



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 096**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06744294 .7**
96 Fecha de presentación : **29.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1912673**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **Procedimiento para fijar moléculas efectoras a proteínas.**

30 Prioridad: **06.07.2005 GB 0513852**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2011

73 Titular/es: **UCB PHARMA, S.A.**
60, allée de la Recherche
1070 Brussels, BE

72 Inventor/es: **Heywood, Sam Philip**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 096 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para fijar moléculas efectoras a proteínas

La presente invención se refiere a procedimientos para fijar moléculas efectoras a proteínas y más específicamente proporciona un procedimiento mejorado para la fijación específica del sitio de una o varias moléculas efectoras a una o a varias cisteínas en una proteína.

Las proteínas con moléculas efectoras fijadas se utilizan para una variedad de fines diferentes que incluyen los usos de diagnóstico y terapéuticos. La alta especificidad y afinidad, por ejemplo, de las regiones variables de un anticuerpo, las convierte en agentes ideales de diagnóstico y terapéuticos, particularmente para modular interacciones proteína:proteína. La función de dirigir hacia una diana, codificada en los fragmentos Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ y en otros fragmentos de anticuerpo, se puede conjugar con una o varias moléculas efectoras, tales como fármacos citotóxicos, toxinas o moléculas poliméricas para incrementar la eficacia. Por ejemplo, puesto que estos fragmentos carecen de una región Fc, tienen una semivida en la circulación corta en animales, pero esto se puede mejorar mediante la conjugación con ciertos tipos de polímero, tal como polietilenglicol (PEG). El incremento del tamaño del PEG conjugado se ha observado que incrementa la semivida en la circulación desde minutos hasta muchas horas y se ha mostrado la modificación de un Fab' con PEG en el intervalo de 5 kDa hasta 100 kDa (Chapman y col., 1999, Nature Biotechnology, 17,780-783; Leong y col., 2001, Cytokine, 16,106-119; Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Los fragmentos de anticuerpo PEGilados, tales como CDP870, se están utilizando actualmente en ensayos clínicos, en donde el efecto del PEG conjugado es conseguir que la semivida en la circulación llegue a niveles que sean aceptables para terapia.

Las moléculas efectoras se pueden fijar a una proteína a través de un grupo reactivo en la proteína que puede tener lugar de forma natural en la proteína o se introduce artificialmente mediante modificación de la proteína. Tales grupos incluyen aminas (lisina), tioles (cisteína, metionina), fenoles (tirosina), ácidos carboxílicos (ácido aspártico, ácido glutámico) u otras cadenas laterales de aminoácidos. El sitio de la fijación de las moléculas efectoras puede ser al azar o específico del sitio, aunque la fijación específica del sitio se prefiere generalmente.

El residuo de tiol procedente del aminoácido cisteína que contiene azufre, es un grupo reactivo empleado generalmente que se puede utilizar para el acoplamiento selectivo de moléculas efectoras a proteínas. La fijación específica del sitio, por ejemplo, de moléculas efectoras a anticuerpos se consigue, en general, mediante la fijación de residuos de cisteína, puesto que tales residuos son relativamente poco comunes en fragmentos de anticuerpo. Las regiones bisagra de los anticuerpos son regiones comunes para la fijación específica del sitio, puesto que contienen residuos de cisteína y están alejadas de otras regiones del anticuerpo que probablemente están implicadas en la unión al antígeno. Las regiones bisagra adecuadas están presentes de forma natural o se pueden crear empleando técnicas de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.677.425; WO98/25971; Leong y col., 2001 Cytokine, 16,106-119; Chapman y col., 1999 Nature Biotechnology, 17, 780-783). Alternativamente, las cisteínas específicas del sitio se pueden modificar en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, para crear cisteína(s) expuesta(s) a la superficie (documento US 5.219.996).

Cuando las moléculas efectoras se tienen que fijar de forma específica del sitio, a través de una cisteína, el tiol diana en la proteína está recubierto frecuentemente con un producto peptídico pequeño relacionado con la fermentación, tal como glutatión o está recubierto deliberadamente con un aditivo químico empleado durante la extracción de la proteína (p. ej., un fragmento de anticuerpo) y la purificación, tal como 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). Los agentes de recubrimiento se tienen que eliminar para activar el tiol diana, antes de que se pueda fijar una molécula efectora. En muchos casos, es deseable activar selectivamente una o varias cisteínas diana para fijar la molécula efectora, sin reducir otras cisteínas dentro de la proteína. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo Fab' tienen un enlace disulfuro intercatenario natural, entre las regiones constantes de la cadena pesada y ligera (C_{H1} y C_L) y de este modo reducen selectivamente una cisteína diana en otro lugar en el anticuerpo, p. ej., la región bisagra, la reducción se tiene que realizar con mucho cuidado para que el disulfuro entre C_L:C_{H1} permanezca intacto y se evite la fijación de moléculas efectoras en las cisteínas intercatenarias. Por consiguiente, se emplean convencionalmente condiciones de reducción 'suaves' para eliminar el agente de recubrimiento del tiol y activar los tioles diana, antes de la reacción con una molécula efectora. Esta reducción suave se consigue generalmente incubando el fragmento de anticuerpo con un reductor a base de tiol, tal como β-mercaptoetanol (β-ME), β-mercaptoetilamina (β-MA) o ditiotreitil (DTT) (véase, por ejemplo, el documento EP0948544). Después de la reducción y la reacción con las moléculas efectoras (bajo esas condiciones), una gran parte de los fragmentos de anticuerpo no tienen ninguna molécula efectora fijada y éstas se tienen que purificar de forma aparte a los fragmentos de anticuerpo que tienen el número correcto de moléculas efectoras fijadas. Esta baja eficacia de la fijación de moléculas efectoras puede ser una desventaja durante la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpo terapéuticos modificados, en donde es importante conseguir una eficacia de producción máxima.

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la fijación selectiva de una o varias moléculas efectoras a una o a varias cisteínas en una proteína. En el procedimiento de la presente invención, una gran proporción de proteína está modificada correctamente, comparada con los métodos de la técnica anterior, incrementado de forma significativa la eficacia de la fijación de moléculas efectoras.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para fijar una o varias moléculas efectoras a una o a varias cisteínas en una proteína que comprende:

a) activar una o varias cisteínas en una proteínas mediante la diafiltración de la proteína frente a un agente reductor monotiol o un agente reductor multitiol que es incapaz de formar puentes disulfuro intramoleculares y

5 b) hacer reaccionar la proteína tratada con una molécula efectora.

El término 'proteína' tal y como se emplea en esta memoria, incluye proteínas, polipéptidos y fragmentos de los mismos que contienen una o varias cisteínas que se pueden utilizar para la fijación de moléculas efectoras. Las proteínas se pueden modificar, p. ej., para producir variantes y fragmentos de los mismos, mientras que se conserve cuando sea necesario, la propiedad biológica deseada (p. ej., la capacidad de unirse a un sitio diana). Las proteínas se pueden modificar empleando diversas técnicas de ingeniería genética o proteica, por ejemplo, para introducir cisteínas en la proteína para emplear como sitios para la fijación de las moléculas efectoras. Por tanto, las cisteínas empleadas para la fijación de las moléculas efectoras pueden estar presentes de forma natural en la proteína y/o se pueden modificar en la proteína mediante técnicas de ADN recombinante. Por ello, el número y la posición de las cisteínas disponibles para la fijación de las moléculas efectoras, se pueden controlar específicamente dependiendo del uso destinado a la proteína y el número de moléculas efectoras necesarias.

