la actividad biológica o por la inserción covalente de restos poli(etilenglicol) junto o en el sitio activo de la proteína. Por ejemplo, se ha encontrado que la modificación de la hormona del crecimiento humano empleando reactivos de NHS-PEGilación reduce la actividad biológica de la proteína en más de 10 veces (Clark, R. y col., J. Biol. Chem. 271, 21969-21977, 1996). La hormona del crecimiento humano contiene 9 lisinas además del aminoácido del extremo N. Ciertas lisinas están situadas en regiones de la proteína, conocidas por ser críticas para la fijación de un receptor (Cunningham, B.C. y col., Science 254, 821-825, 1991). Además, la modificación de la eritropoyetina con el uso de reactivos de poli

(etilenglicol) reactivos con amino produce también una pérdida casi completa de la actividad biológica (Wojchowski, D.M. y col., Biochim. Biophys. Acta 910, 224-232, 1987). La modificación covalente del interferón- $\alpha 2$  con reactivos de PEGilación reactivos con el grupo amino produce una pérdida del 40-75% de la bioactividad (patente US-5 382 657). Una modificación similar del G-CSF se traduce en una pérdida de actividad superior al 60% (Tanaka, H. y col., Cancer Res. 51, 3710-3714, 1991) y de la interleucina-2 en una pérdida de bioactividad superior al 90% (Goodson, R.J. y Katre, N.V., Biotechnology 8, 343-346, 1990).

Van den Berg, C.L. y col. (Europ. J. Cancer 33, 1108-1113, 1997; y WO 94/22466) han unido mediante enlace covalente el poli(etilenglicol) reactivo con la cisteína (20 kDa) con la IGFBP-1, lo cual conduce a una vida media prolongada en suero, de 13,6 h. Tal como describen en WO 94/22466 se cree que los aminoácidos del dominio medio de la IGFBP-1 pueden sustituirse con cisteína por PEGilación específica, sin interferir en la fijación ni en la inhibición del IGF. Los aminoácidos de las posiciones 98 y 101 se sustituyen por cisteínas, porque la serina 101 es un sitio de fosforilación natural importante, expuesto en la superficie de la proteína y que no participa en la fijación de los IGF. La IGFBP-1 monoPEGilada de 20 kDa posee una actividad "*in vitro*" comparable pero no mayor que la IGFBP-1 de tipo salvaje en lo que respecta a la inhibición del crecimiento de las células tumorales. Según van den Berg, C.L. y col., Europ. J. Cancer 33, 1108-1113, 1997, su IGFBP-1 PEGilada "*in vivo*" no es capaz de inhibir directamente la acción del IGF en la célula tumoral.

Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un derivado mejorado de la IGFBP que tenga actividad inhibidora del crecimiento tumoral y una vida media prolongada "*in vivo*", que pueda administrarse con preferencia en forma de unas pocas aplicaciones de bolo por semana y que sea capaz de suprimir el crecimiento tumoral, la angiogénesis y/o la metástasis.

### Resumen de la invención

Ahora se ha encontrado de modo sorprendente que la IGFBP-4 PEGilada de 30 kDa a 40 kDa (IGFBP-4 PEGilada de 30-40 kDa), con preferencia monoPEGilada, de la invención tiene propiedades superiores en lo que respecta a la aplicabilidad terapéutica para el tratamiento de tumores, por ejemplo la supresión del crecimiento tumoral, la angiogénesis y/o la metástasis "*in vivo*", que no se encuentran cuando se aplica la IGFBP-4 sola o la IGFBP-4 PEGilada de peso más bajo. Además, los conjugados de la invención evitan efectos secundarios molestos "*in vivo*", como puedan ser la alteración de las células renales normales, que se observa en el caso de la IGFBP-4 PEGilada de peso más bajo.

La presente invención proporciona un conjugado que consiste en la proteína 4 de fijación del factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP-4) y uno o dos grupos poli(etilenglicol), dichos grupos poli(etilenglicol) tienen un peso molecular total de 30 a 40 kDa. Con preferencia, los grupos poli(etilenglicol) están conjugados con la IGFBP-4 mediante grupos amino primarios (PEGilación reactiva con grupos amino). Es también preferido que el conjugado sea un conjugado de la IGFBP-4 monoPEGilada. Es preferido sobre todo que el conjugado sea un conjugado de la IGFBP-4 monoPEGilada en el extremo N, unido mediante el grupo amino del extremo N de la IGFBP-4.

Son también preferidos los conjugados que incluyen un PEG ramificado.

La invención se refiere además a métodos para la producción de conjugados según la invención.

La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen un conjugado según la invención.

La invención se refiere también a métodos para la producción de composición farmacéutica que contengan un conjugado de la invención.

La invención se refiere también al uso de un conjugado según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, con preferencia el cáncer de páncreas.

La invención se refiere además a métodos para el tratamiento del cáncer humano (p. ej. cáncer de mama, de pulmón, de próstata o de colon), con preferencia del cáncer de páncreas, caracterizados porque se administra una cantidad farmacéuticamente eficaz de la IGFBP-4 PEGilada de 30-40 kDa a un paciente que necesite tal tratamiento, con preferencia en aplicaciones de bolo, de una a siete, por semana.

### Descripción detallada de la invención

"IGFBP-4 PEGilada reactiva con amino" o "PEGilación reactiva con amino" empleados aquí indican que la IGFBP-4 está unida mediante enlace covalente a uno, dos o tres grupos poli(etilenglicol) por unión a la molécula de la IGFBP-4 mediante la reacción con sus grupos amino. Los grupos PEG pueden insertarse en diferentes sitios de la molécula de la IGFBP-4 que sean grupos amino primarios, con preferencia en los sitios más reactivos, p. ej. los grupos  $\epsilon$ -amino de las cadenas laterales lisina o en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N. Debido a los métodos sintéticos empleados, la IGFBP-4 PEGilada puede estar formada por una mezcla de IGFBP-4 mono- y di-PEGiladas, los sitios de PEGilación pueden ser diferentes en moléculas diferentes o bien pueden ser sustancialmente homogéneos en lo que respecta a la cantidad de cadenas laterales de poli(etilenglicol) por molécula y/o el sitio de PEGilación de la molécula.

Tal como se emplea aquí, PEGilación reactiva con amino significa un método para la inserción aleatoria de cadenas de poli(etilenglicol) en grupo(s) amino primario(s) de la proteína IGFBP-4 diana mediante el uso de poli(etilenglicol) reactivo (activado), con preferencia mediante el uso de ésteres de N-hidroxisuccinimidilo de, con preferencia, el metoxipoli(etilenglicol). Con la reacción de unión se inserta el poli(etilenglicol) en grupos amino primario reactivos, por ejemplo los grupos  $\epsilon$ -amino de los restos lisina o los grupos  $\alpha$ -amino de los aminoácidos del extremo N de la IGFBP-4. Tal conjugación del PEG con las proteínas es bien conocida en la técnica. Se da por ejemplo una visión de conjunto de estos métodos en el artículo de Veronese, F.M., *Biomaterials* 22, 405-417, 2001. Según Veronese, la conjugación del PEG con grupos amino primario de las proteínas se realiza empleando PEGs activados que realizan un alquilación de dichos grupos amino primarios. Para tal reacción pueden utilizarse PEGs alquilantes activados, tales como el PEG-aldehído, el cloruro de PEG-tresilo y el PEG-epóxido. Pueden utilizarse también PEGs acilantes, por ejemplo ésteres de hidroxisuccinimidilo de PEGs carboxilados o PEGs en los que el grupo hidroxilo terminal se haya activado con cloroformatos o carbonilimidazoles. Otros reactivos PEG útiles son los PEGs con prolongaciones aminoácido. Tales reactivos pueden contener los llamados PEGs ramificados, en tal caso por lo menos dos moléculas de PEG idénticas o diferentes se unen entre sí mediante un espaciador peptídico (con preferencia la lisina) y, por ejemplo, se unen a la IGFBP-4 en forma de carboxilato activado del espaciador lisina. La monounión por el extremo N se describe también en Kinstler, O. y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 477-485, 2002.

La presencia de varios grupos amino primario potencialmente reactivos en la proteína diana (en el caso de la IGFBP-4 existen 12 lisinas + 1 aminoácido terminal) conduce a una serie de isómeros de la IGFBP-4 PEGilada, que difieren en el punto de inserción de la cadena de poli(etilenglicol) y que a continuación se llamarán “isómeros posicionales”. El punto de inserción en una molécula individual de la IGFBP-4 no es claramente previsible y por esta razón se denomina “aleatorio”. Nueve de las doce lisinas (Lys 67, Lys 124, Lys 134, Lys 136, Lys 192, Lys 204, Lys 210, Lys 215 y Lys 223) están situadas en regiones, de las que se ha dicho que son necesarias para la formación de complejos con el IGF (Qin, X. y col., *J. Biol. Chem.* 273, 23509-23516, 1998). Por tanto, cabe esperar una fuerte reducción de la afinidad del IGF con la IGFBP-4 PEGilada aleatoriamente. De modo sorprendente, este no es caso para los conjugados de la presente invención.

Es también preferido insertar los grupos PEG a la IGFBP-4 mediante una PEGilación de reacción con un tiol. La PEGilación por reacción con un tiol tal como se emplea aquí indica un método para insertar un poli(etilenglicol) a una proteína diana (IGFBP-4 mutante) mediante el uso de un poli(etilenglicol) activado, reactivo con un tiol, con preferencia mediante el uso de ésteres de la N-maleimida con preferencia del metoxipoli(etilenglicol). Con la reacción de unión se inserta con preferencia el poli(etilenglicol) en la Cys 110 y/o la Cys 117. Tal conjugación de PEG con sulfhidrilo de proteínas es ampliamente conocida en el estado de la técnica. Un repaso de tales métodos se describe por ejemplo en Veronese, F.M., *Biomaterials* 22, 405-417, 2001. Según Veronese, la conjugación del PEG con los grupos tiol de las proteínas puede realizarse empleando PEGs activados con tiol. Para tal reacción pueden emplearse PEGs activados reactivos con tiol, por ejemplo el PEG-disulfuro de ortopiridilo, la PEG-maleimida, la PEG-vinilsulfona y la PEG-yodoacetamida.

