

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 183**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03808554 .4**
96 Fecha de presentación: **23.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1667708**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54 Título: **Conjugados de polietilenglicol de interferón-beta-1b con potencia biológica in vitro potenciada**

30 Prioridad:
26.12.2002 US 436020 P
20.06.2003 US 479914 P
20.06.2003 US 479913 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2012

73 Titular/es:
MOUNTAIN VIEW PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
3475-S EDISON WAY
MENLO PARK, CA 94025-1813, US

72 Inventor/es:
SAIFER, MARK G., P.;
MARTINEZ, ALEXA, L.;
WILLIAMS, DAVID, L. y
SHERMAN, MERRY, R.

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO FACES, José

ES 2 389 183 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de polietilenglicol de interferón-beta-1b con potencia biológica *in vitro* potenciada.

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION****Campo de la invención**

10 **[0001]** La presente invención está en los campos de la bioquímica de proteínas y las ciencias farmacéuticas y
médicas. En particular, la invención proporciona procedimientos para la producción de conjugados entre polímeros
solubles en agua (por ejemplo, poli(etilenglicol) y derivados del mismo) y citocinas (por ejemplo, interferón-*beta*),
conjugados que tienen elevada potencia en comparación con conjugados de polímero de la misma citocina
15 sintetizada por procedimientos convencionales. La invención también proporciona conjugados producidos por tales
procedimientos, composiciones que comprenden tales conjugados, kits que comprenden tales conjugados y
composiciones y procedimientos de uso de los conjugados y composiciones en la prevención, diagnóstico y
tratamiento de una variedad de afecciones médicas y veterinarias. La invención también proporciona procedimientos
de determinación del (de los) sitio(s) de unión de polímeros por alquilación reductora bajo ciertas condiciones.

Técnica relacionada

20 **[0002]** La siguiente descripción de la técnica relacionada incluye interpretaciones de los presentes inventores que
no están, por sí mismas, en la técnica anterior. Las citocinas son proteínas reguladoras secretadas que controlan la
supervivencia, crecimiento, diferenciación y/o función efectora de células de modo endocrino, paracrino o autocrino
(revisado en Nicola, N.A. (1994) en: Guidebook to Cytokines and Their Receptors, Nicola, N.A., ed., pág. 1-7, Oxford
25 University Press, Nueva York). Debido a su potencia, especificidad, pequeño tamaño y facilidad relativa de
producción en organismos recombinantes, las citocinas pueden tener posibles aplicaciones como agentes
terapéuticos.

30 **[0003]** Dos factores clave han impedido el desarrollo de citocinas, en particular, y proteínas recombinantes, en
general, como agentes terapéuticos – sus semividas generalmente cortas en la circulación y su posible antigenicidad
e inmunogenicidad. Como se usa en el presente documento y generalmente en la materia, el término “antigenicidad”
se refiere a la capacidad de una molécula para unirse a anticuerpos preexistentes, mientras que el término
“inmunogenicidad” se refiere a la capacidad de la molécula para provocar una respuesta inmunitaria *in vivo*, si esa
35 respuesta implica la formación de anticuerpos (una “respuesta humoral”) o la estimulación de respuestas
inmunitarias celulares.

[0004] Para la administración de proteínas terapéuticas recombinantes, la administración intravenosa (*i.v.*) es
frecuentemente deseable con el fin de lograr las mayores actividades en circulación y para minimizar problemas de
biodisponibilidad y degradación. Sin embargo, las semividas de proteínas pequeñas tras la administración *i.v.* son
40 normalmente extremadamente cortas (véanse los ejemplos en Mordenti, J. y col., (1991) Pharm Res 8:1351-1359;
Kuwabara, T. y col., (1995) Pharm Res 12:1466-1469). Las proteínas con radios hidrodinámicos que superan los de
la albúmina de suero, que tienen un radio de Stokes de aproximadamente 36 Å y un peso molecular de
aproximadamente 66.000 Dalton (66 kDa), son generalmente retenidas en la circulación sanguínea por riñones
sanos. Sin embargo, proteínas más pequeñas, que incluyen citocinas tales como factor estimulante de colonias de
45 granulocitos (“G-CSF”), interleucina-2 (“IL-2”), interferón-*alfa* (“IFN-*alfa*”) e interferón-*gamma* (“IFN-*gamma*”), son
rápidamente eliminadas de la circulación sanguínea por filtración glomerular (Brenner, B.M. y col., (1978) Am J
Physiol 234:F455-F460; Venkatachalam, M.A. y col., (1978) Circ Res 43:337-347; Wilson, G., (1979) J Gen Physiol
74:495-509; Knauf, M.J. y col., (1988) J Biol Chem 263:15064-15070; Kita, Y. y col., (1990) Drug Des Deliv 6:157-
167; Rostaing, L. y col., (1998), J Am Soc Nephrol 9:2344-2348). Como resultado, el mantenimiento de
50 concentraciones terapéuticamente útiles de proteínas recombinantes pequeñas en la circulación es problemático
tras la inyección. Por tanto, normalmente deben administrarse mayores concentraciones de tales proteínas e
inyecciones más frecuentes. Las pautas de dosis resultantes aumentan el coste de la terapia, disminuyen la
probabilidad del cumplimiento del paciente y aumentan el riesgo de acontecimientos adversos, por ejemplo,
reacciones inmunitarias. Tanto las respuestas inmunitarias celulares como humorales pueden reducir las
55 concentraciones en circulación de proteínas recombinantes inyectadas a un grado tal que pueda excluir la
administración de una dosis eficaz o pueda conducir a acontecimientos limitantes del tratamiento que incluyen
eliminación acelerada de la eficacia y anafilaxia (Ragnhammar, P. y col., (1994) Blood 84:4078-4087;
Wadhwa, M. y col., (1999) Clin Cancer Res 5:1353-1361; Hjelm Skog, A.-L. y col., (2001) Clin Cancer Res 7:1163-
1170; Li, J. y col., (2001) Blood 98:3241-3248; Basser, R.L. y col., (2002) Blood 99:2599-2602; Schellekens, H.,
60 (2002) Clin Ther 24:1720-1740).

[0005] La modificación de proteínas recombinantes por la unión covalente de poli(etilenglicol) (“PEG”) se ha
investigado exhaustivamente como un medio de tratar las deficiencias tratadas anteriormente (revisado en Sherman,
M.R. y col., (1997) en: Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications, Harris, J.M. y col., eds., pág.
65 155-169, American Chemical Society, Washington, D.C.; Roberts, M.J. y col., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:459-

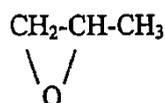
476). Se ha mostrado que la unión de PEG a proteínas estabiliza las proteínas, mejora su biodisponibilidad y/o reduce su inmunogenicidad *in vivo* (la unión covalente de PEG a una proteína u otro sustrato se denomina en el presente documento, y se conoce en la técnica, como "PEGilación"). Además, la PEGilación puede aumentar significativamente el radio hidrodinámico de proteínas. Si una proteína pequeña tal como una citocina se acopla a una única cadena larga de PEG (por ejemplo, que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 18 kDa), el conjugado resultante tiene un radio hidrodinámico que supera el de la albúmina de suero y su eliminación de la circulación por los glomérulos renales se retarda espectacularmente. Los efectos combinados de PEGilación - proteólisis reducida, reconocimiento inmunitario reducido y tasas reducidas de eliminación renal - confieren ventajas sustanciales con respecto a las proteínas PEGiladas como agentes terapéuticos.

[0006] Desde los años 70 se han hecho intentos por usar la unión covalente de polímeros para mejorar la seguridad y eficacia de diversas proteínas para uso farmacéutico (véase, por ejemplo, Davis, F.F. y col., la patente de EE.UU. nº 4.179.337). Algunos ejemplos incluyen el acoplamiento de PEG o poli(óxido de etileno) ("POE") a adenosina desaminasa (EC 3.5.4.4) para su uso en el tratamiento de enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave (Davis, S. y col., (1981) Clin Exp Immunol 46:649-652; Hershfield, M.S. y col., (1987) N Engl J Med 316:589-596), a superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) para el tratamiento de afecciones inflamatorias (Saifer, M. y col., las patentes de EE.UU. nº 5.006.333 y 5.080.891) y a urato oxidasa (EC 1.7.3.3) para la eliminación de ácido úrico en exceso de la sangre y orina (Kelly, S.J. y col., (2001) J Am Soc Nephrol 12:1001-1009; Williams, L.D. y col., publicación PCT nº WO 00/07629 A3 y la patente de EE.UU. nº 6.576.235; Sherman, M.R. y col., publicación PCT nº WO 01/59078 A2).

[0007] Los POE y PEG son polímeros compuestos por unidades de óxido de etileno covalentemente ligadas. Estos polímeros tienen la siguiente estructura general:



en la que R_2 puede ser un grupo hidroxilo (o un derivado reactivo del mismo) y R_1 puede ser hidrógeno, como en dihidroxi-PEG ("diol de PEG"), un grupo metilo, como en monometoxi-PEG ("mPEG"), u otro grupo alquilo inferior, por ejemplo, como en *iso*-propoxi-PEG o *t*-butoxi-PEG. El parámetro n en la estructura general de PEG indica el número de unidades de óxido de etileno en el polímero y se denomina en el presente documento y en la materia el "grado de polimerización". Polímeros de la misma estructura general, en la que R_1 es un grupo alquilo C_{1-7} , también se han denominado derivados de oxirano (Yasukohchi, T. y col., patente de EE.UU. nº 6.455.639). Los PEG y POE pueden ser lineales, ramificados (Fuke, I. y col., (1994) J Control Release 30:27-34) o con forma de estrella (Merrill, E.W., (1993) J Biomater Sci Polim Ed 5:1-11). Los PEG y POE son anfipáticos, es decir, son solubles en agua y en ciertos disolventes orgánicos y pueden adherirse a materiales que contienen lípidos, que incluyen virus envueltos y las membranas de células animales y bacterianas. Ciertos copolímeros al azar o de bloques o alternantes de óxido de etileno (OCH_2CH_2) y óxido de propileno, que tiene la siguiente estructura:



tienen propiedades que son suficientemente similares a las del PEG, ya que se cree que estos copolímeros son sustituciones adecuadas para el PEG en ciertas aplicaciones (véase, por ejemplo, Hiratani, H., patente de EE.UU. nº 4.609.546 y Saifer, M. y col., patente de EE.UU. nº 5.283.317). El término "poli(óxidos de alquileo)" y la abreviatura "POA" se usan en el presente documento para referirse a tales copolímeros, además de a PEG o POE y copolímeros de poli(oxietileno-oximetileno) (Pitt, C.G. y col., patente de EE.UU. nº 5.476.653). Como se usa en el presente documento, el término "polialquilenglicoles" y la abreviatura "PAG" se usan para referirse genéricamente a polímeros adecuados para su uso en los conjugados de la invención, particularmente PEG, más particularmente PEG que contienen un único grupo reactivo ("PEG monofuncionalmente activados").

[0008] La unión covalente de PEG u otros poli(óxidos de alquileo) a una proteína requiere la conversión de al menos un grupo terminal del polímero en un grupo funcional reactivo. Este procedimiento se denomina frecuentemente "activación" y el producto se llama "PEG activado" o poli(óxido de alquileo) activado. Los monometoxi-PEG, en los que un oxígeno en un extremo está rematado con un grupo metilo químicamente estable no reactivo (para producir un "grupo metoxilo") y, en el otro extremo, con un grupo funcional que es reactivo hacia grupos amino sobre una molécula de proteína, se usan más comúnmente para tales enfoques. Los llamados mPEG "ramificados", que contienen dos o más grupos metoxilo distales a un único grupo funcional activado, se usan menos comúnmente. Un ejemplo de PEG ramificado es di-mPEG-lisina, en la que el PEG está acoplado a ambos grupos amino, y el grupo carboxilo de lisina es casi siempre activado por esterificación con *N*-hidroxisuccinimida (Martinez, A. y col., patente de EE.UU. nº 5.643.575; Greenwald, R.B. y col., patente de EE.UU. nº 5.919.455; Harris, J.M. y col., patente de EE.UU. nº 5.932.462).

[0009] Comúnmente, los polímeros activados se hacen reaccionar con un compuesto bioactivo que tiene grupos

funcionales nucleófilos que sirven de sitios de unión. Un grupo funcional nucleófilo que comúnmente se usa como sitio de unión es el grupo *epsilon*-amino de residuos de lisina. Como sitios de unión también se han usado grupos *alfa*-amino accesibles a disolvente, grupos ácido carboxílico, grupos guanidino, grupos imidazol, grupos carbonilo adecuadamente activados, restos hidrato de carbono oxidados y grupos tiol.

[0010] El grupo hidroxilo de PEG se ha activado con cloruro cianúrico antes de su unión a proteínas (Abuchowski, A. y col., (1977) J Biol Chem 252:3582-3586; Abuchowski, A. y col., (1981) Cancer Treat Rep 65:1077-1081). Sin embargo, el uso de este procedimiento tiene desventajas, tal como la toxicidad del cloruro cianúrico y su reactividad no específica por proteínas que tienen grupos funcionales distintos de aminas, tales como residuos de cisteína o tirosina accesibles a disolvente que pueden ser esenciales para la función. Con el fin de vencer estas y otras desventajas se han introducido PEG activados alternativos, tal como derivados de succinato de succinimidilo de PEG ("SS-PEG") (Abuchowski, A. y col., (1984) Cancer Biochem Biophys 7:175-186), derivados de carbonato de succinimidilo de PAG ("SC-PAG") (Saifer, M. y col., patente de EE.UU. nº 5.006.333) y derivados de aldehído de PEG (Royer, G.P., patente de EE.UU. nº 4.002.531).

[0011] Comúnmente, varias (por ejemplo, 5 a 10) cadenas de uno o más PAG, por ejemplo, uno o más PEG con un peso molecular de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, se acoplan a la proteína diana por grupos amino primarios (los grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina y, posiblemente, el grupo *alfa*-amino del aminoácido del extremo amino ("extremo N")). Más recientemente se han sintetizado conjugados que contienen una única cadena de mPEG de mayor peso molecular, por ejemplo, 12 kDa, 20 kDa o 30 kDa. Se han demostrado correlaciones directas entre las semividas en plasma de los conjugados y un peso molecular creciente y/o número creciente de cadenas de PEG acopladas (Knauf, M.J. y col., arriba; Katre, N.V. (1990) J Immunol 144:209-213; Clark, R. y col., (1996) J Biol Chem 271:21969-21977; Bowen, S. y col., (1999) Exp Hematol 27:425-432; Leong, S.R. y col., (2001) Cytokine 16:106-119). Por otra parte, como aumenta el número de cadenas de PEG acopladas a cada molécula de proteína, entonces se modifica la probabilidad de un grupo amino en una región esencial de la proteína y, por tanto, se alterará la función biológica de la proteína, particularmente si es una proteína de unión a receptor. Para proteínas más grandes que contienen muchos grupos amino, y para enzimas con sustratos de bajo peso molecular, el equilibrio entre el aumento de la duración de la acción y la disminución de la actividad específica puede ser aceptable, ya que se produce un aumento neto en la actividad biológica de los conjugados que contienen PEG *in vivo*. Sin embargo, para proteínas más pequeñas que funcionan por interacciones con receptores de la superficie celular, tales como citocinas, se ha informado que un grado de sustitución relativamente alto reduce la actividad funcional hasta el punto de invalidar la ventaja de una semivida prolongada en la circulación sanguínea (Clark, R. y col., arriba).

[0012] Por tanto, la conjugación de polímeros es una tecnología bien establecida para prolongar la bioactividad y disminuir la inmunorreactividad de proteínas terapéuticas tales como enzimas (véanse, por ejemplo, solicitud provisional de EE.UU. nº 60/436.020 presentada el 26 de diciembre de 2002 y solicitudes provisionales de EE.UU. nº 60/479.913 y 60/479.914, presentadas ambas el 20 de junio de 2003). Una clase de proteínas terapéuticas que se beneficiaría especialmente de tal disminución de la inmunorreactividad son la interferón-beta, particularmente interferón-beta-1b ("IFN- β -1b;" SEC ID N°: 1) (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1996) Neurology 47:889-894). Sin embargo, la conjugación de polímeros con proteínas reguladoras que funcionan uniéndose específicamente a receptores de la superficie de la célula normalmente: (1) interfiere con tal unión; (2) disminuye sustancialmente las potencias de transducción de señales de agonistas de citocinas; y (3) disminuye sustancialmente las potencias competitivas de antagonistas de citocinas. Ejemplos publicados de tales conjugados con actividad de unión a receptor disminuida incluyen conjugados de polímero de factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") (Kinstler, O. y col., publicación PCT nº WO 96/11953; Bowen, S. y col., arriba); hormona de crecimiento humana ("hGH") (Clark, R. y col., arriba); antagonistas de hGH (Ross, R.J.M. y col., (2001) J Clin Endocrinol Metab 86:1716-1723; y *In-alpha* (Bailon, P. y col., (2001) Bioconjug Chem 12:195-202; Willie, D.C. y col., (2001) Pharm Res 18:1354-1360; y Wang, Y.-S. y col., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:547-570), entre otros. En un caso extremo, el acoplamiento de polímeros a interleucina-15 ("IL-15") convirtió este factor de crecimiento similar a IL-2 en un inhibidor de la proliferación celular (Pettit, D.K. y col., (1997) J Biol Chem 272:2312-2318). Aunque no se pretende quedar ligado a teoría, el mecanismo para tales efectos no deseables de la PEGilación puede implicar el impedimento estérico de interacciones de receptores por los grupos PEG voluminosos, neutralización de carga, o ambos.