Ejemplos de proteínas adecuadas incluyen, pero no están limitados a los mismos, enzimas, hormonas, anticuerpos, receptores, factores de crecimiento, proteínas séricas, tales como albúmina, lipoproteínas y fibrinógeno, enzimas fibrinolíticas, tales como activador tisular del plasminógeno (t-PA), estreptocinasa y urocinasa, modificadores de la respuesta biológica, tales como interleucinas, interferones y factores estimuladores de las colonias, eritropoyetina y hormonas peptídicas, tales como la hormona luteinizante, la hormona del crecimiento, gastrina, hormona estimuladora del folículo, TSH, ACTH, proteínas que se unen a IGF, receptores solubles, tales como IL-1R, TNFR, IL-17R y otros.

Preferentemente, la proteína a la que se fijan las moléculas efectoras en el procedimiento de la presente invención, es un anticuerpo o un fragmento del mismo. El término 'anticuerpo' tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a anticuerpos completos y a fragmentos funcionalmente activos o derivados de los mismos, que pueden ser, pero no están limitados a los mismos, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fv, Fab, fragmentos Fab' y F(ab')₂ y fragmentos que se unen a epítopos de cualquiera de los anteriores. Otros ejemplos de fragmentos adecuados de anticuerpos también incluyen los descritos en los documentos WO2005003169, WO2005003170 y WO2005003171. Preferentemente la proteína para uso en la presente invención es un fragmento Fab'.

Los anticuerpos incluyen, por tanto, moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno de forma específica. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o una subclase de molécula de inmunoglobulina y se pueden obtener a partir de cualquier especie que incluye, por ejemplo, ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que tienen una o varias regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) procedentes de una especie no humana y una región estructural procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089).

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulinas que se han modificado genéticamente de forma que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Preferentemente, las regiones constantes de la cadena pesada y ligera son humanas y las regiones variables se obtienen a partir de otras especies.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar según cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica del hibridoma (Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocito B humano (Kozbor y col., *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole y col., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos también se pueden obtener según cualquier método adecuado, tal como los descritos en Babcook, J. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (15), 7843-7848, documentos WO92/02551, WO2004/051268 y WO2004/106377.

Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener a partir de cualquier anticuerpo completo, especialmente un anticuerpo monoclonal completo, empleando cualquier técnica adecuada de escisión enzimática y/o digestión, por ejemplo, mediante tratamiento con pepsina. Alternativamente, o además, los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y la re-expresión de ADN que codifica las regiones variables y/o constantes del anticuerpo. Las técnicas convencionales de la biología molecular se pueden utilizar para modificar, añadir o eliminar aminoácidos o dominios, de la forma deseada. Cualquier alteración de las regiones variable o constante sigue incluyéndose en los términos regiones "variable" y "constante", tal y como se emplean en la presente memoria.

Los métodos para crear y preparar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Boss y col., documento US 4.816.397; Cabilly y col., documento US 6.331.415; Shrader y col., documento WO 92/02551; Ward y col., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann y col., 1988, Nature, 322, 323; Bird y col., 1988, Science, 242, 423; Queen y col., documento US 5.585.089; Adair, documento WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10,1-142; Verma y col., 1998, Journal of Immunological Methods, 216,165-181).

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos para emplear en la presente invención pueden poseer una región bisagra natural o modificada que comprende una o varias cisteínas que se pueden utilizar como sitios para la fijación de las moléculas efectoras. La región bisagra natural es la región bisagra que está asociada generalmente con el dominio C_H1 de la molécula de anticuerpo. Una región bisagra modificada es cualquier región bisagra que difiere en longitud y/o composición de la región bisagra natural. Tales regiones bisagra pueden incluir regiones bisagra procedentes de otras especies, tales como las regiones bisagra de ser humano, ratón, conejo, tiburón, cerdo, hámster, camello, llama o cabra. Otras regiones bisagra modificadas pueden comprender una región bisagra completa obtenida a partir de un anticuerpo de una clase o subclase diferente de la del dominio C_H1. Por tanto, por ejemplo, un dominio C_H1 de la clase γ 1 se puede fijar a una región bisagra de la clase γ 4. Alternativamente, la región bisagra modificada puede comprender parte de una región bisagra natural o una unidad repetida en la que cada unidad en la repetición se obtiene a partir de una región bisagra natural. En otra alternativa, la región bisagra natural se puede alterar convirtiendo una o varias cisteínas u otros residuos en residuos neutros, tales como serina o alanina, o convirtiendo residuos colocados de forma adecuada en residuos de cisteína. De este modo, el número de residuos de cisteína en la región bisagra se puede incrementar o disminuir. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser totalmente sintéticas y se pueden diseñar para que posean las propiedades deseadas, tales como longitud, composición de cisteínas y flexibilidad.

Ya se ha descrito una variedad de regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US5.677.425, WO9915549, WO9825971 y WO2005003171 y estos se incorporan en esta memoria como referencia. En un ejemplo, la proteína para emplear en la presente invención es un fragmento Fab' con una región bisagra natural o modificada.

Alternativamente, o además, las cisteínas específicas del sitio para la fijación de las moléculas efectoras, se pueden modificar en los anticuerpos o en fragmentos de los mismos, por ejemplo, para crear cisteína(s) expuesta(s) a la superficie (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.219.996 y WO2006034488). Por tanto, utilizando técnicas de modificación adecuadas, se puede modificar el número de cisteínas en un anticuerpo o en un fragmento del mismo, para proporcionar un número específico de sitios para la fijación de las moléculas efectoras.

Por tanto, en una realización de la presente invención, la proteína es un fragmento de anticuerpo Fab' y cada cisteína a la que se fija una molécula efectora está en la región bisagra. En otra realización, la proteína es un fragmento de anticuerpo Fab' o Fab y al menos una cisteína a la que se fija una molécula efectora, es una cisteína modificada, preferentemente una cisteína expuesta a la superficie. En una realización, dos o más moléculas efectoras se fijan a un fragmento de anticuerpo Fab' y al menos una de dichas moléculas se fija a una cisteína en la región bisagra.

Cuando la proteína de la presente invención es un anticuerpo o un fragmento del mismo, el anticuerpo será capaz generalmente de unirse selectivamente a un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno asociado a una célula, por ejemplo, un antígeno de la superficie celular sobre células, tales como células bacterianas, células de levadura, linfocitos T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser un antígeno soluble. Los antígenos también pueden ser cualquier antígeno con importancia médica, tales como los antígenos que aumentan la expresión durante una enfermedad o una infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos particulares de antígenos de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas tales como las integrinas β 1, p. ej., VLA-4, E-selectina, P-selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de leche humana (HMFG1 y 2), antígenos del CMH de clase I y CMH de clase II y VEGF, y cuando sea adecuado, sus receptores. Los antígenos solubles incluyen interleucinas, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos víricos, por ejemplo, antígenos del virus respiratorio sincitial o de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral- α , factor de necrosis tumoral- β , factores estimuladores de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento obtenidos a partir de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β , y cuando sea adecuado, sus receptores.

En el procedimiento de la presente invención, al menos una molécula efectora está ligada covalentemente a través de un grupo tiol de un residuo de cisteína, localizado en la proteína. El enlace covalente será generalmente un puente disulfuro, un enlace tio-éter o, en particular, un enlace azufre-carbono. Se pueden utilizar moléculas efectoras activadas de forma adecuada, por ejemplo, derivados selectivos de tiol, tales como maleimida, piridilditio, vinilsulfona, yodacetilo, bromoacetilo y derivados de cisteína.