La invención proporciona formas PEGiladas de la IGFBP-4 que tienen propiedades mejoradas. Tales conjugados de IGFBP-4 PEGilada contienen uno o dos grupos PEG, lineales o ramificados, insertados de modo aleatorio a la IGFBP-4, el peso molecular total de todos los grupos PEG existentes en el conjugado resultante suma aproximadamente de 30 a 40 kDa. Es obvio para los expertos en la materia que son posibles ligeras desviaciones del intervalo de pesos moleculares indicado, en el supuesto de que la IGFBP-4 PEGilada no produzca efectos negativos en las células renales normales, tal como se describe en el ejemplo 15 para la IGFBP-4 PEG20. También la IGFBP-4 PEGilada con un peso molecular de los PEG superior a 40 kDa despliega actividad antitumoral. Sin embargo, se espera que tal actividad disminuya a medida que aumenta el peso molecular, debido a su menor penetración en los tumores.

Tal como se emplea aquí, “peso molecular” indica un peso molecular medio de los PEG. El término “aproximadamente” delante de un peso molecular concreto indica que en dichos preparados de PEG algunas moléculas pueden pesar más y otras pueden pesar menos que el valor de peso molecular indicado.

Las siguientes formas PEGiladas de la IGFBP-4 son ejemplos de conjugados contemplados como formas de ejecución de la invención:

- la IGFBP-4 monoPEGilada, en la que el grupo PEG tiene un peso molecular de 30 a 40 kDa;
- la IGFBP-4 diPEGilada, en la que los grupos PEG tienen un peso molecular de aprox. 20 kDa cada uno;
- y mezclas de las anteriores.

“PEG” o “grupo PEG” de la invención significa un resto que tiene el poli(etilenglicol) como componente esencial. Tal PEG puede contener además otros grupos químicos, que son necesarios para las reacciones de fijación; que resultan de la síntesis química de la molécula; o que son un espaciador para mantener una distancia óptima entre las partes de la molécula entre sí. Además, tal PEG puede tener uno o más cadenas laterales PEG, que estén unidas entre sí. Los grupos PEG de más de una cadena PEG se llaman PEGs ramificados o multibrazos. Los PEGs ramificados pueden obtenerse, por ejemplo, por adición de poli(óxido de etileno) a varios polioles, incluidas la glicerina, la pentaeritrita y la sorbita. Por ejemplo puede obtenerse un PEG de cuatro ramas a partir de la pentaeritrita y de óxido de etileno. Los PEGs ramificados tienen por lo general de 2 a 8 ramas y se describen por ejemplo en EP-A 0 473 084 y en la

patente US-5 932 462. Son preferidos en especial que tienen dos cadenas laterales PEG (PEG2) unidas a grupos amino primarios de una lisina (Monfardini, C. y col., *Bioconjug. Chem.* 6, 62-69, 1995).

“Sustancialmente homogéneo” tal como se emplea aquí indica que solamente las moléculas de IGFBP-4 PEGiladas producidas, contenidas o utilizadas son las que tienen uno o dos grupos PEG insertados. El material resultante de la obtención puede contener pequeñas cantidades de la proteína sin reaccionar (es decir, carente del grupo PEG). Tal como se ha comprobado por mapeo del péptido y secuenciación del extremo N, en uno de los ejemplos que siguen se proporciona la obtención de por lo menos un 90% de un conjugado de PEG-IGFBP-4 (con preferencia monoPEGilado) y como máximo un 5% de proteína sin reaccionar. El aislamiento y la purificación de tales preparados homogéneos de IGFBP-4 PEGilada pueden realizarse mediante los métodos habituales de purificación, con preferencia por cromatografía de exclusión de tamaños.

“MonoPEGilado” tal como se emplea aquí indica que la IGFBP-4 está PEGilada solamente en uno de sus grupos amino de cada molécula de la IGFBP-4; solamente un grupo PEG está unido mediante enlace covalente a este sitio y los sitios de inserción pueden variar entre las especies monoPEGiladas. La IGFBP-4 monoPEGilada constituye por lo menos el 90% del material obtenido y con preferencia especial la IGFBP-4 monoPEGilada forma el 92% o más del material obtenido, el resto es IGFBP-4 sin reaccionar (sin PEGilar). Los preparados de IGFBP-4 monoPEGilada según la invención son, pues, lo suficientemente homogéneos para aportar las ventajas de un preparado homogéneo, p. ej. en una aplicación farmacéutica. Lo mismo se diga de las especies diPEGiladas.

Los “PEGs activados” o “reactivos PEG activados” son bien conocidos por el estado de la técnica. Se emplean con preferencia los PEGs activados electrófilamente, por ejemplo los ésteres succinimidilo de ácidos alcoxitubíricos del poli(etilenglicol) (“lower alkoxy-PEG-SBA”) o los ésteres de succinimidilo de ácidos alcoxiopropiónicos del poli(etilenglicol) (“lower alkoxy-PEG-SPA”) o los PEGs activados con N-hidroxisuccinimida. Puede utilizarse cualquier método de reacción de un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción del PEG activado con la IGFBP-4, el éster de succinimidilo ejemplificado es un grupo saliente que produce la formación de la amida. El uso de los ésteres de succinimidilo para obtener conjugados de proteínas se describe en la patente US-5 672 662.

Con el reactivo de PEGilación se combina con la IGFBP-4 se ha constatado que, para un pH de 7,0, se obtiene una proporción de proteína/PEG de 1/3 y con una temperatura de reacción de 20-25°C se obtiene una mezcla de especies mono- y di-PEGiladas con trazas de especies tri-PEGiladas. Cuando la proporción de proteína/PEG se sitúa en 1/1, se produce ante todo la especie mono-PEGilada. Manipulando las condiciones de reacción (p. ej. la proporción de los reactivos, el pH, la temperatura, la concentración de proteína, la duración de la reacción, etc.) se pueden variar las cantidades relativas de las diferentes especies PEGiladas.

La IGFBP-4 monoPEGilada puede obtenerse también con arreglo a los métodos descritos en WO 94/01451. En el documento WO 94/01451 se describe un método para obtener un polipéptido recombinante con un grupo aminoácido terminal reactivo en posición alfa-carbono. Los pasos de este método implican la formación del polipéptido recombinante y la protección del mismo con uno o más grupos protectores añadidos biológicamente sobre la alfa-amino del extremo N y sobre el alfa-carboxilo del extremo C. Después puede hacerse reaccionar el polipéptido con agentes protectores químicos para proteger selectivamente los grupos reactivos de la cadena lateral y, de este modo, impedir que se modifiquen los grupos de la cadena lateral. Después se puede romper el polipéptido con un reactivo específico de los grupos protectores, formándose un grupo aminoácido reactivo terminal reactivo, no protegido, en posición alfa-carbono. Con reactivos PEG activados se modifica el grupo aminoácido reactivo terminal reactivo, no protegido, en posición alfa-carbono. Después se desprotegen los grupos de la cadena lateral de la copia simple de polipéptido modificado en posición terminal, de cadena lateral protegida, para formar una copia simple de polipéptido recombinante, modificado en posición terminal. El número y el orden de los pasos de este método pueden variarse para obtener una modificación selectiva.

Los conjugados de IGFBP-4 según la invención pueden obtenerse por reacción covalente de un grupo amino primario de la IGFBP-4 con un reactivo bifuncional, formándose un compuesto intermedio provisto de enlace amídico y por reacción covalente del compuesto intermedio provisto de enlace amídico con un derivado activado del poli(etilenglicol) para formar un conjugado de la proteína IGFBP-4. En el proceso recién indicado, el reactivo bifuncional es con preferencia el S-acetiltiopropionato de N-succinimidilo o el S-acetiltioacetato del N-succinimidilo y el derivado activado del poli(etilenglicol) se elige con preferencia entre el grupo formado por el yodo-acetilmetoxy-PEG, la metoxi-PEG-vinilsulfona y la metoxi-PEG-maleimida.

Los conjugados de la IGFBP-4 pueden obtenerse por un enlace covalente reactivo con amino de grupos tiol con la IGFBP-4 (“activación”) e insertando el derivado de poli(etilenglicol) (PEG) sobre la IGFBP-4 activada resultante. El primer paso consiste en la unión covalente de los grupos tiol con los grupos NH<sub>2</sub> de la IGFBP-4. Esta activación de la IGFBP-4 se realiza con reactivos bifuncionales que llevan un grupo tiol protegido y un grupo reactivo adicional, por ejemplo los ésteres activos (p. ej. un éster de succinimidilo), anhídridos, ésteres de ácidos sulfónicos, halogenuros de ácidos carboxílicos o de ácidos sulfónicos, apropiados. El grupo tiol se protege con grupos ya conocidos de la técnica, p. ej. grupos acetilo. Los reactivos bifuncionales son capaces de reaccionar con los grupos ε-amino de los aminoácidos lisina formando un enlace amídico. La obtención de los reactivos bifuncionales ya conocida en la técnica. Los productos previos de los ésteres NHS bifuncionales se describen en el documento DE-39 24 705, mientras que la derivatización del compuesto acetiltio se describe en March, J., *Advanced Organic Chemistry* 375-376, 1997. El

reactivo bifuncional SATA es un producto comercial (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU; y Pierce, Rockford, IL), que se describe también en Duncan, R.J., Anal. Biochem. 132, 68-73, 1983.

El número de grupos tiol que se añadirán a la molécula de IGFBP-4 puede elegirse ajustando los parámetros de reacción, es decir, la concentración de proteína (IGFBP-4) y la proporción de proteína/reactivo bifuncional. La IGFBP-4 se activa con preferencia con la unión covalente de 1 a 5 grupos tiol por molécula de IGFBP-4, con mayor preferencia de 1,5 a 3 grupos tiol por cada molécula de IGFBP-4. Estos intervalos se refieren a la distribución estadística del grupo tiol entre la población de la proteína IGFBP-4.

La reacción se lleva a cabo, por ejemplo, en una solución acuosa tamponada, de pH 6,5-8,0, p. ej. con fosfato potásico 10 mM, NaCl 300 mM, de pH 7,3. El reactivo bifuncional puede añadirse en DMSO. Una vez finalizada la reacción, con preferencia después de 30 minutos, se interrumpe la reacción por adición de lisina. El exceso de reactivo bifuncional puede separarse por métodos ya conocidos en la técnica, p. ej. por diálisis o por filtración a través de una columna. El promedio del número de grupos tiol insertados a la IGFBP-4 puede determinarse por métodos fotométricos, descritos por ejemplo en Grasetti, D.R. y Murray, F.J., en: J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119, 41-49, 1967.

La reacción anterior se continúa con la unión covalente de un derivado activado de poli(etilenglicol). Los derivados idóneos de PEG son moléculas de PEG activadas de un peso molecular medio comprendido entre 15 y 40 kDa, dependiendo de si se desea un producto mono- o di-PEGilado.

