



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 000**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01928395 .1**
96 Fecha de presentación : **06.04.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1267942**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

54 Título: **Nuevas composiciones químicamente modificadas de proteína que estimulan eritropoyetina y métodos.**

30 Prioridad: **07.04.2000 US 545335**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2011

73 Titular/es: **AMGEN Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es: **Kinstler, Olaf, Boris;**
Gegg, Colin, V.;
Freeman, Aimee y
Boone, Thomas, Charles

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 365 000 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

Nuevas composiciones químicamente modificadas de proteína que estimulan eritropoyetina y métodos.

Antecedentes de la invención

5 La nueva proteína estimulante de eritropoyetina (NESP) es un análogo de eritropoyetina hiperglicosilada que tiene cinco cambios en la secuencia de aminoácidos de rHuEPO que provee dos cadenas adicionales de carbohidrato. Más específicamente, la NESP contiene dos cadenas adicionales de carbohidrato enlazadas a N en los residuos aminoácidos 30 y 88 (numeración correspondiente a la secuencia de EPO humana) (ver la Solicitud PCT No. US 94/09257 (WO 9505465)).

10 La NESP es biológicamente distinta de EPO, tiene una vida media en suero más larga y una actividad biológica más alta *in vivo*; Egrie et al., ASH 97, Blood, 90:56a (1997). La NESP ha mostrado tener un incremento de 3 veces en la vida media en suero en ratones, ratas, perros y humanos; Id. En ratones, una vida media en suero más larga y una actividad más alta *in vivo* permite una dosificación menos frecuente (una vez a la semana o una vez cada dos semanas) en comparación con rHuEPO para obtener la misma respuesta biológica; Id.

15 Un estudio farmacocinético demostró que, consistente con los estudios en animales, la NESP tiene una vida media en suero significativamente mayor que rHuEPO en pacientes con insuficiencia renal crónica, lo cual sugiere que se puede emplear también un programa de dosificación menos frecuente en humanos; MacDougall, et al., J American Society of Nephrology, 8:268A (1997). Un programa de dosificación menos frecuente sería más conveniente tanto para médicos como para pacientes, y sería particularmente útil para aquellos pacientes que se administraron la medicación por sí mismos. Otras ventajas de una dosificación menos frecuente pueden incluir una menor cantidad de fármaco es introducida a los pacientes, una reducción en la naturaleza o severidad de los pocos efectos secundarios observados con la administración de rHuEPO, y una mayor conformidad.

Aunque una vida media extendida de NESP ofrece la ventaja de una dosificación menos frecuente con relación a EPO, todavía existen indicaciones potenciales, tales como quimioterapia, que puede requerir incluso de una vida media terapéutica más prolongada quee la que demuestra actualmente la NESP.

25 Una aproximación común utilizada a menudo para extender las vidas medias de las proteínas *in vivo* es la conjugación química de un polímero soluble en agua, tal como polietilén glicol (PEG), con la proteína de interés (véase M. L. Rucci et al, Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 5, 1991 páginas 133 - 151, N. V. Katre, Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 10, 1993, páginas 91 - 114). Generalmente, las moléculas de polietilén glicol se conectan a la proteína a través de un grupo reactivo encontrado sobre la proteína. Grupos amino, tales como aquellos sobre residuos de lisina o en el N-terminal, son convenientes para tal acoplamiento.

30 Se ha utilizado una variedad de métodos para unir las moléculas de polietilén glicol con la proteína (PEGilación). Por ejemplo, Royer (Patente de los Estados Unidos No. 4.002.531) establece que se utilizó alquilación reductiva para la unión de moléculas de polietilén glicol con una enzima. Davis et al. (Patente de los Estados Unidos No. 4.179.337) divulga conjugados de PEG:proteína que involucran, por ejemplo, enzimas e insulina. Shaw (Patente de los Estados Unidos No. 4.904.584) divulga la modificación de la cantidad de residuos de lisina en proteínas para la unión de moléculas de polietilén glicol a través de grupos reactivos amina. Hakimi et al. (Patente de los Estados Unidos No. 5.834.594) divulga conjugados de PEG:proteína solubles en agua sustancialmente no inmunogénicos, que involucran por ejemplo, las proteínas IL-2, interferón alfa, e IL-Ira. Los métodos de Hakimi et al. involucran la utilización de enlazadores únicos para conectar los diferentes grupos amino libres en la proteína con PEG. Kinstler et al. (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.824.784 y 5.985.265) enseña métodos que permiten proteínas selectivamente modificadas químicamente en el N-terminal y análogos de las mismas, incluyendo G-CSF e interferón de consenso. En forma muy importante, estas proteínas modificadas tienen ventajas con relación a la estabilidad de la proteína, e igualmente ofrecen ventajas en el procesamiento.

45 Los enfoques de PEGilación tales como los descritos anteriormente se aplican tradicionalmente a proteínas no glicosiladas derivadas de sistemas de expresión bacterianos con el propósito de hacer mejoras en solubilidad y en la vida media circulante *in vivo* (tales propiedades son conferidas típicamente a proteínas glicosiladas (glicoproteínas) a través de las estructuras funcionales de carbohidrato añadidas en el transcurso de la expresión eucariota). Los efectos de PEGilación sobre las vidas medias *in vivo* de proteínas no glicosiladas se presentan generalmente a través de la deriva de las propiedades fisicoquímicas y dinámicas de PEG que confieren un mayor volumen hidrodinámico y masa total al conjugado, reduciendo así la tasa de aclaramiento renal. Los beneficios adicionales incluyen típicamente mayor solubilidad y menor inmunogenicidad para el conjugado. Sin embargo, no todas las proteínas responden igualmente a la PEGilación y no existe garantía de un mejor desempeño.

50 La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que una proteína altamente glicosilada, por ejemplo, NESP, puede ser PEGilada para proveer una composición farmacéutica con un perfil de duración incluso más dramáticamente sostenido que la NESP, permitiendo una dosis cada 4 - 6 semanas para elevar los hematocritos y tratar la anemia, y por lo tanto proporcionar una tremenda ventaja terapéutica.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con una preparación de NESP químicamente modificada (o un análogo de la misma) y con métodos relacionados.

5 La presente invención se relaciona adicionalmente con una preparación de NESP químicamente modificada en el N-terminal (o un análogo de la misma).

La presente invención se relaciona adicionalmente con una preparación de NESP químicamente modificada representada como una población mixta ya sea de isoformas posicionales monosustituidas o formas polisustituidas.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 describe la estrategia de diseño para la PEGilación de NESP: (A) el tamaño del polímero de PEG varía entre 5 kD, 20 kD y 30 kD; (B) la conformación del polímero PEG puede ser bien lineal o ramificada con pesos moleculares totales de PEG de 10 kD, 20 kD o 40 kD; y (C) las preparaciones de PEG:NESP con diferentes grados de sustitución pueden ser aisladas para incluir: mono-PEG, di-PEG o, en algunos casos, tri-PEG de NESP.

15 La Figura 2 describe las diferentes químicas de reacción para la PEGilación de NESP: (A) alquilación reductiva de NESP con PEG-aldehído; (B) acilación de NESP con éster N-succinimidilo de PEG; y (C) PEGilación de las cadenas laterales de polisacárido de NESP por medio de oxidación limitada con peryodato del carbohidrato con el aldehído resultante que reaccionó con PEGhidrazida para formar un enlace de hidrazona seguido por posterior reducción con cianoborohidruro de sodio para estabilizar el enlace.

20 La Figura 3 es una gráfica que describe los datos de actividad *in vivo* de diferentes conjugados de poli-PEG:NESP de 5 kD vs. NESP no modificada (■). Las muestras -▲-, -▼-, -●-, y -◆- son mezclas de poli-PEG:NESP de 5 kD con grados progresivamente menores de sustitución. El grafica el % de absorción de hierro vs. los ng/mL administrados.

25 La Figura 4 es una gráfica que describe la prolongación de niveles elevados de hemoglobina (HGB) en respuesta al tratamiento con diferentes conjugados de PEG:NESP con relación a NESP no modificada. Se representa gráficamente una inyección única en bolo de 100 µg/kg de NESP (◆), conjugado de mono-PEG:NESP lineal de 20 kD derivado de metoxi-PEG activado con éster de NHS (■), conjugado lineal de 20 kD (80% de mono-PEG:NESP y 20% de di-PEG:NESP) derivado por medio de alquilación reductiva de PEG activado por aldehído (▼), y un control salino (●). Se representa gráficamente HGB (g/dL) vs. # de días después del tratamiento.

30 La Figura 5 es una gráfica que describe la prolongación de niveles elevados de reticulocitos en respuesta al tratamiento con diferentes conjugados de PEG:NESP con relación a NESP no modificada. Inyección única en bolo de 100 µg/kg de NESP (O), conjugados de mono-PEG:NESP lineal de 20 kD (●), de mono-PEG:NESP lineal de 5 kD (▼) y de di-PEG:NESP de 5 kD (◆) derivados por medio de alquilación reactiva de metoxi-PEG activado por aldehído, un conjugado de mono-PEG:NESP ramificado de 20 kD (■) a partir de PEG activado con éster de NHS, y un control salino (A). Se representa gráficamente el recuento absoluto de reticulocitos vs. el # de días después del tratamiento.

35 La Figura 6 es una gráfica que describe la prolongación de niveles elevados de hemoglobina en respuesta al tratamiento con diferentes conjugados de PEG:NESP con relación a la NESP no modificada. Inyección única en bolo de 100 µg/kg de NESP (O), conjugados de mono-PEG:NESP lineal de 20 kD (●), de mono-PEG:NESP lineal de 5 kD (▼) y de di-PEG:NESP (◆) derivados por medio de alquilación reductiva a partir de metoxi-PEG activado por aldehído y un conjugado de mono-PEG:NESP ramificado de 20 kD (■) a partir de PEG activado por el éster de NHS. Se representa gráficamente HGB (g/dL) vs. el # de días después del tratamiento.

40 La Figura 7 describe un cromatograma en una columna HP de Sefarosa Q del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD. La columna era una HP de Sefarosa Q HiTrap que utilizó un gradiente lineal de NaCl 50 mM a 200 mM para eluir el producto.

45 La Figura 8 describe un cromatograma en columna de Q Sefarosa HP del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD. La columna era una HP de Sefarosa Q HiTrap que utilizó un gradiente lineal de NaCl 50 mM a 200 mM para eluir el producto.

La Figura 9 describe un cromatograma en columna de Q Sefarosa HP del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD. La columna era una HP de Sefarosa Q HiTrap que utilizó un gradiente lineal de NaCl 50 mM a 200 mM para eluir el producto.

50 La Figura 10 es una gráfica que describe la respuesta de reticulocitos de ratones anémicos después de inyecciones únicas en bolo de 3 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 3 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 3 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●). Se representa gráficamente el recuento absoluto de reticulocitos vs. el # de días después del tratamiento.

La Figura 11 es una gráfica que describe la respuesta de reticulocitos de ratones anémicos después de inyecciones únicas en bolo de 10 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 10 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 10 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●). Se representa gráficamente el recuento absoluto de reticulocitos vs. el # de días después del tratamiento.

5 La Figura 12 es una gráfica que describe la respuesta de reticulocitos de ratones anémicos después de inyecciones únicas en bolo de 30 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 30 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 30 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●) vs. 30 µg/kg de NESP no modificada (O). Se representa gráficamente el recuento absoluto de reticulocitos vs. el # de días después del tratamiento.

10 La Figura 13 es una gráfica que describe la respuesta de hemoglobina de ratones anémicos después de inyecciones únicas en bolo de 3 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 3 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 3 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●). Se representa gráficamente HGB (g/dL) vs. el # de días después del tratamiento.

15 La Figura 14 es una gráfica que describe la respuesta de hemoglobina de ratones anémicos después de inyecciones únicas en bolo de 10 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 10 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 10 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●). Se representa gráficamente HGB (g/dL) vs. el # de días después del tratamiento.

20 La Figura 15 es una gráfica que describe la respuesta de hemoglobina de ratones anémicos después de inyecciones únicas en bolo de 30 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 30 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 30 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●) vs. 30 µg/kg de NESP no modificada (O). Se representa gráficamente HGB (g/dL) vs. el # de días después del tratamiento.

25 La Figura 16 es una gráfica que describe la respuesta de reticulocitos de ratones normales después de inyecciones únicas en bolo de 3 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 3 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 3 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●). Se representa gráficamente el recuento absoluto de reticulocitos vs. el # de días después del tratamiento.

La Figura 17 es una gráfica que describe la respuesta de reticulocitos de ratones normales después de inyecciones únicas en bolo de 10 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 10 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 10 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●). Se representa gráficamente el recuento absoluto de reticulocitos vs. el # de días después del tratamiento.

30 La Figura 18 es una gráfica que describe la respuesta de reticulocitos de ratones normales después de inyecciones únicas en bolo de 30 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 30 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 30 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●) vs. 30 µg/kg NESP no modificada (O). Se representa gráficamente el recuento absoluto de reticulocitos vs. el # de días después del tratamiento.

35 La Figura 19 es una gráfica que describe la respuesta de hemoglobina de ratones normales después de inyecciones únicas en bolo de 3 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 3 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 3 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●). Se representa gráficamente HGB (g/dL) vs. el # de días después del tratamiento.

40 La Figura 20 es una gráfica que describe la respuesta de hemoglobina de ratones normales después de inyecciones únicas en bolo de 10 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 10 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 10 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●). Se representa gráficamente HGB (g/dL) vs. el # de días después del tratamiento.

45 La Figura 21 es una gráfica que describe la respuesta de hemoglobina de ratones normales después de inyecciones únicas en bolo de 30 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD (▼), de 30 µg/kg del conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD (■), y de 30 µg/kg de la mezcla del conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD (●) vs. 30 µg/kg NESP no modificada (O). Se representa gráficamente HGB (g/dL) vs. el # de días después del tratamiento.

50 La Figura 22 describe cromatogramas de HPLC de exclusión por tamaño del poli-PEG:NESP de 5 kD (—), el mono-PEG:NESP de 20 kD (- - -) y el mono-PEG:NESP de 30 kD (---). La columna de SEC era una Tosohaas TSK 3000 SWx1 (5 micrones - 7,8 mm X 30 cm) que utilizó NaHPO₄ 100 mM, 1etanol al 10%, NaCl 150 mM, pH 6,9, para eluir los productos.

Descripción detallada de la invención

Para descubrir si la vida media terapéutica *in vivo* de una glicoproteína tal como NESP sería benéfica a partir de la PEGilación, se sintetizaron una variedad de diferentes conjugados de PEG:NESP y se analizaron *in vivo* durante una eritropoyesis prolongada.

- 5 Con el propósito tanto de optimizar los efectos potenciales de la PEGilación como de identificar los sitios preferidos y la química de las uniones de PEG, se empleó una estrategia de diseño en donde se varió tanto la longitud y conformación del polímero, como el grado y los sitios de unión (ver la Figura 1).

10 Los métodos para preparar la NESP PEGilada de la presente invención generalmente comprenden las etapas de (a) hacer reaccionar NESP con polietilén glicol (tal como un éster reactivo o un derivado de PEG-aldehído) bajo condiciones mediante las cuales NESP se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener el(los) producto(s) de reacción. Debido a que los sitios específicos de modificación de NESP pueden alterar significativamente la actividad intrínseca del conjugado, se exploraron tres diferentes químicas de PEGilación (ver la Figura 2). El primer enfoque utiliza alquilación reductiva para conjugar PEG-aldehído (O-(3-Oxopropil)-O'-metilpolietilén glicol) a una amina primaria de NESP. Bajo condiciones apropiadas, este enfoque ha demostrado que produce conjugados de PEG predominantemente modificados a través de la α -amina en el N-terminal de la proteína. Debido a que el PEG se enlaza a través de una amina secundaria por medio de alquilación reductiva existe la posibilidad de conservar la carga en el N-terminal de la proteína.

15 La segunda química aplicada a la PEGilación de NESP fue la acilación de las aminas primarias de NESP utilizando el éster de la NHS de metoxi-PEG (O-[(N-Succinimidiloxycarbonil)-metil]-O'-metilpolietilén glicol). En contraste con la química anterior, la acilación con metoxi-PEG-NHS resulta en un enlace amida que eliminará la carga de la amina primaria original.