La expresión 'molécula efectora', tal y como se utiliza en esta memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de las mismas, p. ej., ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o presentes en la naturaleza, ácidos nucleicos y sus fragmentos, p. ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos informadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se

pueden detectar mediante espectroscopía RMN o RES. Se apreciará que una molécula efectora puede comprender una molécula efectora sencilla o dos o más de tales moléculas, unidas de tal modo que forman un resto aislado que se puede fijar a una proteína empleando el procedimiento de la presente invención.

5 Los agentes antineoplásicos particulares incluyen agentes citotóxicos y citoestáticos, por ejemplo, agentes de alquilación, tales como agentes mostaza de nitrógeno (p. ej., clorambucil, melfalán, mecloretamina, ciclofosfamida o mostaza de uracilo) y derivados de los mismos, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida, busulfán o cisplatino; antimetabolitos, tales como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, ácido fluoroacético o ácido fluorocítrico, antibióticos, tales como bleomicinas (p. ej., sulfato de bleomicina), doxorubicina, daunorrubicina, mitomicinas (p. ej., mitomicina C), actinomicinas (p. ej., dactinomicina) plicamina, caliqueamicina y sus derivados, o esperamicina y sus derivados; inhibidores de la mitosis, tales como etopósido, vincristina o vinblastina y sus derivados; alcaloides tales como elipticina; polioles tales como taxicina-I o taxicina-II; hormonas, tales como andrógenos (p. ej., dromostanolona o testolactona), progestinas (p. ej., acetato de megestrol o acetato de medroxiprogesterona), estrógenos (p. ej., difosfato de dimetilestilbestrol, fosfato de poliestradiol o fosfato de estramustina) o antiestrógenos (p. ej., tamoxifeno); antraquinonas, tales como mitoxantrona, ureas, tales como hidroxurea; hidrazinas, tales como procarbazona; o imidazoles, tales como dacarbazina.

15 Los metales quelantes incluyen quelatos de metales di- o tripositivos que tienen un número de coordinación desde 2 hasta 8 inclusive. Ejemplos particulares de tales metales incluyen tecnecio (Tc), renio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb), bismuto (Bi), indio (In), galio (Ga), itrio (Y), terbio (Tb), gadolinio (Gd) y escandio (Sc). En general, el metal es preferentemente un ranionucleido. Radionucleidos particulares incluyen ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{58}Co , ^{60}Co , ^{67}Cu , ^{195}Au , ^{199}Au , ^{110}Ag , ^{203}Pb , ^{206}Bi , ^{207}Bi , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{160}Tb , ^{153}Gd y ^{47}Sc .

20 El metal quelante puede ser, por ejemplo, uno de los tipos anteriores de quelato metálico con cualquier agente quelante polidentado adecuado, por ejemplo, poliaminas acíclicas o cíclicas, poliéteres (p. ej., éteres corona y derivados de los mismos); poliamidas; porfirinas; y derivados carbocíclicos.

25 En general, el tipo de agente quelante dependerá del metal en uso. Sin embargo, un grupo particularmente útil de agentes quelantes en conjugados de acuerdo con la invención son las poliaminas acíclicas y cíclicas, especialmente poli(ácidos aminocarboxílicos), por ejemplo, ácido dietilentriaminopentaacético y sus derivados, y aminas macrocíclicas, p. ej., derivados cíclicos de tri-aza y tetra-aza (por ejemplo, tal y como se describe en el documento de la memoria de patente internacional n^o WO 92/22583); y poliamidas, especialmente desferrioxamina y sus derivados.

30 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no están limitadas a las mismas, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, los polipéptidos y los péptidos de interés incluyen, pero no están limitados a los mismos, inmunoglobulinas, albúmina, toxinas, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente anti-angiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina, o un agente modificador de la respuesta biológica, tal como linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

35 Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnosis. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en la tomografía de emisión de positrones) y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general el documento de patente de EE.UU. n^o 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, rojo de rodamina, verde de rodamina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, alofococianina, rojo de Texas, azul de Pacífico, azul de Marina, verde de Oregón y las series de Alexa Fluor 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700 y 750; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aecuorina; y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

40 Los polímeros sintéticos o presentes en la naturaleza para uso como moléculas efectoras incluyen, por ejemplo, polímeros de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituidos de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno, o polisacáridos ramificados o no ramificados, p. ej., un homopolisacárido o heteropolisacárido, tal como lactosa, amilosa, dextrano, almidón o glicógeno.

45 Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente, incluyen uno o varios grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituidos, o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido, tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de los mismos.

5 "Derivados" tal y como se emplea en esta memoria, incluye derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol, tal como ácido o éster de α -halocarboxílico, p. ej., yodoacetamida, una imida, p. ej., maleimida, una vinil sulfona o maleimidias disulfuro y similares. El grupo reactivo puede unirse directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el residuo de un grupo tal formará parte en algunos casos del producto como el grupo ligante entre la proteína y el polímero.

10 El tamaño del polímero que puede ser lineal o ramificado, se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular medio ponderado desde 500 Da hasta 100.000 Da, preferentemente desde 5.000 hasta 40.000 Da y más preferentemente desde 10.000 hasta 40.000 Da y 20.000 hasta 40.000 Da. El tamaño del polímero en particular, se puede seleccionar basándose en el uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad para dirigirse a ciertos tejidos, tales como tumores, o aumentar la semivida en la circulación (para un informe, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en un tejido, por ejemplo, para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5.000 Da. Para las aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de alto peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 25.000 Da a 40.000 Da.

15 Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero polialquileo, tal como poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de éste, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 40.000 Da.

20 Los polímeros de la presente invención se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, a partir de Nippon Oil and Fats; Nektar Therapeutics) o se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles comercialmente, empleando procedimientos químicos convencionales.

25 En un aspecto preferido de la presente invención, al menos una de las moléculas efectoras fijada a la proteína es una molécula de polímero, preferentemente PEG o un derivado del mismo. En relación con la fijación de restos de polietilenglicol (PEG), se hace referencia en general en "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (compilador), Plenum Press, Nueva York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (compiladores), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

30 En un ejemplo de la presente invención, cada molécula efectora fijada a la proteína, es PEG, la proteína es un fragmento de anticuerpo y cada molécula de PEG está ligada covalentemente a través de un grupo maleimida a uno o a varios grupos tiol en el fragmento de anticuerpo. En una realización preferida, la proteína es un fragmento Fab' de anticuerpo y una molécula PEG está enlazada a través de un grupo maleimida a una cisteína aislada en la región bisagra. El PEG puede ser lineal o ramificado. Para fijar las moléculas de PEG ramificadas, un residuo de lisina se enlaza con preferencia covalentemente al grupo maleimida. A cada uno de los grupos amino sobre el residuo de lisina, se fija preferentemente un polímero de metoxi(polietilenglicol). En un ejemplo, el peso molecular de cada polímero es de aproximadamente 20.000 Da y el peso molecular total de la molécula de polímero completa es por ello de aproximadamente 40.000 Da.

35 Dos o varias moléculas efectoras se pueden fijar a cisteínas en la proteína empleando el procedimiento descrito en esta memoria, de forma simultánea o secuencial repitiendo el procedimiento. Preferentemente, si dos o varias de las moléculas efectoras están fijadas a la proteína, se fijan de forma simultánea.

40 El procedimiento de la presente invención también se extiende a una o a varias etapas antes y/o después del procedimiento descrito en esta memoria, en donde otras moléculas efectoras se fijan a la proteína empleando cualquier método adecuado, por ejemplo, a través de otras cadenas laterales de aminoácidos disponibles, tal como grupos amino e imino. Otras moléculas efectoras tales se pueden fijar a la proteína empleando procedimientos convencionales químicos o de ADN recombinante, en donde la proteína se une directamente o a través de un agente de acoplamiento, a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras a los anticuerpos, por ejemplo, se conocen bien en la técnica (véase, Hellstrom *y col.*, *Controlled Drug Delivery*, 2ª ed., Robinson *y col.*, compiladores, 1987, págs. 623-53; Thorpe *y col.*, 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik *y col.*, 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos de memoria descriptiva de las patentes internacionales con número WO93/06231, WO92/22583, WO90/09195, WO89/01476, WO9915549 y WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, el enlace se puede conseguir empleando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, tal y como se describe en el documento de memoria descriptiva de la patente europea nº 392745.