[0013] El Tayar y col. (publicación PCT nº WO 99/55377) se refiere a la PEGilación de interferón-beta-1a (SEC ID N°: 2) en la cisteína en la posición 17.

[0014] Pepinsky y col. (publicación PCT nº WO 00/23114) se refiere a muteínas de interferón-beta-1a y a conjugados de PEG de las mismas.

[0015] Katre y col. (patente de EE.UU. nº 4.917.888) se refiere a la solubilización de una proteína conjugada biológicamente activa que es interferón-beta, interleucina-2, o una inmunotoxina.

[0016] Lin y col. (publicación PCT nº WO 03/061577) se refiere a la PEGilación en general y desvela en el Ejemplo

2 la mono-PEGilación de interferón-beta-1a en el extremo N por alquilación reductora.

5 [0017] Por tanto, existe una necesidad de procedimientos para producir conjugados que contienen PAG (por ejemplo, que contienen PEG y/o POE), particularmente conjugados entre tales polímeros solubles en agua y proteínas de unión a receptor, con sustancial preservación de la bioactividad (por ejemplo, al menos aproximadamente el 40%), bioactividad casi completa (por ejemplo, al menos aproximadamente el 80%) o bioactividad esencialmente completa (por ejemplo, al menos aproximadamente el 90%). Tales conjugados tendrán los beneficios proporcionados por el componente de polímero de solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad *in vivo* disminuidas y presentarán potencia o utilidad sustancialmente elevada en comparación con conjugados de polímero convencionales en un animal en el que los conjugados se han introducido para fines profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 [0018] La presente invención trata las necesidades identificadas anteriormente y proporciona procedimientos para la preparación de conjugados de poli(etilenglicol), y derivados de los mismos, con interferón-beta-1b. La invención también proporciona conjugados producidos por tales procedimientos. En comparación con los componentes bioactivos sin conjugar correspondientes, los conjugados de la invención tienen elevada estabilidad (es decir, estabilidad en almacén prolongada y semividas *in vivo* prolongadas). Además, en comparación con los conjugados del mismo componente bioactivo preparado con cadenas de polímero que están unidas al azar a sitios accesibles a disolvente a lo largo de las cadenas de polipéptidos, los conjugados de la invención tienen elevada actividad de unión a receptor, que puede medirse o emplearse *in vitro*, y elevada potencia, que puede medirse tanto *in vitro* como *in vivo*.

25 [0019] Específicamente, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la potencia biológica *in vitro* o un interferón-beta no glucosilado que comprende acoplar selectivamente, en presencia de un tensioactivo, uno o más polímeros solubles en agua con el aminoácido del extremo amino o dicho interferón-beta, en el que dicho aminoácido del extremo amino está localizado remotamente del (de los) dominio(s) de unión a receptor o dicho interferón-beta y en el que

- 30 (i) el polímero soluble en agua lleva un único grupo aldehído y el acoplamiento comprende alquilación reductora de una base de Schiff formada con el polímero soluble en agua y reducción de la base de Schiff con un agente reductor suave o
- 35 (ii) el acoplamiento comprende acoplar una hidrazida, hidracina, semicarbazida u otro polímero soluble en agua que contiene amina con un residuo de serina o treonina del extremo N o el interferón-beta que se ha eliminado oxidativamente con un aldehído con peryodato, y

en el que el polímero soluble en agua es un polialquilenglicol seleccionado del grupo que consiste en un poli(etilenglicol), un mono-metoxipoli(etilenglicol) y un monohidroxi-poli(etilenglicol).

40 [0020] Además, la invención proporciona conjugados producidos por tales procedimientos, composiciones que comprenden tales conjugados, kits que contienen tales conjugados y composiciones para su uso en una variedad de pautas terapéuticas y de diagnóstico.

45 [0021] Los polímeros adecuados para su uso en estos procedimientos de la invención son uno o más poli(etilenglicoles), uno o más monometoxipoli(etilenglicoles) y uno o más monohidroxipoli(etilenglicoles). Los polímeros adecuados para su uso en los procedimientos de la invención normalmente tienen pesos moleculares de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa, ambos incluidos, o más particularmente pesos moleculares de entre aproximadamente 8 kDa y aproximadamente 14 kDa, ambos incluidos; entre aproximadamente 50 10 kDa y aproximadamente 30 kDa, ambos incluidos; entre aproximadamente 18 kDa y aproximadamente 22 kDa, ambos incluidos; o de aproximadamente 20 kDa o aproximadamente 30 kDa.

[0022] En ciertas realizaciones, el uno o más polímeros están covalentemente acoplados (particularmente por un enlace amina secundaria) con el grupo *alfa*-amino del aminoácido del extremo amino sobre la citocina.

55 [0023] Para conjugados de polímero de agonistas de la invención, es preferible que el (los) sitio(s) de unión a polímero esté(n) alejado(s) de todos los dominios de unión a receptor. La invención también proporciona composiciones, particularmente composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más de los conjugados de la invención y uno o más componentes adicionales tales como uno o más diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. La invención también proporciona kits que comprenden uno o más de los conjugados, composiciones y/o composiciones farmacéuticas de la invención.

60 [0024] La invención también proporciona los conjugados usados en procedimientos para la prevención, diagnóstico o tratamiento de un trastorno físico en un animal (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) que padece o está predispuesto al trastorno físico. Tales procedimientos pueden comprender, por ejemplo, administrar al animal

una cantidad eficaz de uno o más de los conjugados, composiciones o composiciones farmacéuticas de la presente invención. Trastornos físicos adecuadamente tratados o prevenidos según tales procedimientos de la invención incluyen cánceres (por ejemplo, un cáncer de mama, un cáncer uterino, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer testicular, un cáncer de pulmón, una leucemia, un linfoma, un cáncer de colon, un cáncer gastrointestinal, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de hueso, un cáncer neurológico, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de piel, un sarcoma, un carcinoma, un adenoma y un mieloma); enfermedades infecciosas (por ejemplo, enfermedades bacterianas, enfermedades fúngicas, enfermedades parasitarias y enfermedades víricas (tales como una hepatitis vírica, una enfermedad producida por un virus cardiotrópico, VIH/SIDA); y trastornos genéticos (por ejemplo, anemia, neutropenia, trombocitopenia, hemofilia, enanismo y enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave ("EICG")); trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide) y trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, diversas formas y etapas de esclerosis múltiple ("EM") tales como EM recurrente-remitente, EM progresiva primaria y EM progresiva secundaria; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; enfermedad de Alzheimer; y similares).

[0025] En realizaciones adicionales, la invención proporciona procedimientos para la escisión oxidativa selectiva de un residuo de serina del extremo N de una proteína bioactiva sin oxidar residuos de aminoácidos funcionalmente esenciales de dicha proteína bioactiva. Ciertos de tales procedimientos de la invención comprenden, por ejemplo, (a) ajustar la concentración de ión hidrógeno de una disolución de la proteína bioactiva a un pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10, más preferentemente a pH de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8; (b) mezclar la disolución de proteína bioactiva con aproximadamente 0,1 moles a aproximadamente 10 moles, o más preferentemente con aproximadamente 0,5 moles a aproximadamente 5 moles, de un peryodato por mol de proteína bioactiva; y (c) incubar dicha mezcla durante al menos una hora, preferentemente a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 40°C. Proteínas adecuadas para su uso según tales procedimientos incluyen citocinas (incluyendo interferón-*beta* (particularmente interferón-*beta*-1b, que preferentemente tiene la secuencia de aminoácidos especificada en SEC ID N°: 1).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026] La Figura 1 muestra modelos moleculares de citocinas creadas con el software RasMol (Saile, R.A. y col., (1995) Trends Biochem Sci 20:374-376) basado en datos cristalográficos. Cada uno de los modelos se representa en forma de "cinta" o "diagrama en color", excepto ciertos residuos de particular interés que se muestran en forma "esferas y varillas". Estas formas son opciones seleccionadas usando el software RasMol. Las partes oscuras de las cintas representan dominios de las citocinas y factores de crecimiento que se informa que participan en la unión a sus receptores. Para cada estructura se indica el código de acceso en la base de datos de proteínas ("PDB") (véanse Laskowski, R.A., (2001) Nucleic Acids Res 29:221-222; Peitsch, M.C., (2002) Bioinformatics 18:934-938; Schein, C.H., (2002) Curr Pharm Des 8:2113-2129).

[0027] La Figura 1 muestra un modelo molecular de interferón-*beta*-1a humano (véase SEC ID N°: 2) en el que se indican varios residuos de lisina que están dentro de o adyacentes a los dominios de unión a receptor (Lys 19, Lys 33, Lys 99 y Lys 134). Además, el sitio de glucosilación (Asn 80) y el residuo de metionina del extremo N ("Met 1") se muestran en forma de "esferas y varillas" (basándose en los datos de Karpusas, M. y col., (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:11813-11818; Karpusas, M. y col., (1998) Cell Mol Life Sci 54:1203-1216; Runkel, L. y col., (2000) Biochemistry 39:2538-2551). La Met 1 está alejada de los sitios de unión 1 y 2, mientras que varios residuos de lisina están localizados dentro de los dominios de unión a receptor. (código PDB 1AUI) La estructura de interferón-*beta*-1b (véase SEC ID N°: 1) se diferencia de la de interferón-*beta*-1a en que carece del residuo de metionina del extremo N y el resto hidrato de carbono, además de que tiene un residuo de serina sustituido con el residuo de cisteína desemparejado (Cys 17 de SEC ID N°: 2).

[0028] La Figura 2 representa la resolución por HPLC de exclusión por tamaño de interferón- β -1b ("IFN") de sus conjugados formados por alquilación reductora con aldehído de mPEG de 20 kDa a diversas concentraciones de entrada ("1x," "2x" o "4x") con cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN) como agente reductor. Los conjugados que contienen una cadena de PEG ("PEG₁-IFN") o dos cadenas ("PEG₂-IFN") se resuelven a partir de IFN al que el PEG no se acopló bajo estas condiciones ("IFN PEGilado vacío").

[0029] La Figura 3 demuestra la escisión oxidativa por peryodato de sodio de aproximadamente el 90% de PEG₁-IFN- β sintetizado por alquilación reductora bajo diversas condiciones. La HPLC de exclusión por tamaño en presencia de dodecilsulfato de sodio ("SDS") resolvió el PEG₁-IFN- β residual a partir de los productos de escisión, que incluye formaldehído e IFN en el que la serina del extremo N se escindió a un aldehído ("aldehído de IFN").

[0030] La Figura 4 representa la resolución por cromatografía de fase inversa de PEG₁-IFN- β a partir de IFN- β PEGilado vacío, PEG sin unir, SDS sin unir y componentes secundarios de la mezcla de reacción.

[0031] La Figura 5 representa resultados de cromatografía de fase inversa ("FI") analítica de una mezcla de reacción de PEGilación y fracciones de una columna de FI preparativa que se enriquecieron en PEG₁-IFN- β (fracción 51) o en IFN- β PEGilado vacío (fracción 53), respectivamente.

[0032] La **Figura 6** representa resultados de análisis electroforéticos de una mezcla de reacción de PEGilación y fracciones de una columna de FI preparativa que están enriquecidas tanto en PEG₁-IFN-β (fracción 51) como en conjugados que contienen más de una cadena de PEG (fracción 49). El gel se tiñó para proteína con un colorante fluorescente y se fotografió con iluminación ultravioleta. La intensidad de la tinción se midió con el software de obtención de imágenes Kodak 1D.

[0033] La **Figura 7** representa resultados de análisis electroforéticos de las mismas muestras que en la Figura 6, excepto que el gel se tiñó para PEG con un reactivo que contenía BaCl₂, I₂ y KI. La intensidad de la tinción en una fotografía del gel se midió como en la Figura 6A. El pico de PEG de 20 kDa libre residual es detectable en la mezcla de reacción.

[0034] La **Figura 8** representa cromatogramas de fase inversa de muestras de IFN-β-1b que tanto no se trataron (curva superior) o se incubaron con NaIO₄ 0,5 mM que escindió los residuos de serina del extremo N de tanto los componentes principales como secundarios a derivados de aldehído (curva intermedia) como se oxidaron con NaIO₄ y se hicieron reaccionar con carbazato de 9-fluorenilmetilo ("carbazato de Fmoc"). El componente secundario ("pico A") contiene un residuo de metionina oxidado. Los aumentos similares en los tiempos de retención de tanto el pico A como del componente principal después de la oxidación reflejan la escisión de residuos de serina del extremo N en cada pico a un aldehído. No se detectó aumento en el porcentaje de pico A después de la incubación con NaIO₄ bajo estas condiciones. La formación de conjugados de Fmoc a partir de las formas oxidadas del pico A y el componente principal se indica por los aumentos en sus tiempos de retención y las absorbancias después de la reacción con carbazato de Fmoc.

[0035] La **Figura 9** demuestra la síntesis de PEG₁-IFN-β mediante la reacción de carbazato de PEG de 20 kDa con el derivado de aldehído de IFN-β. La proporción creciente del conjugado detectada después de la incubación de la proteína con NaIO₄ 0,125 mM a temperatura ambiente durante 0,5, 1 ó 2 horas indica que la conversión completa de la serina del extremo N a un aldehído requiere más de 1 hora bajo estas condiciones. PEG₁-IFN-β se resolvió incompletamente a partir de carbazato de PEG de 20 kDa sobre esta columna de exclusión por tamaño.

[0036] La **Figura 10** demuestra la mayor potencia antiproliferativa sobre células de linfoma de Burkitt humano (células Daudi) de diluciones de PEG₁-IFN-β que se purificó por cromatografía de fase inversa (fracción 51, caracterizada en las Figuras 17-19) que de las diluciones de la disolución madre de IFN-β. La concentración de PEG₁-IFN-β purificado requerida para inhibir el 50% del crecimiento inhibible de estas células fue aproximadamente 40 pg/ml, que fue aproximadamente un sexto de la requerida para la disolución madre de IFN-β. La concentración de IFN-β PEGilado vacío purificado (fracción 53 del cromatograma de fase inversa mostrado en la Figura 17) requerida para inhibir el 50% del crecimiento inhibible de estas células fue aproximadamente 80 pg/ml, que es aproximadamente un tercio de la requerida para la disolución madre de IFN-β.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0037] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que comúnmente son entendidos por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento pueda usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los procedimientos preferidos y materiales se describen en lo sucesivo.

[0038] Según las reivindicaciones en el presente documento, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la potencia biológica *in vitro* de un interferón-beta no glucosilado que comprende acoplar selectivamente uno o más polímeros solubles en agua sintéticos al aminoácido del extremo amino de dicho interferón-beta, en el que dicho aminoácido del extremo amino está localizado remotamente del (de los) dominio(s) de unión a receptor de dicho interferón-beta.

[0039] La invención proporciona además un procedimiento para la escisión oxidativa selectiva de un residuo de serina o treonina del extremo N de una proteína bioactiva sin oxidar residuos de aminoácidos funcionalmente esenciales de dicha proteína bioactiva, que comprende:

a) ajustar la concentración de ión hidrógeno de una disolución de dicha proteína bioactiva a un pH entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8;

b) mezclar dicha disolución de proteína bioactiva con aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 moles de un perodato por mol de proteína bioactiva; y

c) incubar dicha mezcla durante al menos una hora a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 40°C.

Definiciones

5 **[0040] Aproximadamente:** como se usa en el presente documento cuando se refiere a cualquier valor numérico, el término “aproximadamente” significa un valor de $\pm 10\%$ del valor establecido (por ejemplo, “aproximadamente 50°C” engloba un intervalo de temperaturas de 45°C a 55°C, ambos incluidos; similarmente, “aproximadamente 100 mM” engloba un intervalo de concentraciones de 90 mM a 110 mM, ambos incluidos).