Los derivados activados de PEG son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Morpurgo, M. y col., J. Bioconjug. Chem. 7, 363-368, 1996, para el caso de la PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada son idóneas para la obtención de compuestos de la invención. Los ejemplos de reactivos PEG son el yodo-acetil-metoxi-PEG y la metoxi-PEG-vinilsulfona. El uso de estas sustancias activadas con yodo es conocido en la técnica y se describe p. ej. por Hermanson, G.T., en: Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996, pp. 147-148.

Un método preferido de PEGilación específica de la cisteína se emplea aquí como método para insertar cadenas de poli(etilenglicol) a un péptido diana (IGFBP-4) mediante el uso de una metoxi-poli(etilenglicol)-maleimida de 20 kDa o de una PEG2-maleimida ramificada de 40 kDa (= PEG-maleimida) (Shearwater Polymers, Inc.; Huntsville, Alabama) en un grupo sulfhidrilo reducido de la cadena de polipéptido de la proteína. La IGFBP-4 nativa no posee cisteínas libres porque todas las cisteínas están ocupadas en la formación de enlaces disulfuro. La reducción de la IGFBP-4 nativa en presencia de concentraciones bajas o moderadas de agentes reductores, por ejemplo el  $\beta$ -mercaptoetanol, el ditiotreitolo o el TCEP, conduce a la abertura selectiva del enlace disulfuro y a la exposición de los grupos sulfhidrilo reducidos, que pueden modificarse específicamente con la PEG-maleimida.

Se supone que los enlaces disulfuro del dominio central de la IGFBP-4 son muy sensibles a la reducción y esto permite la PEGilación específica de la cisteína en los sitios cisteína 110 y cisteína 117. La especificidad de la reacción de adición sobre la cisteína 110 y 117 de la IGFBP-4 se ha confirmado por el mapeo de los péptidos de la IGFBP-4 monoPEGilada aislada e identificación de los péptidos por espectrometría de masas EM-LC y secuenciación de los picos del péptido. Las formas PEGiladas de la IGFBP-4 presentan un área de pico reducida del péptido que contiene las dos cisteínas.

Con mayor preferencia, la especie PEG se activa con maleimida utilizando una alcoxi-PEG-maleimida, por ejemplo la metoxi-PEG-maleimida (PM = 15.000 - 40.000; Shearwater Polymers, Inc.). La reacción de adición de la alcoxi-PEG-maleimida se lleva a cabo después de la eliminación "*in situ*" del grupo protector del tiol en solución tampón acuosa, p. ej. fosfato potásico 10 mM, NaCl 300 mM, EDTA 2 mM, pH = 6,2. La eliminación del grupo protector puede efectuarse por ejemplo con hidroxilamina en DMSO a 25°C, pH = 6,2, durante unos 90 minutos. Para la modificación del PEG, la proporción molar de la IGFBP-4 activada/alcoxi-PEG-maleimida debería situarse entre 1/1 y 1/6. La reacción puede interrumpirse con la adición de cisteína y la reacción de los grupos tiol (-SH) restantes con la N-metilmaleimida u otros compuestos apropiados, capaces de formar enlaces disulfuro. Debido a la reacción de los grupos tiol activos restantes con un grupo protector, por ejemplo la N-metilmaleimida u otros grupos protectores idóneos, la proteína IGFBP-4 de los conjugados de la invención puede contener tales grupos protectores. En general, el procedimiento aquí descrito producirá una mezcla de moléculas que tienen números variables de tioles protegidos por números diferentes de grupos protectores, en función del número de grupos tiol activados de la proteína, que no se hayan conjugado con la PEG-maleimida.

Mientras la N-metilmaleimida forma el mismo tipo de enlace covalente cuando se emplea para bloquear los grupos tiol restantes de la proteína PEGilada, los compuestos disulfuro por un reacción de intercambio intermolecular sulfuro/disulfuro darán lugar a la formación de un enlace de puente disulfuro del reactivo bloqueador. Los reactivos bloqueadores preferidos para este tipo de reacción de bloqueo son la glutatona oxidada (GSSG), la cisteína y la cistamina. En el caso de la cisteína no se introduce ninguna otra carga adicional en la proteína PEGilada, mientras que el uso de reactivos bloqueadores GSSG o cistamina se traduce en la introducción de una carga adicional negativa o positiva.

La PEGilación reactiva con tiol de los mutantes de la IGFBP-4 puede realizarse con arreglo a los métodos del estado de la técnica (véase, p. ej., WO 94/22466 y Veronese, F.M., Biomaterials 22, 405-417, 2001). Otros derivados

de PEG activado son conocidos de la técnica y se describe por ejemplo en Morpurgo, M. y col., J. Bioconjug. Chem. 7, 363-368, 1996, para el caso de la PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal o de cadena ramificada son idóneas para la obtención de compuestos según la invención. Los ejemplos de reactivos PEG son el yodo-acetil-metoxi-PEG y la metoxi-PEG-vinilsulfona. El uso de estas sustancias activadas con yodo ya se conocido en la técnica y se ha descrito, p. ej. en Hermanson, G.T., en: Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996, pp. 147-148.

La purificación ulterior de los compuestos de la invención, incluida la separación de las especies mono- y/o di-PEGiladas de otras formas de PEGilación mayor, puede realizarse por métodos ya conocidos de la técnica, p. ej. por cromatografía de columna.

El porcentaje de los conjugados mono-PEG y la proporción entre las especies mono- y di-PEG puede controlarse añadiendo las fracciones más amplias alrededor del pico de elución para disminuir el porcentaje del mono-PEG o las fracciones más estrechas para aumentar el porcentaje del mono-PEG en la composición. En torno al noventa por ciento de conjugados mono-PEG es un buen equilibrio entre rendimiento y actividad. Algunas veces pueden ser deseables composiciones en las que, por ejemplo, por lo menos el noventa y dos por ciento o por lo menos el noventa y seis por ciento de los conjugados sean especies mono-PEG (n igual a 1). En una forma de ejecución de esta invención, el porcentaje de conjugados, en los que n es 1, se sitúa entre el noventa por ciento y el noventa y seis por ciento.

#### Formulaciones farmacéuticas

La IGFBP-4 PEGilada puede administrarse en forma de mezcla o como especie PEGilada diferente separada por cromatografía de intercambio iónico o por cromatografía de exclusión de tamaños. Los compuestos de la presente invención pueden formularse con arreglo a los métodos de fabricación de composiciones farmacéuticas, dichos métodos ya son conocidos de los expertos en la técnica. Para la producción de tales composiciones se combina la IGFBP-4 PEGilada según la invención en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, con preferencia por diálisis frente una solución acuosa que contenga los ingredientes deseados de las composiciones farmacéuticas. Tales vehículos aceptables se describen, por ejemplo, en el manual Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, editorial Mack Publishing Company, coordinado por Oslo y col. (p. ej. en las pp. 1435-1712). Las composiciones típicas contienen una cantidad eficaz de la sustancia según la invención, por ejemplo de 0,1 a 100 mg/ml, junto con una cantidad adecuada de vehículo. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden fabricarse por métodos ya conocidos de la técnica. Por lo general se dializan las soluciones de la IGFBP-4 PEGilada frente al tampón que se utilizará en la composición farmacéutica y se ajusta la concentración final deseada de la proteína por concentración o por dilución.

Tales composiciones farmacéuticas pueden utilizarse para la administración por inyección o por infusión y contienen una cantidad eficaz de la IGFBP-4 PEGilada junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de varios contenidos de tampón (p. ej. arginina, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos, por ejemplo detergentes y agentes solubilizantes (p. ej. el Tween<sup>TM</sup> 80/Polysorbate, Pluronic<sup>TM</sup> F68), antioxidantes (p. ej. ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (Timersol<sup>TM</sup>, alcohol bencílico) y cargas de relleno (p. ej. sacarosa, manita), el material se incorpora a las preparaciones divididas en partículas de compuestos poliméricos, por ejemplo de ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., o a liposomas. Tales composiciones pueden influir en la estabilidad del estado físico, en la velocidad de liberación y de eliminación del organismo de la IGFBP-4 PEGilada de la invención.

#### Dosificaciones y concentraciones farmacológicas

En un régimen estándar de tratamiento de cáncer, los pacientes se tratan por ejemplo con dosificaciones comprendidas entre 0,01 y 3 mg de la IGFBP-4 PEGilada por kg y por día, durante un período de tiempo que abarca desde el día uno hasta 30 días o incluso durante más tiempo. Se aplica el fármaco en forma de inyección de bolo diaria única por vía subcutánea o i.v. o i.p. (intraperitoneal) o por infusión de una formulación farmacéutica que contenga de 0,1 a 100 mg de la IGFBP-4 PEGilada por ml. Este tratamiento puede combinarse con cualquier tratamiento estándar (p. ej. quimioterapéutico) aplicando la IGFBP-4 PEGilada antes, durante o después del tratamiento estándar. Esto produce un mejor resultado que el se obtiene con el tratamiento estándar solo.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: PEGilación de la IGFBP-4 con PEG de 40 kDa y separación de los productos PEGilados por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC).

A) SES-PAGE con tinción Coomassie del material de partida 1 (pista 1) y material obtenido en la reacción de PEGilación de 40 kDa. Patrón (std) = Mark 12, patrón de peso molecular (Invitrogen); 1 = IGFBP-4 de tipo salvaje (material de partida); 2 = IGFBP-4 después de la PEGilación con mPEG2 de 40 kDa.

B) Separación de los productos PEGilados por cromatografía de exclusión de tamaños ("SEC"). La SEC de la IGFBP-4 PEGilada aleatoria de 40 kDa se realiza en Superose 6 (Pharmacia) en tampón fosfato 20 mM, de pH = 7,5, NaCl 500 mM, caudal = 0,5 ml/min.

## ES 2 285 215 T3

C) Análisis de los productos PEGilados por SDS PAGE. Patrón = Mark 12, estándar de peso molecular (Invitrogen); 3 = IGFBP-4 poliPEG40; 4 = IGFBP-4 no PEGilada; 5 = IGFBP-4 monoPEG40.

Figura 2: Cinética de la IGFBP-4 monoPEG40kDa en suero comparada con la IGFBP-4 monoPEG20kDa y la IGFBP-4 no PEGilada. Se inyecta a ratones SCID por vía subcutánea una dosis única de 1 mg/200  $\mu$ l de IGFBP-4 monoPEG40kDa o de IGFBP-4 monoPEG20kDa o de IGFBP-4 no PEGilada en PBS. Se recogen las muestras de suero en un intervalo de tiempo de 0,5 a 120 h después de la inyección, tal como se indica, y se analiza su contenido de IGFBP-4 monoPEG40kDa o de IGFBP-4 monoPEG20kDa o de IGFBP-4 no PEGilada por Western Blotting con un anticuerpo anti-IGFBP-4 (UBI) después de una purificación de afinidad o por ELISA.