55 En el procedimiento de la presente invención, una o varias cisteínas se activan en la etapa (a) antes de la fijación de las moléculas efectoras. El término 'activación' tal y como se emplea en esta memoria, se refiere al procedimiento de producir un tiol libre en cada cisteína a la que se fija una molécula efectora en la etapa (b). En un ejemplo, 'activación' se refiere a la eliminación de un aducto unido a la cisteína, tal como glutatión. En otro ejemplo, 'activación' se refiere a la reducción de un enlace disulfuro entre dos cisteínas en cadenas de polipéptidos distintas, por ejemplo, la reducción del enlace disulfuro entre una o varias cisteínas de la región bisagra de un F(ab')₂ para activar las cisteínas de la región bisagra de los fragmentos Fab' constituyentes. En una realización, una cisteína de la región bisagra de un fragmento

Fab' se activa eliminando un aducto unido a la cisteína. En otra realización, una cisteína de la región bisagra de un fragmento Fab' se activa reduciendo el enlace disulfuro entre dos cisteínas de la región bisagra en un F(ab')₂.

Preferentemente, cada cisteína que está activada en la etapa (a) del procedimiento, no tiene un enlace disulfuro con otra cisteína dentro del mismo polipéptido. Por ejemplo, cuando la proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo, una cisteína activada en la etapa (a) preferentemente no es la cisteína intercatenaria de la cadena pesada, C_{H1}, o la cisteína intercatenaria de la cadena ligera, C_L, o una cisteína intracatenaria de la cadena ligera o pesada. Por ello, la presente invención proporciona un procedimiento en el que moléculas efectoras se pueden fijar de forma eficaz y selectivamente a residuos específicos de cisteína y se pueden conservar otros enlaces disulfuro deseables dentro de la proteína.

En otra realización de la presente invención, en donde la proteína es un fragmento de anticuerpo Fab', el producto del procedimiento es un fragmento de anticuerpo Fab' en el que una molécula efectora se fija a una cisteína aislada en la región bisagra y se conserva el puente disulfuro intercatenario entre la cadena pesada y la ligera (C_{H1} y C_L).

En otra realización, dos o varias proteínas pueden estar enlazadas a través de una o varias moléculas efectoras, usando el procedimiento de la presente invención. Las proteínas que pueden ser las mismas o diferentes, se pueden enlazar a través de una o de varias moléculas efectoras, cuando es adecuado usando enlazadores adecuados. En un ejemplo, se pueden enlazar anticuerpos divalentes a través de un puente intercatenario que contiene una molécula efectora enlazada covalentemente. En un ejemplo tal, dos fragmentos Fab' se enlazan empleando el procedimiento de la presente invención, con una molécula de PEG a través de enlazadores adecuados, para producir un anticuerpo multivalente. En un ejemplo tal, dos fragmentos Fab' se reticularan con un puente de dimaleimida PEGilada para producir DFM-PEG, tal y como se describe en el documento WO99/64460.

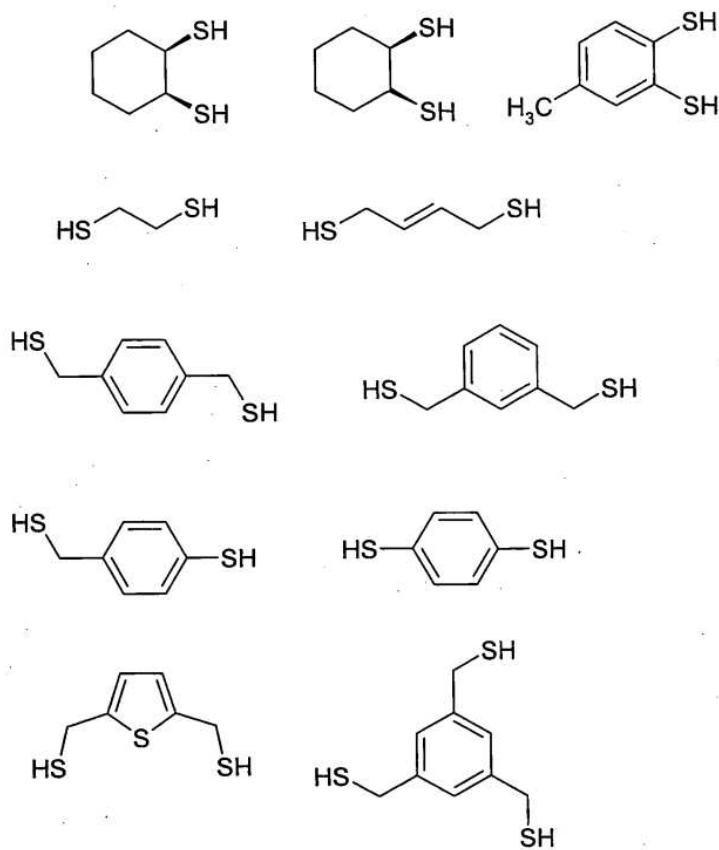
Las cisteínas se activan selectivamente en la etapa (a) del procedimiento de la presente invención mediante diafiltración de la proteína frente a un agente reductor monotiol o un agente reductor multitiol que es incapaz de formar puentes disulfuro intramoleculares. La diafiltración es una técnica bien conocida y se emplea generalmente para cambiar el tampón de muestras proteicas. Las células de diafiltración están a disposición comercial, por ejemplo, la célula con agitación de Amicon y el sistema "Centramate" de Pall. Una muestra de proteína, típicamente en un tampón, se diafiltra a través de una membrana que retiene la proteína y permite el intercambio del tampón. A lo largo del tiempo, el tampón original que contiene la proteína se sustituye por un nuevo tampón. En la presente invención, la expresión 'diafiltrar frente a un agente reductor monotiol o un agente reductor multitiol que es incapaz de formar puentes disulfuro intramoleculares' se refiere a la diafiltración de una proteína frente a un disolvente, de forma adecuada un tampón, que contiene un agente reductor adecuado.

La etapa (a) del procedimiento se realiza generalmente en una solución tampón acuosa, ejemplos de las mismas incluyen pero no están limitados a los mismos, tampón fosfato o tampón citrato. La proteína puede estar en el mismo tampón que el tampón de diafiltración o puede ser diferente. Preferentemente el pH del tampón está en el intervalo entre 2,0 y 10,0, más preferentemente entre 4,0 y 7,0. En una realización preferida, el pH del tampón está entre 6,0 y 7,0. El tampón puede contener opcionalmente un agente quelante, tal como EDTA, EGTA, CDTA o DTPA. Preferentemente el tampón contiene EDTA entre 1 y 5 mM, preferentemente 2 mM. Como alternativa, o además, el tampón puede ser un tampón quelante, tal como ácido cítrico, ácido oxálico, ácido fólico, bicina, tricina, tris o ADA.

Los agentes reductores adecuados para el uso en la presente invención, son agentes reductores monotioles y agentes reductores multitioles que son incapaces de formar puentes disulfuro intramoleculares.

Los agentes reductores monotiol para emplear en la presente invención son ampliamente conocidos en la técnica, ejemplos de los mismos incluyen sin estar limitados a los mismos, β-mercaptoetilamina, β-mercaptoetanol, cisteína y glutatión. Preferentemente el agente reductor monotiol para emplear en la presente invención, es β-mercaptoetilamina.