20 La química final de unión evaluada utiliza una oxidación suave de NESP bajo condiciones seleccionadas para orientar el diol que pende de la penúltima unidad de glicosilo del ácido siálico para oxidación hasta un aldehído. El glicolaldehído resultante reaccionó luego con una metoxi-PEG-hidrazida (O-(Hidrazinocarbonilmetil)-O'-metilpolietilén glicol) para formar una hidrazona semi-estable entre el PEG y NESP. La hidrazona fue posteriormente reducida por medio de cianoborohidruro de sodio para producir un conjugado estable de PEG:NESP.

25 Los métodos actuales proveen cada uno una mezcla de conjugado de polímero:proteína, lo que significa que únicamente se observan moléculas del conjugado de polímero:proteína. Como se estableció por medio del mapeo de péptidos y la secuenciación del N-terminal, un ejemplo más abajo proporciona una preparación que es al menos 90% conjugado de polímero:proteína, y un máximo de 10% de proteína no reaccionada. Preferiblemente, el material PEGilado es al menos 95% de la preparación (como en el ejemplo de trabajo más adelante) y más preferiblemente, el material PEGilado es 99% de la preparación o más. El conjugado de polímero:proteína tiene actividad biológica y las actuales preparaciones PEGiladas de NESP suministradas aquí son aquellas que son suficientemente homogéneas para mostrar las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, de fácil aplicación clínica para la predicción de muchas farmacocinéticas.

30 También se puede escoger preparar una mezcla de moléculas del conjugado de polímero:proteína, y la ventaja aportada aquí es que se puede seleccionar la proporción del conjugado de mono-polímero:proteína para incluir en la mezcla. Por lo tanto, si se desea, se puede preparar una mezcla de diferentes proteínas con diferentes cantidades de estructuras funcionales poliméricas unidas (es decir, di-, tri-, tetra-, etc.) y combinar dichos conjugados con el conjugado de mono-polímero:proteína preparado utilizando los actuales métodos, y tener una mezcla con una proporción predeterminada del conjugado de mono-polímero:proteína.

35 Los experimentos iniciales diseñados para evaluar y optimizar las estequiometrías de reacción de PEG:proteína revelaron que la PEGilación por medio de alquilación reductiva utilizando PEG-aldehído fue sorprendentemente algo ineficiente, requiriendo relaciones molares sustancialmente más altas de PEG con respecto a la proteína que lo típicamente observado con proteínas no glicosiladas. En forma similar, la acilación con ésteres de PEG-NHS fue también más lenta y menos eficiente de lo esperado. Fue evidente por lo tanto que la PEGilación de proteínas no glicosiladas no era necesariamente predictiva de la PEGilación de proteínas glicosiladas y que era necesario una optimización adicional de las condiciones de reacción.

40 Las moléculas de polímeros contempladas para uso en los enfoques de PEGilación descritos aquí pueden ser seleccionadas entre polímeros solubles en agua o una mezcla de los mismos. El polímero soluble en agua se puede seleccionar del grupo que consiste en, por ejemplo, polietilén glicol, monometoxi-polietilén glicol, dextrano, poli-(N-vinil pirrolidona), homopolímeros de propilén glicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), dextrano, HPMA, Fleximer™, y polivinil alcohol. El polímero seleccionado debe ser soluble en agua para que la proteína a la cual está unida no precipite en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. Para las reacciones de acilación, el(los) polímero(s) seleccionado(s) debe(n) tener un solo grupo éster reactivo. Para la presente alquilación reductiva, el(los) polímero(s) seleccionado(s) debe(n) tener un solo grupo aldehído reactivo. Un reactivo preferido PEG-aldehído es polietilén glicol propionaldehído, que es estable en agua, o derivados mono ariloxi o alcoxi C₁-C₁₀ de los mismos (ver, la Patente de los Estados Unidos No. 5.252.714).

El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

Un polímero soluble en agua particularmente preferido para su uso aquí es polietilén glicol, abreviado como PEG. Como se lo utiliza aquí, se entiende que polietilén glicol abarca cualquiera de las formas de PEG que han sido utilizadas para formar derivados de otras proteínas, tales como mono-alcoxi(C₁-C₁₀)- o ariloxi-polietilén glicol.

La proporción de moléculas de polietilén glicol con respecto a moléculas de proteína variará, al igual que sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (en términos de eficiencia de la reacción en la que no hay exceso de proteína o de polímero sin reaccionar) se determinará por medio del peso molecular del polietilén glicol seleccionado y la cantidad de grupos reactivos disponibles (típicamente grupos amino ∞ o \circ). En lo que respecta al peso molecular, entre más alto el peso molecular del polímero, menor el número de moléculas de polímero que pueden estar unidas a la proteína. En forma similar, se debe tener en cuenta la ramificación del polímero cuando se optimizan estos parámetros. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular (o cuantas más ramificaciones tenga) mayor será la relación polímero:proteína. En la presente invención, se evaluaron diferentes longitudes de polímeros PEG lineales (5 kD, 20 kD y 30 kD). En forma similar, se evaluaron también conjugados de polímeros PEG ramificados en dos brazos (10 kD, 20 kD y 40 kD). A partir de cada preparación, se aislaron muestras de PEG:NESP mono y disustituidas para investigar los efectos de sitios secundarios de PEGilación.

En general, para las reacciones de PEGilación contempladas aquí, el peso molecular promedio preferido es aproximadamente de 2 kDa hasta aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica \pm 1 kDa). Más preferiblemente, el peso molecular promedio es aproximadamente de 5 kDa hasta aproximadamente 40 kDa. La proporción de polímero soluble en agua con respecto a NESP estará generalmente en el rango de 1:1 para mono-PEG, 2:1 para di-PEG etc., y las proporciones de masa para PEG:proteína serían de 1:7 para mono-PEG de 5 kD hasta 1:1,3 para mono-PEG de 30 kD.

El método para obtener la preparación PEGilada de NESP puede ser purificación del material PEGilado de una población de moléculas no PEGiladas de NESP. Por ejemplo, más abajo se presenta un ejemplo donde se separa NESP mono y/o di-PEGilada utilizando cromatografía de intercambio iónico por tamaño. La cromatografía de exclusión por tamaño se usa como herramienta analítica para caracterizar los productos purificados.

La presente invención también provee un método para obtener selectivamente NESP químicamente modificada en el N-terminal. El método comprende alquilación reductiva que aprovecha la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina versus el N-terminal) disponibles por derivatización en una proteína particular. Bajos las condiciones apropiadas de reacción, se logra una derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el N-terminal con un polímero que contiene un grupo carbonilo. La reacción se lleva a cabo a un pH que permite tomar ventaja de las diferencias de pK_a entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y aquellos del grupo α -amino del residuo del N-terminal de la proteína. Por medio de tal formación de derivados selectiva se controla la unión de un polímero soluble en agua con una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el N-terminal de la proteína y no se presenta modificación significativa de otros grupos reactivos, tal como grupos amino de cadena lateral de lisina. La preparación será superior al 80% del conjugado de mono-polímero:proteína, y más preferiblemente superior al 95% del conjugado de mono-polímero:proteína.

La NESP de la presente invención es un análogo de EPO hiperglicosilado que contiene dos sitios de glicosilación adicionales con una cadena adicional de carbohidrato unida a cada sitio. Se construyó la NESP utilizando mutagénesis dirigida al sitio y expresada en células huésped de mamífero. Los detalles de la producción de NESP se encuentran en la Solicitud PCT de propiedad compartida No. US 94/09257 (WO 9505465). Se introdujeron nuevos sitios de glicosilación enlazados a N para rHuEPO por medio de alteraciones en la secuencia de ADN para codificar los aminoácidos Asn-X-Ser/Thr en la cadena de polipéptido. Se transfectó ADN que codifica NESP en células huésped de Ovario de Hámster Chino (CHO) y se analizó el polipéptido expresado por la presencia de cadenas adicionales de carbohidrato. En una modalidad preferida, la NESP tendrá dos cadenas de carbohidrato adicionales enlazadas a N en los residuos 30 y 88. La numeración de la secuencia de aminoácidos es la de la eritropoyetina humana (EPO). La secuencia de aminoácidos de la NESP es la descrita en la SEQ ID NO: 1. Se entiende que NESP tendrá el complemento normal de sitios de glicosilación enlazados a N y enlazados a O además de los sitios nuevos.

La NESP de la presente invención puede incluir también cambios conservadores de aminoácidos en uno o más residuos en la SEQ ID NO: 1. Estos cambios no dan como resultado la adición de una cadena de carbohidrato y tendrán poco efecto sobre la actividad biológica del análogo.

En general, comprendidas en la presente invención están las composiciones farmacéuticas que contienen cantidades efectivas de proteína o productos derivados de la invención junto con diluyentes, estabilizadores, preservantes, solubilizadores, emulsificantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes con diferente contenido amortiguador (por ejemplo, Tris-HCl, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como agentes detergentes y solubilizantes (por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), preservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol

benéfico) y sustancias a granel (por ejemplo, lactosa, manitol); ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435:1712. Una cantidad efectiva de ingrediente activo es una cantidad terapéutica, profiláctica, o efectiva para diagnóstico, que puede ser determinada fácilmente por una persona capacitada en el arte tomando en consideración factores tales como el peso corporal, la edad, y el objetivo terapéutico o profiláctico.

Las composiciones de PEG:NESP de la presente invención pueden incluir también un agente amortiguador para mantener el pH de la solución dentro de un rango deseado. Los agentes preferidos incluyen acetato de sodio, fosfato de sodio, y citrato de sodio. También se pueden utilizar las mezclas de estos agentes amortiguadores. La cantidad de agente amortiguador útil en la composición depende en gran medida del amortiguador particular utilizado y del pH de la solución. Por ejemplo, el acetato es un amortiguador más eficiente a pH 5 que a pH 6 de tal manera que se puede utilizar menos acetato en una solución a pH 5 que a pH 6. El rango de pH preferido para las composiciones de la presente invención es pH 3,0 - 7,5.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir además un agente para ajuste de la isotonicidad para hacer la solución isotónica y más compatible para inyección. El agente más preferido es cloruro de sodio dentro de un rango de concentración de 0 - 150 mM.

Como se lo utiliza aquí, y cuando se contemplan conjugados de PEG:NESP, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad que produce un incremento en hematocritos que produce un beneficio a un paciente. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de una cantidad de factores, incluyendo la condición física general del paciente y la causa subyacente de la anemia. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de rHuEPO para un paciente que sufre de insuficiencia renal crónica es de 50 a 150 unidades/kg tres veces por semana. La cantidad de rHuEPO usada para terapia produce una tasa aceptable de incremento de hematocritos y mantiene los hematocritos en un nivel benéfico (usualmente de forma aproximada al menos 30% y típicamente en un rango del 30% al 36%). Puede determinarse fácilmente una cantidad terapéuticamente efectiva de las presentes composiciones por alguien capacitado en el arte utilizando materiales y procedimientos disponibles públicamente.

La invención provee para su administración conjugados de PEG:NESP menos frecuentemente que NESP y/o EPO. La frecuencia de la dosificación variará dependiendo de la condición que está siendo tratada, pero en general será aproximadamente una vez por 4 - 6 semanas. Se entiende que las frecuencias de las dosis actualmente utilizadas pueden variar algo con respecto a las frecuencias divulgadas aquí debido a variaciones en las respuestas por parte de diferentes individuos a los conjugados de PEG:NESP; se entiende que el término "aproximadamente" refleja tales variaciones.

La presente invención puede utilizarse por lo tanto para estimular la producción de glóbulos rojos y corregir los niveles deprimidos de glóbulos rojos. Más comúnmente, los niveles de glóbulos rojos disminuyen debido a la anemia. Entre las condiciones tratables por medio de la presente invención se incluyen anemia asociada con una declinación o pérdida de la función del riñón (insuficiencia renal crónica), anemia asociada con terapia mielosupresora, tal como con fármacos antivirales o quimioterapéuticos (tales como AZT), anemia asociada con el progreso de cánceres no mieloides, y anemia asociada con infecciones virales (tales como el VIH). También pueden tratarse condiciones que pueden conducir a anemia en un individuo por lo demás sano, tal como una pérdida anticipada de sangre durante una cirugía. En general, cualquier condición que pueda ser tratada con rHuEPO y/o NESP puede también ser tratada con los conjugados de PEG:NESP de la invención.

La invención también prevé la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de hierro con el propósito de mantener una mayor eritropoyesis durante la terapia. La cantidad que va a ser suministrada puede determinarse fácilmente por alguien capacitado en el arte con base en la terapia con rHuEPO.

Los conjugados de PEG:NESP preparados de acuerdo con la presente invención se administran preferiblemente por medio de una inyección intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. Sin embargo, sería claro para alguien capacitado en el arte que también se podrían utilizar efectivamente otras rutas de suministro usando las composiciones de la presente invención.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar más completamente la invención. El Ejemplo 1 describe la preparación y el análisis de los conjugados de PEG:NESP preparados por medio del acoplamiento ya sea de metoxi-PEG-hidracidas de 5 kD o de 20 kD con NESP a través de aldehídos generados en las cadenas de carbohidrato de NESP por oxidación con peryodato de sodio. El Ejemplo 2 describe la preparación y el análisis de conjugados de PEG:NESP preparados utilizando polímeros PEG de 20 kD como ésteres de NHS-PEG y aldehídos de PEG para producir conjugados de PEG-NESP por acilación y alquilación reductiva respectivamente. El Ejemplo 3 demuestra los efectos sobre la actividad del grado de sustitución y las variaciones del tamaño del polímero y conformación para diferentes conjugados de PEG:NESP. El Ejemplo 4 describe la eficacia de tres conjugados de PEG:NESP: mono-PEG:NESP de 20 kD; la mezcla de poli-PEG:NESP de 5 kD; y mono-PEG:NESP de 30 kD, como se examinó con tres dosis diferentes con relación a una NESP de control, en un modelo anémico de ratón. En el Ejemplo 5, se evaluaron tres conjugados diferentes de PEG-NESP en un bioensayo con un ratón normal para comparar y contrastar su potencial eritropoyético y duración.

Ejemplo 1

Los conjugados de PEG:NESP fueron producidos por acoplamiento bien de hidracidas de metoxi-PEG de 5 kD o de 20 kD a NESP a través de los aldehídos generados en las cadenas de carbohidratos de NESP por oxidación con peróxido de sodio. El grado de modificación fue controlado variando la concentración del peryodato de sodio durante la oxidación.

Los conjugados fueron preparados oxidando primero NESP (2 - 4 mg/ml en acetato de sodio 50 mM) ya sea con meta-peryodato de sodio 1 mM o 10 mM (Sigma) durante treinta minutos a temperatura ambiente en acetato de sodio 100 mM, pH 5,6. Se remueve luego el peryodato por cambio de amortiguador en acetato de sodio 100 mM, pH 5,4. Se añade luego hidrazida de metoxi-PEG (Shearwater Polymers) con un exceso molar de 5 - 100 veces de polímero:proteína, preferiblemente con un exceso de 100 veces. Se redujo aún más el enlace de hidrazona intermedio por medio de la adición de cianoborohidruro de sodio 15 mM (Sigma) y se permitió que reaccionara durante la noche a 4°C. Se fraccionaron luego los conjugados resultantes por medio de FPLC de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75, de 26 mm x 60 cm (Pharmacia) eluida con fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2. Las preparaciones resultantes están en el rango de tamaño de -40 kD a -200 kD, de acuerdo a lo estimado por SDS-PAGE.

Las muestras de PEG:NESP fueron analizadas por el enlazamiento del receptor en un formato EIA *in vitro*. El ensayo *in vitro* es un ensayo de desplazamiento en donde los conjugados de PEG:NESP compiten por el enlazamiento del receptor de EPO con un conjugado de EPO-HRP utilizado como reportero. Los resultados del ensayo *in vitro* sugieren que los conjugados de PEG:NESP tenían una menor afinidad aparente por el receptor de la NESP.