Figura 3: Inhibición de la fosforilación mediada por el IGF-I del receptor de IGF-I con derivados de la IGFBP-4

A) Análisis por Western Blot de la fosforilación del IGF-IR por acción del IGF-I en ausencia y en presencia de derivados de la IGFBP-4.

Se estimulan las células NIH3T3 que sobreexpresan al receptor de IGF-I con IGF-I 2 nM en presencia o en ausencia de un exceso triple de la IGFBP-4. Pasados 10 minutos se lisan las células y se somete el material lisado a un procedimiento Western Blotting con anticuerpos anti-fosfotirosina para detectar al receptor de IGF-I fosforilado en la tirosina. La IGFBP-4 monoPEG20kDa y la IGFBP-4 monoPEG40kDa inhiben la estimulación del receptor por completo en concentraciones 6 nM. En términos de inhibición la fosforilación del receptor de IGF-I inducida por el IGF-I ambas formas PEGiladas de la IGFBP-4 demuestran ser tan eficaces como la IGFBP-4 de tipo salvaje.

B) Valoración de la fosforilación del receptor de IGF-I mediada por el IGF-I con derivados de la IGFBP-4.

Se estimulan células NIH3T3, que sobreexpresan al receptor de IGF-I, con IGF-I 3,3 nM en presencia o en ausencia de varias concentraciones de derivados de la IGFBP-4. Pasados 10 minutos se lisan las células y se somete el material lisado a un ensayo ELISA basado en la medición del receptor de IGF-I fosforilado. La IGFBP-4 monoPEGilada (20 ó 40 kDa) y la IGFBP-4 de tipo salvaje inhiben la estimulación del receptor con un valor IC50 de 3 nM.

Figura 4: La fijación de la IGFBP-4 monoPEG20 se determina por cromatografía de exclusión de tamaños.

Las capacidades de fijación de la IGFBP-4 o de las isoformas PEGiladas de la misma se determinan en un ensayo basado en la cromatografía de exclusión de tamaños. Se inyectan 70 nmoles (6  $\mu$ g) de IGF-I en la columna (HRP 75, Pharmacia; condiciones de trabajo: fosfato sódico 20 mM, pH = 7,4, NaCl 500 mM, 1 ml/min) solo o bien junto con 96 nmoles de IGFBP-4 monoPEG20kDa (equivalentes a 25  $\mu$ g de la IGFBP-4 de tipo salvaje) después de un paso de preincubación (a temperatura ambiente durante 30 min). Se cuantifica el IGF-I libre integrando el pico de IGF-I del cromatograma (Chromleon, Dionex). El área del pico guarda una relación negativa con la capacidad de fijación de la IGFBP-4. En el ensayo se pone de manifiesto que más del 90% del IGF-I se fija por acción de la IGFBP-4 monoPEG20kDa. Se obtienen resultados similares con la IGFBP-4 monoPEG40kDa.

Figura 5: Inhibición de la fijación de IGF-I sobre la IGFBP-4 de tipo salvaje inmovilizada por acción de la IGFBP-4 de tipo salvaje, monoPEGilada y poliPEGilada aleatoriamente con 20 kDa. Determinación de los valores IC50 de la IGFBP-4 de tipo salvaje, monoPEG y poliPEG. Para la medición de los valores IC50 se inmoviliza la IGFBP-4 de tipo salvaje en la superficie de un "chip" sensor. Se hace el seguimiento de la fijación de IGF-I (10 nM) sobre la IGFBP-4 inmovilizada por adición de concentraciones crecientes de la IGFBP-4 de tipo salvaje, IGFBP-4 monoPEG20 y IGFBP-4 poliPEG20, antes del contacto con el "chip". Se constata que la competición de la fijación de IGF-I sobre la IGFBP-4 inmovilizada con la IGFBP-4 mono- o poli-PEGilada es tan eficaz como con la IGFBP de tipo salvaje. Se obtienen resultados similares con la IGFBP-4 PEG-40kDa.

### Ejemplo 1

#### *Fermentación, renaturalización y purificación de la IGFBP-4*

La producción de la IGFBP-4 de tipo salvaje recombinante en *E. coli* o en levadura se ha descrito por ejemplo en Miyakoshi, N. y col., *Endocrinology* 142, 2641-2648, 2001 y en Kiefer, M.C. y col., *J. Biol. Chem.* 267, 12692-12699, 1992. La IGFBP-4 recombinante humana es también un producto comercial (suministrado p. ej. por GroPep Ltd., Adelaida, Australia).

#### *Condiciones de fermentación*

Se realiza la siembra del cultivo en un matraz erlenmeyer de 500 ml, con un volumen de cultivo de 100 ml, a 37°C en una incubadora agitadora durante 7 h. Se lleva a cabo el cultivo principal en una fermentación de lote alimentado de 10 l, con un volumen inicial de 8 l. El pH del medio de cultivo (levadura Springer 50 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*3H<sub>2</sub>O g/l, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0,74 g/l, glucosa 40,0 g/l, ampicilina 100 mg/l, sulfato de canamicina 50 mg/l) se mantiene a pH = 6,8 + 0,3 por adición de una solución de amoníaco (al 12% en p/v) como base y una solución de glucosa monohidratada (al 75 p/v) como ácido y fuente de carbono. Se mantiene el nivel de oxígeno disuelto en o por encima del 20% por aporte de aire a razón de 1,0 vvm y variando la velocidad de agitación (500 rpm - 1000 rpm).



## ES 2 285 215 T3

Una vez el cultivo ha alcanzado una densidad óptica (OD) de 10 (medida a 580 nm con espectrómetro UV-visible) se inicia la alimentación de una solución de levadura de Springer (500 g/l). Se lleva a cabo la inducción de la expresión de proteína en una OD de 15 con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG). La IGFBP-4 se expresa de modo predominante en forma insoluble como cuerpos de inclusión (aprox. 80%).

Se continúa el cultivo hasta 12 h y una OD de 35 y entonces se recogen las células por centrifugación (13.000 rpm durante 30 min).

### *Aislamiento y purificación de los cuerpos de inclusión*

El culote celular se suspende en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH = 7,0) que contiene  $MgSO_4$  1 mM. Después de la adición de 0,3 g de lisozima por 100 g de células secas y 30 U de benzonasa por 1 g de células secas se somete la suspensión celular a la prensa francesa (French press) (1000 bar (14.500 psi), un ciclo) para la disgregación. Después de la disgregación se diluye la suspensión 1:2 con tampón Brij (200 ml/l de Brij del 30%, 1,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH = 7,0) y se continúa la agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para aislar los cuerpos de inclusión se centrifuga la suspensión a 13.000 rpm durante 30 min. Se suspende de nuevo el culote obtenido en tampón 0,1 M Tris-HCl (pH = 6,5) que contiene EDTA 5 mM y se centrifuga de nuevo a 13.000 rpm durante 30 min. Se guarda el culote que contiene los cuerpos de inclusión purificados a -20°C hasta la purificación ulterior de la IGFBP-4.

### *Solubilización, naturalización y purificación*

Se solubilizan 20 g de cuerpos de inclusión en un tampón que contiene cloruro de guanidinio 8M, Tris 100 mM, EDTA 5 mM y DTE 100 mM (pH = 8,5). Después de la solubilización se ajusta el pH a 2,5 con HCl y se dializa el solubilizado frente a cloruro de guanidinio 6M, EDTA 5 mM (pH = 2,5). Se analiza el contenido de proteína por absorción UV. Se realiza la naturalización a temperatura ambiente. Se diluye la proteína no replegada en dos pulsos (con un intervalo de 5 h) de 0,25 mg de proteína por ml en un volumen de 4500 ml (arginina 0,6 M, EDTA 1 mM, GSH 3 mM, GSSG 1 mM, pH = 8,5) hasta una concentración final de proteína de 0,5 mg/ml. La naturalización se completa durante una noche.

Se guarda la muestra de naturalización hasta el 25% en  $(NH_4)_2SO_4$  y se centrifuga. Se dializa el líquido sobrenadante frente a citrato sódico 50 mM, NaCl 100 mM (pH = 4,5) y se le añade  $(NH_4)_2SO_4$  0,8 M y arginina 0,2 M (mediante la adición de  $(NH_4)_2SO_4$  sólido y dilución de una solución patrón 1 M de arginina/HCl). Después de ajustar el pH a 8,5 con NaOH se introduce la muestra en una columna de fenil-Sepharose (Phenyl-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), equilibrada con fosfato sódico 20 mM, NaCl 100 mM,  $(NH_4)_2SO_4$  1M, pH = 7,5). Se lava la columna con tampón de equilibrio sin  $(NH_4)_2SO_4$ . Se realiza la elución de la IGFBP-4 en un gradiente de fosfato sódico 20 mM hasta fosfato sódico 20 mM suplementado con etilenglicol del 50% y un lavado después de la elución con fosfato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, etilenglicol del 50%, pH = 7,5.

Se reúnen los líquidos eluidos con arreglo a SDS-PAGE, se diluyen 1:2 con citrato 50 mM, pH = 4,2, y se introducen en una columna de S-Sepharose (Pharmacia). Se lava la columna con fosfato sódico 20 mM, pH = 7,5, y se efectúa la elución con un gradiente hasta fosfato sódico 20 mM, NaCl 600 mM. Se reúnen finalmente las IGFBP-4 en base a la SDS-PAGE.

### *Ejemplo 2*

#### *PEGilación de 40 kDa de la IGFBP-4 (PEGilación amino-reactiva aleatoria)*

Se realiza la PEGilación de 40 kDa por reacción de la IGFBP-4 con el éster mPEG-2NHS, un derivado de lisina que lleva dos cadenas PEG de 20 kDa y un solo éster de N-hidroxisuccinimidilo reactivo (Shearwater Polymers, Inc.; Huntsville, Alabama, EE.UU.; a continuación se llamará mPEG2 40 kDa).

Se PEGila la IGFBP-4 por adición de una solución acuosa de mPEG2 40 kDa a una solución concentrada de la IGFBP-4 en PBS. Se añade el mPEG2 40 kDa en una proporción molar de 2 moléculas de PEG por cada molécula de la IGFBP-4. Se deja progresar la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos y finalmente se interrumpe con la adición de una solución 1 M de arginina (tamponada a pH = 8,0 con HCl) hasta una concentración final de 100 mM.