Otros agentes reductores adecuados incluyen agentes reductores multitioles que son incapaces de formar puentes disulfuro intramoleculares. La expresión 'agentes reductores multitioles que son incapaces de formar puentes disulfuro intramoleculares' tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a agentes reductores que contienen dos o varios grupos tiol que son incapaces de formar puentes disulfuro intramoleculares entre los grupos tiol. Ejemplos de tales agentes reductores se muestran a continuación:



Agentes reductores no adecuados para el uso en la presente invención son agentes reductores multitioles que son capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares, por ejemplo, ditiotreitól que puede formar un puente disulfuro intramolecular entre sus dos grupos tiol.

- 5 Para una persona experta en la técnica estará claro que los agentes reductores adecuados se pueden identificar determinando el número de tioles libres producido después de que la proteína se haya tratado con el agente reductor en la etapa (a) o determinando el número de moléculas efectoras fijadas en la etapa (b), por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Los métodos para determinar el número de tioles libres son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo, Lyons y *col.*, 1990, Protein Engineering, 3, 703.
- 10 Las concentraciones adecuadas de agente reductor también se pueden determinar empíricamente por una persona experta en la técnica. Preferentemente, el agente reductor se utiliza en una concentración entre 0,3 y 5 mM, más preferentemente entre 0,3 y 4 mM, incluso más preferentemente entre 0,3 y 3 mM, aún más preferentemente, entre 0,3 y 2 mM. Las concentraciones preferidas son 1,1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 mM. Preferentemente la concentración de agente reductor es menor para conseguir una activación selectiva de las cisteínas diana. Por ello, en una realización, la concentración de agente reductor no excede de 5 mM. En una realización, la concentración de agente reductor no excede de 4 mM. En una realización, la concentración de agente reductor no excede de 3 mM. En una realización, la concentración de agente reductor no excede de 2 mM. En una realización, la concentración de agente reductor no excede de 1 mM.
- 20 En una realización de la presente invención, antes del comienzo de la diafiltración en la etapa (a) no hay ningún agente reductor presente en la muestra de proteína y la proteína se pone en contacto con el agente reductor mediante diafiltración. Por tanto, en una realización, el agente reductor solamente se incorpora en el tampón de diafiltración y no hay ningún agente reductor presente en la muestra de proteína antes de la etapa (a) del procedimiento.
- 25 En otra realización, el agente reductor también se añade a la proteína antes de la diafiltración en la etapa (a). Preferentemente, el agente reductor se añade a la proteína inmediatamente antes de comenzar con la diafiltración. El agente reductor añadido a la proteína puede ser el mismo que el agente reductor en el tampón de diafiltración o puede ser diferente. En los dos casos, el agente reductor utilizado es preferentemente un agente reductor monotiol o un agente reductor multitiole que es incapaz de formar puentes disulfuro intramoleculares. Por lo tanto, en una realización, el agente reductor añadido a la muestra de proteína es diferente del agente reductor en el tampón de diafiltración. Preferentemente, el agente reductor añadido a la proteína es el mismo que el agente reductor en el tampón de diafiltración, es decir, un agente reductor monotiol o un agente reductor multitiole que es incapaz de formar puentes disulfuro intramoleculares. Preferentemente, el agente reductor en la muestra de proteína y en el tampón de diafiltración
- 30

5 es β -mercaptoetilamina. Preferentemente, la concentración de partida de agente reductor en la muestra de proteína antes de la diafiltración es entre 0,5 y 1,5 veces la concentración de agente reductor en el tampón de diafiltración, más preferentemente entre 0,75 y 1,25, incluso más preferentemente entre 0,9 y 1,1. En una realización, la concentración de agente reductor en la muestra de proteína al comienzo de la diafiltración es aproximadamente la misma que la concentración de agente reductor en el tampón de diafiltración, preferentemente es la misma.

Se apreciará que la activación de las cisteínas en una proteína en la etapa (a) del procedimiento de la presente invención, la puede mejorar una persona experta en la técnica, variando el agente reductor utilizado, la concentración de agente reductor, la concentración de la proteína, el pH de la reacción, la temperatura, la duración de la diafiltración y el flujo.

10 El flujo de diafiltración adecuado se puede determinar de este modo empíricamente una persona experta en la técnica. El flujo adecuado incluye entre 1 y 15 diavolumenes/h. Un flujo menor también se puede utilizar, por ejemplo, entre 0,2 y 0,9 diavolumenes/h. En una realización, el flujo es 0,5 diavolumenes/h.

La diafiltración se puede realizar a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo, entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, por ejemplo, a temperatura ambiente.

15 La etapa (a) del método se realiza durante el tiempo suficiente para activar cada cisteína a la que se va a fijar una molécula efectora en la etapa (b). Las duraciones adecuadas las puede determinar empíricamente un experto en la técnica. Típicamente, la diafiltración tiene lugar durante un periodo de entre 1 y 20 horas. En una realización, la diafiltración tiene lugar durante un periodo de entre 1 y 10 horas, típicamente 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 horas. En una realización, la diafiltración tiene lugar durante un periodo de 6,5 horas.

20 Una concentración adecuada de proteína para uso en el procedimiento de la invención también se puede determinar empíricamente por un experto en la técnica, dependiendo del tipo de proteína. Por ejemplo, cuando la proteína es un fragmento de anticuerpo Fab', las concentraciones adecuadas incluyen entre 1 y 200 mg/l, preferentemente entre 2 y 30 mg/l, preferentemente 20 mg/l.

25 Opcionalmente, después de la diafiltración frente a un agente reductor, el nivel de agente reductor se puede reducir o se puede eliminar el agente reductor entre la etapa (a) y (b) del procedimiento, usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En una realización, la concentración de agente reductor se reduce mediante diafiltración de la proteína frente a un tampón que no contiene ningún agente reductor, por ejemplo, continuando la diafiltración de la etapa (a) frente a este nuevo tampón. En otra realización, el nivel de agente reductor se reduce mediante diafiltración frente a un tampón que contiene una concentración inferior de agente reductor. En otra realización, el nivel de agente reductor se reduce o el agente reductor se elimina de la muestra de proteína mediante filtración en gel.

30 En la etapa (b) del procedimiento, una o varias moléculas efectoras reaccionan con la proteína tratada, producida en la etapa (a) del método, para fijar una molécula efectora en la(s) cisteína(s) activada(s).

35 La etapa (b) del procedimiento se puede realizar generalmente en un disolvente, por ejemplo, una solución tampón acuosa, tal como fosfato, citrato o acetato. Típicamente, este es el tampón en el que se ha diafiltrado la muestra de proteína o se ha transferido por filtración en gel. La reacción se puede realizar generalmente a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo, entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, por ejemplo, a temperatura ambiente. El tampón puede contener opcionalmente un agente quelante, tal como EDTA, EGTA, CDTA o DTPA. Preferentemente el tampón contiene EDTA entre 1 y 5 mM, preferentemente 2 mM. Como alternativa, o además, el tampón puede ser un tampón quelante, tal como ácido cítrico, ácido oxálico, ácido fólico, bicina, tricina, tris o ADA. La molécula efectora se empleará en general en una concentración, al menos equimolar en relación con la concentración de la proteína, es decir, al menos 1:1. Típicamente, la molécula efectora se empleará con un exceso de concentración en relación con la concentración de la proteína. Típicamente, la molécula efectora tiene entre 1,1 y 100 veces de exceso molar, preferentemente 1,1,1,5, 2, 3, 5,10 o 50 veces de exceso molar. Otros ejemplos de concentraciones adecuadas de molécula efectora incluyen 1,2,1,25,1,3 y 1,4 veces de exceso molar. Alternativamente, cuando se fijan 2 o más proteínas a una o varias moléculas efectoras, la molécula efectora puede no estar en exceso, por ejemplo, la proporción de molécula efectora frente a proteína puede ser entre 0,1 y 1, preferentemente 0,5. La duración de la reacción se puede determinar empíricamente por una persona experta en la técnica y típicamente es entre 1 y 20 horas. En una realización, la reacción tiene lugar durante un periodo de 14-16 horas.