Se evaluó luego la bioactividad de diferentes conjugados de PEG:NESP *in vivo* monitoreando la ingesta de hierro en roedores después de una única dosis subcutánea del conjugado. En el ensayo, se condicionan previamente los ratones en una cámara hiperbárica para suprimir la expresión de eritropoyetina endógena, luego se los dosifica con una inyección única subcutánea en bolo de NESP o un conjugado de PEG:NESP. Después de cinco días, los ratones recibieron una inyección intravenosa del isótopo Fe⁵⁹ como trazador para monitorear la entrada de hierro en los glóbulos rojos. Dos días después de la administración de Fe⁵⁹, se sacrifican los animales y se analiza la ingesta de hierro en función de la dosis.

Inicialmente, se analizaron diferentes reservas de conjugados de poli-PEG:NESP de 5 kD con diferentes grados de PEGilación por la ingesta de hierro en función de la dosis de conjugado. Los resultados del ensayo *in vivo* están descritos en la Figura 3, y demostraron que los conjugados de PEG:NESP preparados por acoplamiento de la hidrazida de PEG con NESP oxidada se desempeñan en forma comparable a NESP sola en el bioensayo de ingesta de hierro.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe la preparación y análisis de conjugados de PEG:NESP preparados utilizando ésteres de NHS-PEG y aldehídos de PEG producidos a partir de polímeros PEG de 20 kD. Se optimizaron las estequiometrías de reacción y las condiciones del amortiguador para que cada química produjera conjugados de mono-PEG:NESP de 20 kD con buen rendimiento. Se preparó también un derivado de mono-PEG:NESP de 20 kD por acilación de NESP con el éster de metoxi-PEG-NHS de 20 kD, así como una mezcla (~ 80%/20%) del derivado de mono/di-PEG:NESP de 20 kD por medio de alquilación reductiva de NESP con metoxi-PEG-aldehído de 20 kD.

La reacción con metoxi-PEG-aldehído (Shearwater Polymers) puede ser llevada a cabo a un pH 4 - 6 siendo óptimo un pH 5,2. La concentración de NESP en la mezcla de reacción fue de 4 mg/ml en acetato de sodio 50 mM. El exceso molar usado de PEG-aldehído fue de 5 - 20 veces, y se añadió cianoborohidruro de sodio hasta una concentración final de 15 mM. Se agitó la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente y luego durante 18 horas a 5°C. Después de completarse la reacción, se diluyó la mezcla hasta una conductividad de menos de 5 mS/cm, el pH se elevó hasta 7,0, y se cargó la mezcla en una columna HP de Sefarosa Q (Pharmacia). Se eluyeron los productos de la columna utilizando un gradiente lineal de NaCl 50 mM hasta NaCl 200 mM amortiguados en Bis-Tris-Propano 10 mM, pH 7,0. Esta purificación permite la separación de especies con base en la cantidad de moléculas de PEG unidas a NESP.

La reacción con éster de NHS activado por PEG, metoxi-SPA-PEG (Shearwater Polymers), fue llevada a cabo a pH 8,0 con una concentración de NESP de 2 - 4 mg/ml en amortiguador de Bicina 50 mM. Se añadió una solución amortiguada de NESP a 10 - 20 equivalentes molares de PEG. Se agitó la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de que se completó la reacción, se diluyó la mezcla hasta una conductividad de menos de 5 mS/cm, el pH se elevó hasta 7,0, y se cargó la muestra sobre una columna QHP (Pharmacia). Los productos fueron eluidos con un gradiente lineal de NaCl 50 mM hasta NaCl 200 mM amortiguados en Bis-Tris-Propano 10 mM, pH 7,0.

Los dos conjugados aislados de PEG:NESP, uno mono-PEG:NESP de 20 kD (NHS) y una mezcla (~ 80%/20%) de mono/di-PEG:NESP de 20 kD (aldehído) fueron luego probados en un bioensayo *in vivo* en múrido. El bioensayo en

5 múmero mide reticulocitos, precursores de glóbulos rojos, y hemoglobina como monitores de eritropoyesis en respuesta a una dosis única de NESP o de PEG:NESP en ratones normales. Específicamente, el ensayo mide la intensidad y la duración de una respuesta incrementada de hemoglobina y de reticulocitos resultante de inyecciones subcutáneas en bolo de 100 µg/kg en ratones hembra BDF 1. Los resultados del ensayo están descritos en la Figura 4, y los resultados del estudio indicaron un incremento significativo y la prolongación de la respuesta de hemoglobina de los conjugados de PEG:NESP con relación a una dosis equivalente de NESP sola.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra los efectos sobre la actividad del grado de sustitución y las variaciones del tamaño y conformación del polímero para conjugados de PEG:NESP.

10 Utilizando tanto químicas basadas en metoxi-PEG-aldehído como en metoxi-PEG-NHS, se sintetizaron una variedad de conjugados de PEG:NESP a partir de polímeros lineales de 5 kD, 20 kD y 30 kD así como de polímeros ramificados de 10 kD, 20 kD y 40 kD. A partir de estas reacciones, se aislaron cromatográficamente preparaciones de PEG:NESP monosustituidas y disustituidas y se las probó durante una eritropoyesis prolongada en el bioensayo con ratones.

15 La reacción con metoxi-PEG-aldehído (Shearwater Polymers) se realizó con una concentración de NESP de 4 mg/ml y un exceso molar de 25 veces de PEG en NaOAc 20 mM, pH 5,0, con la adición de cianoborohidruro de sodio hasta una concentración final de 20 mM. Se agitó la reacción durante la noche a 4°C, se diluyó 4 veces con Tris 20 mM, pH 7,2, y se ajustó el pH hasta un pH 7,4 con NaOH. Se cargó luego la mezcla de reacción diluida sobre una columna HP de Sefarosa Q HiTrap de 5 ml (Pharmacia). Se resolvieron las isoformas PEGiladas de NESP por medio de elución con un gradiente de NaCl 0 - 150 mM en Tris 20 mM, pH 7,2.

25 La reacción con éster de metoxi-PEG-NHS (Shearwater Polymers) se realizó con una concentración de NESP de 4 mg/ml y un exceso molar de 5 - 7 veces de PEG en amortiguador de Bicina 50 mM, pH 8. Se agitó la reacción durante la noche a 4°C, se diluyó 4 veces con Tris 20 mM, pH 7,2, y se ajustó el pH hasta un pH 7,4 con NaOH. Se cargó luego la mezcla de reacción diluida sobre una columna HP de Sefarosa Q HiTrap de 5 ml (Pharmacia). Se resolvieron las isoformas PEGiladas de NESP por medio de elución con un gradiente de NaCl 0 - 150 mM en Tris 20 mM, pH 7,2 (ver las Figuras 5-7).

Se emplearon estos esquemas de proceso para cada uno de los polímeros lineales de 5 kD, 20 kD y 30 kD así como los ésteres ramificados de PEG-NHS de 10 kD, 20 kD y 40 kD. Los diferentes conjugados están enlistados en la Tabla 1 a continuación:

TABLA 1		
Polímero de PEG	Química de Conjugación	Grado de Sustitución
Lineal de 5 kD	Éster de mPEG-NHS	mono/di-PEG
Lineal de 20 kD	Éster de mPEG-NHS	mono-PEG
Lineal de 20 kD	Éster de mPEG-NHS	di-PEG
Lineal de 30 kD	Éster de mPEG-NHS	mono-PEG
Lineal de 30 kD	Éster de mPEG-NHS	di-PEG
Lineal de 5 kD	mPEG-aldehído	mono-PEG
Lineal de 5 kD	mPEG-aldehído	di-PEG
Lineal de 20 kD	mPEG-aldehído	mono-PEG
Lineal de 30 kD	mPEG-aldehído	mono-PEG
Lineal de 30 kD	mPEG-aldehído	di-PEG
Ramificado de 10 kD	Éster ramificado de mPEG-NHS	mono/di-PEG
Ramificado de 20 kD	Éster ramificado de mPEG-NHS	mono-PEG
Ramificado de 40 kD	Éster ramificado de mPEG-NHS	mono-PEG
Ramificado de 20 kD	mPEG-aldehído	mono-PEG

Ramificado de 40 kD	mPEG-aldehído	mono-PEG
Lineal de 5 kD	mPEG-hidrazida	alto (>7 PEG)
Lineal de 5 kD	mPEG-hidrazida	bajo (1-5 PEG)
Lineal de 20 kD	mPEG-hidrazida	alto (>7 PEG)
Lineal de 20 kD	mPEG-hidrazida	medio (-4-7 PEG)
Lineal de 20 kD	mPEG-hidrazida	bajo (1-5 PEG)

5 Cada isoforma purificada fue probada entonces en un bioensayo *in vivo* en un múrido por una actividad eritropoyética prolongada medida por cambios en las determinaciones de reticulocitos y hemoglobina después de inyecciones únicas subcutáneas en bolo de 100 µg/kg en ratones BDF 1 hembra normales. Cada conjugado monosustituido de PEG:NESP de las series poliméricas lineal y ramificada mostraron una prolongación significativa y comparable del efecto eritropoyético (ver las Figuras 8 y 9). Los conjugados disustituidos de PEG:NESP de los polímeros PEG de 20 kD y 30 kD fueron considerablemente menos activos, pero inesperadamente, el conjugado disustituido de PEG:NESP de 5 kD demostró una actividad equivalente a la contraparte monosustituida. Todos los
10 conjugados monosustituidos, ramificados de PEG:NESP demostraron actividad prolongada comparable a la de los conjugados análogos monosustituidos lineales de PEG:NESP.

Estos ejemplos demuestran por lo tanto la duración mejorada de la estimulación eritropoyética por una variedad de conjugados de PEG:NESP utilizando inyecciones en bolo de una sola dosis en modelos de ratón normal.

Ejemplo 4

15 Este ejemplo describe la eficacia de tres conjugados de PEG:NESP: mono-PEG:NESP de 20 kD; la mezcla de poli-PEG:NESP de 5 kD; y mono-PEG:NESP de 30 kD, como se examinó con tres dosis diferentes con relación a una NESP de control, en un modelo de ratón anémico.

20 Para inducir una condición anémica, se trataron previamente los ratones con cisplatino a razón de 1 mg/kg/día durante 3 días, seguido por un período de descanso de 7 días. Después de 3 ciclos de diez días, se dosificaron los ratones con inyecciones únicas en bolo de 30 µg/kg, 10 µg/kg o 3 µg/kg de los conjugados de mono-PEG:NESP de 20 kD, de mono-PEG:NESP de 30 kD o el poli-PEG:NESP de 5 kD y se comparó con una NESP sola de control a razón de 30 µg/kg. Se monitorearon los niveles de reticulocito y de hemoglobina en función del tiempo y en respuesta a la dosis individual de cada fármaco (ver las Figuras 10 - 15).

25 Estos datos demuestran las ventajas inesperadas de una reducción 3 veces de la dosis e incrementos significativos en la vida media eritropoyética para los conjugados de PEG:NESP con relación a NESP sola, en que los resultados demuestran una dependencia clara de la dosis tanto por la magnitud como por la duración ya sea de la respuesta del reticulocito o de la hemoglobina a los conjugados de PEG:NESP. En algunos casos el conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD parece superar modestamente al conjugado de poli-PEG:NESP de 5 kD, que supera modestamente al conjugado de mono-PEG:NESP de 20 kD, sugiriendo que el conjugado de mono-PEG:NESP de 30 kD podría ser una configuración preferida.

30 Ejemplo 5

35 En este ejemplo, se evaluaron tres diferentes conjugados de PEG-NESP en un bioensayo con un ratón normal para comparar y contrastar su potencial eritropoyético y duración. Los tres compuestos analizados fueron: mono-PEG:NESP de 30 kD derivado por acilación con el éster de PEG-NHS de 30 kD, el mono-PEG:NESP de 20 kD derivado por alquilación reductiva con el PEG-aldehído de 20 kD y la mezcla de poli-PEG:NESP de 5 kD derivada por alquilación reductiva con el PEG-aldehído de 5 kD. Cada conjugado de PEG:NESP fue probado como una dosis subcutánea única en bolo a razón de 30 µg/kg, 10 µg/kg o 3 µg/kg. Se utilizó NESP no modificada como control a razón de 30 µg/kg en una inyección única en bolo. La respuesta eritropoyética y la duración fueron monitoreadas en función del recuento de reticulocitos o la concentración de hemoglobina (ver las Figuras 16 - 21) en función del tiempo. Estos datos muestran que todas las tres formas de PEG:NESP son capaces de inducir una fuerte respuesta
40 eritropoyética con una reducción significativa e la dosis. Además, estos conjugados de PEG:NESP demuestran una eficacia prolongada con relación a la NESP no modificada.

Materiales y métodos

La presente NESP puede ser preparada de acuerdo con la Solicitud PCT No. US 94/09257 (WO-A-9505465).

45 Los conjugados preparados aquí fueron caracterizados también utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) como herramienta analítica. La columna SEC era una Tosohaas TSK 3000 SWx1 (5 micras - 7,8 mm X 30

cm) que utilizó NaHPO₄ 100 mM, etanol al 10%, NaCl 150 mM, pH 6,9, para eluir los productos. En la Figura 22 se describe un cromatograma representativo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.

5 <120> NUEVAS COMPOSICIONES QUÍMICAMENTE MODIFICADAS DE PROTEÍNA QUE ESTIMULAN ERITROPOYETINA Y MÉTODOS

<130> A-682

<140> [Aún No Asignada]

<141> 2001-04-06

10 <160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

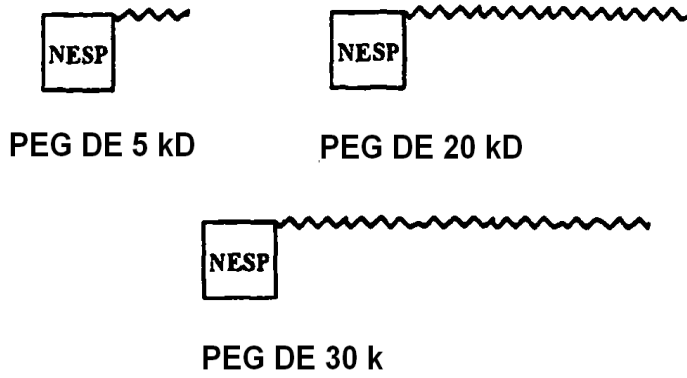
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1                    5                      10                      15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Asn Glu Thr
                20                      25                      30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
                35                      40                      45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
    50                      55                      60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
    65                      70                      75                      80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Val Asn Glu Thr Leu Gln Leu His Val Asp
                85                      90                      95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
                100                      105                      110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
    115                      120                      125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
    130                      135                      140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
    145                      150                      155                      160
Cys Arg Thr Gly Asp
                165
    