10 **[0041] Residuo de aminoácido:** como se usa en el presente documento, el término “residuo de aminoácido” se refiere a un aminoácido específico, normalmente deshidratado, como resultado de su participación en dos enlaces peptídicos, en un esqueleto de polipéptido o cadena lateral, pero también cuando el aminoácido participa en un enlace peptídico, como produce en cada extremo de una cadena de polipéptidos lineal. Los residuos de aminoácidos se denominan por los códigos de tres letras o los códigos de una sola letra que son comunes en la materia.

15 **[0042] Antagonista:** como se usa en el presente documento, el término “antagonista” se refiere a un compuesto, molécula, resto o complejo que reduce, reduce sustancialmente o inhibe completamente los efectos biológicos y/o fisiológicos de una citocina dada sobre una célula, tejido u organismo que están mediados por los receptores para la citocina dada. Los antagonistas pueden llevar a cabo tales efectos en una variedad de formas, que incluyen con el agonista para sitio(s) de unión o receptor(es) sobre la superficie celular; interacción con el agonista de tal forma que se reduzca, reduzca sustancialmente o inhiba completamente la capacidad del agonista para unirse a receptores de la superficie celular; unión a e inducción de un cambio conformacional en receptores de la superficie celular de forma que los receptores asuman una estructura con la que el agonista ya no pueda unirse (o sólo pueda unirse con afinidad y/o eficiencia reducida o sustancialmente reducida); inducción de un cambio fisiológico (por ejemplo, aumento en los complejos de señalización intracelular; aumento en inhibidores transcripcionales; reducción en la expresión de receptores de ligandos de la superficie celular, etc.) en células, tejidos u organismos de forma que la unión del agonista, o la señal fisiológica inducida por el agonista tras la unión a la célula, se reduzca, se reduzca sustancialmente o se inhiba completamente; y otros mecanismos por los que los antagonistas pueden llevar a cabo sus actividades, que serán familiares para el experto habitual en la materia. Como generalmente entenderá el experto habitual en la materia, un antagonista puede tener una estructura similar al ligando que antagoniza (por ejemplo, el antagonista puede ser una muteína, variante, fragmento o derivado del agonista), o puede tener una estructura completamente sin relacionar.

35 **[0043] Componente bioactivo:** como se usa en el presente documento, el término “componente bioactivo” se refiere a un compuesto, molécula, resto o complejo que tiene una actividad biológica particular *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo* con una célula, tejido, órgano u organismo, y que puede unirse a uno o más polialquilenglicoles para formar los conjugados de la invención. Componentes bioactivos preferidos incluyen proteínas y polipéptidos tales como aquellos que se describen en el presente documento.

40 **[0044] Unido:** como se usa en el presente documento, el término “unido” se refiere a unión que puede ser covalente, por ejemplo, acoplado químicamente, o no covalente, por ejemplo, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, etc. Enlaces covalentes pueden ser, por ejemplo, éster, éter, fosfoéster, tioéster, tioéter, uretano, amida, amina, péptido, imida, hidrazona, hidrazida, enlaces carbono-azufre, enlaces carbono-fósforo y similares. El término “unido” es más amplio e incluye términos tales como “acoplado”, “conjugado” y “unido”.

45 **[0045] Conjugado/conjugación:** como se usa en el presente documento, “conjugado” se refiere al producto de unión covalente de un polímero, por ejemplo, PEG o POE, con un componente bioactivo, por ejemplo, una proteína o glucoproteína. “Conjugación” se refiere a la formación de un conjugado como se define en la frase anterior. En la presente invención pueden usarse cualquier procedimiento usado normalmente por aquellos expertos en la materia de la conjugación de polímeros con materiales biológicamente activos.

50 **[0046] Acoplado:** el término “acoplado”, como se usa en el presente documento, se refiere a la unión por enlaces covalentes o por interacciones no covalentes fuertes, normalmente y preferentemente a la unión por enlaces covalentes. En la presente invención pueden usarse cualquier procedimiento usado normalmente por aquellos expertos en la materia para el acoplamiento de materiales biológicamente activos.

55 **[0047] Citocina:** como se usa en el presente documento, el término “citocina” se define como una proteína reguladora secretada que controla la supervivencia, crecimiento, diferenciación y/o función efectora de células, de modo endocrino, paracrino o autocrino (revisado en Nicola, N.A., arriba; Kossiakoff, A.A. y col., (1999) *Adv Protein Chem* 52:67-108). Según esta definición, las citocinas incluyen interleucinas, factores estimulantes de colonias, factores de crecimiento y otros factores de péptidos producidos por una variedad de células, que incluyen aquellas específicamente desveladas o ejemplificadas en el presente documento. Al igual que sus parientes cercanos, las hormonas de polipéptidos y los factores de crecimiento, las citocinas inician sus funciones reguladoras por unión a proteínas de receptor específicas sobre la superficie de sus células diana.

65 **[0048] Enfermedad, trastorno, afección:** como se usa en el presente documento, los términos “enfermedad” o “trastorno” se refieren a cualquier afección adversa de un ser humano o animal que incluye tumores, cáncer,

alergias, adicción, autoinmunidad, infección, envenenamiento o alteración de la función mental o corporal óptima. "Afecciones" como se usa en el presente documento incluye enfermedades y trastornos, pero también se refiere a estados fisiológicos. Por ejemplo, la fertilidad es un estado fisiológico, pero no una enfermedad o trastorno. Por tanto, las composiciones de la invención adecuadas para prevenir el embarazo disminuyendo la fertilidad se describirían como un tratamiento de una afección (fertilidad), pero no un tratamiento de un trastorno o enfermedad. Otra afecciones son entendidas por aquellos expertos habituales en la materia.

[0049] Cantidad eficaz: como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un conjugado dado o composición que es necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Una cantidad eficaz de un conjugado dado o composición de la presente invención sería la cantidad que logra este resultado seleccionado, y una cantidad tal puede determinarse por rutina por un experto habitual en la materia usando ensayos que se conocen en la técnica y/o que se describen en el presente documento sin la necesidad de experimentación adicional. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar una deficiencia del sistema inmunitario podría ser la cantidad necesaria para producir la activación del sistema inmunitario, produciendo el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica para antígeno tras la exposición a un antígeno. El término también es sinónimo de "cantidad suficiente". La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que está tratándose, la composición particular que se administra, la vía de administración, el tamaño del sujeto y/o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto habitual en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un conjugado o composición particular de la presente invención sin necesitar experimentación adicional.

[0050] Uno, un o una: cuando los términos "uno", "un" o "una" se usan en esta divulgación significan "al menos uno" o "uno o más", a menos que se indique lo contrario.

[0051] PEG: como se usa en el presente documento, "PEG" incluye todos los polímeros de óxido de etileno, tanto si son lineales o ramificados o de múltiples brazos como si están rematados en los extremos o terminados con hidroxilo. "PEG" incluye aquellos polímeros que se conocen en la técnica como poli(etilenglicol), metoxipoli(etilenglicol) o mPEG o éter monometílico poli(etilenglicol), alcoxipoli(etilenglicol), poli(óxido de etileno) o PEO, α -metil- ω -hidroxipoli(oxi-1,2-etanodiilo) y polioxirano, entre otros nombres que se usan en la materia para polímeros de óxido de etileno.

[0052] PEGilación, PEGilado y PEGilado vacío: como se usa en el presente documento, "PEGilación" se refiere a cualquier procedimiento para el acoplamiento covalente de PEG con una molécula diana bioactiva, especialmente una proteína de unión a receptor. El conjugado así producido se denomina que está "PEGilado". Como se usa en el presente documento, "PEGilado vacío" se refiere a la porción de la proteína en una mezcla de reacción de PEGilación a la que no se ha unido covalentemente PEG. Sin embargo, el producto PEGilado vacío puede haberse alterado durante la reacción o etapas de purificación posteriores, por ejemplo, como consecuencia de exposición al agente reductor durante la PEGilación por alquilación reductora y/o habiendo eliminado uno o más agentes inhibidores, compuestos, etc., durante las etapas de procesamiento y/o de purificación.

[0053] Polipéptido: como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) linealmente ligados por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). Indica una cadena de aminoácidos molecular y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Este término también pretende referirse a los productos de modificaciones pos-expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, hiperglucosilación, acetilación, fosforilación. Un polipéptido puede derivarse de una fuente biológica natural o producirse por tecnología de ADN recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Puede generarse de cualquier manera, que incluye por síntesis química.

[0054] Proteína y glucoproteína: como se usa en el presente documento, el término proteína se refiere a un polipéptido generalmente de un tamaño superior a aproximadamente 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos. Las proteínas tienen generalmente una estructura tridimensional definida, aunque no tengan necesariamente tal estructura, y se denominan frecuentemente plegados, a diferencia de péptidos y polipéptidos, que frecuentemente no poseen una estructura tridimensional definida, pero que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, y se denominan sin plegar. Sin embargo, los péptidos también pueden tener una estructura tridimensional definida. Como se usa en el presente documento, el término glucoproteína se refiere a una proteína acoplada a al menos un resto de hidrato de carbono que está unido a la proteína por una cadena lateral que contiene oxígeno o que contiene nitrógeno de un residuo de aminoácido, por ejemplo, un residuo de serina o un residuo de asparagina.

[0055] Remoto: como se usa en el presente documento, el término "remoto" (como en "aminoácido del extremo N remoto" o "sitio de glucosilación remoto") se refiere a una estructura en la que la localización de uno o más sitios de unión con respecto a uno o más polímeros sobre una proteína es distal a o está espacialmente retirada de una o más regiones de unión a receptor o dominios de la proteína, como se evalúa por modelado molecular. La

conjugación de un polímero en un sitio de unión remoto tal (normalmente el aminoácido del extremo N (para proteínas de unión a receptor que, por tanto, se denominan proteínas de unión a receptor del “extremo N remoto” o

“NR”) o uno o más restos de hidrato de carbono o sitios de glucosilación sobre una glucoproteína (para proteínas de unión a receptor que, por tanto, se denominan proteínas de unión a receptor de “glucosilación remota” o “GR”)) no produce impedimento estérico sustancial de la unión de la proteína a su(s) receptor(es). De ahí que se diga que un aminoácido del extremo amino o un sitio de glucosilación sobre una citocina está “localizado remotamente de uno o más dominios de unión a receptor” de la citocina cuando la conjugación (por ejemplo, unión covalente) de un polímero soluble en agua al aminoácido del extremo amino o sitio de glucosilación, respectivamente, no interfiere sustancialmente con la capacidad de la citocina para unirse a su(s) receptor(es), particularmente a receptores de la superficie de la célula. Por supuesto, se reconoce que una citocina dada puede contener más de un dominio de unión a receptor. En tales situaciones, un aminoácido del extremo amino o sitio de glucosilación de una citocina puede localizarse remotamente de un dominio tal o de más de uno de tales dominios, y todavía considerarse que está “localizado” remotamente de uno o más dominios de unión a receptor”, mientras que la conjugación del aminoácido del extremo amino o sitio de glucosilación no interfiere sustancialmente con la unión de la citocina a su(s) receptor(es) por uno o más de los dominios de unión a receptor. Tanto si la conjugación interfiere sustancialmente como si no con la capacidad de una proteína para unirse a su(s) receptor(es) puede determinarse fácilmente usando ensayos conocidos en la técnica de unión a ligando-receptor que serán familiares para el experto habitual en la materia.

[0056] El PEG es un polímero altamente extendido y flexible que ocupa un gran volumen en disolución con respecto a una proteína de peso molecular similar. Sin embargo, aunque el residuo de aminoácido con el que el PEG está unido puede estar remoto de uno o más sitios de unión a receptor, porciones del polímero podrían interferir, hasta cierto grado, con la unión a receptor. La probabilidad de tal interferencia aumenta con el peso molecular y de ahí el volumen ocupado por el polímero en disolución. En cualquier caso, la unión elegida como diana de PEG a uno o más sitios remotos de la(s) región (regiones) de unión a receptor interferirá menos con la función de la citocina que la PEGilación al azar.

[0057] Los procedimientos de evaluación de la unión ligando-receptor incluyen, sin limitación, ensayos de unión competitivos, ensayos de unión a radioreceptor, ensayos basados en células, mediciones de resonancia de plasmones superficiales, dispersión de la luz dinámica, ultracentrifugación y ultrafiltración.

[0058] Sustancial, sustancialmente: como se usa en el presente documento, la conjugación de una proteína se dice que no interfiere “sustancialmente” con la capacidad de la proteína para unirse a su(s) receptor(es) si la tasa y/o cantidad de unión de una proteína conjugada con un receptor no es inferior a aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% o más, de la tasa de unión y/o cantidad de la citocina correspondiente que no se ha conjugado.

[0059] Tratamiento: como se usa en el presente documento, los términos “tratamiento”, “tratan”, “tratado” o “tratar” se refieren a profilaxis y/o terapia. Cuando se usa con respecto a una enfermedad infecciosa, por ejemplo, el término puede referirse a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto a infestación por un patógeno o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto se infecte con el patógeno o muestre signos de enfermedad atribuibles a la infección, además de un tratamiento después de que el sujeto se haya infectado con el fin de luchar contra la infección, por ejemplo, para reducir o eliminar la infección o para prevenir que empeore.

50 Visión general

[0060] La presente invención proporciona procedimientos para la síntesis de conjugados de polímero de proteínas de unión a receptor que retienen inesperadamente alta actividad de unión a receptor con respecto a conjugados de polímero de la misma proteína de unión a receptor en los que uno o más polímeros están unidos al azar. Mediante el uso de análisis estructurales basados en cristalografía por rayos X y resonancia magnética nuclear, software de análisis mutacional y modelado molecular, los presentes inventores han identificado sitios diana para la PEGilación de citocinas que participan o no participan en la unión a sus receptores. Como una clase de proteínas, estas citocinas se denominan en el presente documento proteínas de unión a receptor. Seleccionando una estrategia sintética que elija como diana la unión a polímero con la(s) región (regiones) de proteínas de unión a receptor que no participan en interacciones con receptor se evitan ciertos impedimentos estéricos no deseables y los conjugados de polímero resultantes retienen potencia anormalmente alta. Aquellas proteínas de unión a receptor que tienen un residuo del extremo amino que está remoto de una o más de sus regiones de unión a receptor o dominios se definen en el presente documento como proteínas de unión a receptor del “extremo N remoto” o “NR”; incluyen todas las citocinas o antagonistas de las mismas que tienen su aminoácido del extremo amino localizado remotamente del sitio o sitios de unión a receptor de la proteína.

[0061] En realizaciones adicionales de la invención se producen conjugados que comprende uno o más poli(etilenglicoles) covalentemente acoplados a citocinas que tienen sitios de glucosilación naturales que están remotos de una o más

5 de sus regiones de unión a receptor o dominios. Este subconjunto de proteínas de unión a receptor se denomina en el presente documento proteínas de unión a receptor de "GR". Cuando un polímero hidrófilo o anfipático se acopla selectivamente a o cerca de un sitio de "glucosilación remota" tal, especialmente cuando la proteína diana es una forma no glucosilada de una proteína que está naturalmente glucosilada, el polímero puede imitar los efectos favorables del hidrato de carbono que se produce naturalmente, por ejemplo, sobre la agregación, estabilidad y/o

10 solubilidad. De ahí que la unión del polímero en o cerca de un sitio de glucosilación se denomine en el presente documento "pseudoglucosilación". Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos para la síntesis de conjugados en los que el acoplamiento selectivo para sitio de un polímero sintético sustituya eficazmente los restos de hidrato de carbono que se producen naturalmente. La pseudoglucosilación resultante contribuye a la mejora de la solubilidad, disminución de la agregación y eliminación retardada de la circulación sanguínea en comparación con

15 otras formas no glucosiladas de la proteína. Por tanto, este enfoque es particularmente ventajoso para preparar conjugados y composiciones de proteínas que se producen por tecnología de ADN recombinante en células huésped procariontas (por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli*), ya que los organismos procariontas generalmente no glucosilan proteínas que expresan.

20 **[0062]** Análogamente, la PEGilación selectiva del resto de hidrato de carbono de una glucoproteína puede producir "pseudohiperoglucosilación" de la glucoproteína. Este procedimiento se describió, por ejemplo, por C. Bona y col. en la publicación PCT nº WO 96/40731. Por tanto, este enfoque es particularmente ventajoso para preparar conjugados y composiciones de proteínas que se producen por tecnología de ADN recombinante en células huésped eucariotas (por ejemplo, en levaduras, células vegetales y células animales (incluyendo células de mamífero y de insecto), ya que los organismos eucariotas generalmente glucosilan proteínas que expresan, si aquellas proteínas incluyen señales de glucosilación que se producen naturalmente o señales de glucosilación introducidas por tecnología de ADN recombinante. Tales proteínas de unión a receptor de GR pseudoglucosiladas están dentro del alcance de la presente invención.