40 Cuando es necesario, el producto deseado que contiene el número deseado de moléculas efectoras, se puede separar de cualquier material de partida o de otros productos generados durante el procedimiento, mediante medios convencionales, por ejemplo, mediante técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de intercambio iónico, de exclusión por tamaño, o de interacción hidrófoba. Por tanto, en una realización, el procedimiento de la presente invención comprende adicionalmente la etapa (c) en la que se purifica la proteína con el número deseado de moléculas efectoras fijadas.

55 EJEMPLOS

La presente invención se describe a continuación sólo a modo de ejemplo, en donde se hace referencia a:

Figura 1: Efecto del tiempo de reducción sobre la eficacia de la PEGilación de un Fab'.

Figura 2: Una comparación del efecto de las condiciones reductoras sobre la eficacia de la PEGilación.

Figura 3: Una comparación del efecto del tipo de reductor sobre la eficacia de la PEGilación.

Figura 4: Efecto de la concentración de reductor sobre la eficacia de la PEGilación.

5 Figura 5: Efecto del pH sobre la eficacia de la PEGilación.

El término 'Fab'-PEG' en todas las figuras representa un Fab' con un PEG 40.000 fijado a la cisteína aislada de la región bisagra.

10 El término 'Multi-PEG' en todas las figuras representa material PEGilado de alto peso molecular en el cual más de 1 molécula de PEG está fijada al fragmento de anticuerpo Fab'.

Ejemplo 1:

15 20 ml de Fab' que contenía un tiol aislado en la región bisagra a 10 mg/ml en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, se redujo por diafiltración en una célula agitada de Amicon 8050 con una membrana de peso molecular límite (MWCO) 10000, frente a 2-mercaptoetilamina 2 mM, fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6. Inmediatamente antes del comienzo de la diafiltración, se añadió 2-mercaptoetilamina a la solución Fab' hasta tener una concentración final de 2 mM.

20 Durante la diafiltración se retiraron partes alícuotas de 1 ml del material retenido, cada 30 min y el agente reductor se eliminó de la parte alícuota mediante filtración rigurosa en gel sobre una columna PD10 equilibrada con fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 6. El Fab' reducido se PEGiló en el mismo tampón con un exceso 3 veces molar de PEG-maleimida 40k (Nektar) a temperatura ambiente, durante 16 horas. La PEGilación del Fab' (porcentaje PEGilado) se midió mediante HPLC de exclusión por tamaño.

La Figura 1 muestra la progresión a lo largo del tiempo de la reacción hasta un equilibrio de ~80% de monoPEGilación del Fab' después de 5 horas de diafiltración.

Ejemplo 2:

25 Muestras de Fab' de 8 ml que contenían un tiol aislado en la región bisagra a 10 mg/ml, en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, se redujeron por diafiltración en una célula de agitación de Amicon modelo 8010 con una membrana de MWCO 10000 frente a 2-mercaptoetilamina 1 mM o 2-mercaptoetanol 1 mM o glutatión reducido 1 mM o ditioneitol 1 mM, todo en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, durante 16 horas a temperatura ambiente. Los agentes reductores se retiraron a continuación mediante diafiltración continuada de los Fab's frente a fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, durante 4 horas a temperatura ambiente. Los Fab's reducidos se PEGilaron en el mismo tampón con un exceso cinco veces molar de PEG-maleimida 40k (Nektar) a temperatura ambiente, durante 16 horas. En paralelo, muestras de 0,5 ml de Fab' que contenían un tiol aislado en la región bisagra a 10 mg/ml, en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, se redujeron mediante incubación con 2-mercaptoetilamina 5 mM o 2-mercaptoetanol 5 mM o glutatión reducido 5 mM o ditioneitol 5 mM, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los agentes reductores se eliminaron mediante filtración rigurosa en gel sobre una columna PD10 equilibrada con fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6. Los Fab's reducidos se PEGilaron con un exceso 5 veces molar de PEG-maleimida 40k (Nektar) a temperatura ambiente durante 16 horas.

35 La PEGilación del Fab' se midió mediante HPLC de exclusión por tamaño y SDS-PAGE reductor y no reductor. El análisis por SDS-PAGE mostraba que el puente disulfuro intercatenario estaba retenido en el Fab'-PEG (monopegilado).

40 La Figura 2 muestra que la reducción por diafiltración empuja el equilibrio hacia más monoPEGilación del Fab', comparada con la incubación que daba como resultado una alta proporción de Fab' que permanecía sin PEGilar. La diafiltración empleando 2-mercaptoetilamina incrementaba el porcentaje de Fab' que estaba monoPEGilado desde 55 hasta 85%. De forma similar, la diafiltración que empleaba glutatión o 2-mercaptoetanol incrementaba el porcentaje de Fab' que estaba monoPEGilado desde 25% hasta 58% y desde 22% hasta 42%, respectivamente. La Figura 2 también muestra que si el agente reductor es un di-tiol capaz de formar un puente disulfuro intramolecular, por ejemplo, ditioneitol, esto empuja el equilibrio de la monoPEGilación anterior a una multiPEGilación extensa, no deseada, en las cisteínas intercatenarias.

Ejemplo 3:

50 Muestras de Fab' de 8 ml que contenían un tiol aislado en la región bisagra a 10 mg/ml, en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, se redujeron mediante diafiltración en una célula de agitación de Amicon modelo 8010 con una membrana de MWCO 10000 frente a 2-mercaptoetilamina 1 mM o 2-mercaptoetanol 1 mM o glutatión reducido 1 mM o L-cisteína 1 mM, todo en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, durante 16 horas a temperatura ambiente. Los agentes reductores se retiraron a continuación mediante diafiltración continuada de los Fab's frente a fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, durante 4 horas a temperatura ambiente. Los Fab's reducidos se PEGilaron con un exceso 5 veces molar de PEG-maleimida

40k (Nektar) a temperatura ambiente durante 16 horas.

La PEGilación del Fab' se midió mediante HPLC de exclusión por tamaño y SDS-PAGE reductor y no reductor.

La Figura 3 muestra que la β -mercaptoetilamina y la cisteína son particularmente eficaces para reducir el Fab', para proporcionar niveles elevados de monoPEGilación.

5 Ejemplo 4:

10 Muestras de Fab' de 6 ml que contenían un tiol aislado en la región bisagra a 10 mg/ml, en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, se redujeron por diafiltración en una célula agitada de Amicon modelo 8010 con una membrana de MWCO 10000 frente a 2-mercaptoetilamina 0,3 mM o 1 mM o 3 mM o 5 mM, en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, durante 16 horas a temperatura ambiente. El agente reductor se retiró a continuación mediante diafiltración continuada de los Fab's frente a fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6, durante 4 horas a temperatura ambiente. Los Fab's reducidos se PEGilaron con un exceso 3 veces molar de PEG-maleimida 40k (Nektar) a temperatura ambiente durante 16 horas. La PEGilación de Fab' se midió mediante HPLC de exclusión por tamaño y SDS-PAGE reductor y no reductor.