```

REIVINDICACIONES

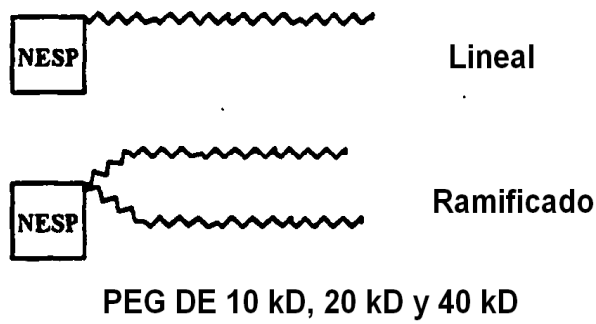
- 5 1. Una preparación de nueva proteína estimulante de eritropoyetina químicamente modificada (NESP), opcionalmente en un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable, donde dicha NESP es modificada químicamente con un compuesto químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(N-vinil pirrolidona), polietilén glicoles, homopolímeros de propilén glicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxitilados y polivinil alcoholes, y en donde la preparación es al menos 90% conjugado de polímero:proteína, y a lo sumo 10% de proteína que no ha reaccionado.
2. Una preparación de la reivindicación 1 que es al menos 95% conjugado de polímero:proteína y a lo sumo 5% de proteína que no ha reaccionado.
- 10 3. Una preparación de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 donde dicha NESP es químicamente modificada con polietilén glicol.
4. Una preparación de la reivindicación 3 donde dicho polietilén glicol tiene un peso molecular de aproximadamente entre 2 kD y 100 kD.
- 15 5. Una preparación de la reivindicación 4 en donde dicho polietilén glicol tiene un peso molecular de aproximadamente entre 5 kD y 30 kD.