30 **[0063]** Por tanto, la invención también engloba conjugados de polímero de proteínas de unión a receptor de "NR" que retienen actividad de unión a receptor sustancial, casi completa o esencialmente completa y proteínas de unión a receptor de "GR" pseudoglucosiladas que retienen actividad de unión a receptor sustancial, casi completa o esencialmente completa. Como se usa en el presente documento, se dice que una citocina "retiene actividad de unión a receptor sustancial, casi completa o esencialmente completa" cuando se conjuga con uno o más polímeros

35 solubles en agua según la presente invención, si la conjugación de la citocina no interfiere sustancialmente con la capacidad de la proteína para unirse a su(s) receptor(es), es decir, si la tasa y/o cantidad de unión de la proteína conjugada con respecto a su(s) receptor(es) correspondiente(s) no es inferior a aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%,

40 aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% o más, de la tasa de unión y/o cantidad de una forma sin conjugar de la proteína correspondiente. Dentro del alcance de la presente invención también están incluidos conjugados de polímero de aquellas proteínas de unión a receptor que se clasifican tanto como proteínas de unión a receptor de "NR" como de "GR". Un ejemplo de las últimas proteínas es el interferón *beta* (particularmente interferón-*beta*-1b).

[0064] En realizaciones adicionales, la invención proporciona procedimientos para la síntesis de conjugados de polímero de proteínas de unión a receptor que retienen inesperadamente alta actividad de unión a receptor con respecto a conjugados de polímero de la misma proteína de unión a receptor en los que uno o más polímeros están unidos al azar. La invención también proporciona conjugados producidos por tales procedimientos, y composiciones que comprenden uno o más de estos conjugados de la invención que pueden comprender adicionalmente uno o más componentes adicionales o reactivos, tales como una o más sales tampón, uno o más excipientes de hidrato de carbono, una o más proteínas transportadoras, una o más enzimas, uno o más detergentes, una o más moléculas de ácidos nucleicos, uno o más polímeros tales como PEG sin conjugar o polialquilenglicol. La invención también proporciona kits que comprenden los conjugados y/o composiciones de la invención.

[0065] La invención también proporciona composiciones farmacéuticas o veterinarias que comprenden los conjugados de la invención y al menos un excipiente o vehículo que es aceptable para uso farmacéutico o veterinario. La invención también proporciona conjugados para su uso en el tratamiento de o la prevención de una variedad de trastornos físicos usando composiciones tales que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más de los conjugados o composiciones de la presente invención a un animal que padece o está predispuesto a un trastorno físico o afección.

65 **[0066]** Además, la invención proporciona proteínas de unión a receptor estabilizadas y procedimientos para su

producción para su uso en cultivo celular industrial por los cuales se obtienen potencias inesperadamente altas como resultado de los efectos combinados de retención sustancial de la bioactividad y duración elevada de la acción en uso industrial. Las potencias anormalmente altas de los conjugados de la presente invención pueden reflejarse en la producción de biomasa anormalmente alta, niveles de expresión de proteínas recombinantes anormalmente altos y otras mejoras en las eficiencias del bioprocesamiento.

[0067] En realizaciones adicionales, la invención proporciona procedimientos alternativos para aumentar la potencia biológica de una preparación de interferón-beta, particularmente una preparación de interferón-beta-1b. Procedimientos según este aspecto de la invención pueden comprender, por ejemplo, eliminación de uno o más componentes inhibidores de una preparación de interferón-beta (o interferón-beta-1b). Según este aspecto de la invención, el uno o más componentes inhibidores pueden eliminarse de las preparaciones mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica del procesamiento, purificación y/o análisis de proteínas y péptidos, que incluyen uno o más procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de fase inversa, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de afinidad. Como asunto práctico, la determinación de la potencia biológica de una preparación dada de interferón-beta (es decir, si la potencia biológica es elevada, disminuida o inafectada con respecto a una disolución madre de una citocina tal como interferón-beta) puede llevarse a cabo por cualquier número de ensayos *in vitro* o *in vivo* que sea familiar para el experto habitual en la materia. Por ejemplo, un ensayo de cultivo celular que responde a interferón-beta puede usarse para determinar la potencia biológica de preparaciones de interferón-beta. Ejemplos de tales ensayos de cultivo celular adecuados incluyen ensayos antiproliferativos, ensayos antivíricos, ensayos de transducción de señales y ensayos de activación génica, ejemplos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

[0068] En realizaciones relacionadas, la invención también proporciona procedimientos para determinar la cantidad de un polímero que está unido al extremo amino de una proteína que tiene un residuo de serina del extremo N, en un conjugado de polímero-proteína sintetizado por alquilación reductora. Procedimientos según este aspecto de la invención comprenden, por ejemplo, (a) hacer reaccionar el conjugado con una cantidad suficiente de un agente de oxidación durante un tiempo suficiente para escindir el polímero del residuo de serina de la proteína; y (b) medir el aumento en la porción de proteína sin conjugar en la preparación. Proteínas adecuadas para su uso según tales procedimientos incluyen citocinas (incluyendo interferón-beta (particularmente interferón-beta-1b, que preferentemente tiene la secuencia de aminoácidos especificada en SEC ID N°: 1) y factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (Guerra, P.I. y col., (1998) Pharm Res 15:1822-1827). El agente de oxidación usado en ciertos de tales procedimientos de la invención puede ser un peryodato que incluye metaperyodato de sodio, metaperyodato de potasio, metaperyodato de litio, peryodato de calcio, peryodato de bario y ácido peryódico. Procedimientos adecuados para medir el aumento en la porción de proteína sin conjugar en la preparación incluyen cualquier variedad de procedimientos conocidos en la técnica del análisis de proteínas y péptidos que incluyen, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de fase inversa, electroforesis en gel, electroforesis capilar, ultracentrifugación, ultrafiltración, dispersión de la luz y espectroscopía de masas.

[0069] En realizaciones relacionadas adicionales, la invención proporciona procedimientos para la escisión oxidativa selectiva de un residuo de serina del extremo N de una proteína bioactiva sin oxidar residuos de aminoácidos funcionalmente esenciales de dicha proteína bioactiva. Ciertos de tales procedimientos de la invención comprenden, por ejemplo, (a) ajustar la concentración de ión hidrógeno de una disolución de la proteína bioactiva a un pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10, más preferentemente a pH de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8; (b) mezclar la disolución de proteína bioactiva con aproximadamente 0,1 moles a aproximadamente 10 moles, o más preferentemente con aproximadamente 0,5 moles a aproximadamente 5 moles, de un peryodato por mol de proteína bioactiva; y (c) incubar dicha mezcla durante al menos una hora, preferentemente a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 40°C. Proteínas adecuadas para su uso según tales procedimientos incluyen citocinas (incluyendo interferón-beta (particularmente interferón-beta-1b, que preferentemente tiene la secuencia de aminoácidos especificada en SEC ID N°: 1).

Procedimientos

[0070] Los presentes inventores han descubierto que la elección como diana de polímeros para el aminoácido del extremo amino de una proteína de unión a receptor de "NR" o en la proximidad del sitio de glucosilación de una proteína de unión a receptor de "GR" asegura que el polímero está unido en un sitio que está remoto de una o más de las regiones de unión a receptor o dominios de la proteína, minimizándose así el impedimento estérico de interacciones de receptores por las moléculas de polímero unidas. Por consiguiente, puede preservarse un mayor porcentaje de la actividad de unión a receptor conjugando proteínas según los procedimientos de la presente invención que se produciría si el polímero estuviera unido dentro de o próximo a una parte de la molécula que participa en la unión a su(s) receptor(es). Este principio, que puede producir retención de actividad de unión a receptor inesperadamente alta, puede demostrarse para proteínas de unión a receptor que están seleccionadas de entre factor de crecimiento de fibroblastos básico ("bFGF" o "FGF-2"), factor de crecimiento epidérmico ("EGF"), factor de crecimiento similar a la insulina-1 ("IGF-1"), interferón-alfa ("IFN-alfa"), interferón-beta ("IFN-beta", que incluye IFN-beta-1b), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de monocitos ("M-CSF"), ligando Flt3, factor de citoblastos ("SCF"), interleucinas 2, 3, 4, 6, 10, 12, 13 y 15,

factor de crecimiento transformante *beta* ("TGF-*beta*"), hormona de crecimiento humana ("hGH"), prolactina, hormona lactogénica placentaria, factor neurotrófico ciliar ("CNTF"), leptina y análogos estructurales de estas proteínas de unión a receptor que imitan las acciones de estas proteínas o que son antagonistas de unión a receptor de las mismas. A diferencia, no se predice que la unión selectiva de un gran polímero al extremo amino de IFN-*gamma* preserve la mayoría de la actividad de esta citocina, ya que se espera que tal acoplamiento interfiera con la unión del dímero activo a sus receptores (basándose en los datos de Walter, M.R. y col., (1995) Nature 376:230-235).

[0071] Previamente se ha desvelado la modificación del extremo amino de ciertas proteínas (véase, por ejemplo, Dixon, H.B.F., (1984) J Protein Chem 3:99-108). Por ejemplo, se ha informado que la modificación del extremo N de proteínas estabiliza ciertas proteínas contra la acción de aminopeptidasas (Guerra, P.I. y col., arriba), mejora la solubilidad de la proteína (Hinds, K., y col., (2000) Bioconjug Chem 11:195-201), reduce la carga sobre el grupo amino del extremo N o mejora la homogeneidad de los conjugados resultantes (Kinstler, O., y col. solicitud de patente europea nº EP 0 822 199 A2; Kinstler, O. y col., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:477-485), entre otros. Se ha desvelado un procedimiento alternativo para acoplar polímeros al grupo *alfa*-amino de un residuo de cisteína o histidina del extremo N por una adaptación de un procedimiento conocido en la técnica como "ligación química nativa" (Roberts, M.J. y col., publicación PCT nº WO 03/031581 A2 y publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2003/0105224 A1). Sin embargo, no se ha reconocido o descrito previamente la existencia de las subclases "NR" y "GR" de proteínas de unión a receptor, generalmente aplicable a procedimientos para seleccionar miembros de aquellas clases, y la preparación y uso de conjugados de polímero de tales proteínas de unión a receptor como una forma para preservar actividad funcional inesperadamente alta de proteínas de unión a receptor de "NR".

[0072] Por tanto, hay una ventaja para determinar si una citocina dada tiene o no un extremo N y/o sitio(s) de glucosilación que estén remotos del (de los) sitio(s) de unión a receptor del ligando. La capacidad para predecir si una citocina dada es un ligando "NR" o "GR" antes de la conjugación del ligando con un polímero disminuye sustancialmente la experimentación requerida para producir conjugados de polímero-ligando (por ejemplo, citocinas o antagonistas de las mismas conjugadas con polímeros, por ejemplo, PEG) en los que la antigenicidad e inmunogenicidad del conjugado se reduce con respecto a la antigenicidad e inmunogenicidad del ligando sin conjugar, mientras que no disminuye sustancialmente la unión a receptor y actividades fisiológicas del ligando conjugado.

[0073] Por consiguiente, en realizaciones adicionales, la presente invención proporciona procedimientos para identificar y seleccionar ligandos de proteína de unión a receptor (por ejemplo, citocinas y antagonistas de las mismas) que tienen un extremo N y/o sitio(s) de glucosilación que están remotos de los sitios de unión a receptor de los ligandos de proteína (es decir, procedimientos para identificar y seleccionar proteínas "NR" o "GR"). En ciertas de tales realizaciones de la invención, la localización óptima para la conjugación de uno o más polímeros (por ejemplo, uno o más PEG) puede determinarse usando modelado molecular, por ejemplo, viendo la estructura tridimensional de la proteína (citocina o antagonista de la misma) usando software de modelado molecular para predecir la(s) localización (localizaciones) en la(s) que uno o más polímeros pueden unirse a la proteína sin una pérdida sustancial en la actividad biológica o de unión a receptor de la proteína (véase también Schein, C.H., arriba). Se ha demostrado un enfoque análogo, por ejemplo, para la conjugación de PEG con G-CSF en un intento por mejorar su resistencia a la digestión proteolítica (véase la solicitud de EE.UU. publicada nº 2001/0016191 A1 de T.D. Osslund). Software de modelado molecular adecuado para su uso en la presente invención, tal como RASMOL (Saile y col., arriba) y otros programas usados en la generación de la base de datos de estructuras macromoleculares depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB; véase Laskowski, R.A., arriba), son muy conocidos en la técnica y serán familiares para aquellos expertos habituales en la materia. Usando tal software de modelado molecular, la estructura tridimensional de un polipéptido, por ejemplo, una citocina o antagonista de la misma, puede predecirse o determinarse con un alto grado de confianza basándose en el análisis cristalográfico de los ligandos y sus receptores. De esta forma, un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente qué ligandos son ligandos "NR" o "GR" que son adecuados para su uso según la presente invención.

[0074] Para poner en práctica la presente invención, una vía conveniente para acoplar covalentemente un polímero soluble en agua al grupo *alfa*-amino del residuo de aminoácido del extremo N de una proteína es por alquilación reductora de bases de Schiff formadas con polímeros que llevan un único grupo aldehído, por ejemplo, como se reivindica por G.P. Royer (patente de EE.UU. nº 4.002.531), pero no como se reivindica por J.M. Harris y col. (patente de EE.UU. nº 5.252.714), ya que los últimos inventores sólo reivindican polímeros derivatizados en ambos extremos con grupos aldehído, que son agentes de reticulación y, por tanto, son inadecuados para la síntesis de proteínas de unión a receptor de acción prolongada que retienen actividad de unión a receptor sustancial.

[0075] La dirección de la alquilación reductora de bases de Schiff de monoaldehídos de PEG hacia el grupo *alfa*-amino del aminoácido del extremo N de una proteína de unión a receptor y lejos de los grupos *epsilon*-amino de sus residuos de lisina puede llevarse a cabo mediante una variedad de procedimientos basándose en las divulgaciones en J.T. Edsall en los Capítulos 4 y 5 de Proteins Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions ((1943), Reinhold Publishing Corporation, Nueva York. Se espera que la constante de disociación de ácidos ("pK_a") de un grupo *alfa*-amino de un aminoácido del extremo N de un polipéptido sea inferior a 7,6, mientras que se espera que

los valores de pK_a de los grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina en polipéptidos sean aproximadamente 9,5. Edsall ((1943, arriba) estableció claramente que los aldehídos se combinarán con el grupo amino de un aminoácido "sólo sobre el lado alcalino de su punto isoeléctrico".

5 **[0076]** Por tanto, basándose en la presente divulgación e información que está fácilmente disponible en la materia, el experto habitual en la materia reconocerá que (1) la reacción selectiva de aldehídos con el grupo *alfa*-amino de una proteína se favorecerá por un intervalo de pH que sea inferior a 9,5 (aproximadamente la pK_a de los grupos *epsilon*-amino en la proteína); (2) la tasa de reacción de aldehídos con grupos *epsilon*-amino disminuirá si el pH de la reacción se reduce hacia 7,6 (aproximadamente la pK_a del grupo *alfa*-amino de la proteína); (3) la tasa de
10 reacción de aldehídos con el grupo *alfa*-amino disminuirá menos que la de los grupos *epsilon*-amino ya que el pH de la reacción se reduce hacia 7,6, y (4) la selectividad para la reacción de un aldehído con el grupo *alfa*-amino mejorará algo reduciendo el pH hacia 6,6. Como el último valor es aproximadamente una unidad de pH inferior a la pK_a del grupo *alfa*-amino y tres unidades de pH inferiores a la pK_a de los grupos *epsilon*-amino, aproximadamente el 10% de los grupos *alfa*-amino y aproximadamente el 0,1% de los grupos *epsilon*-amino estarán en su estado sin
15 protonar reactivo. Por tanto, a pH 6,6, la fracción de grupos *alfa*-amino sin protonar es 100 veces superior a la fracción de grupos *epsilon*-amino sin protonar. Por tanto, se obtendrá muy poco aumento en la selectividad reduciendo más el pH de la reacción, por ejemplo, a 5,6, cuando, teóricamente, el 1% de los grupos *alfa*-amino y el 0,01% de los grupos *epsilon*-amino estarían en su estado sin protonar reactivo. Por tanto, en ciertas realizaciones de la invención, ligandos de proteína (particularmente ligandos "NR" o "GR", que incluyen citocinas y antagonistas de
20 las mismas) se conjugan con uno o más polímeros formando una mezcla entre el (los) ligando(s) y el uno o más polímeros reactivos a un pH de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 7,6; a un pH de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 7,0; a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0; a un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0; a un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7,6; a un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7,0; o a un pH de aproximadamente 6,6. Por tanto, los presentes procedimientos se
25 diferencian significativamente de aquellos conocidos en la técnica en los que el acoplamiento de polímeros a grupos *alfa*-amino sobre residuos de aminoácidos del extremo N de ligandos se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 5 (Kinstler, O. y col., (2002) arriba; documento EP 0 822 199 A2; patentes de EE.UU. nº 5.824.784 y 5.985.265; Roberts, M.J. y col., (2002), arriba; Delgado, C. y col., publicación de solicitud de EE.UU. nº 2002/0127244 A1), mientras que el acoplamiento de polímeros a grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina en el esqueleto del polipéptido del ligando se lleva a cabo a un pH de 8,0 (Kinstler, O. y col., documento EP 0 822 199 A2; patentes de EE.UU. nº 5.824.784 y 5.985.265). De la misma forma, los presentes procedimientos también son significativamente
30 distintos de procedimientos enzimáticos que se han usado para acoplar derivados de alquilamina de poli(etilenglicol) a ciertas proteínas usando transglutaminasa, que se lleva a cabo a un pH de 7,5 (Sato, H., (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:487-504).