15 La Figura 4 muestra que la eficacia de la reducción es dependiente de la concentración del agente reductor. Se encontró que 1 mM era óptima para este Fab' bajo esas condiciones. Se apreciará que la reducción de cualquier proteína se puede mejorar variando el agente reductor utilizado, la concentración del agente reductor, la concentración de la proteína, el pH de la reacción, la temperatura, la cantidad de agente reductor que pasa a través de la proteína y el flujo del agente reductor que pasa a través de la proteína.

Ejemplo 5

20 Muestras de Fab' de 6,5 ml a 10 mg/ml, en citrato 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 4, 5, 6 o 7 se redujeron por diafiltración en una célula de agitación de Amicon modelo 8010 con una membrana de MWCO 10000 frente a 2-mercaptoetilamina 1 mM en citrato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 4, 5, 6 o 7, durante 16 horas a temperatura ambiente. El agente reductor se eliminó mediante filtración rigurosa en gel sobre columnas PD10 equilibradas con citrato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 4, 5, 6 o 7. Los Fab's reducidos se PEGilaron con un exceso 4 veces molar de PEG-maleimida 40k (Nektar), a temperatura ambiente durante 5 horas.

25 La PEGilación del Fab' se midió mediante HPLC de exclusión por tamaño.

La Figura 5 muestra el efecto del pH sobre la cantidad de Fab'-PEG producido.

Ejemplo 6

30 Fab' de anticuerpo a 20 mg/ml (\pm 2 mg/ml) en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 6,8 se redujo mediante diafiltración empleando una membrana de NWCO 10000 con un volumen de 15-20 litros, frente a 2-mercaptoetilamina 1 mM en fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 6,8 durante 6,5 horas con un flujo de 1 volumen de diafiltración/h, a temperatura ambiente. Inmediatamente antes del comienzo de la diafiltración, se añadió 2-mercaptoetilamina a la solución de Fab' hasta tener una concentración final de 1 mM. Después de la diafiltración, el agente reductor se eliminó mediante diafiltración continuada a 8 volúmenes de diafiltración/h frente a acetato sódico 20 mM pH 4,5 durante 1 y 1,5 horas.

35 El Fab' reducido se incubó con un exceso 1,25 veces molar de PEG-maleimida 40k (Nektar), a temperatura ambiente durante 16 y 20 horas.

La PEGilación del Fab' se midió mediante HPLC de exclusión por tamaño. Se consiguió un 85% de PEGilación.

El procedimiento de diafiltración se confirmó que era eficaz a gran escala, dando como resultado una eficacia elevada de PEGilación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para fijar una o varias moléculas efectoras a una o a varias cisteínas en una proteína que comprende:
 - a) activar una o varias cisteínas en la proteína mediante diafiltración de la proteína frente a un agente reductor monotiol o un agente reductor multitiol que es incapaz de formar puentes disulfuro intramoleculares y
 - b) hacer reaccionar la proteína tratada con una molécula efectora.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde un agente reductor monotiol o un agente reductor multitiol que es incapaz de formar puentes disulfuro intramoleculares, está presente en la muestra de proteína antes de la etapa (a).
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la concentración de agente reductor en la muestra de proteína está entre 0,5 y 1,5 veces la concentración de agente reductor en el tampón de diafiltración.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la concentración de partida de agente reductor en la muestra de proteína es la misma que la concentración de agente reductor en el tampón de diafiltración.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la concentración de agente reductor es 1 mM.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente reductor se retira de la muestra de proteína entre la etapa (a) y la etapa (b).
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente reductor se elimina por filtración en gel.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agente reductor se elimina por diafiltración.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el agente reductor se selecciona entre β -mercaptoetilamina, β -mercaptoetanol, glutatión o cisteína.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende adicionalmente la etapa (c) en la que la proteína con el número deseado de moléculas efectoras fijadas.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que se purifica la proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la proteína es un fragmento de anticuerpo Fab'.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que al menos una cisteína a la que se ha fijado una molécula efectora está presente en la región bisagra del anticuerpo.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que cada cisteína a la que se ha fijado una molécula efectora está presente en la región bisagra del anticuerpo.
15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la molécula efectora es PEG.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la molécula efectora es PEG-maleimida 40.000.