6. Una preparación de la reivindicación 1 en donde dicha preparación está compuesta de una población mixta de NESP mono-PEGilada y NESP poli-PEGilada.
7. Una preparación de la reivindicación 1 en donde dicha preparación está compuesta de al menos 95% de NESP mono-PEGilada en el N-terminal y a lo sumo 5% de NESP no PEGilada.
- 20 8. Una preparación de la reivindicación 1 en donde dicha NESP tiene la secuencia identificada en la SEQ. ID No. 1.
9. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) una preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y
- (b) un diluyente, estabilizador, preservante, solubilizador, emulsificante, adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9 en donde la preparación comprende al menos 95% del conjugado de polímero:proteína y a lo sumo 5% de NESP que no ha reaccionado.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 y que comprende:
- (a) una preparación de NESP mono-PEGilada, consistiendo dicha NESP mono-PEGilada en una estructura funcional de polietilén glicol conectada con una estructura funcional de NESP únicamente en el N-terminal de la misma y menos de 5% de moléculas de NESP no PEGiladas; y
- 30 (b) un diluyente, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 y que comprende:
- (a) una preparación de NESP mono-PEGilada, consistiendo dicha NESP mono-PEGilada en una estructura funcional de polietilén glicol conectada con una estructura funcional de NESP a través de aldehídos generados en dichas cadenas de carbohidrato de NESP; y menos de 5% de moléculas de NESP no PEGiladas; y
- 35 (b) un diluyente, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 y que comprende:
- (a) una preparación de NESP mono-PEGilada, consistiendo dicha NESP mono-PEGilada en una estructura funcional de polietilén glicol conectada con una estructura funcional de NESP utilizando química de metoxi-PEG-NHS; y menos de 5% de moléculas de NESP no PEGiladas; y
- 40 (b) un diluyente, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 y que comprende:
- (a) una preparación de NESP PEGilada, comprendiendo dicha NESP PEGilada una población mixta de NESP mono-PEGilada y de NESP poli-PEGilada; y menos de 5% de moléculas de NESP no PEGiladas; y
- 45 (b) un diluyente, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable.

15. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método para el tratamiento de un trastorno hematopoyético que comprende la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de dicha preparación.
16. Un proceso para elaborar la preparación de la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