35 **[0077]** La reducción de las bases de Schiff resultantes con agentes reductores suaves tales como cianoborohidruro de sodio o piridina-borano (Cabacungan, J.C. y col., (1982) Anal Biochem 124:272-278) forma enlaces amina secundaria que preservan la carga positiva del grupo *alfa*-amino del extremo N de la proteína a pH fisiológico. Es más probable que tales enlaces que retienen la misma carga que la proteína nativa preserven su actividad biológica que químicas de enlace alternativas que neutralizan la carga, por ejemplo, por formación de enlaces amida (Burg, J. y col., publicación PCT nº WO 02/49673 A2; Kinstler, O. y col., solicitud de patente europea nº EP 0 822 199 A2; Kinstler, O. y col., (1996) Pharm Res, 13:996-1002; Kita, Y. y col., arriba) o enlaces uretano (Gilbert, C.W. y col., patente de EE.UU. nº 6.042.822; Grace, M. y col., (2001) J Interferon Cytokine Res 21:1103-1115; Youngster, S. y col., (2002) Curr Pharm Des 8:2139-2157).

45 **[0078]** Enfoques alternativos para el acoplamiento selectivo de polímeros a residuos de aminoácidos del extremo N son conocidos para aquellos expertos en la materia. Se incluyen procedimientos para acoplar hidrazida, hidracina, semicarbazida u otros polímeros que contienen amina a residuos de serina o treonina del extremo N que se han escindido oxidativamente a aldehídos con peryodato (Dixon, H.B.F., arriba; Geoghegan, K.F., patente de EE.UU. nº 5.362.852; Gaertner, H.F. y col., (1996) Bioconjug Chem 7:38-44; Drummond, R.J. y col., patente de EE.UU. nº 6.423.685).

Polímeros adecuados

55 **[0079]** En ciertas realizaciones de la invención se desea minimizar la formación de reticulaciones intramoleculares e intermoleculares por polímeros tales como PEG durante la reacción en la que el polímero se acopla al componente bioactivo para producir los conjugados de la invención. Esto puede llevarse a cabo usando polímeros que se activan en sólo un extremo (denominados en el presente documento "PEG monofuncionalmente activados" o "PAG monofuncionalmente activados") o preparaciones de polímero en las que el porcentaje de polímeros
60 bifuncionalmente activados (denominados en el caso de PEG lineales "dioles de PEG *bis*-activados") o multifuncionalmente activados es inferior a aproximadamente el 30%, o más preferentemente inferior a aproximadamente el 10%, o lo más preferentemente inferior a aproximadamente el 2% (peso/peso). El uso de polímeros activados que son enteramente o casi enteramente monofuncionales puede minimizar la formación de todo lo siguiente: reticulaciones intramoleculares dentro de moléculas de proteína individuales, estructuras de "mancuerna", en las que
65 una cadena de polímero conecta dos moléculas de proteína, y agregados o geles mayores.

[0080] Las formas activadas de polímeros que son adecuados para su uso en los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden incluir cualquier forma monofuncionalmente activada lineal o ramificada de polímeros que se conoce en la técnica. Por ejemplo, se incluyen aquellas con pesos moleculares (excluyendo la masa del grupo activante) en el intervalo de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa. Intervalos adecuados de pesos moleculares incluyen aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 30 kDa; aproximadamente 8 kDa a aproximadamente 14 kDa; aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 20 kDa; aproximadamente 18 kDa a aproximadamente 60 kDa; aproximadamente 18 kDa a aproximadamente 22 kDa; aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 30 kDa, aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 20 kDa o aproximadamente 30 kDa. En el caso de PEG lineales, pesos moleculares de aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 20 kDa o aproximadamente 30 kDa se corresponden con grados de polimerización (n) de aproximadamente 230, aproximadamente 450 o aproximadamente 680 unidades monoméricas de óxido de etileno, respectivamente. Debe observarse que las ventajas de acoplar proteínas terapéuticas a polímeros que tienen pesos moleculares relativamente altos (es decir, >20-30 kDa) se habían desvelado primero (Saifer, M. y col., publicación PCT n° WO 89/01033 A1, publicada el 9 de febrero de 1989), mucho antes de que se reconociera la existencia de las clases "NR" y "GR" de proteínas de unión a receptor.

[0081] En otras realizaciones de la invención, conjugados de proteínas de unión a receptor con porcentajes anormalmente altos de bioactividad retenida pueden prepararse para su uso *in vitro*, por ejemplo, en cultivo celular, acoplando polímeros monofuncionalmente activados de aproximadamente 1 kDa, aproximadamente 2 kDa o aproximadamente 5 kDa, según los procedimientos de la presente invención. Para tales aplicaciones *in vitro* puede preferirse este menor intervalo de pesos moleculares.

[0082] Opcionalmente, un polímero lineal puede tener un grupo reactivo en un extremo o en ambos extremos, creando así un "polímero reactivo". En ciertas realizaciones de la presente invención puede desearse usar el éster del derivado de N-hidroxisuccinimidilo del ácido monopropiónico de PEG, como se desvela en J.M. Harris y col., patente de EE.UU. n° 5.672.662, u otros ácidos monocarboxílicos de PEG activados con N-hidroxisuccinimida. En ciertas otras realizaciones puede desearse usar tanto los derivados de carbonato de monosuccinimidilo de PEG ("SC-PEG"), como se describen en M. Saifer y col., patentes de EE.UU. n° 5.006.333; 5.080.891; 5.283.317 y 5.468.478, como el derivado de carbonato de mono-*p*-nitrofenilo de PEG, como se desvela en S.J. Kelly y col., arriba; en L.D. Williams y col. publicación PCT n° WO 00/07629 A2, L.D. Williams y col., patente de EE.UU. n° 6.576.235 y en M.R. Sherman y col., publicación PCT n° WO 01/59078 A2. Además, pueden usarse otros tipos de grupos reactivos para sintetizar conjugados de polímeros de proteínas. Estos derivados incluyen derivados de monoaldehído de PEG (Royer, G.P., patente de EE.UU. n° 4.002.531; Harris, J.M. y col., patente de EE.UU. n° 5.252.714), derivados de monoamina, carbonato de mono-tribromofenilo, monocarbonilimidazol, carbonato de mono-triclorofenilo, carbonato de mono-trifluorofenilo, monohidrazida, monohidracina, monosemicarbazida, monocarbazato, monotiosemicarbazida, monoyodoacetamida, monomaleimida, disulfuro de mono-ortopiridilo, monooxima, mono-fenilglioxal, mono-tiazolidin-2-tiona, monotioéster, monotiol, monotriazina y monovinilsulfona de PEG. En realizaciones adicionales, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, hormonas de polipéptido y antagonistas de los mismos pueden acoplarse a uno o más polímeros como se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n° 10/669.597 en tramitación junto con la presente del mismo solicitante.

Componentes bioactivos

[0083] Como se observa anteriormente, los conjugados de la invención comprenden un PAG o POA, y particularmente una cadena de PEG, covalentemente unida a uno o más componentes bioactivos. Componentes bioactivos a los que uno o más polímeros (o cadenas de los mismos) que han unido covalentemente se denominan en el presente documento de forma muy diversa y equivalentemente "componentes bioactivos conjugados" o "componentes bioactivos modificados". Estos términos deben distinguirse en el presente documento de "componentes bioactivos sin conjugar", "componentes bioactivos iniciales" o "componentes bioactivos sin modificar", términos todos los cuales se refieren a componentes bioactivos que no tienen polímeros covalentemente unidos a los mismos. Sin embargo, debe entenderse que un componente bioactivo "sin conjugar", "sin modificar" o "inicial" puede contener otras conjugaciones o modificaciones de no polímero cuando se comparan con una molécula natural o nativa, y todavía se consideraría que son "sin conjugar", "sin modificar" o "iniciales" según la presente invención, ya que el componente bioactivo estaría "sin conjugar", "sin modificar" o "inicial" con respecto a la unión de polímeros, como es el caso para componentes bioactivos que se denominan en el presente documento "PEGilados vacíos".

[0084] El término "estabilizar" un componente bioactivo (o "procedimientos de estabilización" o "componente bioactivo estabilizado") indica que un componente bioactivo se ha estabilizado según los procedimientos de la presente invención (es decir, un componente bioactivo con el que un polímero se ha unido covalentemente según los procedimientos de la invención). Tales componentes bioactivos estabilizados presentarán ciertas características bioquímicas y biofísicas alteradas cuando se comparan con un componente bioactivo que no ha sido estabilizado (es decir, un componente bioactivo con el que un polímero no se ha unido covalentemente). Incluidos entre tales parámetros bioquímicos y biofísicos alterados, particularmente para proteínas de unión a receptor, pueden estar la susceptibilidad disminuida a degradación proteolítica y particularmente el mantenimiento de la actividad de una proteína de unión a receptor durante la incubación bajo ciertas condiciones medioambientales o experimentales

duras. En ciertas realizaciones de la invención, los parámetros bioquímicos y biofísicos alterados pueden incluir, por ejemplo, un aumento de la semivida en la circulación *in vivo*, aumento de la biodisponibilidad, aumento de la duración de la acción *in vitro*.

5 **[0085]** Cualquier proteína de unión a receptor (normalmente una citocina) que tenga actividad biológica (es decir, fisiológica, bioquímica o farmacéutica) asociada a porciones de la molécula que están remotas de su extremo amino o de un sitio de glucosilación que se produce naturalmente o introducido mutacionalmente puede usarse adecuadamente como componente inicial en la presente invención. Tales componentes bioactivos incluyen péptidos, polipéptidos, proteínas. Componentes bioactivos también incluyen fragmentos, muteínas y derivados de tales
10 péptidos, polipéptidos, proteínas, particularmente tales fragmentos, muteínas y derivados que tienen actividad biológica (es decir, fisiológica, bioquímica o farmacéutica).

[0086] Péptidos, polipéptidos y proteínas adecuadas, glucoproteínas que son útiles como componentes bioactivos en la presente invención, incluyen cualquier péptido, polipéptido o proteína, etc., que tenga uno o más de un grupo amino, grupo tiol u otro grupo disponible que esté remoto de la región de unión a receptor o regiones del
15 componente bioactivo y con el que los polímeros puedan unirse selectivamente. Tales péptidos, polipéptidos, proteínas, glucoproteínas incluyen citocinas, que pueden tener cualquiera de una variedad de estructuras (Nicola, N.A., arriba; Schein, C.H., arriba).

[0087] Por ejemplo, péptidos, polipéptidos y proteínas adecuadas de interés incluyen la clase de citocinas que tienen estructuras que comprenden factores estimulantes de colonias (subclases tanto de cadena larga como de cadena corta) (para revisión véase Schein, C.H., arriba). Una variedad de tales proteínas de cuatro haces helicoidales son adecuadas para su uso en la presente invención, que incluye interleucinas, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (subunidad p35), IL-13, IL-15 y IL-17; factores estimulantes de colonias, por ejemplo, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-
25 macrófagos (GM-CSF; Rozwarski, D.A. y col., (1996) *Proteins* 26:304-313); interferones, por ejemplo, IFN- α , IFN- β (incluyendo IFN- β -1b) e IFN consenso; factor inhibidor de leucemia (LIF); eritropoyetina (Epo); trombopoyetina (Tpo); factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF); factor de citoblastos (SCF), también conocido en la técnica como factor de Steel (Morrissey, P.J. y col., (1994) *Cell Immunol* 157:118-131; McNiece, I.K. y col., (1995) *J Leukoc Biol* 58:14-22); oncostatina M (OSM); proteína activadora de fosfolipasa (PLAP); factores neurotróficos; y miméticos de péptidos de los mismos. Aunque la prolactina y la hormona de crecimiento son hormonas clásicas que circulan ampliamente en el cuerpo, a diferencia de las citocinas, que normalmente son producidas cerca de sus células diana, la prolactina y la hormona de crecimiento pertenecen a la misma clase estructural que las citocinas con cuatro haces α -helicoidales (Nicola, N.A., arriba; Goffin, V. y col., arriba) y son dianas similarmente adecuadas
30 para el acoplamiento de polímeros y para la producción de los presentes conjugados según la presente invención.

[0088] Finalmente, aunque algunos anticuerpos funcionan como agonistas o antagonistas de unión a receptor (véase, por ejemplo, Morris, J.C. y col., (2000) *Ann Rheum Dis* 59 (Suppl I):i109-i114), tales inmunoglobulinas no son candidatas adecuadas para el acoplamiento de polímeros al extremo N dentro del alcance de la presente
40 invención, es decir, no son proteínas de unión a receptor de NR, ya que las regiones del extremo amino de tanto las cadenas ligeras como pesadas participan en el reconocimiento de antígeno.

[0089] El interferón-*beta* es de uso particular como componentes bioactivos para su uso en preparar los conjugados de polímero de la presente invención. También son de uso particular muteínas y fragmentos de tales
45 componentes bioactivos, particularmente aquellas que pueden unirse a los receptores para el polipéptido natural o intacto correspondiente, tanto si esta unión induce como si no un efecto biológico o fisiológico. En ciertas de tales realizaciones, las muteínas y fragmentos de los componentes bioactivos pueden actuar de antagonistas para los ligandos correspondientes, que reducen, reducen sustancialmente o inhiben completamente la unión de ligandos a sus receptores y/o la actividad de los ligandos sobre sus células diana, tejidos y/u organismos. También son adecuados otros antagonistas, que pueden o pueden no ser análogos estructurales, muteínas, variantes o derivados de los ligandos de interés para la preparación de los conjugados según la presente invención. Como un asunto práctico, tanto si una muteína, fragmento, variante, derivado o antagonista dado antagoniza como si no los efectos biológicos y/o fisiológicos de un ligando dado puede determinarse, sin experimentación adicional, usando ensayos para los efectos biológicos/fisiológicos del propio ligando, una variedad de los cuales que son muy conocidos en la
50 técnica y/o se describen en el presente documento.

[0090] Las estructuras (primaria, secundaria, terciaria y, si procede, cuaternaria) para estos y otros polipéptidos de interés que se usan ventajosamente según la presente invención son muy conocidas en la técnica y serán familiares para un experto habitual en la materia, particularmente en vista de las estructuras proporcionadas en el presente
60 documento y en las referencias citadas en el presente documento .

Conjugados

[0091] La presente invención proporciona conjugados estables de componentes bioactivos, particularmente de
65 citocinas, para su uso en una variedad de aplicaciones. Tales conjugados de la invención tienen varias ventajas con

respecto a aquellos previamente conocidos en la técnica, como se muestra por las siguientes comparaciones a modo de ejemplo de conjugados conocidos en la técnica:

5 **[0092]** H. Hiratani (patente europea nº EP 0 098 110 B1 y patente de EE.UU. nº 4.609.546) desvela conjugados de copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno ("PEG-PPG", un miembro de la clase general de PAG) con proteínas, que incluye interferones e interleucinas, en los que no se desvela preferencia por evitar regiones de las proteínas que participan en la unión a receptor. En estas referencias, los interferones *alfa*, *beta* y *gamma* se consideraron dianas equivalentes para el acoplamiento de PAG, a diferencia de en la presente invención en la que el interferón-*gamma* no se considera que sea una diana adecuada para el acoplamiento al extremo N debido a que el extremo amino está dentro de la región de unión a receptor de esta citocina. Además, Hiratani desvela conjugados sintetizados sólo con PAG de 1 kDa a 10 kDa, mientras que los procedimientos de la presente invención prefieren el acoplamiento de polímeros sintéticos solubles en agua con pesos moleculares que superan 10 kDa para aplicaciones terapéuticas. Análogamente, N.V. Katre ((1990) arriba) desvela que el acoplamiento de mayores números de cadenas de mPEG de 5 kDa a interleucina-2 recombinante humana aumenta las vidas de los conjugados resultantes en las circulaciones sanguíneas de ratones y conejos. Sin embargo, esta referencia no desveló o reconoció la ventaja de acoplar un número más pequeño de cadenas más largas de PEG o de acoplar una única cadena de PEG de alto peso molecular al extremo amino de IL-2.