El resultado de la reacción de PEGilación se optimiza con vistas a una producción máxima de la IGFBP-4 monoPEGilada con el consumo mínimo simultáneo del reactivo mPEG2-NHS mediante la valoración cuidadosa de las concentraciones de proteína y de PEG. Para la IGFBP-4, el rendimiento en isoformas monoPEGiladas es óptimo cuando las concentraciones de proteína son elevadas (c = 5 mg/ml o superior) y un exceso molar doble de reactivo de PEGilación.

### *Ejemplo 3*

#### *PEGilación de la IGFBP-4 por el extremo N*

La PEGilación específica del extremo N tal como se emplea aquí indica un método para insertar cadenas de poli(etilenglicol) en un polipéptido diana (la IGFBP-4) empleando un poli(etilenglicol)aldehído en pH ácido y condiciones

## ES 2 285 215 T3

reductoras. La reacción de fijación inserta con preferencia el PEG-aldehído al grupo amino del extremo N de una cadena de polipéptido con pocas o ninguna reacciones secundarias, en las que intervengan los grupos  $\varepsilon$ -amino de la lisina.

5 Se dializa la IGFBP-4 humana frente a un tampón acetato 20 mM, pH = 4,5, y se PEGila por adición de una solución acuosa de PEG-aldehído de 40 kDa o de 20 kDa (Shearwater Polymers, Inc.; Huntsville, Alabama). Se añade el PEG-aldehído en una proporción molar de 2 moléculas de PEG por cada molécula de la IGFBP-4. El PEG-aldehído forma una base de Schiff con el grupo amino del extremo N, que a continuación (es decir, después de una hora de incubación) se reduce por adición de cianoborhidruro sódico hasta una concentración final de 20 mM. Se deja  
10 progresar la reacción a temperatura ambiente durante una noche.

Se optimiza el resultado de la reacción de PEGilación con vistas a la producción máxima de IGFBP-4 monoPEGilada en el extremo N con un consumo simultáneo mínimo del reactivo PEG-aldehído mediante la valoración cuidadosa de la proteína y de las concentraciones de PEG. Para la IGFBP-4, el rendimiento en isoformas de IGFBP-4 mono-  
15 PEGiladas es óptimo cuando las concentraciones de péptido son elevadas ( $c = 1$  mg/ml o superior) y un exceso 1,5 molar del reactivo de PEGilación. La purificación de la IGFBP-4 monoPEGilada se efectúa del modo descrito para la proteína PEGilada aleatoria. La especificidad de la reacción de fijación para el extremo N de la proteína se confirma mediante la secuenciación del extremo N y mapeo de péptido de la IGFBP-4 monoPEGilada aislada empleando la endoproteinasa Lys C (calidad de secuencia; Roche Diagnostics GmbH; Alemania) e identificando los péptidos por  
20 cromatografía de masas EM-LC.

### Ejemplo 4

#### 25 *PEGilación específica de cisteína de la IGFBP-4 de tipo salvaje*

La PEGilación específica de cisteína tal como se emplea aquí indica un método para insertar cadenas de poli(etilenglicol) en un polipéptido diana (la IGFBP-4) utilizando una metoxi-poli(etilenglicol)-maleimida de 20 kDa o una PEG2-maleimida de 40 kDa ramificada (= PEG-maleimida) (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama)  
30 sobre un grupo sulfhidrilo reducido de la cadena de polipéptido de la proteína. La IGFBP-4 nativa no posee cisteínas libres, porque todas las cisteínas están ocupadas en la formación de enlaces disulfuro. La reducción de la IGFBP-4 nativa en presencia de concentraciones bajas o moderadas de agentes reductores, por ejemplo el  $\beta$ -mercaptoetanol, el ditioneitol o el TCEP, se traduce en la abertura selectiva del enlace selectivo y la exposición de los grupos sulfhidrilo reducidos, que pueden modificarse específicamente con la PEG-maleimida.

35 Se dializa la IGFBP-4 de una concentración de 0,75 mg/ml frente a fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,2 y se añade el DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol en concentraciones de 30 a 1000  $\mu$ M. Se incuba la mezcla durante 4 h y después se añade una solución acuosa de PEG-maleimida de 20 kDa en una concentración de 1,6 mg/ml. Se interrumpe la reacción y se analiza después de una hora por SDS-PAGE. Se aísla la IGFBP-4 monoPEGilada de las muestras que  
40 contienen la proporción más elevada de este derivado PEGilado por métodos ya descritos para la IGFBP-4 PEGilada aleatoria.

Se supone que los enlaces disulfuro del dominio central de la IGFBP-4 son muy sensibles a la reducción y esto permite la PEGilación específica de cisteína sobre la cisteína 110 o la cisteína 117. La especificidad de la reacción de  
45 fijación para la cisteína 110 y la 117 de la IGFBP-4 se confirma por mapeo de péptidos de la IGFBP-4 monoPEGilada aislada y por identificación de los péptidos mediante espectrometría de masas LC-EM y secuenciación de los picos del péptido. Las formas PEGiladas de la IGFBP-4 presentan un área de pico reducida del péptido que contiene las dos cisteínas.

### 50 Ejemplo 5

#### *Purificación de los isómeros de IGFBP-4 PEG-40kDa*

55 La separación preparativa de los productos de PEGilación para el análisis bioquímico y biológico se realiza por cromatografía de exclusión de tamaños en columna Sephacryl S 400 (Pharmacia) en un tampón de trabajo que consta de fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, suplementado con cloruro sódico 500 mM.

60 Los isómeros de la IGFBP-4-PEG-40kDa eluyen en primer lugar en la cromatografía de exclusión de tamaños, si se comparan con la forma sin modificar. Esto se debe al mayor radio hidrodinámico de la molécula.

A continuación se analizan las fracciones eluidas por SDS-PAGE. En el SDS-PAGE se separan las proteínas con arreglo a su peso molecular. Las formas PEGiladas de la IGFBP-4 migran con mayor lentitud que la proteína de tipo salvaje. La velocidad de migración guarda una relación inversa con la cantidad de PEG insertado en la proteína. Se  
65 efectúa la separación a través de geles NOVEX 4-12% NuPage en un sistema de tampón MOPS SDS.

Los productos se reúnen en tres grupos, que se llaman del modo siguiente:

- IGFBP-4 poli-PEG-40kDa: una población mixta de isoformas de PEGilación, que consta en más del 90% de la IGFBP-4 que lleva más dos o más restos PEG2 de 40 kDa. El peso molecular teórico de la IGFBP-4 poli-PEG-40kDa es de 86 kDa o más. Al parecer pueden llegar a más de 200 kDa según el SDS-PAGE.

- IGFBP-4 mono-PEG-40kDa: un grupo homogéneo en más del 90% de IGFBP-4 PEGiladas que tienen una molécula de mPEG2 de 40 kDa insertada en una molécula de IGFBP-4. Es muy probable que este grupo esté formado por una mezcla de isómeros posicionales, lo cual significa que la cadena de PEG puede estar unida a diferentes restos aminoácido en las moléculas individuales de la proteína. El peso molecular teórico de la IGFBP-4 monoPEG-40kDa se sitúa en torno a 66 kDa. Al parecer la IGFBP-4 monoPEG-40kDa tendría 120 kDa según el SDS-PAGE.

- IGFBP-4 sin PEGilar: un grupo homogéneo de IGFBP-4 que no reacciona con el reactivo PEG y se recupera p. ej. por reciclado.

#### Ejemplo 6

##### a) Producción de la IGFBP-4 PEGilada aleatoria (20 kDa)

Se PEGila de modo aleatorio la IGFBP-4 recombinante humana de tipo salvaje por adición de una solución acuosa del éster N-hidroxisuccinimidilo del ácido metoxipoli(etilenglicol)propiónico, PM = 20.000 (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama; denominado a continuación mPEG-SPA de 20 kDa). Se añade el mPEG-SPA de 20 kDa en una proporción molar de 3 moléculas de PEG por cada molécula de la IGFBP-4. Se deja progresar la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos y se interrumpe finalmente por adición de una solución 1M de arginina (tamponada con HCl a pH = 8,0) en una concentración final de 100 mM.

El resultado de la reacción de PEGilación puede optimizarse con vistas a una producción máxima de la IGFBP-4 monoPEGilada con consumo simultáneo mínimo del reactivo mPEG-SPA mediante la valoración cuidadosa de las concentraciones de proteína y de PEG. Para la IGFBP-4, el rendimiento en isoformas monoPEGiladas es óptimo cuando las concentraciones de proteína son elevadas (c = 5 mg/ml o superiores) y se utiliza un exceso 1,5 molar de reactivo de PEGilación.

##### b) Purificación de los isómeros de IGFBP-4 PEG-20kDa

Se realiza la separación preparativa de los productos de PEGilación para el análisis bioquímico y biológico por cromatografía de exclusión de tamaños en una columna Sephacryl S 300 (Pharmacia) en un tampón de trabajo que contiene fosfato sódico 20 mM, pH = 7,5, suplementado con cloruro sódico 500 mM. Las especies PEGiladas de 20 kDa eluyen en primer lugar en la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) si se comparan con la forma no modificada. Esto se debe al mayor radio hidrodinámico de la molécula.

Se analizan las fracciones eluidas por SDS-PAGE. En el SDS-PAGE se separan las proteínas según sus pesos moleculares. Las formas PEGiladas de la IGFBP-4 migran con mayor lentitud que la proteína de tipo salvaje. La velocidad de migración guarda una relación inversa con la cantidad de PEG que se haya insertado en la proteína. Se efectúa la separación en geles NOVEX 4-12% NuPage en un sistema de tampón MOPS SDS.

#### Ejemplo 7

##### Eliminación del mPEG2 de 40 kDa o del mPEG-SPA de 20 kDa por cromatografía de intercambio iónico

Los reactivos de PEGilación residual, que no reaccionan con la IGFBP-4, se eliminan por cromatografía de intercambio iónico (IEC) empleando SP Sepharose (Pharmacia). Se dializan las muestras introduciéndolas en la columna frente a fosfato sódico 20 mM de pH 5,5 para reducir la concentración de cloruro sódico y ajustar a pH ácido. En estas condiciones el PEG libre no se fija a la resina de la columna y se detecta en el caudal de la columna mediante un ensayo colorimétrico, descrito por Nag, A. y col., Anal. Biochem. 237, 224-231, 1996. Se realiza la elución de la proteína fijada en un paso único con cloruro sódico 300 mM en fosfato sódico 20 mM de pH 5,5. Se dializan las muestras frente a fosfato sódico 20 mM de pH = 7,5, cloruro sódico 150 mM, antes de su almacenado o análisis posterior.