Figura 1

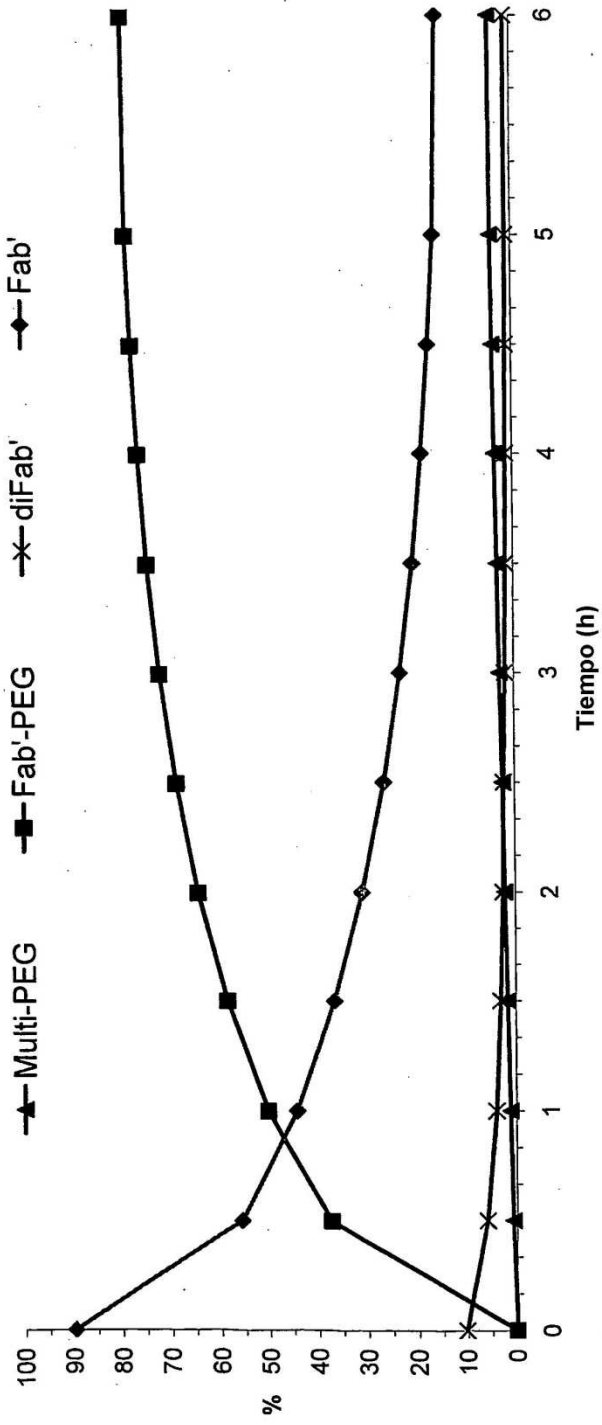


Figura 2

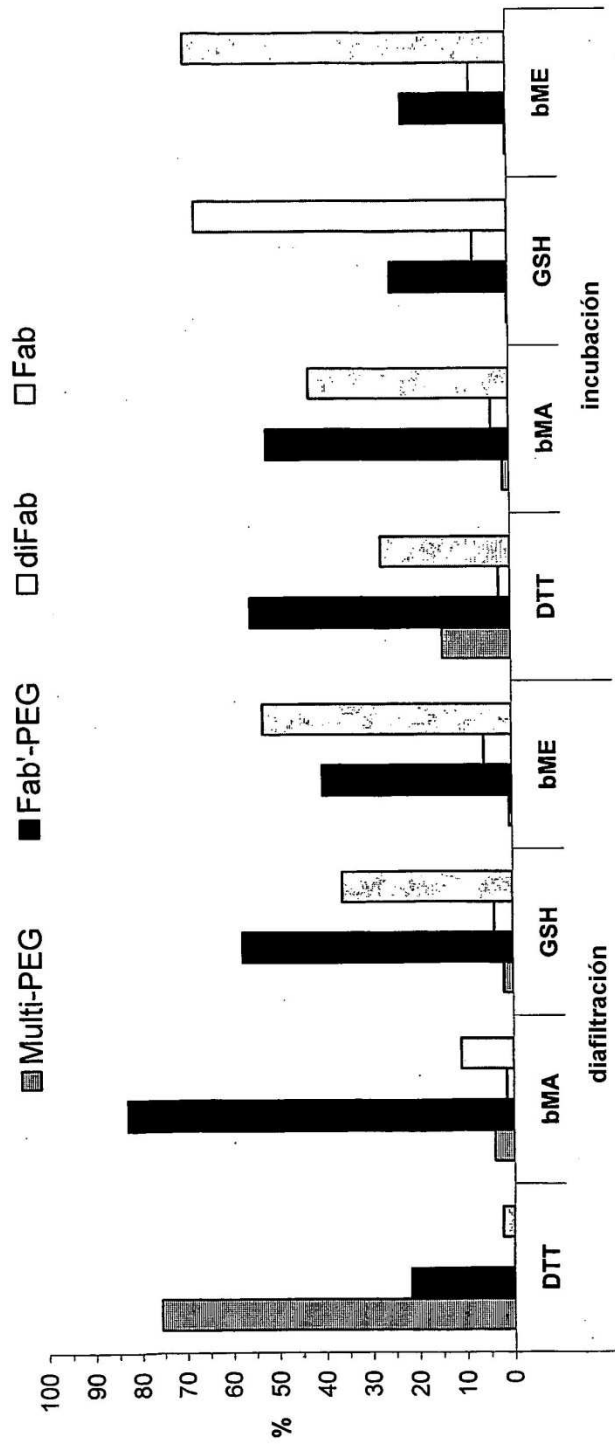


Figura 3

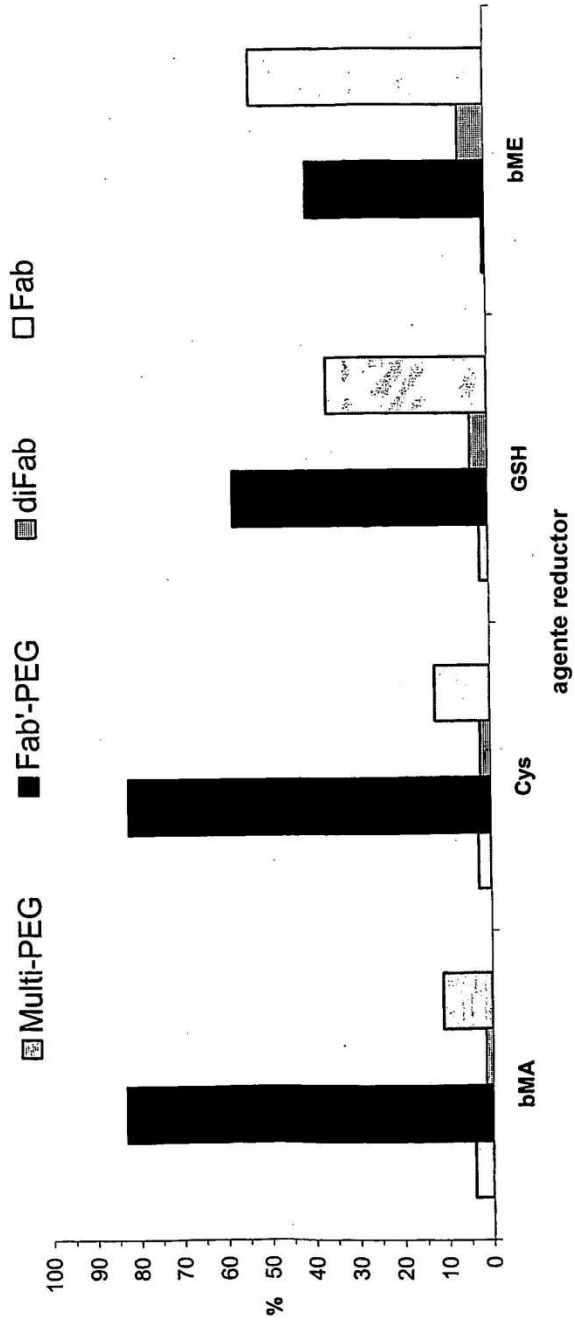


Figura 4

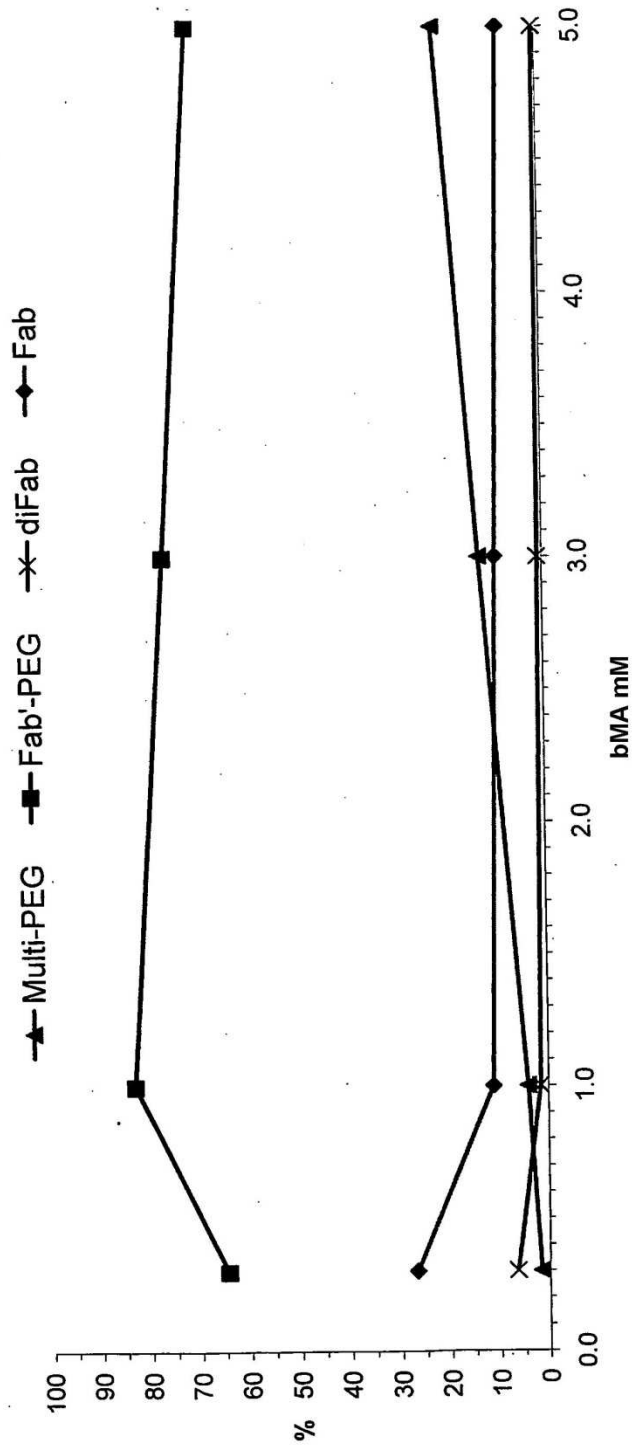


Figura 5