20 **[0093]** G. Shaw (patente de EE.UU. nº 4.904.584 y publicación PCT nº WO 89/05824 A2) desvela procedimientos para inducir unión selectiva a sitio de polímeros reactivos con amina introduciendo, sustituyendo o delecionando residuos de lisina en la proteína diana, especialmente Epo, G-CSF y IL-2. Sin embargo, a diferencia de la divulgación de la presente invención, estas referencias no desvelan que los polímeros reactivos con amina puedan reaccionar con cualquier amina en la proteína diana distinta de los grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina, distinguiendo claramente estas divulgaciones de la presente invención.

25 **[0094]** D.E. Nitecki y col. (patente de EE.UU. nº 4.902.502) desvelan conjugados de IL-2 múltiplemente PEGilados que se prepararon a partir de diversos derivados de cloroformiato de PEG que tenían como intención reaccionar con los grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina. Sin embargo, a diferencia de los presentes procedimientos, esta referencia no desvela procedimiento para evitar la PEGilación de residuos de lisina en regiones de la proteína IL-2 que participa en la unión a receptor, ni ninguna conciencia de que el evitar tales sitios sea ventajoso.

30 **[0095]** N. Katre y col. (patente de EE.UU. nº 5.206.344) desvelan conjugados de PEG-IL-2 en los que PEG se acopla a los grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina, al grupo sulfhidrilo desemparejado del residuo de cisteína que se produce naturalmente en la posición 125 (contando desde el extremo amino) o al grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína que se ha introducido mutacionalmente entre los residuos primero y vigésimo del extremo amino de IL-2. Incluidas entre las muteínas que se desvelan en la patente 344 está IL-2 "des-ala-1", es decir, una muteína en la que la alanina del extremo amino está delecionada y no PEGilada. Sin embargo, a diferencia de la presente divulgación, la patente 344 no desvela ningún procedimiento para evitar el acoplamiento de PEG a residuos de aminoácidos que participan en la unión a receptores, ni ningún reconocimiento de que un enfoque tal fuera ventajoso. De acuerdo con esta idea, y a diferencia de la presente invención, el amplio intervalo de puntos de unión propuesto en la patente 344 no sugiere que el acoplamiento de PEG al extremo amino de IL-2 sea especialmente ventajoso.

45 **[0096]** S.P. Monkarsh y col. (1997) Anal Biochem 247:434-440 y S.P. Monkarsh y col., (1997) en Harris, J.M. y col., eds., Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications, pág. 207-216, American Chemical Society, Washington, D.C., desvelan que el hacer reaccionar interferón-*alfa*-2a con un exceso molar de tres veces de un PEG activado con un peso molecular de 5.300 Dalton produce once isómeros posicionales de monoPEG-interferón, correspondientes a los once residuos de lisina en interferón-*alfa*-2a. No se informó de PEG-interferón en el que el PEG se acoplara al grupo *alfa*-amino en el extremo amino del interferón. Los once isómeros de posición informados en estas referencias mostraron actividades antivíricas en cultivos celulares que oscilaron del 6% al 40% de las del interferón sin modificar y actividades antiproliferativas en cultivos celulares que oscilaron del 9% al 29% de las del interferón sin modificar. Tales resultados demuestran claramente que la PEGilación al azar de residuos de lisina puesta en práctica por estos investigadores interfirió con las funciones del interferón-*alfa*-2a mediadas por sus receptores, a diferencia de conjugados preparados por los procedimientos de la presente invención. Además, a diferencia de los conjugados de la presente invención, no hubo interferón PEGilado del extremo N en los conjugados informados en estas referencias.

60 **[0097]** O. Nishimura y col. (registro de invención legal de la patente de EE.UU. nº H1662) desvelan conjugados de interferón-*alfa*, interferón-*gamma* e IL-2 que se preparan por alquilación reductora de "aldehídos de éter metílico de polietilenglicol" activados con cianoborohidruro de sodio a pH 7,0 (para los conjugados de interferón) o pH 7,15 (para los conjugados de IL-2). Sin embargo, se informó que los conjugados preparados por tales procedimientos habían perdido hasta el 95% de la bioactividad de las proteínas sin modificar, aparentemente debido a la presencia de múltiples sitios de unión a polímero, todos los cuales se informaron que estaban sobre los grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina.

65

[0098] D.K. Pettit y col. (1997) J Biol Chem 272:2312-2318, desvelan conjugados de polímero de interleucina-15 ("IL-15"). Sin embargo, la IL-15 conjugada informada en esta referencia no sólo perdió su capacidad promotora del crecimiento de IL-2 como resultado de acoplar polímeros a residuos de lisina en regiones de la proteína que participan en unión a receptor, sino que también mostró antagonismo en vez de agonismo. Estos autores llegan a la conclusión de que la inhibición selectiva de la unión de IL-15 a uno de varios receptores de la superficie celular puede ser una consecuencia de la conjugación de polímeros y que tal inhibición puede no sólo disminuir la unión a receptor, sino que puede invertir el efecto biológico de la proteína. Evitando el acoplamiento de polímeros a porciones de la proteína de unión a receptor que participan en interacciones con sus receptores, la presente invención evita esta consecuencia no deseable del acoplamiento de polímeros.

[0099] J. Hakimi y col. (patentes de EE.UU. nº 5.792.834 y 5.834.594) desvelan conjugados de PEG ligados a uretano de proteínas que incluyen interferón-*alfa*, IL-2, interleucina-1 ("IL-1") y un antagonista del receptor de IL-1 que se prepararon según se informa con el fin de reducir la inmunogenicidad, aumentar la solubilidad y aumentar la semivida biológica de las proteínas respectivas. En estas referencias, el PEG se acopló a "diversos grupos amino libres", sin referencia a PEGilación del extremo N y, luego, sin divulgación de que los grupos *alfa*-amino del extremo N pudieran o debieran PEGilarse. Estas patentes también establecen que el conjugado desvelado en este documento "tiene al menos una parte" de la actividad biológica original de la proteína de partida, indicando así la posible pérdida de bioactividad sustancial. Este resultado estaría de acuerdo con el uso de los procedimientos de PEGilación no elegidos como diana desvelados en este documento. A diferencia de la presente invención, estas patentes no desvelan ningún intento por mejorar la retención de bioactividad de sus conjugados alterando la selectividad de los procedimientos de PEGilación desvelados en su interior.

[0100] O.B. Kinstler y col. (solicitud de patente europea nº EP 0 822 199 A2) desvelan un procedimiento para hacer reaccionar poli(etilenglicol) con el grupo *alfa*-amino del aminoácido en el extremo amino de un polipéptido, especialmente interferón consenso y G-CSF, que son dos de las proteínas fabricadas por Amgen, Inc., el cesionario de la presente solicitud de patente. Esta publicación indica que "un pH suficientemente ácido para activar selectivamente el grupo *alfa*-amino" es una característica necesaria del procedimiento desvelado. A diferencia, por la presente invención se ha descubierto que la reducción del pH *disminuye* la reactividad de grupos amino con aldehídos de PEG y que el grupo *alfa*-amino es más reactivo que cuando *no* está protonado, es decir, a un pH por encima de su pK_a. Por tanto, los presentes inventores encuentran que ningún pH es "suficientemente ácido para activar selectivamente el grupo *alfa*-amino" de ninguno de los conjugados de citocina de NR de la presente invención. Las explicaciones de la dependencia del pH de la reactividad de grupos *alfa*-amino del extremo N con aldehídos dados por J.T. Edsall (arriba) y por R.S. Larsen y col., ((2001) *Bioconjug Chem* 12:861-869) son más compatibles con la experiencia de los presentes inventores. Además, Kinstler y col. informan del uso de PEGilación del extremo N de polipéptidos para aumentar la homogeneidad de los conjugados resultantes y la protección del extremo amino de la degradación por proteinasas, pero no desvelan que la PEGilación del extremo N pueda preservar una mayor fracción de la actividad de unión a receptor de ciertas proteínas de unión a receptor (véanse, por ejemplo, publicación PCT nº WO 96/11953; patente europea nº EP 0 733 067 B1, y las patentes de EE.UU. nº 5.770.577, 5.824.784 y 5.985.265, toda de Kinstler, O.B. y col.).

[0101] La solicitud europea de Kinstler y col. (EP 0 822 199 A2) también generaliza los beneficios de la PEGilación del extremo N a todos los polipéptidos, que no ha sido la experiencia de los presentes inventores. Específicamente, como los extremos amino de las moléculas de anticuerpo se producen proximales a la región de combinación del antígeno de las proteínas del anticuerpo (Chapman, A.P. (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:531-545), la PEGilación del extremo N de anticuerpos es inesperadamente perjudicial para la bioactividad, en comparación con la PEGilación al azar de residuos de lisina, como se desvela por Larsen, R.S. y col., arriba. Similarmente, se espera que la PEGilación del extremo N de proteínas de unión a receptor que no son proteínas de unión a receptor de "NR", por ejemplo, interferón-*gamma*, sea más inhibitoria de interacciones con receptores que la PEGilación al azar de los residuos de lisina de tales proteínas de unión a receptor.

[0102] Por tanto, como se observa anteriormente, los procedimientos de la presente invención se distinguen de los desvelados por Kinstler y col. en las publicaciones citadas en el presente documento en que los conjugados de la presente invención se preparan conjugando una o más citocinas o antagonistas de las mismas que están seleccionadas como proteínas de unión a receptor de NR con uno o más polímeros formando una mezcla entre el (los) ligando(s) y el uno o más polímeros a un pH de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 7,6; a un pH de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 7,0; a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0; a un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0; a un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7,6; a un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7,0; o a un pH de aproximadamente 6,6. A diferencia, los procedimientos de Kinstler y col. se basan en la conjugación de ligandos a un pH inferior a 5,5, intervalo de pH que los presentes inventores han encontrado que es inferior al óptimo o inferior para preparar preparaciones de ligandos selectivamente conjugadas con polímeros en aminoácidos del extremo N remotos y/o en sitios de glucosilación remotos.

[0103] Pepinsky, B. y col. (publicación PCT nº WO 00/23114 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2003/0021765 A1) desvelan conjugados de polímero de interferón-*beta*-1a glucosilado que son más activos que el

interferón-*beta*-1b no glucosilado en un ensayo antivírico. Cuando Pepinsky y col. acoplaron mPEG de 5 kDa o de 20 kDa al extremo amino de IFN- β -1 por alquilación reductora, no se observó efecto de la PEGilación sobre la potencia antivírica, mientras que el acoplamiento de PEG de mayor peso molecular disminuyó o eliminó la potencia. Esta referencia también desvela que el polialquilenglicol puede acoplarse al interferón-*beta*-1a por una variedad de grupos de acoplamiento en diversos sitios, que incluyen el extremo amino, el extremo carboxilo y el resto de hidrato de carbono de la proteína glucosilada. Sin embargo, se establece que los procedimientos desvelados en esta publicación no son generalizables: "estos estudios indican que, a pesar de la conservación en la secuencia entre interferón-*beta*-1a e interferón-*beta*-1b, son entidades bioquímicas distintas y, por tanto, mucho de lo que se sabe sobre el interferón-*beta*-1b no puede aplicarse al interferón-*beta*-1a y viceversa". A diferencia, la presente invención desvela las características comunes expresadas en proteínas de unión a receptor de "NR" y "GR", como se define en el presente documento. Según la presente invención, tanto el interferón-*beta*-1a como el interferón-*beta*-1b son proteínas de unión a receptor de "NR". Además, el interferón-*beta*-1b es una de proteína de unión a receptor de "GR". Por consiguiente, a diferencia de los procedimientos del documento WO 00/23114, los procedimientos de la presente invención son útiles para preparar conjugados bioactivos estables de tanto interferón-*beta*-1b como interferón-*beta*-1a.

[0104] Z. Wei y col. (patente de EE.UU. nº 6.077.939), desvelan procedimientos para acoplar polímeros solubles en agua (especialmente PEG) al átomo de carbono *alfa* del extremo N de un polipéptido (especialmente eritropoyetina), en el que la amina en el carbono *alfa* del aminoácido del extremo N se transamina primero a un grupo *alfa*-carbonilo que luego se hace reaccionar con un derivado de PEG para formar un enlace oxima o hidrazona. Como el objetivo desvelado de esta referencia era desarrollar un procedimiento que se aplicara a proteínas en general, no se consideró la preservación de la actividad de unión a receptor que puede resultar de la elección del extremo amino como sitio de PEGilación de ciertas proteínas de unión a receptor. Por tanto, a diferencia de la divulgación de Wei y col., la presente invención no requiere la eliminación del grupo *alfa*-amino del extremo N, pero, a diferencia, puede preservar la carga del grupo *alfa*-amino del extremo N a pH neutro mediante la formación de un enlace amina secundaria entre la proteína y el polímero.

[0105] C.W. Gilbert y col. (patente de EE.UU. nº 6.042.822; patente europea nº EP 1 039 922 B1) desvelan la conveniencia de una mezcla de isómeros de posición de PEG-interferón-*alfa*-2b en la que un isómero especialmente deseable tiene PEG acoplado a un residuo de histidina de interferón-*alfa*-2b, especialmente histidina-34, y demuestran que el enlace de PEG a histidina-34 es inestable. Como la histidina-34 se encuentra sobre la superficie del interferón-*alfa*-2b en una región que debe ponerse en contacto íntimo con un receptor de interferón con el fin de desencadenar la transducción de señales, la inestabilidad del enlace entre PEG e histidina-34 desvelado en estas referencias parecer ser crítica para la función del conjugado de PEG-interferón desvelado en este documento. Los conjugados de proteína-polímero ligados a histidina sustancialmente puros se describieron por S. Lee y col., patente de EE.UU. nº 5.985.263. A diferencia, la presente invención demuestra que un conjugado preferido es un conjugado de PEG-interferón en el que el PEG está establemente ligado en un sitio que está remoto de los dominios de unión a receptor del componente de interferón.

[0106] P. Bailon y col., ((2001) Bioconjug Chem 12:195-202), desvelan que el interferón-*alfa*-2a que está PEGilado con una molécula de di-mPEG-lisina de 40 kDa por molécula de interferón comprende cuatro isómeros de posición principales. Esta referencia desvela que casi todo el PEG se unió por enlaces amida a las lisinas 31, 121, 131 ó 134, cada una de las cuales está dentro de o adyacente a los dominios de unión a receptor de interferón-*alfa*-2a (residuos 29-35 y 123-140, según Bailon y col). La PEGilación del extremo N no se informó por Bailon y col. La actividad antivírica de la mezcla aislada de isómeros de posición de PEG-interferón contra infección por el virus de la estomatitis vesicular de células de riñón bovino de Madin-Darby *in vitro* se informó que era el 7% de la del interferón-*alfa*-2a sin conjugar que se probó. Por tanto, la pérdida sustancial de bioactividad que se observó para estos conjugados de PEG-interferón que no incluyen interferón PEGilado del extremo N distingue claramente los conjugados de Bailon y col. de aquellos de la presente invención.

[0107] R.B. Pepinsky y col. ((2001) J Pharmacol Exp Ther 297:1059-1066) desvelan la síntesis de un conjugado de (1) interferón-*beta*-1a glucosilado que tiene un residuo de metionina del extremo N y (2) un aldehído de PEG de 20 kDa. El conjugado, que se denomina en la referencia como que está monoPEGilado en la metionina del extremo N, se dice que retiene la bioactividad completa en un ensayo antivírico. Aunque estos autores desvelan que su elección del sitio del extremo N para la PEGilación de interferón-*beta*-1a glucosilado fue dictada por la disponibilidad de reactivos de PEGilación selectivos para sitio y modelado molecular, reconocen que "algunos efectos son específicos para producto". Además, y a diferencia de la presente invención, las observaciones informadas en este documento no se generalizaron para incluir la clase de proteínas de unión a receptor que se definen en el presente documento como proteínas de unión a receptor de "NR".

[0108] J. Burg y col. (publicación PCT nº WO 01/02017 A2) desvelan la producción de conjugados de alcoxi-PEG de eritropoyetina, glucoproteína, en los que de una a tres cadenas de un metoxi-PEG reaccionó/reaccionaron con grupos sulfhidrilo que se introdujeron químicamente por modificación de grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina sobre la superficie de la glucoproteína. Sin embargo, a diferencia de la presente invención, esta referencia no desvela ningún intento por acoplar PEG al grupo *alfa*-amino libre del aminoácido del extremo N de eritropoyetina o

para evitar modificar residuos de lisina en regiones de la glucoproteína de eritropoyetina que son esenciales para las interacciones con receptores de eritropoyetina.