- 5 (a) hacer reaccionar la NESP con un compuesto químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(n-vinil pirrolidona), polietilén glicoles, homopolímeros de propilén glicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados y polivinil alcoholes bajo condiciones mediante las cuales la NESP se une a uno o más grupos de PEG; y
- (b) obtener el(los) producto(s) de reacción.
- 10 17. El proceso de la reivindicación 16 en donde la etapa (a) comprende alquilación reductiva para conjugar un PEG-aldehído con una amina primaria de la NESP.
18. El proceso de la reivindicación 16 en la etapa (a) comprende acilación de las aminas primarias de NESP usando el éster de NHS de metoxi-PEG.
19. El proceso de la reivindicación 16 en donde la etapa (a) comprende
- 15 (i) la oxidación suave de NESP bajo condiciones seleccionadas para orientar el diol que pende de la penúltima unidad de glicosilo del ácido siálico para oxidación hasta un aldehído;
- (ii) la reacción del glicolaldehído resultante con una metoxi-PEG-hidrazida para formar una hidrazona semi-estable entre el PEG y NESP; y
- (iii) la reducción de la hidrazona por medio de cianoborohidruro de sodio para producir un conjugado estable de PEG:NESP.

A: Tamaño de PEG



B: Conformación de PEG



C: Grado de Sustitución

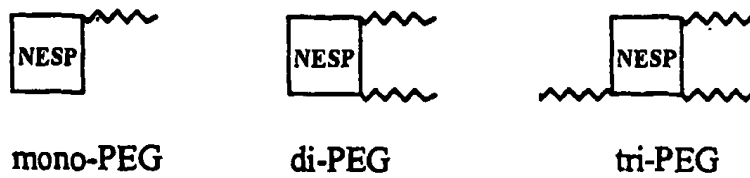