#### Ejemplo 8

##### Determinación de las actividades de fijación por cromatografía de exclusión de tamaños

Se tratan diversas cantidades de la IGFBP-4 (25 µg o cantidades equivalentes de las isoformas PEGiladas de la IGFBP-4) con cantidades conocidas (3,6 y 9 µg, respectivamente) de IGF-1. Se cuantifica el IGF-I libre residual por integración del pico después de separarlo de los complejos IGF-I/IGFBP-4 por cromatografía de exclusión de tamaños en una columna HRP75 (Pharmacia, tampón de trabajo formado por fosfato sódico 20 mM, pH = 7,5, suplementado con cloruro sódico 500 mM; caudal = 1 ml/min).

En este ensayo la IGFBP-4 sin PEGilar, la IGFBP-4 monoPEG-20kDa, la IGFBP-4 poliPEG-20kDa y la IGFBP-4 monoPEG-40kDa presentan una fijación identificada de IGF-1. Por ej. 96 nmoles de la IGFBP-4 monoPEG-20kDa fijan 70 nmoles de IGF-I.

## Ejemplo 9

*Determinación de los parámetros de fijación con FCS*

5 La capacidad de la IGFBP-4 para formar complejos con la IGFBP-4 marcada con TAMRA (tetrametilrodamina) se mide por espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). El principio del ensayo es que, en ausencia de un reactivo de fijación, el IGF-I libre marcado con un marcador fluorescente difunde a una velocidad distinta. La adición de la IGFBP-4 o de isoformas PEGiladas conduce a la formación de un complejo con el IGF-I marcado y a un cambio concomitante en su velocidad de difusión. Debido al diferente comportamiento de difusión, la FCS permite  
10 diferenciar la IGFBP-4 fijada de la libre y cuantificar dicha diferencia. La determinación de la cantidad del IGF-I fijado para diversas concentraciones de la IGFBP-4 permite trazar una curva de fijación y determinar los valores kDa por ajuste de la curva.

15 Todas las mediciones se realizan en un aparato Confocor I (Zeiss, Jena), a una longitud de onda de 543 nm en un tampón formado por: 100 mM HEPES (pH = 7,6), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; 10 mM D(+)-glucosa, 15 mM acetato sódico, 1% de albúmina de suero bovino dializado.

20 La fijación del IGF-I parece indistinguible para varios lotes de IGFBP-4; la IGFBP-4 monoPEG-20kDa, la IGFBP-4 poliPEG-20kDa, la IGFBP-4 monoPEG-40kDa y la IGFBP-4 de tipo salvaje presentan un comportamiento similar en términos de formación de complejo y constantes de fijación ( $0,34 \pm 0,08$  nM).

## Ejemplo 10

25 *Determinación de los parámetros de fijación*

Las constantes de inhibición (valores IC<sub>50</sub>) de la IGFBP-4 de tipo salvaje y de varias isoformas PEGiladas se determinan mediante ensayos de Biacore (<http://www.biacore.com>). Resumiendo, la IGFBP-4 de tipo salvaje se inmoviliza en la superficie de un “chip” Biacore CM5 mediante la química de fijación NHS-EDC, ya conocida en la técnica  
30 (<http://www.biacore.com>). Todos los ensayos de fijación del IGF-I se realizan en un tampón comercial (Biacore HBP-EP; 0,1 M HEPES, pH = 7,4; 0,15 M NaCl; 3 mM EDTA; 0,005% Polysorbat 20 (v/v)). Para determinar los valores IC se mezcla el IGF-I 10 nM con ocho concentraciones, desde 0,5 hasta 1000 nM de la IGFBP-4 de tipo salvaje (o de la IGFBP-4 monoPEG-20kDa o de la IGFBP-4 monoPEG-40kDa) y se aplica sobre el chip en la que se halla inmovilizada la IGFBP-4. Se mide la inhibición como disminución de unidades de respuesta comparadas con las muestras de  
35 10 nM IGF-I puro en ausencia de la IGFBP-4. La IGFBP-4 monoPEG-20kDa y la IGFBP-4 monoPEG-40kDa inhiben la fijación del IGF-I de forma tan eficaz como la IGFBP-4 de tipo salvaje empleada como control, con valores de IC<sub>50</sub> en torno a  $4 \pm 2$  nM.

## 40 Ejemplo 11

*Inhibición de la fosforilación del receptor del IGF-I inducida por el IGF-I con isoformas PEGiladas de la IGFBP-4*

En cápsulas de 3,5 cm de diámetro se mantienen en inanición monocapas confluentes de células NIH3T3, que expresan de modo estable al IGF-IR humano, en medio DMEM que contiene un 0,5% de suero fetal bovino dializado. Después de 48 h se incuban las células sin hormona alguna o con  $5 \times 10^{-9}$  M de IGF-I; cada muestra se incubaba previamente con concentraciones crecientes de proteínas de fijación del IGF o con isoformas PEGiladas de las mismas, a temperatura ambiente durante 1 h. Después de una estimulación a 37°C durante 10 min se quita el medio y se lisan las células con 250 µl de tampón de lisado (20 mM HEPES, pH = 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  
50 mM EGTA (ácido 1,2-bis(2-aminoetoxietano)-N,N,N',N'-tetraacético, Aldrich, EE.UU.), 10 mM ortovanadato sódico y cóctel de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), sobre hielo, durante 10 min. A continuación se raspan las células de la placa y se separa el material insoluble por centrifugación a 4°C durante 20 min. Se determina la concentración de proteína del líquido sobrenadante empleando el ácido bicinonínico (Pierce, Rockford, EE.UU.; Shihabi, Z.K. y Dyer, R.D., Ann. Clin. Lab. Sci. 18, 235-239, 1988). Se incubaba una concentración igual de proteína con  
55 tampón de muestras SDS (63 mM Tris-HCl, pH = 6,8, 3% de SDS, 10% de glicerina, 0,05% de azul de bromofenol, 100 mM DTT), se hierve durante 5 min y se introduce en un gel del 7,5% de poli(acrilamida) en SDS. Después de la electroforesis se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa que en primer lugar se bloquea durante 1 h con PBST (solución salina-Tween tamponada con fosfato) que contiene un 3% de BSA, después se incubaba durante una noche con 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en PBST  
60 que contiene un 3% de BSA. El anticuerpo no fijado se elimina con un lavado extensivo. Después se incubaba la mancha con anticuerpo anti-ratón específico de la IgG conjugado con peroxidasa de rábano rusticano diluido a 1:10000 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y se revela.

La IGFBP-4, la IGFBP-4 monoPEG-20kDa, la IGFBP-4 poliPEG-20kDa y la IGFBP-4 monoPEG-40kDa despliegan todas ellas un potencial inhibidor igualmente bueno. Un exceso molar triple (dosis más baja medida) de cada isoforma bloquea por completo la fosforilación del receptor bloqueado, inducida con IGF-I 2 nM.

## Ejemplo 12

*Inhibición del crecimiento de las líneas de células tumorales con derivados de la IGFBP-4*

- Se utilizan las líneas celulares tumorales humanas PC-3, MDA-MB231, DU-145, HT29, AsPC-1 y PancTu-1 (de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC, American type culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU.) para investigar los efectos inhibidores de los derivados de la IGFBP-4 en el crecimiento de las células tumorales. Se siembran 4000 células AsPC-1 o 1000 células de los demás tipos de células por hoyo en medio 100  $\mu$ l RPMI que contiene un 10% de FBS (suero fetal bovino) y un 1% de glutamina. Se cultivan las células en ausencia o en presencia de la IGFBP-4 sin modificar o de la IGFBP-4 monoPEG-20kDa durante 5 días y se cuantifica la proliferación celular detectando la descomposición de las sales de tetrazolio que se añaden al medio de cultivo. La descomposición de las sales de tetrazolio se debe a la deshidrogenasa mitocondrial en células viables (ensayo WST-1, PanVera, EE.UU.). El crecimiento de las líneas celulares PC-3, MDA-MB 231, DU-145 no se inhibe de modo significativo con los derivados de la IGFBP-4, pero el crecimiento de las líneas celulares HT29, AsPC-1 y PancTu-1 se inhiben hasta en un 55% con la IGFBP-4. La IGFBP-4 PEGilada es incluso más potente que la IGFBP-4 sin modificar.

TABLA 1

*Inhibición del crecimiento de líneas de células tumorales con derivados de la IGFBP-4*

|                                                 | PC-3 | MDA-MB231 | DU-145 | HT29 | AsPC-1 | PancTu-1 |
|-------------------------------------------------|------|-----------|--------|------|--------|----------|
| IGFBP-4<br>[% de inhibición]                    | 10   | 0         | 0      | 30   | 40     | 50       |
| IGFBP-4 mono-<br>PEG-20kDa<br>[% de inhibición] | 10   | 0         | 10     | 40   | 50     | 55       |

## Ejemplo 13

*Cinética de derivados de IGFBP-4 en suero*

- Se inyecta a ratones SCID por vía subcutánea una dosis única de 1 mg/200  $\mu$ l de IGFBP-4 monoPEG-20kDa o de IGFBP-4 monoPEG-40kDa o de IGFBP-4 sin PEGilar en PBS. Se recogen las muestras de suero en un intervalo de tiempo comprendido entre 0,5 y 120 h después de la inyección y se analizan después de la purificación por afinidad con Western Blotting con un anticuerpo anti-IGFBP-4 (United Biomedical Inc., EE.UU.) para determinar la IGFBP-4 monoPEG-20kDa o de IGFBP-4 monoPEG-40kDa o de IGFBP-4 sin PEGilar o con ELISA. La purificación de afinidad se lleva a cabo fijando el IGF-I biotinilado sobre esferillas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y precipitando los derivados de IGFBP-4 de las correspondientes muestras de suero por separación magnética. Se eluye la proteína fijada calentando el tampón de muestra SDS y se separa por SDS PAGE. Se transfieren las proteínas a una membrana PVDF y se detectan con un anticuerpo específico de la IGFBP-4. La cuantificación de las bandas correspondientes a los derivados de la IGFBP-4 se efectúa con un aparato del tipo Lumilimager (Roche).

- El ensayo ELISA se realiza capturando las proteínas PEGiladas con un anticuerpo monoclonal biotinilado contra el PEG (Cheng, T. y col., Bioconjugate Chem. 10, 520-528, 1999) fijado a una placa de microvaloración recubierta con estreptavidina y detectando en especial la IGFBP-4 con un anticuerpo policlonal de IGFBP-4 (marcado con peroxidasa) producido en conejos.