5 **[0109]** J. Burg y col. (publicación PCT nº WO 02/49673 A2) desvelan la síntesis de conjugados de PEG ligados a amida del extremo N de glucoproteínas de eritropoyetina natural y de muteína por un procedimiento que emplea extensiones de péptidos del extremo N selectivamente escindibles que se escinden antes de la PEGilación y después de la citraconilación reversible de todos los grupos *epsilon*-amino de los residuos de lisina de la glucoproteína. Los fundamentos desvelados para el procedimiento de múltiples etapas en esta referencia fue para hacer el procedimiento de PEGilación selectivo para el grupo *alfa*-amino libre del aminoácido del extremo N con el fin de producir conjugados monoPEGilados homogéneos, evitándose así la necesidad de separar conjugados monoPEGilados de derivados múltiplemente PEGilados. Este procedimiento se diferencia del de la presente invención en varios sentidos importantes, que incluyen: (1) el enfoque de Burg y col. está limitado a glucoproteínas de eritropoyetina con las que el alcoxi-PEG está ligado por enlaces amida, mientras que la presente invención es aplicable a una variedad de componentes bioactivos conjugados usando una variedad de polímeros sintéticos; (2) la presente invención se aplica a proteínas de unión a receptor de "NR" y "GR" tanto glucosiladas como sin glucosilar, mientras que Burg y col. sólo desvelan la conjugación de glucoproteínas; (3) la presente invención engloba tanto alcoxi-PEG, tales como mPEG, como hidroxil-PEG monofuncionalmente activado, mientras que Burg y col. sólo desvelan el uso de alcoxi-PEG; y (4) en la presente invención se prefieren enlaces amina secundaria entre el polímero y la proteína con respecto a los enlaces amida usados por Burg y col., ya que los primeros son más estables y conservan la carga positiva sobre el grupo amino. En un trabajo análogo del mismo grupo, J. Burg y col. (patente de EE.UU. nº 6.340.742) desvelan la producción de conjugados ligados por amida de glucoproteínas de eritropoyetina en los que una a tres cadenas de alcoxi-PEG está/están ligada(s) a uno a tres grupos amino de la proteína. Sin embargo, a diferencia de la presente invención, esta referencia no informa de preferencia por el grupo *alfa*-amino del aminoácido del extremo N o por grupos amino que no están en regiones que participan en interacciones con receptores.

30 **[0110]** C. Delgado y col. (patente de EE.UU. nº 6.384.195) desvelan conjugados de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos que se preparan usando un polímero reactivo que se representa como tresil monometoxi-PEG y se denomina en este documento "TMPEG". Esta referencia indica que cuando el TMPEG se pone en contacto con GM-CSF humano recombinante, "el material modificado contiene especies sin actividad y con mayor actividad que el material sin modificar". Como reconocerá fácilmente un experto habitual en la materia, las especies sin actividad no son deseables en una mezcla de conjugados de polímero-componente bioactivo, particularmente en composiciones para uso terapéutico que comprenden tales conjugados, ya que pueden contribuir a los riesgos de administrar el conjugado a un paciente en necesidad de tal administración sin contribuir a los efectos beneficiosos. Como se observa en el presente documento, la presente invención vence esta limitación en la materia al menos en parte evitando la modificación de GM-CSF y otras proteínas de unión a receptor en sitios sobre las proteínas que participan en su actividad de unión a receptor, reduciendo así o eliminando la síntesis de especies sin actividad. La presente invención también proporciona procedimientos para el fraccionamiento y la purificación de conjugados que tienen diferentes tamaños, diferentes cargas y/o diferentes grados de protección de cargas sobre la proteína por el polímero.

45 **[0111]** Es de notar que la patente de EE.UU. nº 6.384.195 no menciona la PEGilación del extremo N de GM-CSF y, por tanto, no reconoce las ventajas de los procedimientos de la presente invención. Finalmente, la patente de EE.UU. nº 6.384.195 indica una preferencia por conjugados en los que más de un PEG se acopla a cada molécula de GM-CSF, sin ninguna consideración de si sobre la molécula de GM-CSF aquellas moléculas de PEG están unidas o no (distinto de estar acopladas a residuos de lisina). Por tanto, estableciendo una preferencia por conjugados con hasta seis moléculas de PEG por GM-CSF, la referencia establece una preferencia por conjugados en los que PEG podría unirse a todos los posibles residuos de lisina, asegurándose así que el PEG se unirá en posiciones que impiden estéricamente la estrecha aproximación de la proteína a sus receptores de la superficie de la célula. A diferencia, la presente invención indica la falta de deseo de acoplar PEG a residuos de lisina, excepto cuando aquellos residuos de lisina estén remotos de los dominios de la proteína de unión a receptor que son esenciales para interacciones con los receptores y, por tanto, para la transducción de señales (en el caso de agonistas) o con el fin de inhibir competitivamente la transducción de señales (en el caso de antagonistas).

55 **[0112]** T. Nakamura y col. (publicación PCT nº WO 02/32957 A1) desvela que el aumento del peso molecular del PEG que está acoplado al grupo *epsilon*-amino del residuo de lisina en la posición 52 de la glucoproteína de eritropoyetina aumenta el efecto eritropoyético del conjugado *in vivo*, a la vez que disminuye la afinidad del conjugado por receptores de eritropoyetina. Sin embargo, a diferencia de la presente invención, esta referencia no desvela el acoplamiento de PEG en el extremo amino, ni reconoce ninguna ventaja de hacerlo.

60 **[0113]** Por tanto, la presente invención proporciona conjugados de componentes bioactivos acoplados a polímeros sintéticos que tienen distintas ventajas estructurales y funcionales a aquellas que se han desvelado previamente.

Composiciones

[0114] La invención proporciona conjugados o complejos que comprenden uno o más componentes bioactivos, adecuadamente una o más citocinas, acoplados a uno o más polímeros estabilizantes tales como uno o más PEG. Normalmente, tales conjugados se producen por los procedimientos de la presente invención descritos en el presente documento; sin embargo, conjugados que tienen las estructuras y actividades descritas en el presente documento, independientemente de los procedimientos usados para producir tales conjugados, se consideran equivalentes a aquellos producidos por los presentes procedimientos y, por tanto, están englobados por la presente invención. En aspectos relacionados, la invención también proporciona composiciones que comprenden uno o más de tales conjugados o complejos. Composiciones según este aspecto de la invención comprenderán uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, etc.) de los conjugados o complejos anteriormente descritos de la invención. En ciertos de tales aspectos, las composiciones pueden comprender uno o más componentes adicionales, tales como una o más sales tampón, uno o más agentes caotrópicos, uno o más detergentes, una o más proteínas (por ejemplo, albúmina o una o más enzimas), uno o más polímeros sin unir, uno o más agentes osmóticamente activos. Las composiciones de este aspecto de la invención puede estar en cualquier forma, que incluye sólida (por ejemplo, polvo seco) o disolución (particularmente en forma de una solución salina tamponada fisiológicamente compatible que comprende uno o más de los conjugados de la invención).

A. Composiciones farmacéuticas

[0115] Ciertas composiciones de la invención se formulan particularmente para su uso como composiciones farmacéuticas para su uso en aplicaciones profilácticas, de diagnóstico o terapéuticas. Tales composiciones comprenderán normalmente uno o más de los conjugados, complejos o composiciones de la invención y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un sólido no tóxico, carga semisólida o líquida, diluyente, material de encapsulamiento o auxiliar de formulación de cualquier tipo que pueda ser tolerado por un receptor animal, que incluye un ser humano u otro mamífero, en el que la composición farmacéutica se introduce sin efectos adversos resultantes de su adición.

[0116] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a un receptor por cualquier modo de administración adecuado, tal como por vía oral, rectalmente, parenteralmente, intrasistémicamente, vaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (como por polvos, pomadas, gotas o parche transdérmico), bucalmente, como un espray oral o nasal o por inhalación. El término "parenteral" como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal, intracisternal, subcutánea e intra-articular.

[0117] Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención para inyección parenteral pueden comprender disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, además de polvos estériles para reconstitución en disoluciones inyectables estériles o dispersiones antes de uso. Ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, poli(etilenglicol)), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

[0118] Tales composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, alcohol bencílico, clorobutanol, fenol, ácido sórbico. También pueden desearse incluir agentes osmóticos tales como azúcares, cloruro sódico. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como aluminio, monoestearato, hidrogeles y gelatina.

[0119] En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de los fármacos, se desea ralentizar la absorción de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede llevarse a cabo por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en fluidos corporales acuosos. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender de su forma física. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco parenteralmente administrado puede llevarse a cabo disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite.

[0120] Las formas de liberación prolongada inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. La tasa de liberación de fármaco puede controlarse dependiendo de la relación de fármaco con respecto al polímero de vehículo y de la naturaleza del polímero de vehículo particular empleado. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y

poli(anhídridos) biocompatibles. Las formulaciones inyectables de liberación prolongada también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos del cuerpo.

5 **[0121]** Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de uso.

10 **[0122]** Las formas de dosificación sólidas para administración por vía oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, los compuestos activos se mezclan con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) cargas o sustancias de relleno tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes de disgregación tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) adsorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, PEG sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes de tamponamiento.

20 **[0123]** También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blanda y rellena dura usando excipientes tales como lactosa (azúcar de la leche), además de PEG de alto peso molecular.

25 **[0124]** Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y vainas tales como recubrimientos entéricos o cronomodulantes y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente opacificantes y también puede ser de una composición tal que liberen el (los) principio(s) activo(s) solo(s) o preferencialmente en una cierta parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de incorporación de composiciones que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente mencionados.

35 **[0125]** Formas de dosificación líquidas para administración por vía oral pueden incluir emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la materia tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, trigo, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, PEG y ésteres de ácido graso de sorbitano, y mezclas de los mismos.

[0126] Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también puede incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

45 **[0127]** Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto y mezclas de los mismos.

50 **[0128]** La administración tópica incluye administración a la piel o mucosa, que incluye superficies del pulmón y ojo. Las composiciones para administración tópica, que incluyen aquellas para inhalación, pueden prepararse como un polvo seco que puede estar presurizado o no presurizado. En composiciones de polvo no presurizado, los principios activos en forma finamente dividida pueden usarse en mezcla con un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable de mayor tamaño que comprende partículas que tienen un tamaño, por ejemplo, de hasta 100 micrómetros de diámetro. Vehículos inertes adecuados incluyen azúcares tales como lactosa y sacarosa. Deseablemente, al menos el 95% en peso de las partículas del principio activo tienen un tamaño de partícula efectivo en el intervalo de 0,01 a 10 micrómetros.

60 **[0129]** Alternativamente, la composición farmacéutica puede estar presurizada y contener un gas comprimido tal como nitrógeno o un propulsor gaseoso licuado. El medio propulsor licuado y, de hecho, la composición total puede estar preferentemente de forma que los principios activos no se disuelvan en su interior a ningún grado sustancial. La composición presurizada también puede contener un agente tensioactivo. El agente tensioactivo puede ser un agente tensioactivo no iónico líquido o sólido o puede ser un agente tensioactivo aniónico sólido. Es preferible usar el agente tensioactivo aniónico sólido en forma de una sal de sodio.

65 **[0130]** Otra forma de administración tópica es al ojo. En este modo de administración, los conjugados o

composiciones de la invención se administran en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de forma que los compuestos activos se mantienen en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los compuestos penetren en el tejido conjuntivo o la córnea y regiones internas del ojo como, por ejemplo, la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/cuerpo ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una pomada, aceite vegetal o un material de encapsulamiento.

[0131] Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferentemente supositorios que pueden prepararse mezclando los conjugados o composiciones de la invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, PEG o una cera de supositorio, que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura del cuerpo y, por tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan los fármacos.

[0132] Las composiciones farmacéuticas usadas en los presentes procedimientos terapéuticos también pueden administrarse en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias de lípidos. Los liposomas están formados por cristales hidratados líquidos mono- o multi-laminares que están dispersados en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable que pueda formar liposomas. Además de uno o más de los conjugados o composiciones de la invención, las presentes composiciones farmacéuticas en forma de liposoma también pueden contener uno o más estabilizadores, conservantes, excipientes. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los procedimientos para formar liposomas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Zalipsky, S. y col., patente de EE.UU. nº 5.395.619). Los liposomas que comprenden fosfolípidos que están conjugados con PEG, el más comúnmente fosfatidiletanolamina acoplado a monometoxi-PEG, tienen propiedades ventajosas, que incluyen vidas prolongadas en la circulación sanguínea de mamíferos (Fisher, D., patente de EE.UU. nº 6.132.763).

B. Usos

[0133] Como se observa en cualquier parte en el presente documento, los procedimientos, conjugados y composiciones de la presente invención se usan ventajosamente en procedimientos para mantener o potenciar la bioactividad de los componentes biológicos sin interferir con la capacidad de los componentes biológicos para unirse a sus receptores. Ciertos de tales procedimientos de la invención pueden implicar la administración de uno o más de los conjugados y composiciones a células, tejidos, órganos u organismos. En particular, la invención proporciona la liberación controlada de uno o más componentes de los conjugados, complejos o composiciones a células, tejidos, órganos u organismos, proveyendo así al usuario de la capacidad para regular, temporalmente y espacialmente, la cantidad de un componente particular que es liberado para actividad sobre las células, tejidos, órganos u organismos.

[0134] En general, tales procedimientos de la invención implican una o más actividades. Por ejemplo, un procedimiento tal de la invención comprende: (a) preparar uno o más conjugados o composiciones de la invención como se detalla en el presente documento; y (b) poner en contacto una o más células, tejidos, órganos u organismos con el uno o más conjugados o composiciones, en condiciones que favorezcan la unión del uno o más conjugados o composiciones de la invención con las células, tejidos, órganos u organismos. Una vez los componentes bioactivos de los conjugados y/o composiciones de la invención han sido unidos por (o, en algunos casos, internalizado por) las células, tejidos, órganos u organismos, los componentes se dirigen a llevar a cabo sus funciones biológicas previstas. Por ejemplo, los componentes de péptidos pueden unirse a receptores u otros componentes sobre o dentro de las células, tejidos, órganos u organismos; participar en reacciones metabólicas dentro de las células, tejidos, órganos u organismos; llevar a cabo, regular por incremento o activar, o regular por disminución o inhibir, una o más actividades enzimáticas dentro de las células, tejidos, órganos u organismos; proporcionar un componente estructural ausente a las células, tejidos, órganos u organismos; proporcionar una o más necesidades nutricionales a las células, tejidos, órganos u organismos; inhibir, tratar, invertir o de otro modo mejorar uno o más procedimientos o síntomas de una enfermedad o trastorno físico.

[0135] En realizaciones adicionales, los conjugados y composiciones de la invención pueden usarse en cultivo celular industrial, debido a las potencias inesperadamente altas de los componentes bioactivos de los conjugados que se obtienen como resultado de los efectos combinados de retención sustancial de su bioactividad y aumento de la duración de la acción incluso en las condiciones de uso industrial. Estas potencias inesperadamente altas de los presentes conjugados pueden conducir a producción de biomasa anormalmente alta, niveles anormalmente altos de expresión de proteínas recombinantes y otras mejoras en las eficiencias del bioprocesamiento.

C. Pautas de dosis

[0136] Los conjugados, complejos o composiciones de la invención pueden administrarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* a células, tejidos, órganos u organismos para administrar a los mismos uno o más componentes bioactivos (es decir, una o más citocinas o antagonistas de las mismas). Un experto habitual apreciará qué cantidades eficaces de un

compuesto activo, conjugado, complejo o composición dada pueden determinarse empíricamente y pueden emplearse en forma pura o, si tales formas existen, en formulación farmacéuticamente aceptable o forma de profármaco. Los compuestos, conjugados, complejos o composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente animal (incluyendo un mamífero, tal como un ser humano) en necesidad del mismo como composiciones veterinarias o farmacéuticas en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el tipo y el grado de la respuesta celular que va a lograrse; la identidad y/o actividad del (de los) compuesto(s), conjugado(s), complejo(s) o composición (composiciones) específicas empleadas; la edad, peso corporal o área superficial, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del (de los) compuesto(s) activo(s); la duración del tratamiento; otros fármacos usados en combinación o coincidentes con el (los) compuesto(s), conjugado(s), complejo(s) o composición (composiciones) específicas; y factores similares que son muy conocidos para aquellos expertos habituales en las ciencias farmacéuticas y médicas. Por ejemplo, está perfectamente dentro de la experiencia habitual de la materia empezar con dosis de un compuesto, conjugado, complejo o composición dada de la invención a niveles inferiores a aquellos requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente las dosificaciones hasta que se logre el efecto deseado.