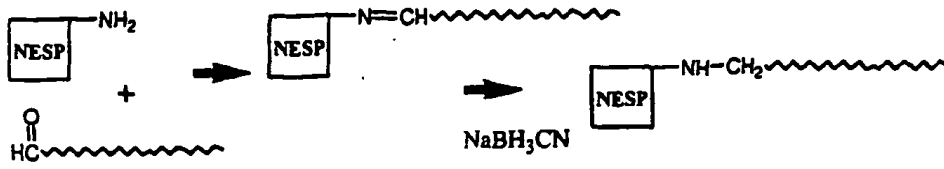
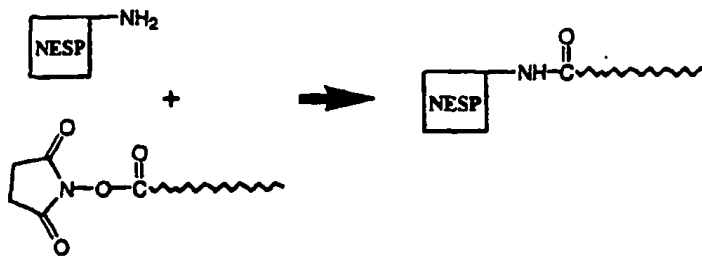


FIGURA 1

Alquilación Reductiva:



Acilación:



Reducción de Hidrazona:

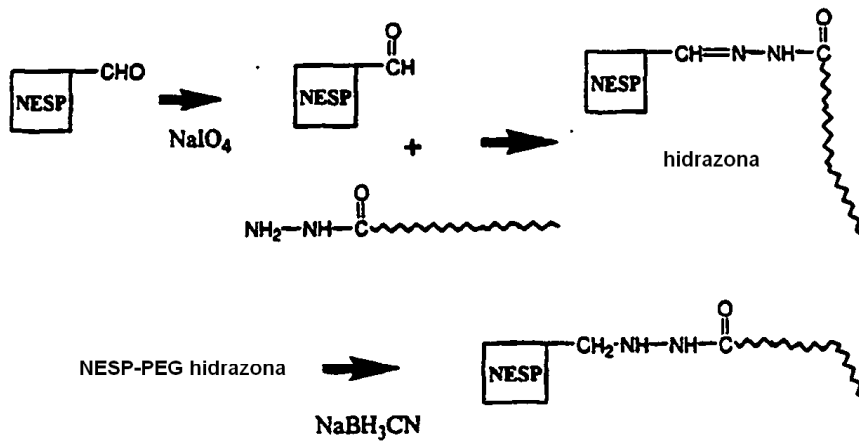


FIGURA 2

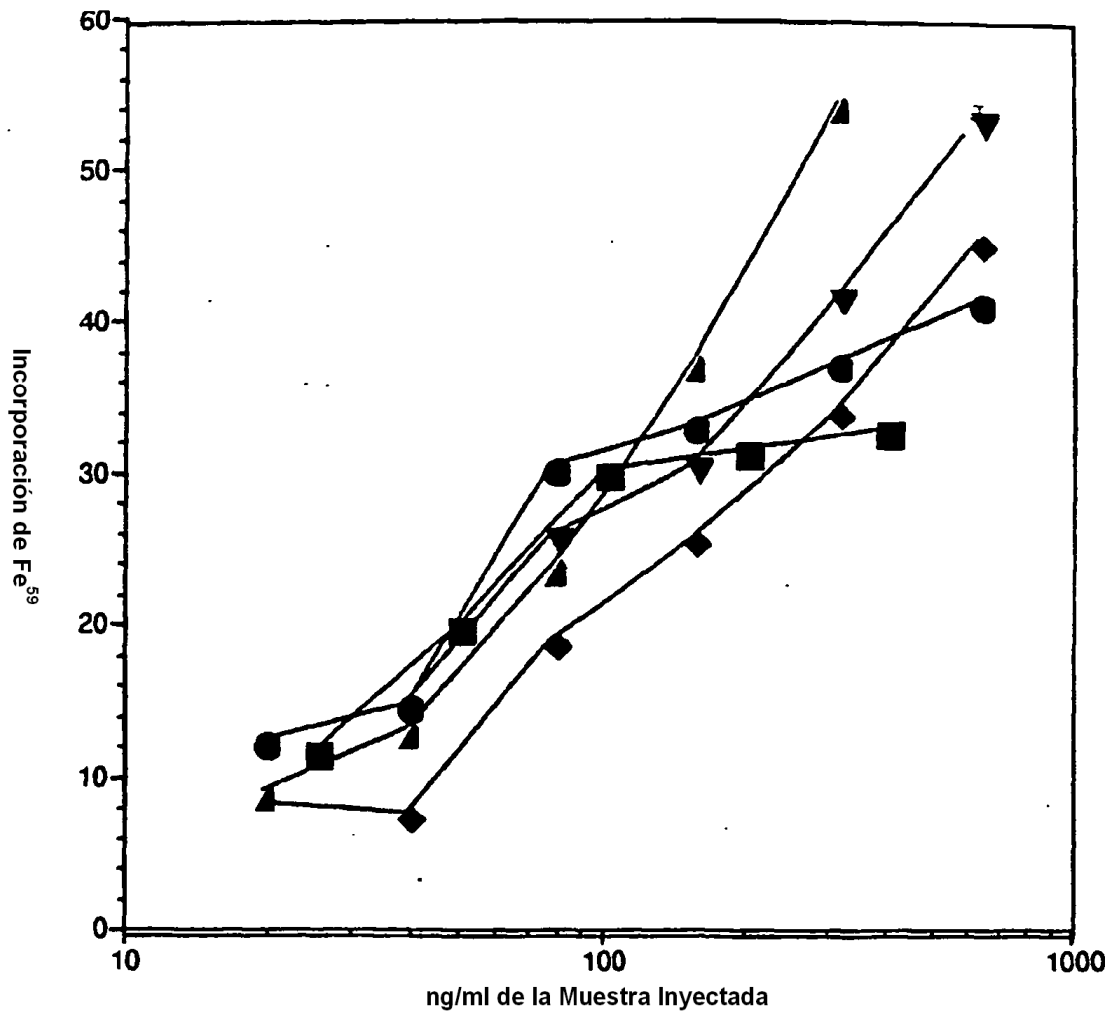


FIGURA 3

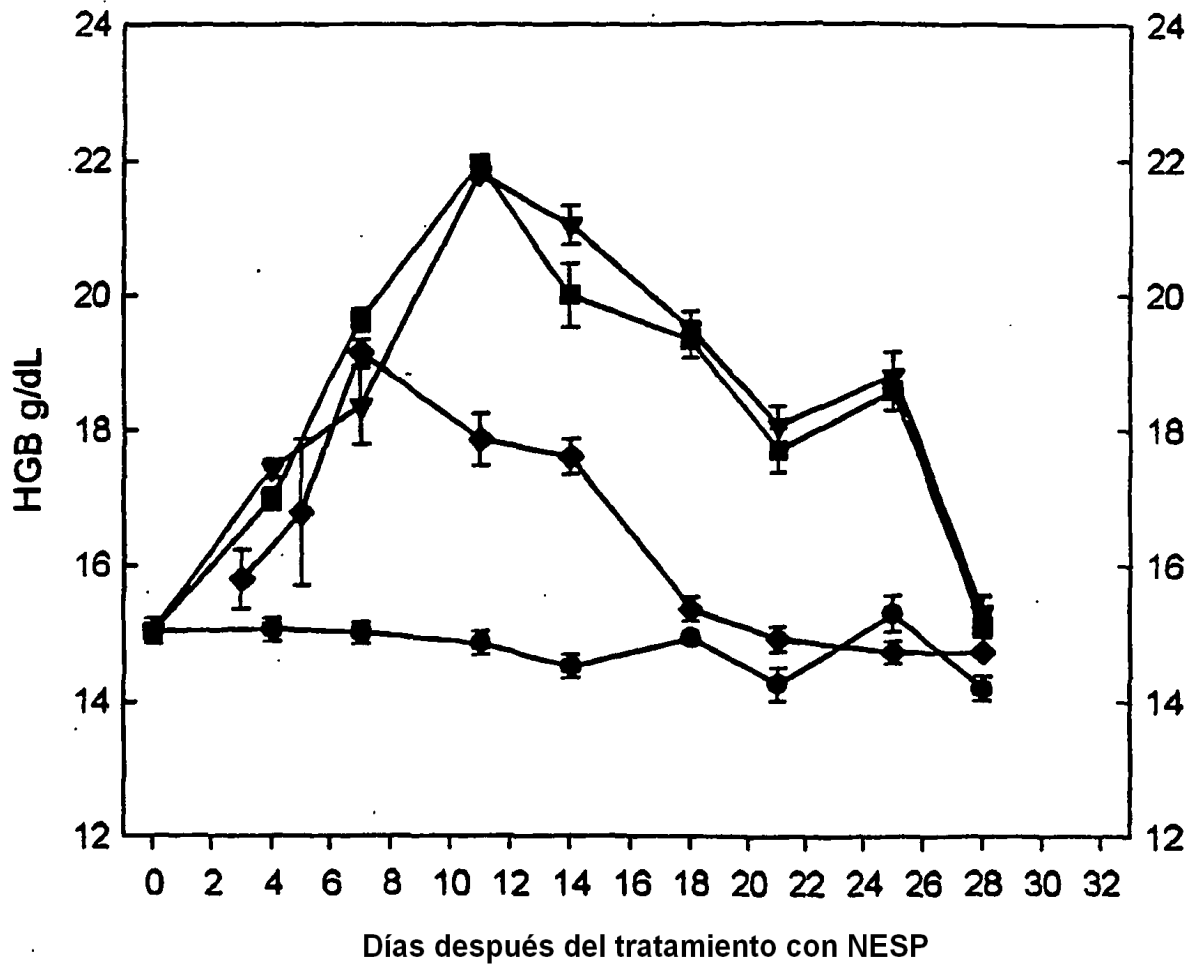


FIGURA 4

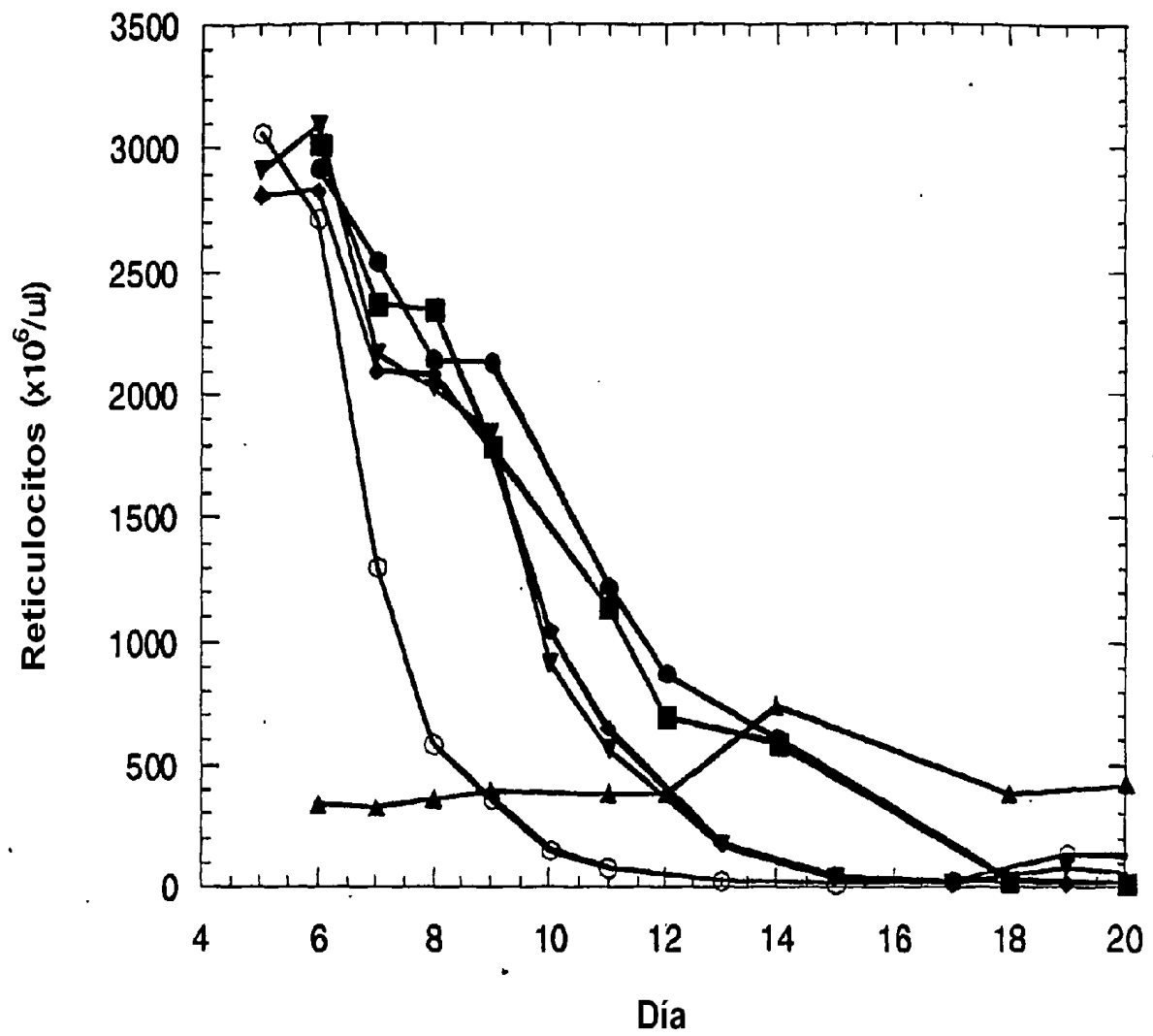


FIGURA 5

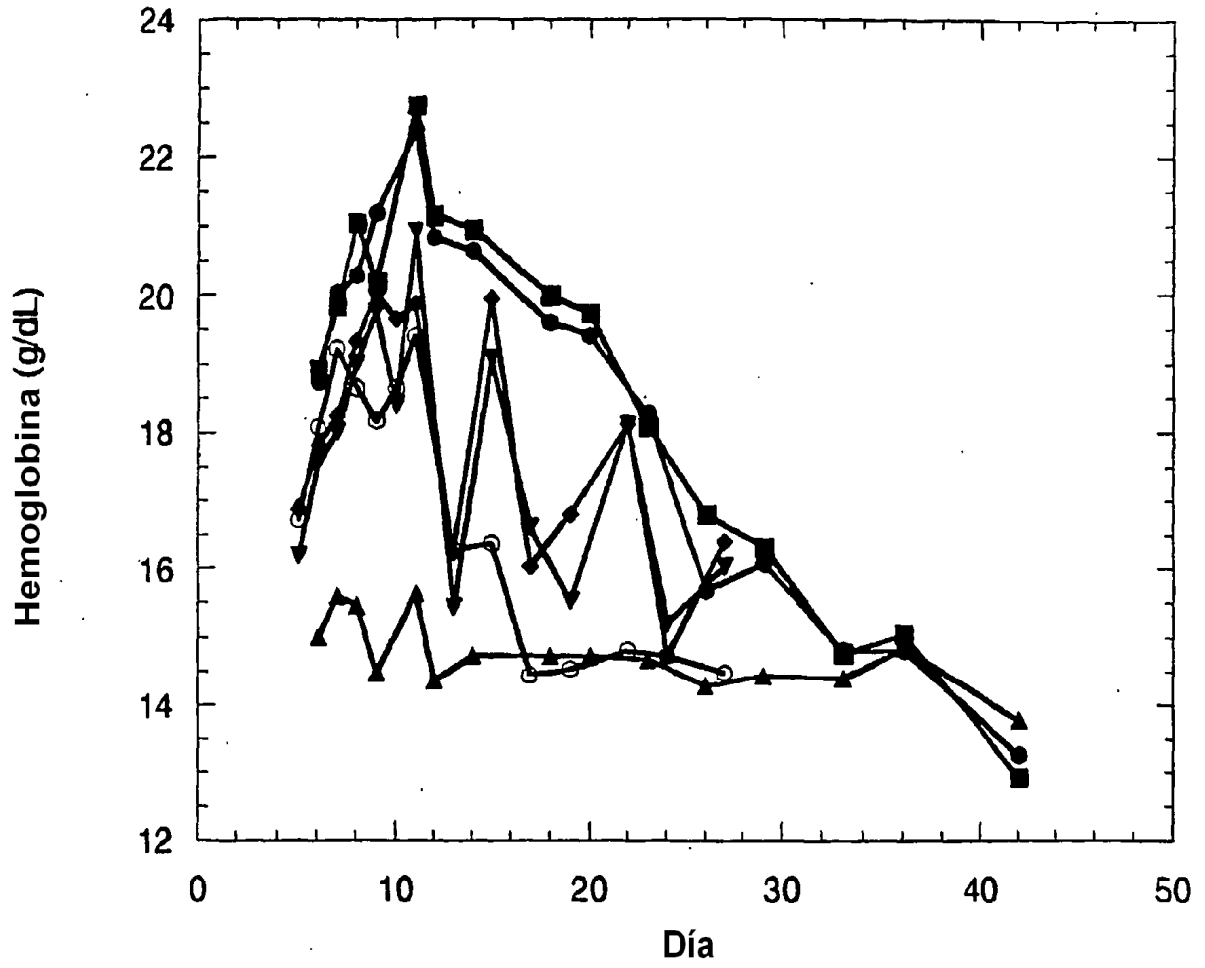


FIGURA 6

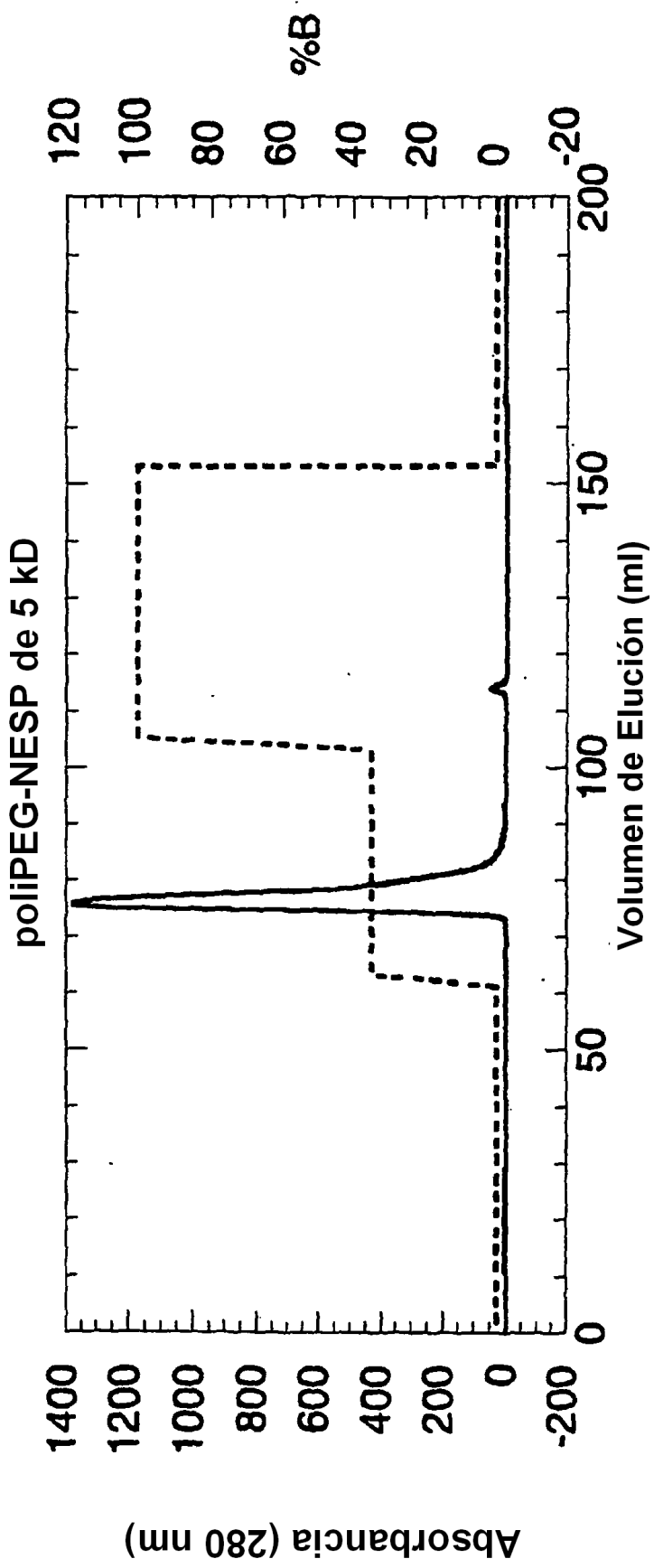


FIGURA 7

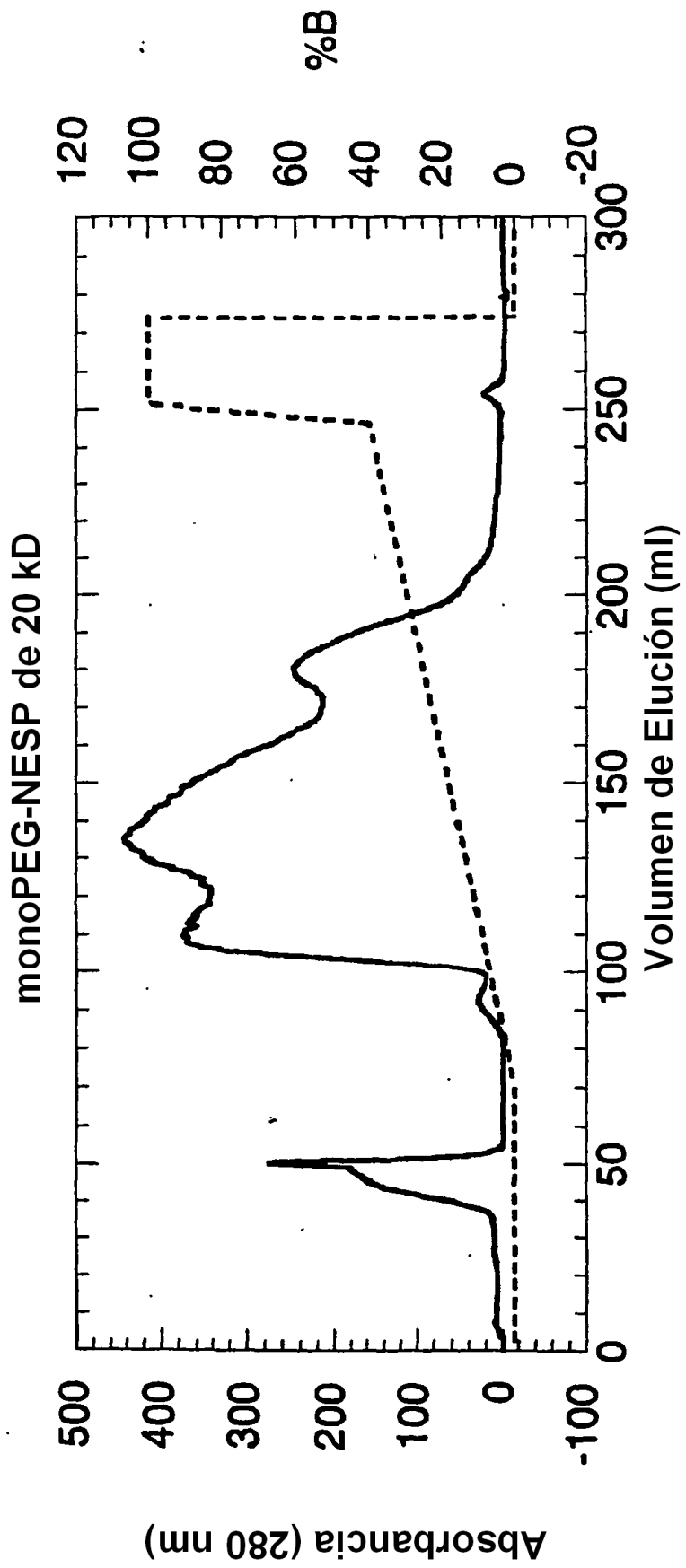


FIGURA 8

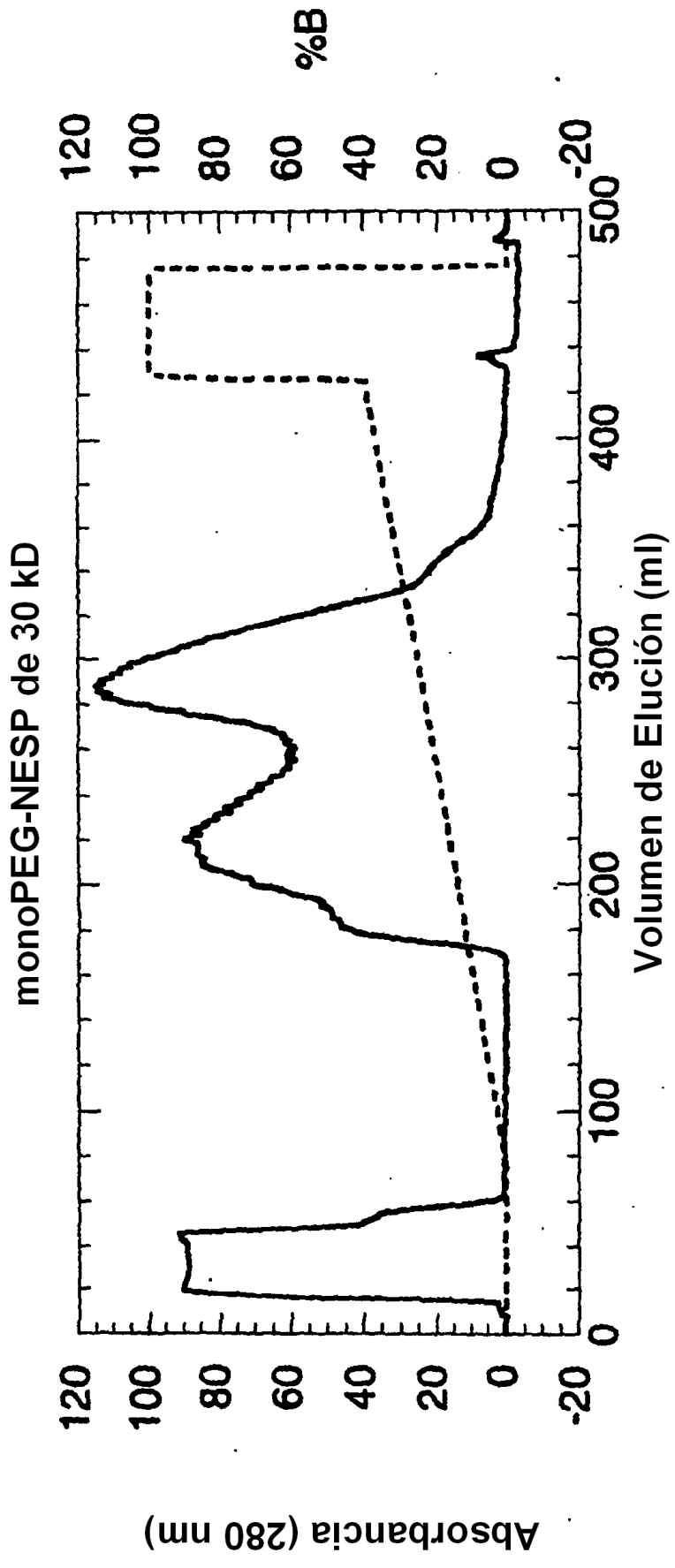


FIGURA 9

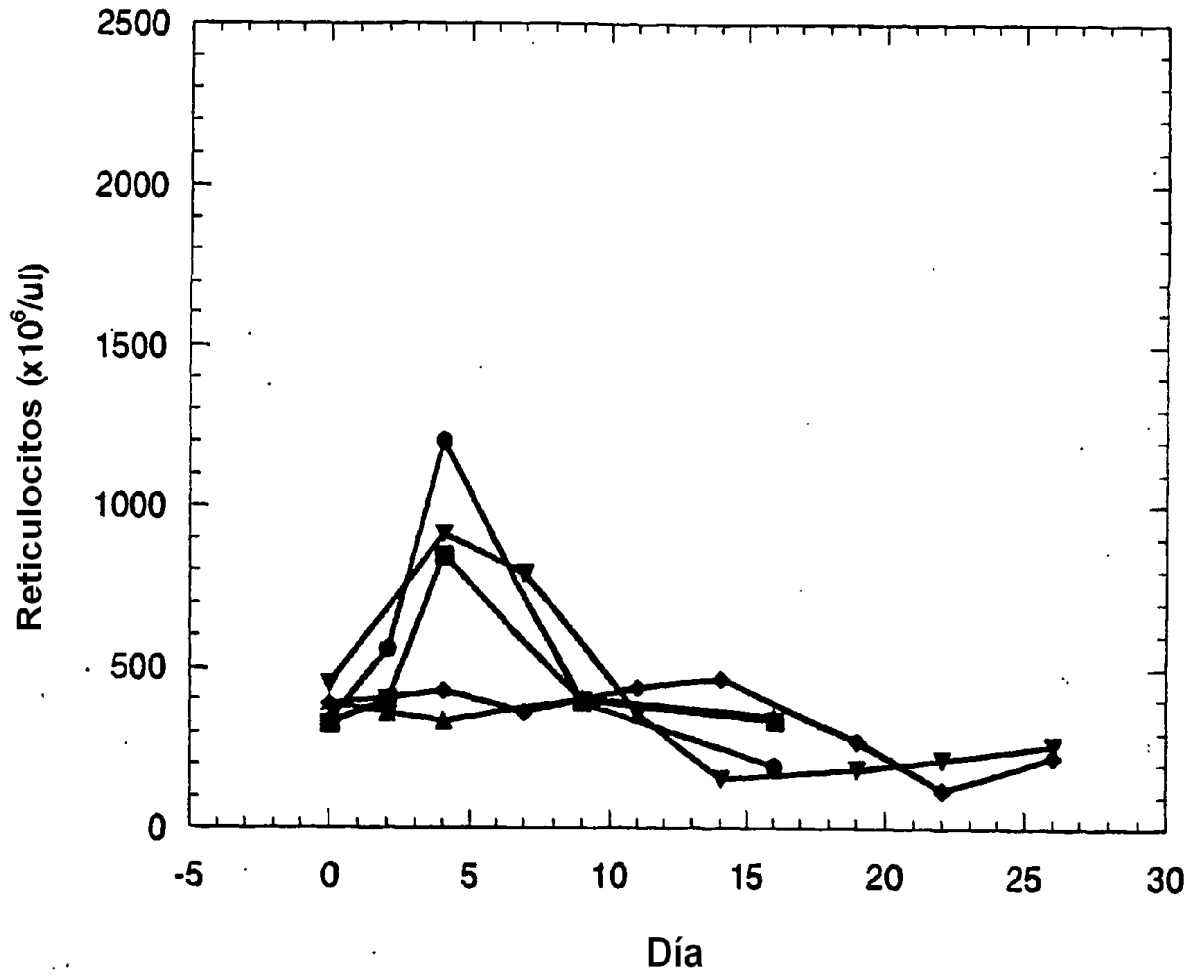


FIGURA 10

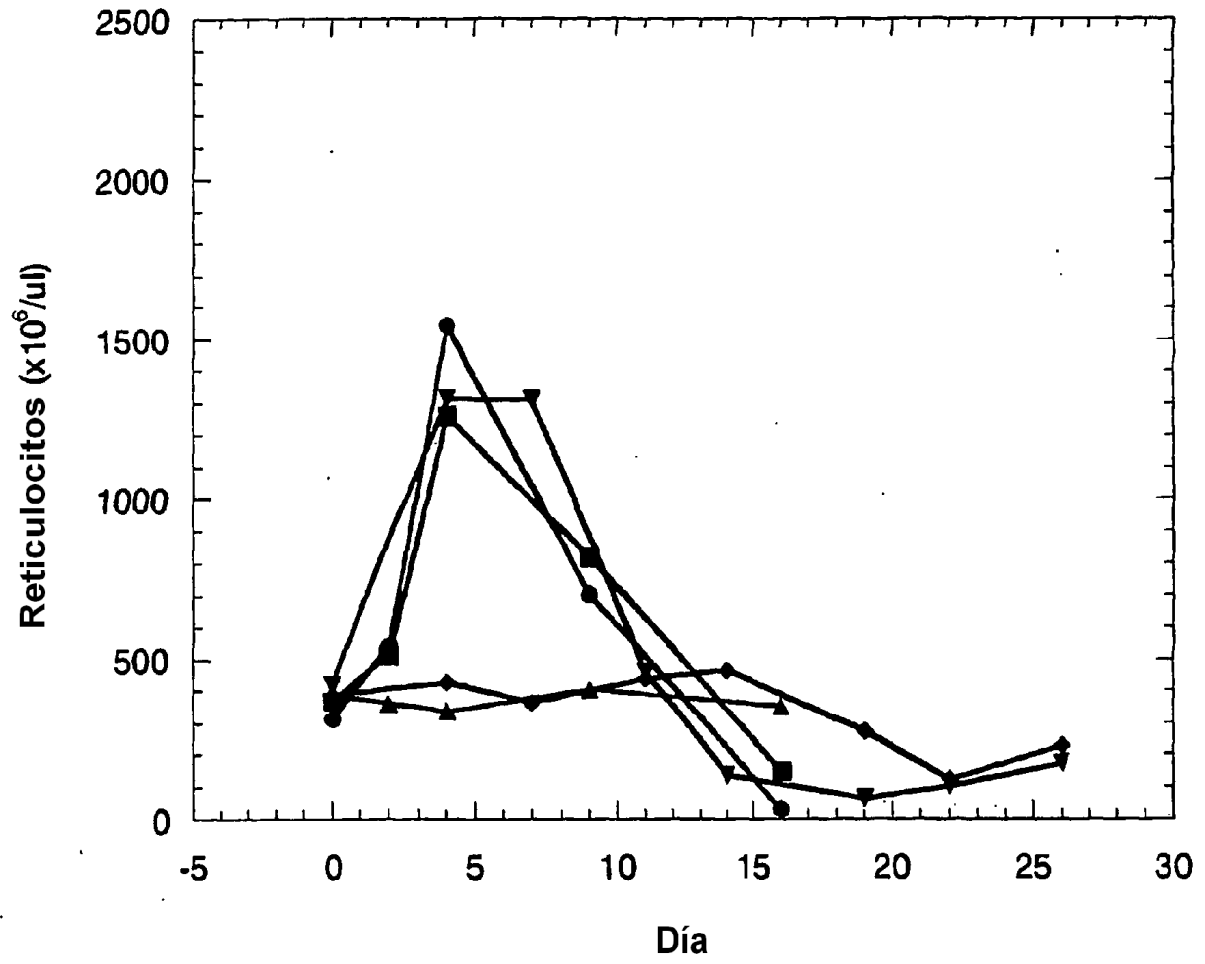


FIGURA 11

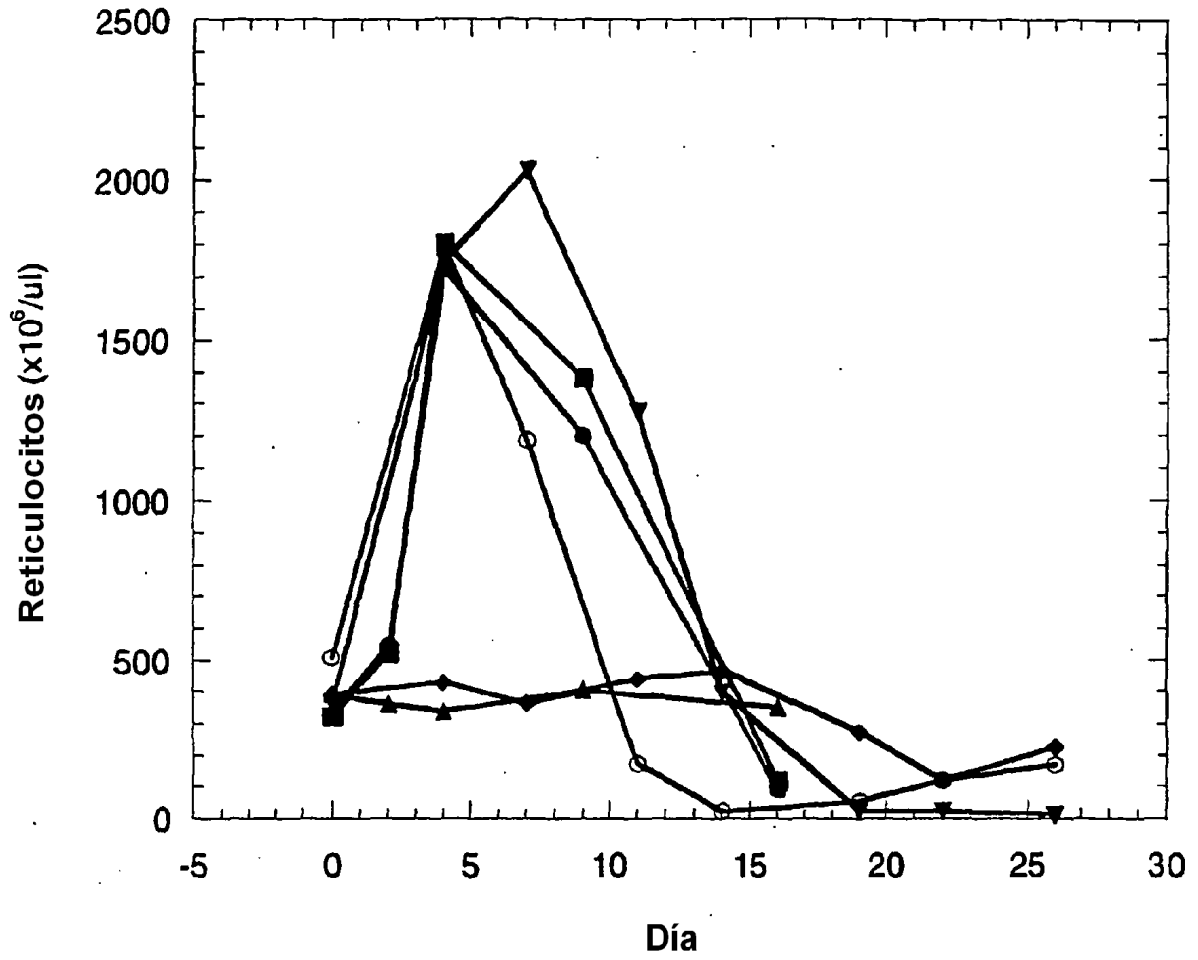


FIGURA 12

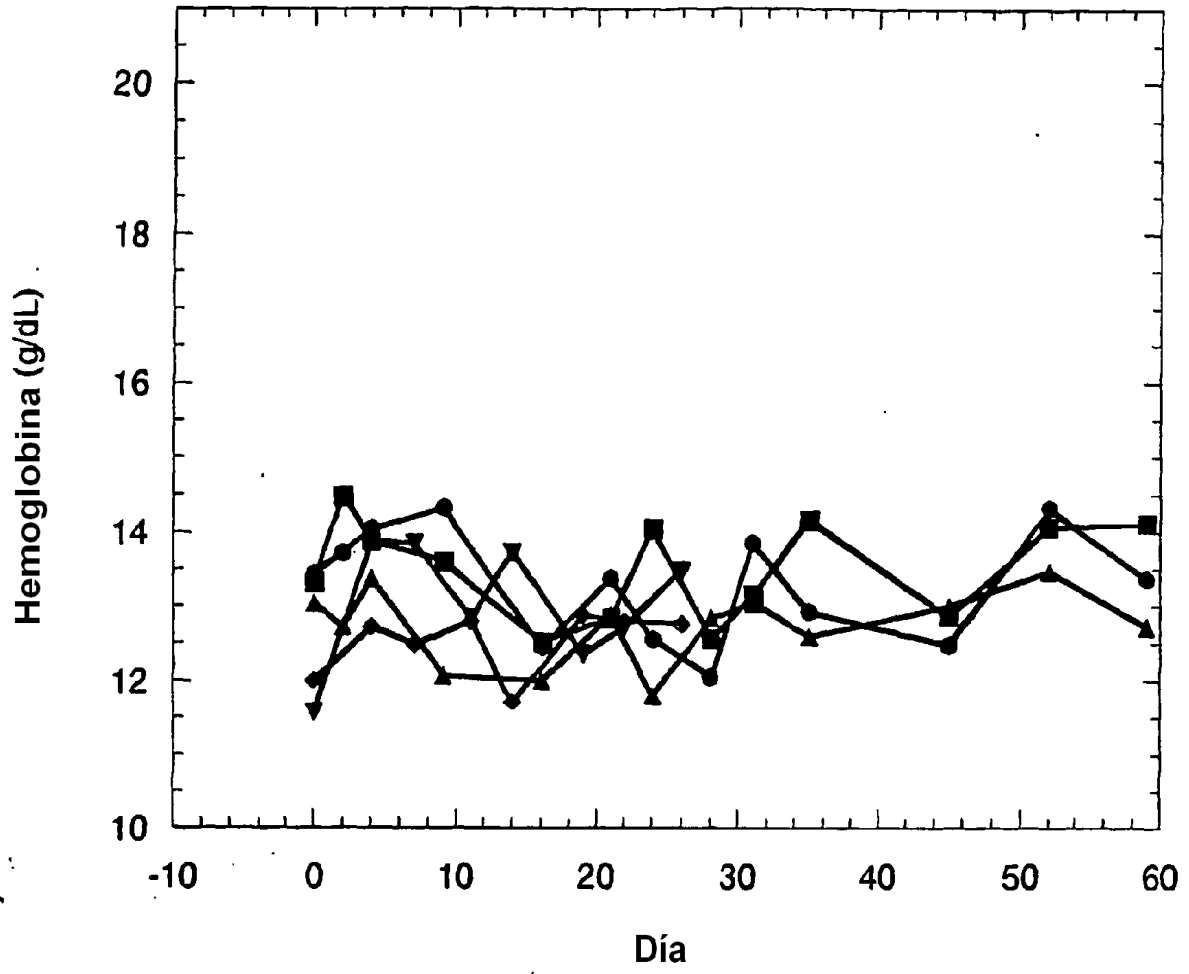


FIGURA 13

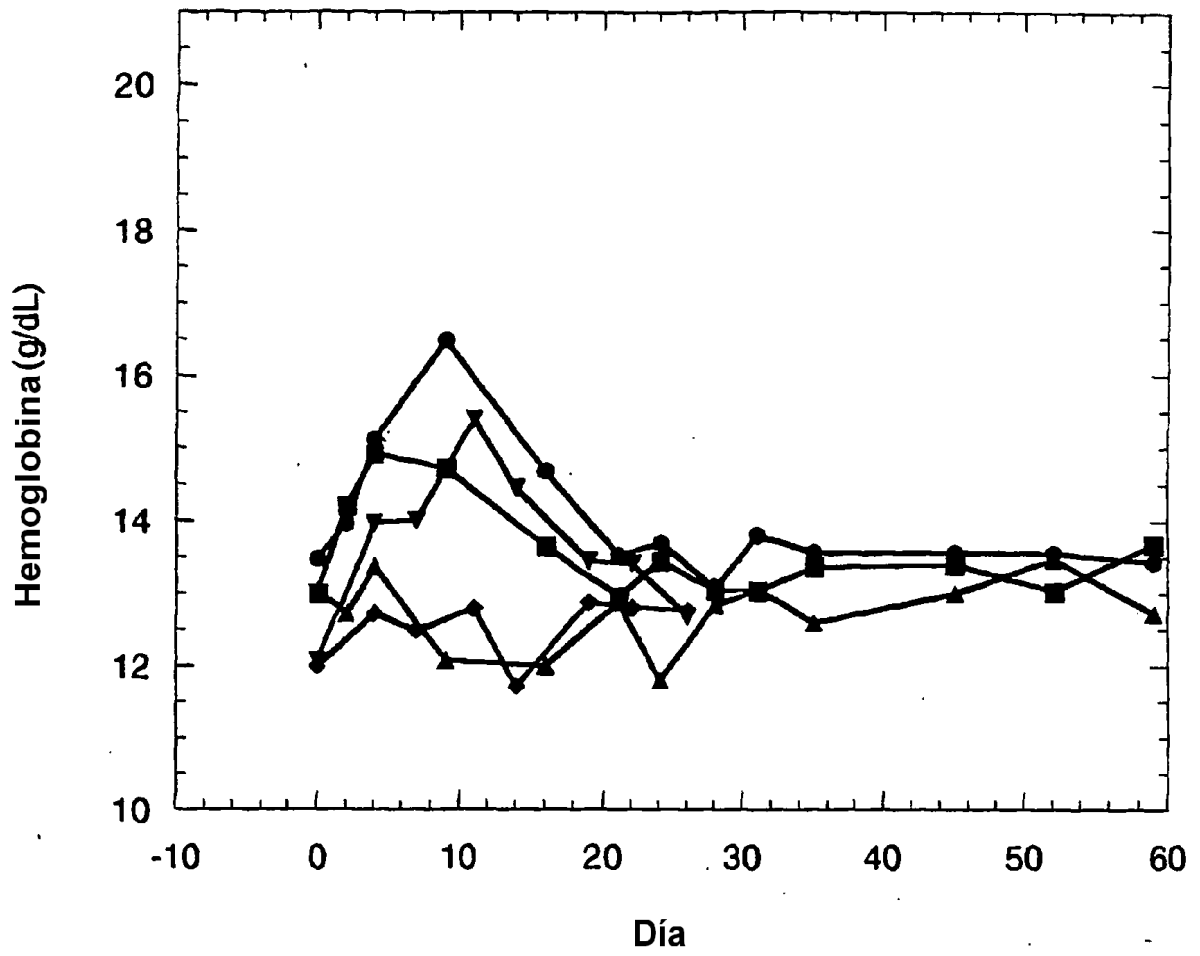


FIGURA 14

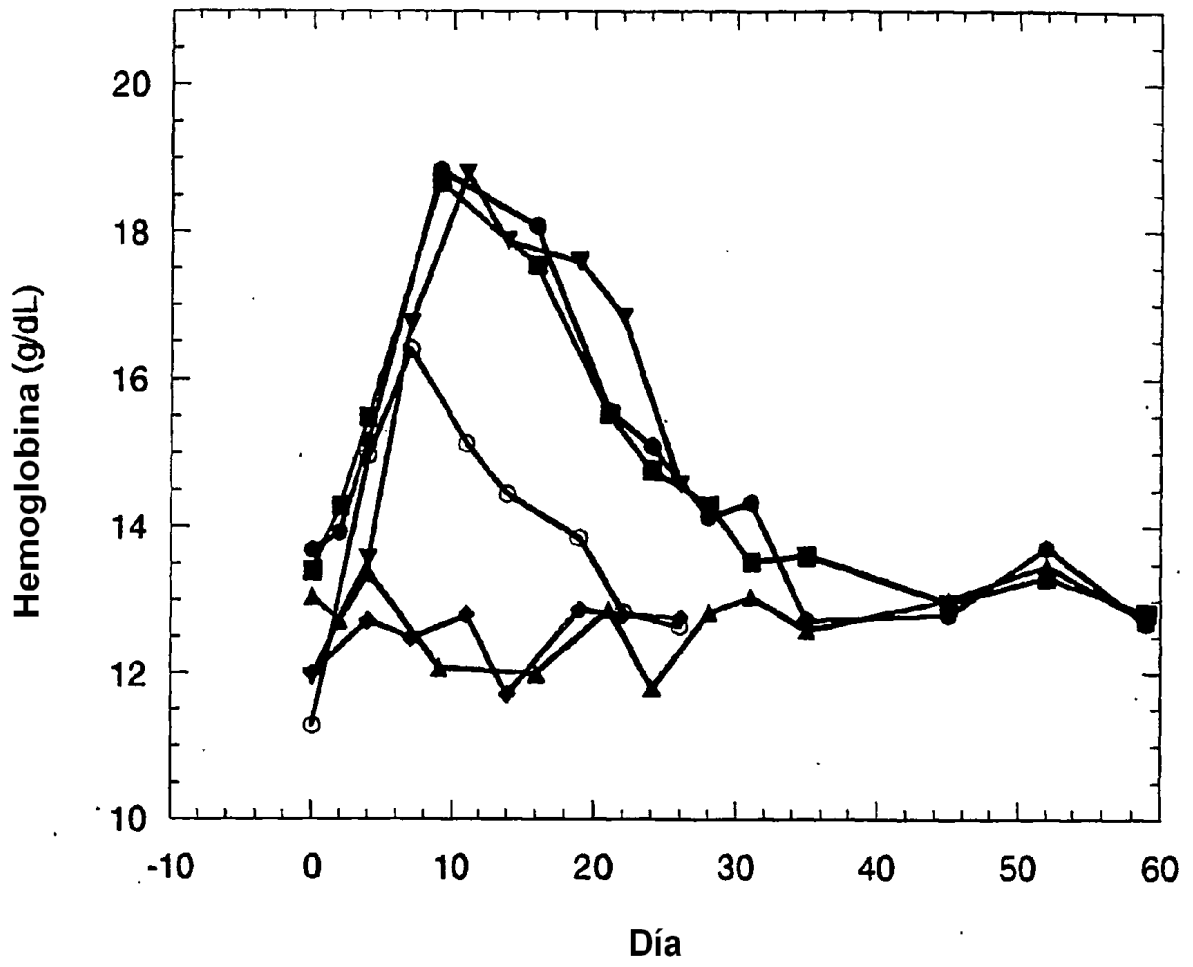


FIGURA 15

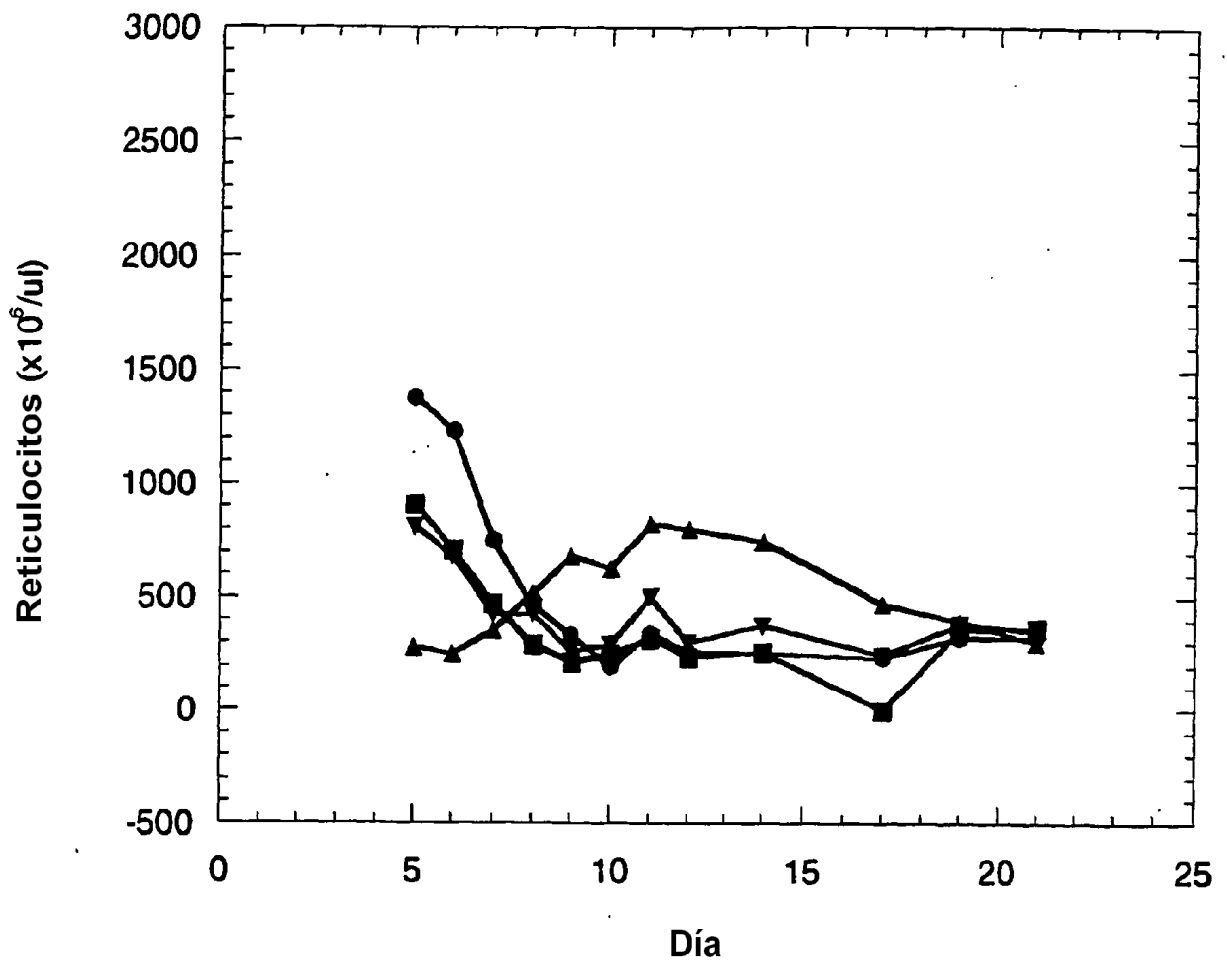


FIGURA 16

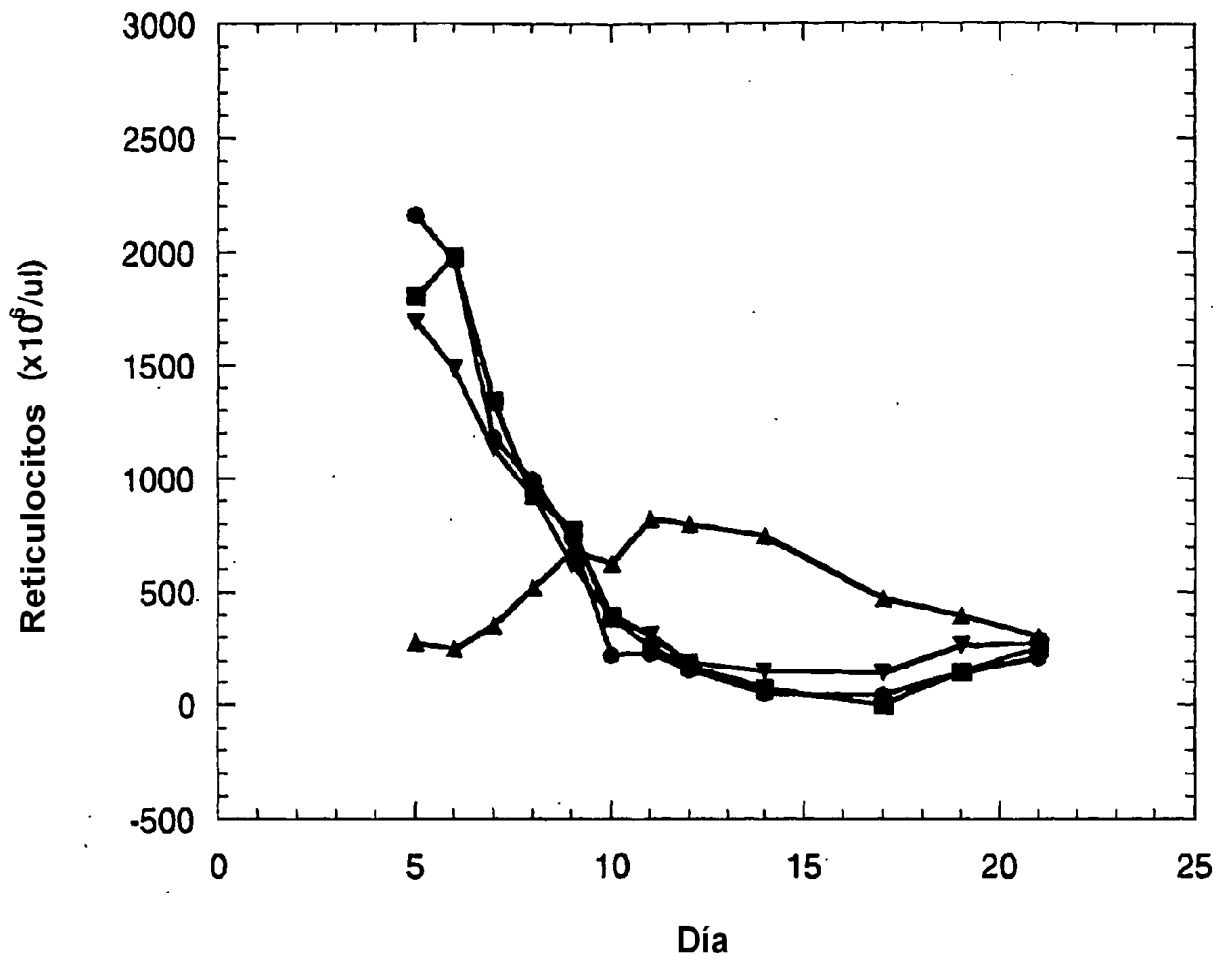


FIGURA 17

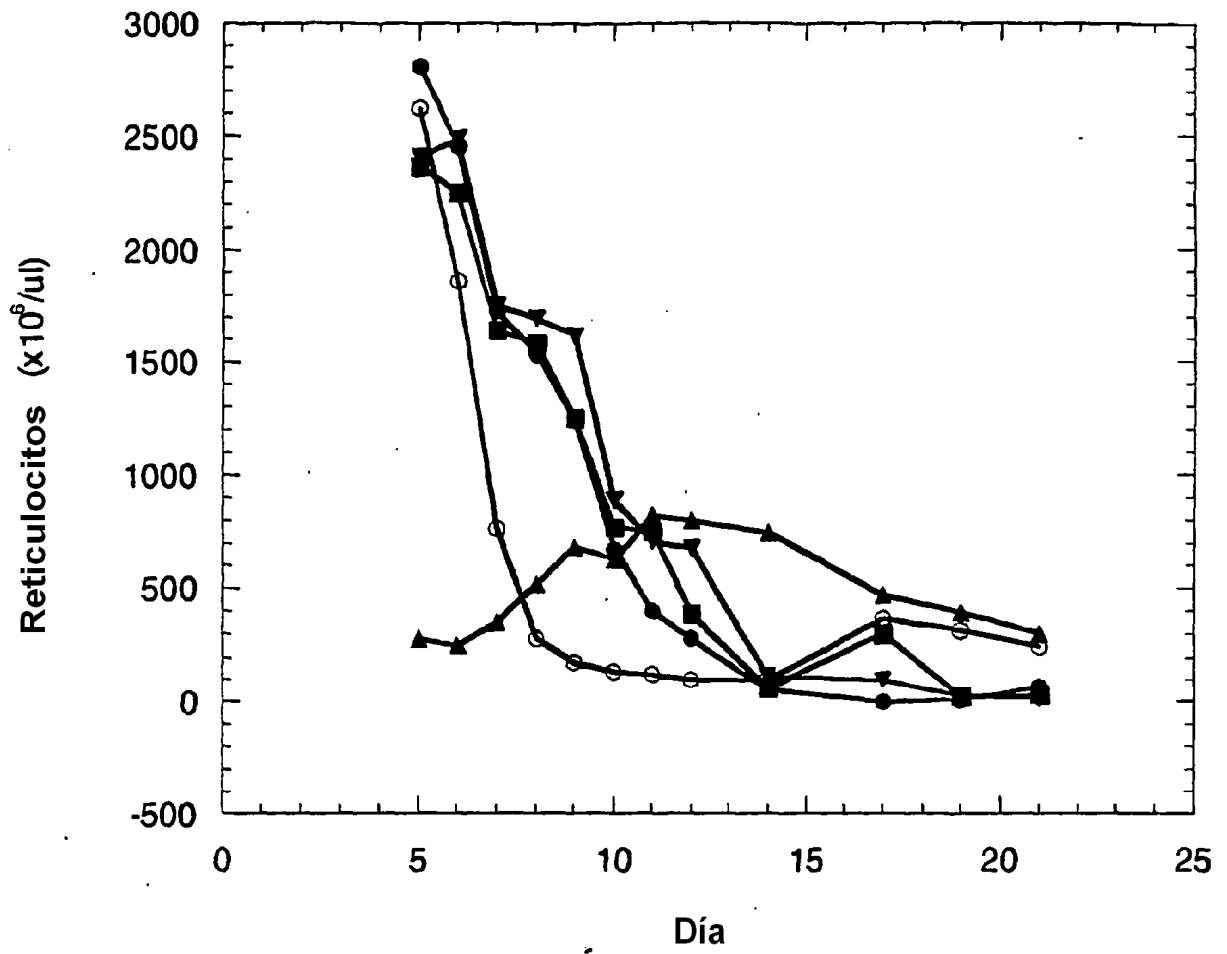


FIGURA 18

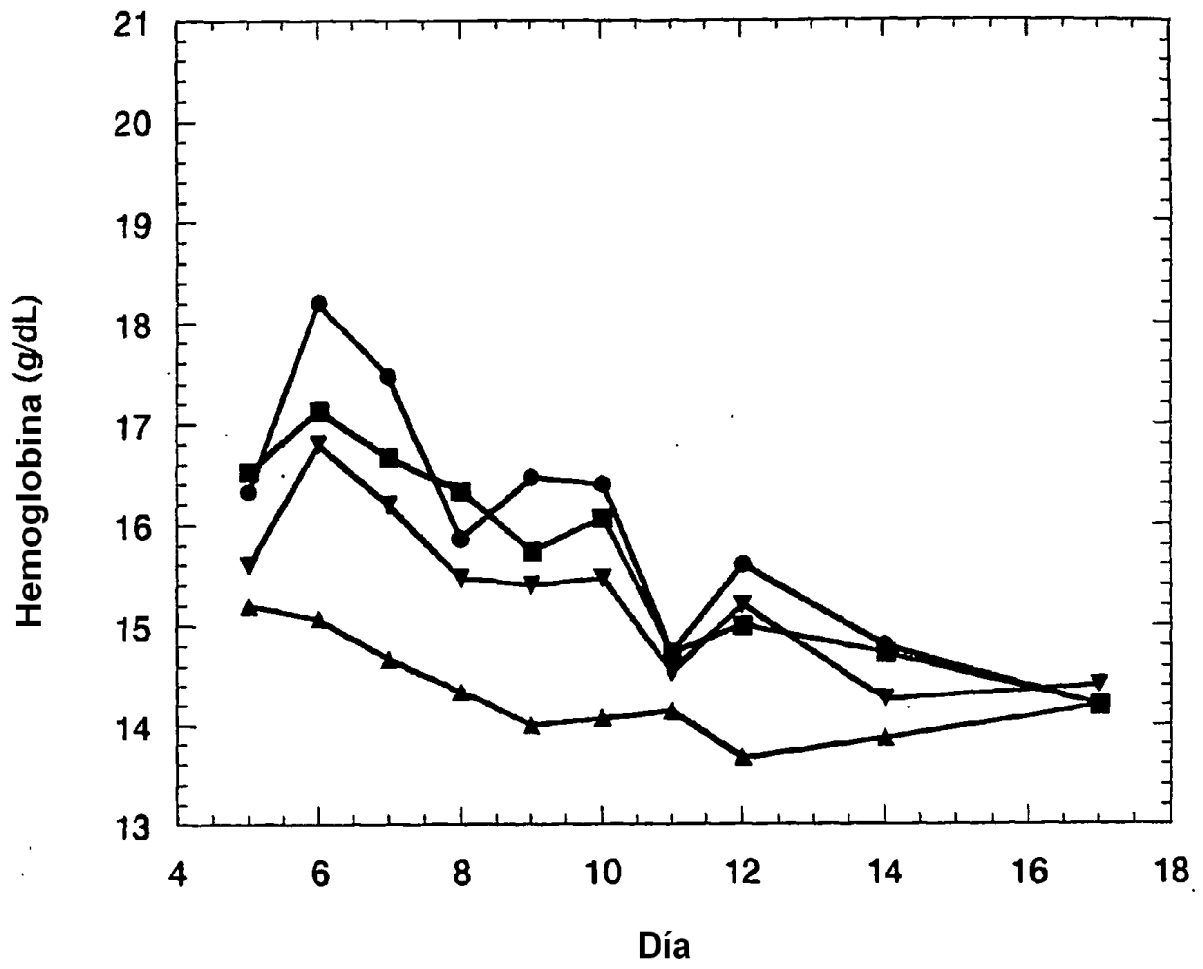


FIGURA 19

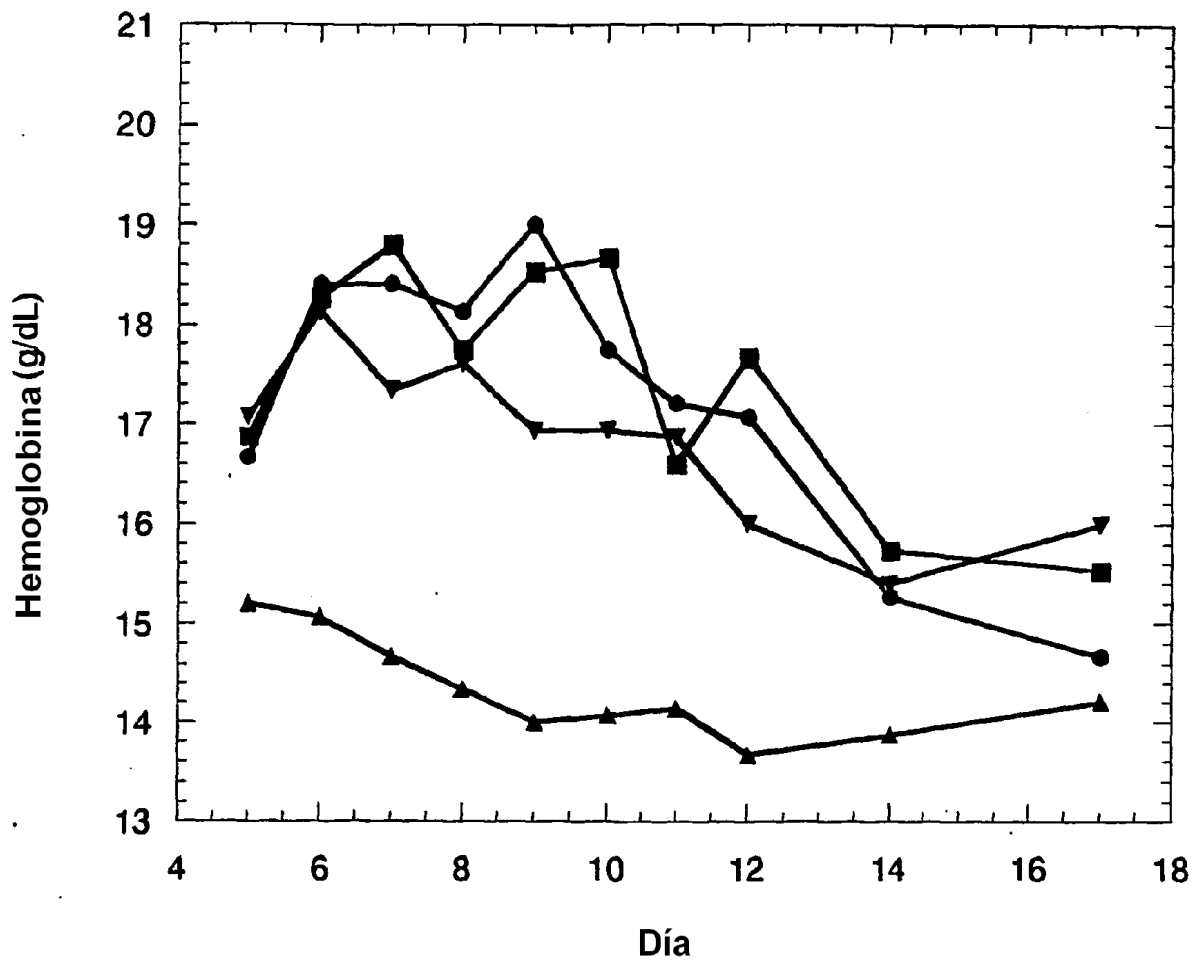


FIGURA 20

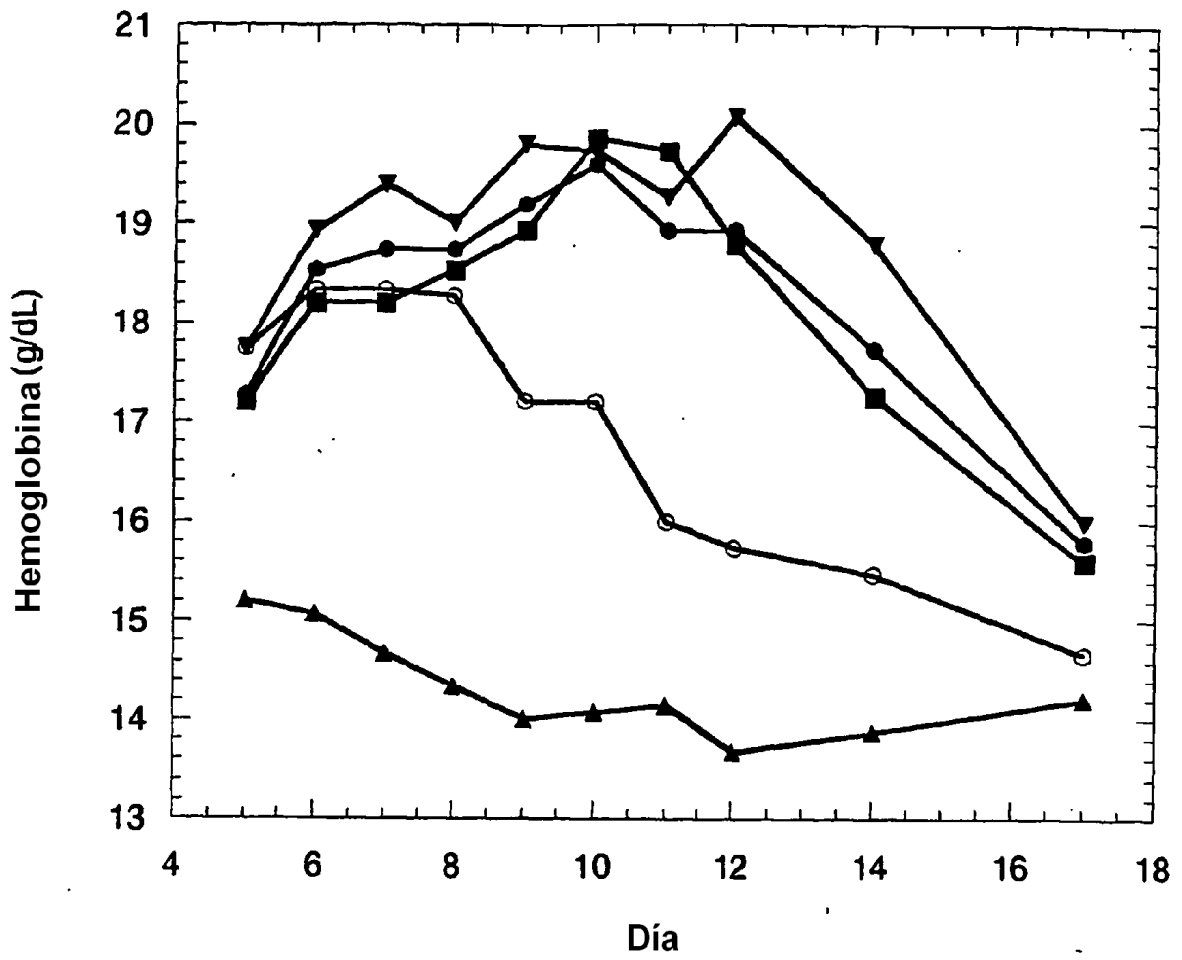


FIGURA 21

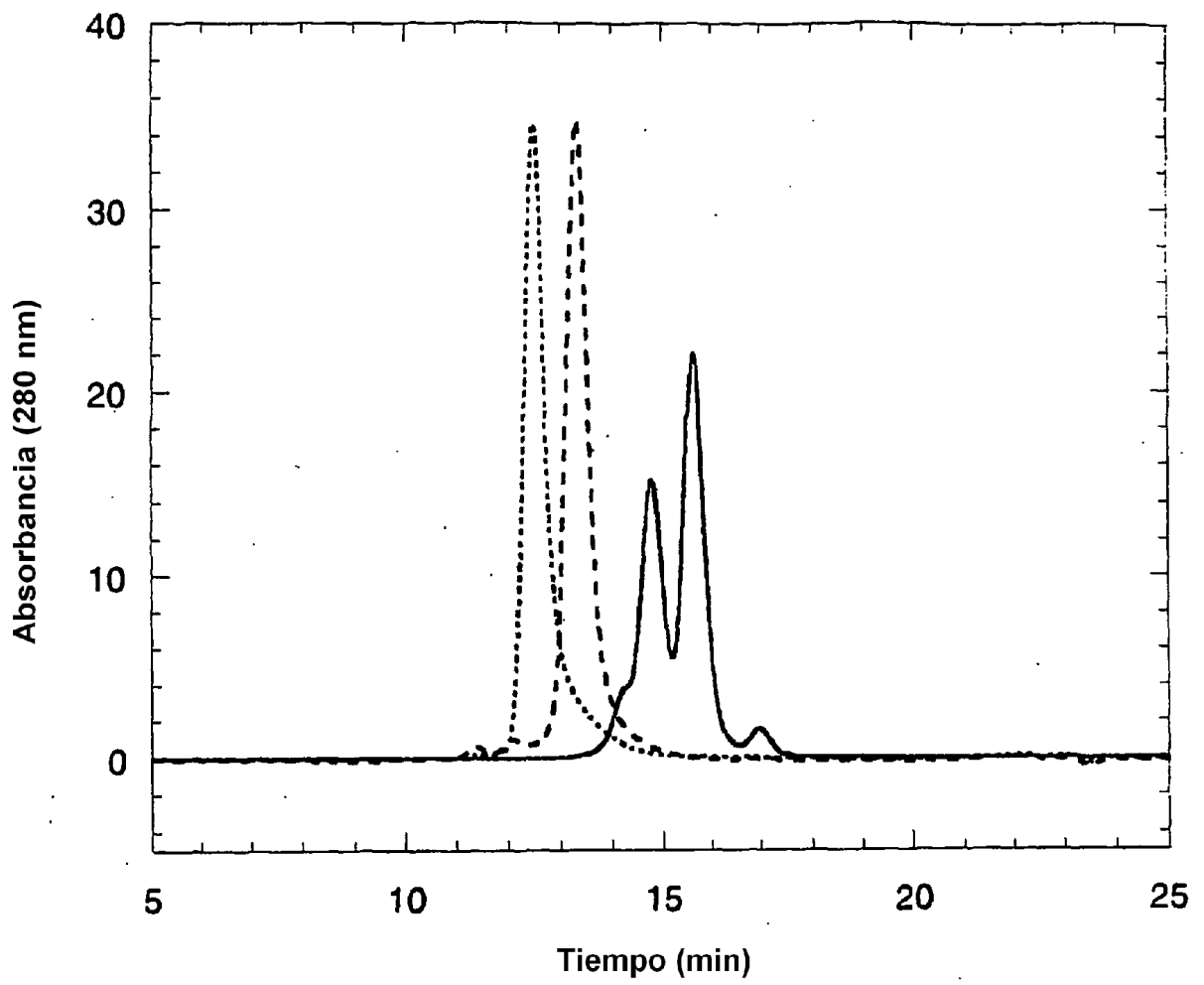


FIGURA 22