- Los niveles en suero de la IGFBP-4 monoPEG-40kDa alcanzan su pico más alto al cabo de 24 horas ( $>75 \mu$ g/ml) y se mantienen elevados hasta las 120 h. En comparación, la IGFBP-4 sin PEGilar y la IGFBP-4 monoPEG-20 presentan picos sustancialmente más bajos (12 y 35  $\mu$ g/ml, respectivamente) y una eliminación del organismo mucho más rápida. Los niveles de la IGFBP-4 sin PEGilar ya vuelven a la línea base después de solo 2 horas. La AUC aumenta significativamente con la PEGilación y la PEGilación con PEG de 40 kDa produce niveles significativamente más altos en suero durante un período de tiempo más largo que el observado para el derivado PEG de 20 kDa de la IGFBP-4.

- La aplicación diaria de la IGFBP-4 monoPEG-20kDa o de la IGFBP-4 monoPEG-40kDa o de la IGFBP-4 sin PEGilar conduce a la acumulación solamente en el suero de los ratones tratados con IGFBP-4 monoPEG-40kDa. Se alcanzan niveles en suero de 300  $\mu$ g/ml al término de un estudio de tres semanas.

## ES 2 285 215 T3

### Ejemplo 14

#### *Efecto antitumoral de derivados de la IGFBP-4 en el modelo ortotópico de cáncer de páncreas PancTu-1*

Se sacan las células tumorales PancTu-1 expandidas “*in vitro*” (0,05% de tripsina-EDTA) de los frascos de cultivo y se transfieren a 50 ml de medio de cultivo (RPMI 1640) el día de la inyección, se lavan una vez (300 x g, 10 min) se suspenden de nuevo en PBS, se lavan de nuevo con PBS y se filtran. Se determinan la concentración y el tamaño celulares y la concentración de las células se ajusta con PBS a una concentración celular de  $6,6 \times 10^7$ /ml.

Se inyectan células tumorales en un volumen de  $15 \mu\text{l}$  ( $= 1,0 \times 10^6$  células) con control visible en el lóbulo duodenal del páncreas a través de la serosa hacia el tejido pancreático de ratones SCID hembras de 8-10 semanas de edad (C.B-17) y un peso corporal por lo menos de 20 g. Después se recoloca suavemente el páncreas en la cavidad abdominal y se cierra la incisión del peritoneo con una sutura continua (4-0 Vicryl). Se adapta la piel y se cierra con 3-4 grapas para heridas.

A partir del séptimo día después de la inoculación con las células tumorales se tratan dos grupos, compuestos por 8 animales cada uno, con la IGFBP-4 monoPEG-20kDa o con la IGFBP-4 monoPEG-40kDa. La dosis diaria de 1 mg de proteína en 0,2 ml de PBS, administrada por vía i.p., se normaliza al contenido de proteína de la muestra por determinación de la absorción del resto proteína a 280 nm. Un tercer grupo de 8 animales se trata solamente con PBS. Después de 21 días de tratamiento se extraen muestras de sangre de cada animal y se determina el volumen del tumor primario y el peso del tumor de cada animal. Se detecta el marcador de tumor pancreático CA19.9, un determinante antigénico de hidrato de carbono, expresado en mucina de alto peso molecular (MUC1), mediante EIA (ADI, Alpha Diagnostics, Texas, EE.UU.) y se determina la Cyfra 21.1 en un aparato Elecsys1010 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania).

Ambos marcadores tumorales resultan significativamente reducidos con el tratamiento con la IGFBP-4 monoPEG-40, pero no por el tratamiento con la IGFBP-4 monoPEG-20.

La administración crónica de la IGFBP-4 monoPEG-20 no inhibe el crecimiento tumoral. El volumen medio del tumor al término es de  $287 \text{ mm}^3$  y es muy similar al del grupo de control, que recibe únicamente el PBS ( $226 \text{ mm}^3$ ). En cambio, el tratamiento con la IGFBP-4 PEG-40 reduce el crecimiento del tumor. El volumen tumoral medio se calcula en  $163 \text{ mm}^3$ .

TABLA 2

*Efecto del tratamiento de ratones que llevan el tumor PancTu-1 con derivados de la IGFBP-4 en el marcador tumoral CA19.9 en suero*

| grupo | tratamiento                | aplicación | niveles CA19.9<br>(mediana, U/ml) | cambio (%) | CI        |
|-------|----------------------------|------------|-----------------------------------|------------|-----------|
| 2     | control                    | i.p.       | 127,3                             |            |           |
| 4     | IGFBP-4 mono-<br>PEG-20kDa | i.p.       | 108,5                             | (-16%)     | 0,57-1,24 |
| 6     | IGFBP-4 mono-<br>PEG-40kDa | i.p.       | 40,2                              | (-66%)     | 0,17-0,79 |

TABLA 3

*Efecto del tratamiento de ratones que llevan el tumor PancTu-1 con derivados de la IGFBP-4 en el marcador tumoral Cyfra 21.1 en suero*

| grupo | tratamiento                | aplicación | niveles Cyfra 21.1<br>(mediana, U/ml) | cambio (%) | CI        |
|-------|----------------------------|------------|---------------------------------------|------------|-----------|
| 2     | control                    | i.p.       | 19,3                                  |            |           |
| 4     | IGFBP-4 mono-<br>PEG-20kDa | i.p.       | 22,6                                  | (+11%)     | 0,63-1,74 |
| 6     | IGFBP-4 mono-<br>PEG-40kDa | i.p.       | 10,2                                  | (-65%)     | 0,17-0,82 |

#### Ejemplo 15

##### *Influencia de la IGFBP-4 PEGilada en células renales/órganos renales normales*

Se resectan tumores primarios y órganos renales y se fijan en formalina. Se dividen los tumores por el centro en dos partes y se incrustan ambas dentro de un bloque de Paraplast. Se procesan ambos órganos renales (cortes longitudinal y vertical) y se incrustan. Se realizan la tinción histológica de rutina con hematoxilina y eosina en parafina.

El tratamiento crónico con la IGFBP-4 monoPEG-20kDa aplicada por vía s.c. o i.p. induce una alteración histopatológica entre moderada y severa del tejido renal. Las células pertenecientes a los túbulos proximales se vacuolizan sin signos de inflamación ni de necrosis. Estos resultados no se observan después de una aplicación s.c. o i.p. de la IGFBP-4 monoPEG-40kDa.

#### Lista de referencias

- Byun, D. y col., en *J. Endocrinology* 169, 135-143, 2001
- Chelius, D. y col., *J. Endocrinology* 168, 283-296, 2001
- Clark, R. y col., *J. Biol. Chem.* 271, 21969-21977, 1996
- Conover, C.A. y col., *J. Biol. Chem.* 270, 4395-4400, 1995
- Culouscou, J.M. y Shoyab, M., *Cancer Res.* 51, 2813-2819, 1991
- Cunningham, B.C. y col., *Science* 254, 821-825, 1991
- Damon, S.E. y col., *Endocrinology* 139, 3456,3464, 1998
- DE 39 24 705
- Diehl, D. y col., *J. Cancer Res. Clinical Oncol.* 127, supl. 1, p. 54, 2001
- Duncan, R.J., *Anal. Biochem.* 132, 68-73, 1983
- EP-A 0 473 084
- Goodson, R.J. y Katre, N.V., *Biotechnology* 8, 343-346, 1990
- Grasetti, D.R. y Murray, F.J., *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41-49, 1967
- Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996, pp. 147-148

## ES 2 285 215 T3

**Hershfield**, M.S. y col., *New England Journal of Medicine* 316, 589-596, 1987

**Honda**, Y. y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 1389-1396, 1996

<http://www.biacore.com>

<http://www.expasy.ch>

**Katre**, N.V., *J. Immunol.* 144, 209-213, 1990

**Kiefer**, M.C. y col., *J. Biol. Chem.* 267, 12692-12699, 1992

**Kinstler**, O. y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 477-485, 2002

**March**, J., *Advanced Organic Chemistry* 375-376, 1997

**Meyers**, F.J. y col., *Clin. Pharmacol. Ther.* 49, 307-313, 1991

**Miyakoshi**, N. y col. en *Endocrinology* 142, 2641-2648, 2001

**Mohan**, S. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8338-8342, 1989

**Monfardini**, C. y col., *Bioconjug. Chem.* 6, 62-69, 1995

**Morpurgo**, M. y col., *J. Bioconjug. Chem.* 7, 363-368, 1996

**Nag**, A. y col., *Anal. Biochem.* 237, 224-231, 1996

**Qin**, X. y col., *J. Biol. Chem.* 273, 23509-23516, 1998

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, editorial Mack Publishing Company, coordinado por Oslo y col. (p. ej. en las pp. 1435-1712)

**Schiltz**, P.M. y col., *J. Bone Mineral Res.* 8, 391-396, 1993

**Shihabi**, Z.K. y Dyer, R.D., *Ann. Clin. Lab. Sci.* 18, 235-239, 1988

**Tanaka**, H. y col., *Cancer Res.* 51, 3710-3714, 1991

patente US-5 382 657

patente US-5 672 662

patente US-5 932 462

van den **Berg**, C.L. y col., *Europ. J. Cancer* 33, 1108-1113, 1997

**Veronese**, F.M., *Biomaterials* 22, 405-417, 2001

WO 94/01451

WO 94/22466

**Wojchowski**, D.M. y col., *Biochim. Biophys. Acta* 910, 224-232, 1987

**Yu**, H. y **Rohan**, T., *Natl. Cancer Inst.* 92, 1472-1489, 2000.



REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que consta de la proteína 4 de fijación del factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP-4) y uno o dos grupos poli(etilenglicol), dichos grupos poli(etilenglicol) tienen un peso molecular total de 30 a 40 kDa.

2. Un conjugado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el o los grupos poli(etilenglicol) es/son grupos poli(etilenglicol) ramificados.

3. Un conjugado según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el conjugado está unido mediante grupo(s) amino primario(s) de la IGFBP-4

4. Un conjugado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el conjugado está unido al grupo cisteína 110 y/o cisteína 117 de la IGFBP-4.

5. Un conjugado según las reivindicaciones de 1 a 3, que contiene un grupo poli(etilenglicol).

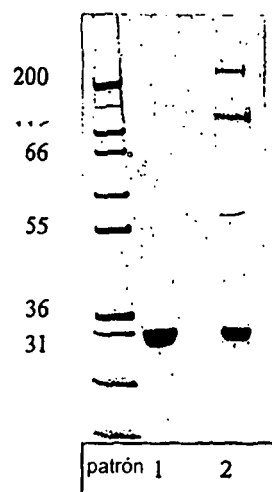
6. Un método para la obtención de conjugado que consta de la proteína 4 de fijación del factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP-4) y uno o dos grupos poli(etilenglicol), dicho(s) grupo(s) poli(etilenglicol) tienen un peso molecular total de 30 a 40 kDa, dicho método consiste en hacer reaccionar la IGFBP-4 con poli(etilenglicol) activado en condiciones tales que dicho poli(etilenglicol) se una químicamente a dicha IGFBP-4 a través de los grupos amino primarios o los grupos tiol de la IGFBP-4.

7. Una composición farmacéutica que contiene un conjugado según las reivindicaciones de 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

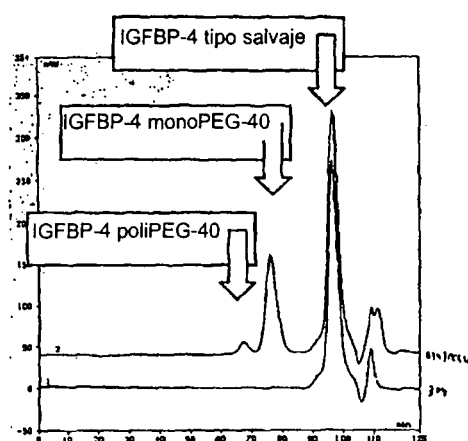
8. Una composición farmacéutica que contiene un conjugado según una de las reivindicaciones de 1 a 4 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

**Fig. 1**

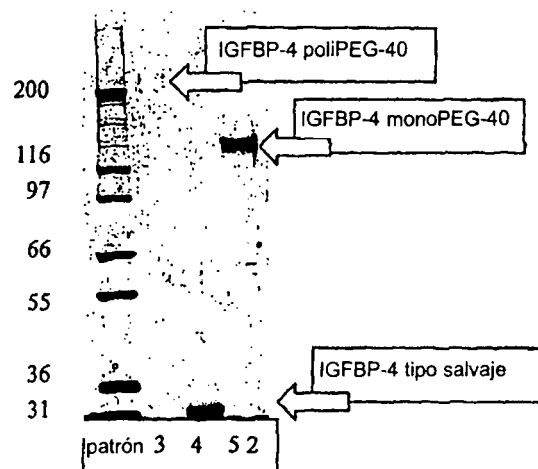
A)



B)



C)



**Fig. 2**

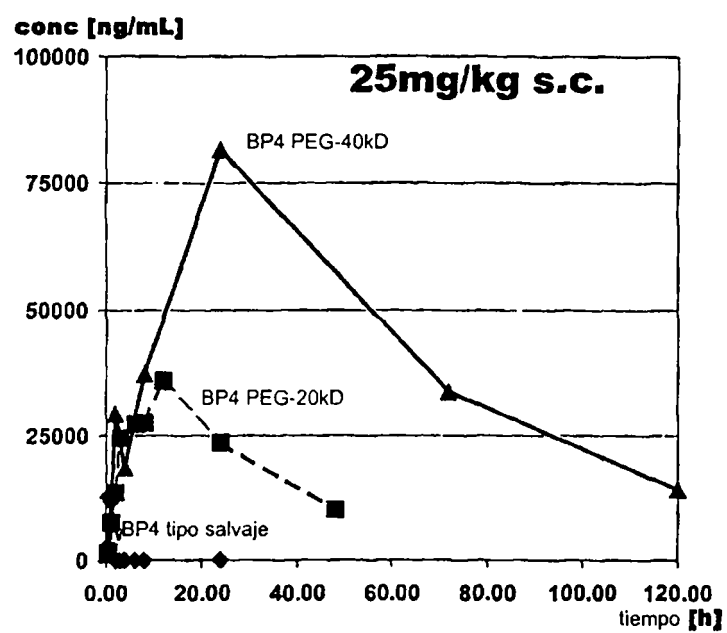
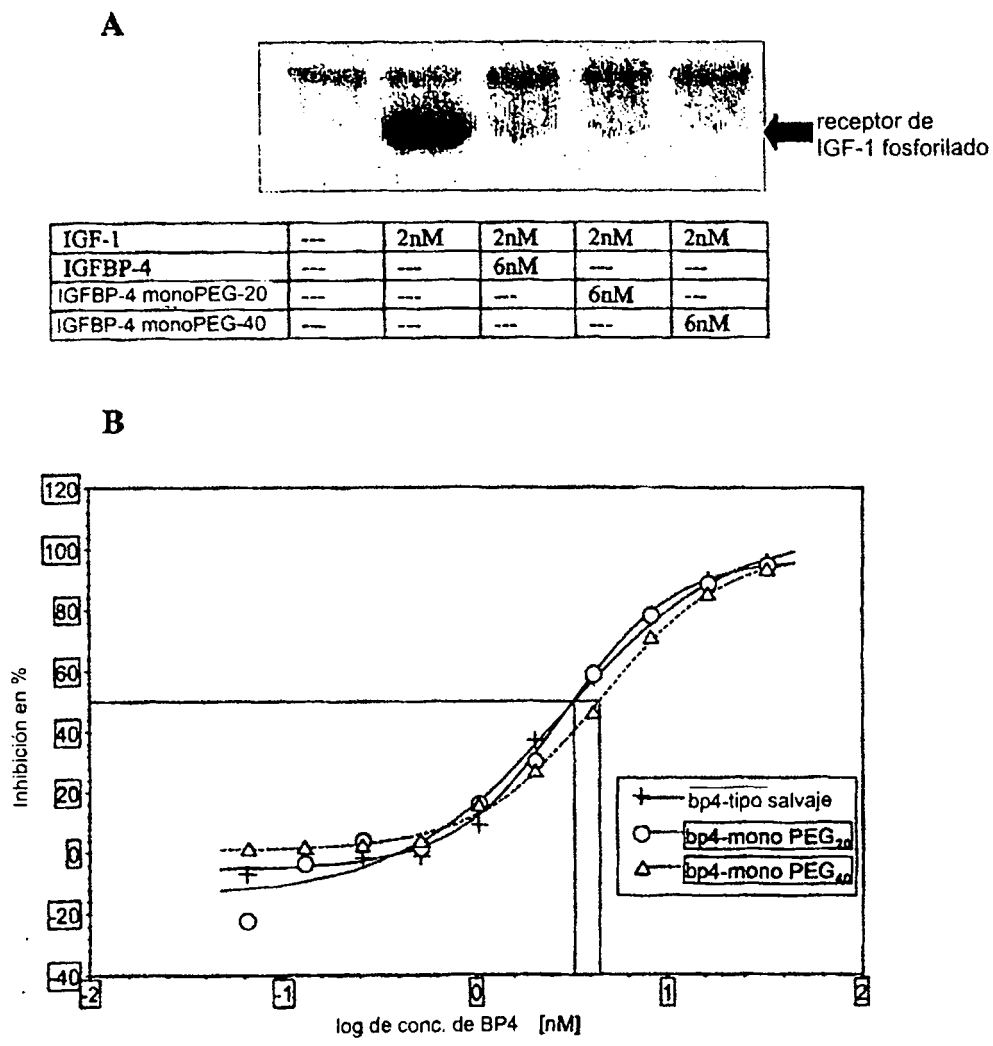
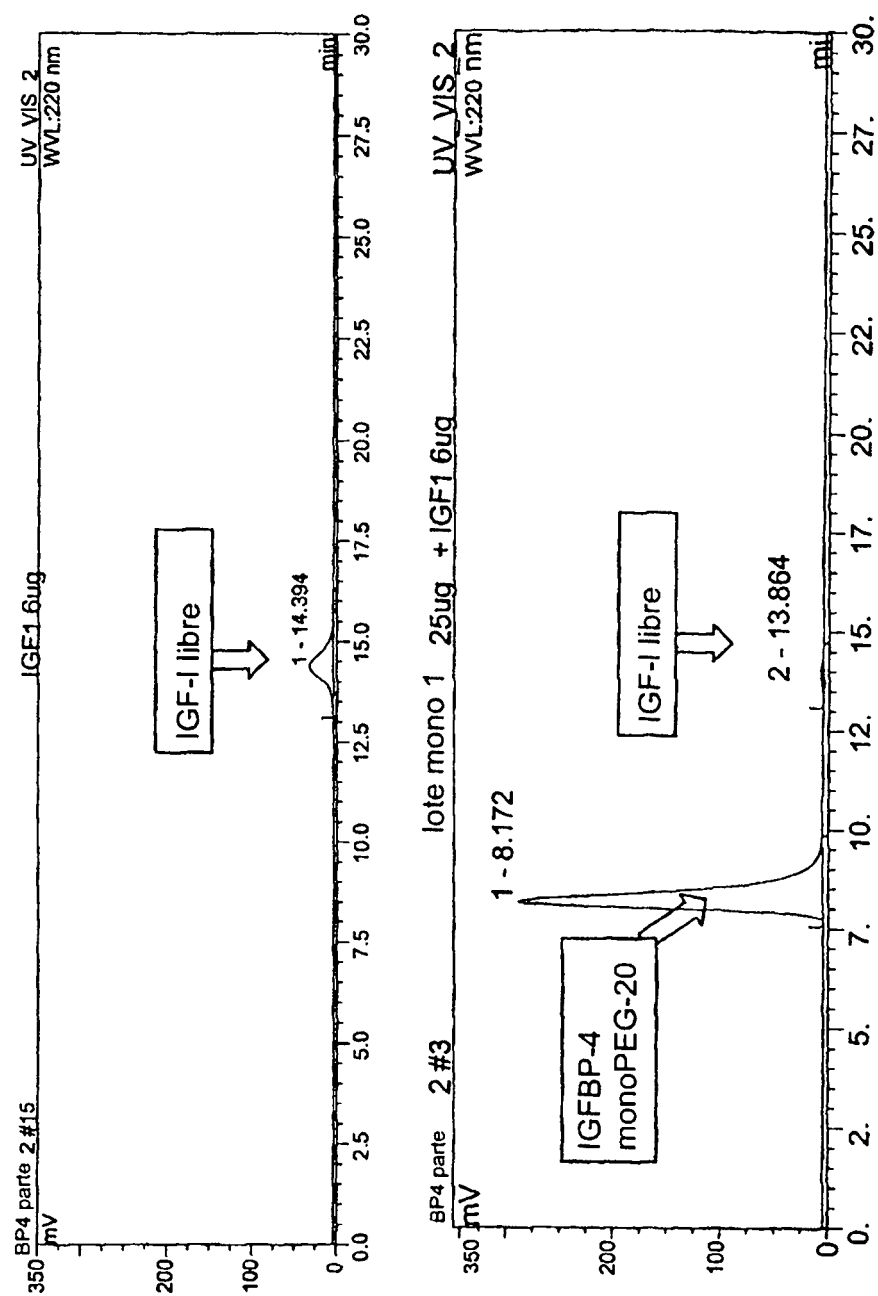


Fig. 3



**Fig. 4**



**Fig. 5**