[0137] Las pautas de dosis también pueden disponerse de un modo específico para el paciente para proporcionar una concentración predeterminada de un compuesto activo dado en la sangre, como se ha determinado por técnicas aceptadas y rutinarias en la materia, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, de intercambio iónico o líquida de alta resolución ("HPLC") de fase inversa, bioensayos o inmunoensayos. Por tanto, las pautas de dosis de pacientes pueden ajustarse para lograr niveles en sangre relativamente constantes como se mide por HPLC o inmunoensayos, según procedimientos que son rutinarios y familiares para aquellos expertos habituales en las ciencias médicas, farmacéuticas y/o farmacológicas.

D. Usos de diagnóstico y terapéuticos

[0138] Un uso de diagnóstico de un conjugado de la invención podría ser para localizar células o tejidos que tienen capacidad de unión anormalmente alta por la citocina, por ejemplo, un cáncer, dentro del cuerpo de un animal, especialmente un ser humano, por administración de un conjugado o composición de la invención, en el que el conjugado (o uno o más componentes, es decir, el componente bioactivo y/o el polímero sintético) está marcado o comprende una o más marcas detectables de forma que se permita la detección, por ejemplo, por detección óptica, radiométrica, fluorescente o resonante según procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mayoría de los cánceres de pulmón de células no pequeñas expresan concentración anormalmente altas de receptores para factor de crecimiento epidérmico (Bunn, P.A. y col., (2002) Semin Oncol 29(Suppl 14):38-44). Por tanto, en otro aspecto de la invención, los conjugados y composiciones de la invención pueden usarse en procedimientos de diagnóstico o terapéuticos, por ejemplo, en diagnosticar, tratar o prevenir una variedad de trastornos físicos en un animal, particularmente un mamífero, tal como un ser humano, predispuesto a o que padece un trastorno tal. En tales enfoques, el objetivo de la terapia es retardar o prevenir el desarrollo del trastorno, y/o curar, inducir una remisión o mantener una remisión del trastorno, y/o reducir o minimizar los efectos secundarios de otras pautas terapéuticas.

[0139] Por tanto, los conjugados, complejos y composiciones de la presente invención pueden usarse para la protección, supresión o tratamiento de trastornos físicos tales como infecciones o enfermedades. El término "protección" de un trastorno físico, como se usa en el presente documento, engloba "prevención", "supresión" y "tratamiento". "Prevención" implica la administración de un complejo o composición de la invención antes de la inducción de la enfermedad o trastorno físico, mientras que "supresión" implica la administración del conjugado o composición antes de la aparición clínica de la enfermedad; por tanto, la "prevención" y la "supresión" de un trastorno físico normalmente se realizan en un animal que está predispuesto a o es susceptible al trastorno, pero que todavía no está sufriendo. Sin embargo, el "tratamiento" de un trastorno físico implica la administración del conjugado o composición terapéutica de la invención después de la aparición de la enfermedad. Se entenderá que en la medicina y la veterinaria no siempre es posible distinguir entre "prevenir" y "suprimir" un trastorno físico. En muchos casos, el acontecimiento o acontecimientos inductores finales pueden ser desconocidos o latentes, y ni el paciente ni el médico pueden darse cuenta del acontecimiento inductor hasta bien después de su manifestación. Por tanto, es común usar el término "profilaxis", como distinto de "tratamiento", para englobar tanto "prevenir" como "suprimir" como se define en el presente documento. Por tanto, el término "protección", usada según los procedimientos de la presente invención, pretende incluir la "profilaxis". Los procedimientos según este aspecto de la invención pueden comprender una o más etapas que permiten que el profesional clínico logre los objetivos terapéuticos anteriormente descritos. Un procedimiento tal de la invención puede comprender, por ejemplo: (a) identificar un animal (preferentemente un mamífero, tal como un ser humano) que padece o está predispuesto a un trastorno físico; y (b) administrar al animal una cantidad eficaz de uno o más de los conjugados, complejos o composiciones de la presente invención como se describen en el presente documento, de forma que la administración del conjugado, complejo o composición prevenga, retarde o diagnostique el desarrollo del, o cure o induzca la remisión del, trastorno físico en el animal.

[0140] Como se usa en el presente documento, un animal que está "predispuesto a" un trastorno físico se define

como un animal que no presenta una pluralidad de síntomas físicos manifiestos del trastorno, pero que está genéticamente, fisiológicamente o de otro modo en riesgo de desarrollar el trastorno. En los presentes procedimientos, la identificación de un animal (tal como un mamífero, que incluye un ser humano) que está predispuesto a, en riesgo de o que padece un trastorno físico dado puede llevarse a cabo según procedimientos conocidos en la técnica convencionales que serán familiares para el profesional clínico habitual, que incluyen, por ejemplo, ensayos radiológicos, ensayos bioquímicos (por ejemplo, ensayos de los niveles relativos de péptidos, proteínas, electrolitos particulares, etc., en una muestra obtenida de un animal), procedimientos quirúrgicos, cribado genético, historia familiar, palpación física, pruebas patológicas o histológicas (por ejemplo, evaluación microscópica de muestras de tejido o fluido corporal o frotis, ensayos inmunológicos, etc.), prueba de fluidos corporales (por ejemplo, sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, semen), obtención de imágenes (por ejemplo, radiológicas, fluorescentes, ópticas, resonantes (por ejemplo, usando resonancia magnética nuclear ("RMN") o resonancia de espín electrónico ("ESR")), etc. Una vez un animal se ha identificado por uno o más de tales procedimientos, el animal puede tratarse agresivamente y/o proactivamente para prevenir, suprimir, retardar o curar el trastorno físico.

[0141] Trastornos físicos que pueden prevenirse, diagnosticarse o tratarse con los conjugados, complejos, composiciones de la presente invención incluyen cualquier trastorno físico para el que el componente bioactivo (normalmente, la citocina o antagonista de la misma) de los conjugados o composiciones pueda usarse en la prevención, diagnóstico o tratamiento. Tales trastornos incluyen una variedad de cánceres (por ejemplo, cánceres de mama, cánceres uterinos, cánceres de ovario, cánceres de próstata, cánceres testiculares, leucemias, linfomas, cánceres de pulmón, cánceres neurológicos, cánceres de piel, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de hueso, cánceres de colon y otros gastrointestinales, cáncer pancreáticos, cánceres de vejiga, cánceres de riñón y otros carcinomas, sarcomas, adenomas y mielomas); enfermedades iatrogénicas; enfermedades infecciosas (por ejemplo, enfermedades bacterianas, enfermedades fúngicas, enfermedades víricas (incluyendo hepatitis, enfermedades producidas por virus cardiotrópicos, VIH/SIDA), enfermedades parasitarias); trastornos genéticos (por ejemplo, fibrosis quística, esclerosis lateral amiotrófica, distrofia muscular, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Pompe, trastorno de inmunodeficiencia combinada grave, enanismo), anemia, neutropenia, trombocitopenia, hemofilia y otros trastornos de la sangre; trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, esclerosis múltiple ("EM", que incluye EM recurrente-remitente, EM progresiva primaria, EM progresiva secundaria), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer); trastornos enzimáticos (por ejemplo, gota, uremia, hipercolesterolemia); trastornos de etiología incierta o multifocal (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, hipertensión, enfermedad inflamatoria del intestino); trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, psoriasis) y otros trastornos de importancia médica que serán fácilmente familiares para el experto. Los conjugados, complejos, composiciones y procedimientos de la presente invención también pueden usarse en la prevención de la progresión de la enfermedad, tal como en la quimioprevención de la progresión de una lesión premaligna a una lesión maligna.

[0142] Uno o más conjugados, complejos o composiciones de la invención, o una o más de las composiciones farmacéuticas de la invención, pueden administrarse a un animal en necesidad del mismo mediante una variedad de vías de administración, que incluyen por vía oral, rectalmente, parenteralmente (incluyendo inyección e infusión intravenosamente, intra-arterialmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intracisternalmente, subcutáneamente e intra-articular), intrasistémicamente, vaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (como por polvos, pomadas, gotas o parche transdérmico), bucalmente, como un spray oral o nasal o por inhalación. Por la invención, una cantidad eficaz de los conjugados, complejos o composiciones puede administrarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* a células o a animales que padecen o están predispuestos a un trastorno particular, previniéndose, retardándose, diagnosticándose o tratándose así el trastorno en el animal. Como se usa en el presente documento, "una cantidad eficaz de un conjugado (o complejo o composición)" se refiere a una cantidad de forma que el conjugado (o complejo o composición) lleve a cabo la actividad biológica del componente bioactivo (es decir, la citocina o antagonista de la misma) del conjugado, complejo o composición, previniéndose, retardándose, diagnosticándose, tratándose o curándose así el trastorno físico en el animal al que se ha administrado el conjugado, complejo o composición de la invención. Un experto habitual apreciará qué cantidades eficaces de los conjugados, complejos o composiciones de la invención pueden determinarse empíricamente, según procedimientos convencionales muy conocidos para aquellos expertos habituales en las ciencias farmacéuticas y médicas; véanse, por ejemplo, Beers, M.H. y col., eds. (1999) Merck Manual of Diagnosis & Therapy, 17ª edición, Merck y Co., Rahway, NJ; Hardman, J.G. y col., eds. (2001) Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª edición, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York; Speight, T.M. y col., eds. (1997) Avery's Drug Treatment, 4ª edición, Adis International, Auckland, Nueva Zelanda; Katzung, B.G. (2000) Basic & Clinical Pharmacology, 8ª edición, Lange Medical Books/McGraw-Hill, Nueva York.

[0143] Se entenderá que, cuando se administra a un paciente humano, la dosificación diaria, semanal o mensual total de los conjugados, complejos y composiciones de la presente invención será decidida por el médico adjunto dentro del alcance del criterio médico sensato. Por ejemplo, se obtienen resultados satisfactorios por administración de ciertos de los conjugados, complejos o composiciones de la invención a dosificaciones apropiadas dependiendo del compuesto bioactivo específico usado, dosificaciones que serán fácilmente familiares para el experto o que pueden determinarse fácilmente empíricamente usando sólo experimentación rutinaria. Según este aspecto de la invención, los conjugados, complejos o composiciones pueden administrarse una vez o, en dosis divididas, por

ejemplo, una vez o dos veces por día, o una vez o dos veces por semana, o una vez o dos veces por mes, etc. También pueden determinarse fácilmente empíricamente pautas de dosis apropiadas para diversos modos de administración (por ejemplo, parenteral, subcutánea, intramuscular, intraocular, intranasal, etc.) usando sólo experimentación rutinaria, o serán rápidamente evidentes para el experto habitual en la materia dependiendo de la identidad del componente bioactivo (es decir, la citocina o antagonista de la misma) del conjugado, complejo o composición.

[0144] En aplicaciones adicionales, los conjugados, complejos y composiciones de la invención pueden usarse para elegir específicamente como diana un agente de diagnóstico o terapéutico para una célula, tejido, órgano u organismo que expresa un receptor para, se une, incorpora o de otro modo capta, el componente bioactivo (es decir, la citocina o antagonista de la misma) del conjugado, complejo o composición. Procedimientos según este aspecto pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto la célula, tejido, órgano u organismo con uno o más conjugados, complejos o composiciones de la invención, que adicionalmente comprenden uno o más agentes de diagnóstico o terapéuticos, de forma que el conjugado, complejo o composición esté unido a o sea captado por la célula, tejido, órgano u organismo, administrándose así el agente de diagnóstico o terapéutico a la célula, tejido, órgano u organismo. El agente de diagnóstico o terapéutico usado puede ser al menos un agente seleccionado de un ácido nucleico, un compuesto orgánico, una proteína o péptido, un anticuerpo, una enzima, una glucoproteína, una lipoproteína, un elemento, un lípido, un sacárido, un isótopo, un hidrato de carbono, un agente de obtención de imágenes, una sonda detectable, o cualquier combinación de los mismos, que pueda estar detectablemente marcado como se describe en el presente documento. Un agente terapéutico de la presente invención puede tener un efecto terapéutico sobre la célula diana (o tejido, órgano u organismo), seleccionándose el efecto de corregir un gen o proteína defectuoso, una acción de fármaco, un efecto tóxico, un efecto estimulante del crecimiento, un efecto inhibidor del crecimiento, un efecto metabólico, un efecto catabólico, un efecto anabólico, un efecto antivírico, un efecto antifúngico, un efecto antibacteriano, un efecto hormonal, un efecto neurohumoral, un efecto estimulante de la diferenciación de células, un efecto inhibidor de la diferenciación de células, un efecto neuromodulador, un efecto antineoplásico, un efecto antitumoral, un efecto estimulante o inhibidor de la insulina, un efecto estimulante de la médula ósea, un efecto estimulante de citoblastos pluripotentes, un efecto estimulante del sistema inmunitario, y cualquier otro efecto terapéutico conocido que pueda proporcionarse por un agente terapéutico administrado a una célula (o tejido, órgano u organismo) por un sistema de administración según este aspecto de la presente invención.

[0145] Tales agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse de compuestos conocidos y nuevos y composiciones que incluyen antibióticos, esteroides, agentes citotóxicos, fármacos vasoactivos, anticuerpos y otros agentes terapéuticos. Ejemplos de tales agentes incluyen antibióticos y otros fármacos usados en el tratamiento de choque bacteriano tal como gentamicina, tobramicina, nafcilina, cefalosporinas parenterales, etc.; corticosteroides suprarrenales y análogos de los mismos tales como dexametasona, mitigar la lesión celular producida por endotoxinas; fármacos vasoactivos tales como un agente bloqueante de receptores *alfa*-adrenérgicos (por ejemplo, fenoxibenzamina), un agonista de receptores *beta*-adrenérgicos (por ejemplo, isoproterenol) y dopamina.

[0146] Los conjugados, complejos y composiciones de la invención también pueden usarse para diagnosticar enfermedad y para monitorizar respuesta terapéutica. En ciertos de tales procedimientos, los conjugados, complejos o composiciones de la invención pueden comprender una o más marcas detectables (tal como aquellas descritas en cualquier parte en el presente documento). En tales procedimientos específicos, estos conjugados, complejos o composiciones detectablemente marcados de la invención pueden usarse para detectar células, tejidos, órganos u organismos que expresan receptores, o captan de otro modo, el componente bioactivo (es decir, citocina o antagonista de la misma) de los conjugados, complejos o composiciones. En un ejemplo de un procedimiento tal, la célula, tejido, órgano u organismo se pone en contacto con uno o más de los conjugados, complejos o composiciones de la invención en condiciones que favorecen la unión o captación del conjugado por la célula, tejido u organismo (por ejemplo, por unión del conjugado a un receptor de la superficie de la célula o por pinocitosis o difusión del conjugado en la célula), y luego detectando el conjugado unido a o incorporado en la célula usando medios de detección específicos para la marca usada (por ejemplo, detección por fluorescencia para conjugados fluorescentemente marcados; obtención de imágenes de resonancia magnética para conjugados magnéticamente marcados; obtención de imágenes radiomarcadas para conjugados radiomarcados; etc.). Otros usos de tales conjugados detectablemente marcados pueden incluir, por ejemplo, obtención de imágenes de una célula, tejido, órgano u organismo, o la estructura interna de un animal (incluyendo un ser humano), administrando una cantidad eficaz de una forma marcada de uno o más de los conjugados de la invención y midiendo la radiación detectable asociada a la célula, tejido, órgano u organismo (o animal). Procedimientos de detectar diversos tipos de marcas y sus usos en la obtención de imágenes de diagnóstico y terapéuticas son muy conocidos para el experto, y se describen en cualquier parte en el presente documento.

[0147] En otro aspecto, los conjugados y composiciones de la invención pueden usarse en procedimientos para modular la concentración o actividad de un receptor específico para el componente bioactivo del conjugado sobre la superficie de una célula que expresa un receptor tal. Por "modular" la actividad de un receptor dado se indica que el conjugado, tras la unión al receptor, tanto activa como inhibe la actividad fisiológica (por ejemplo, la cascada de señalización intracelular) mediada por ese receptor. Aunque no se pretende quedar ligado a explicación mecánica alguna particular para la actividad reguladora de los conjugados de la presente invención, tales conjugados pueden

antagonizar la actividad fisiológica de un receptor celular por unión al receptor mediante el componente bioactivo del conjugado, bloqueándose así la unión del agonista natural (por ejemplo, el componente bioactivo sin conjugado) y previniéndose la activación del receptor por el agonista natural, aunque no se induzca una activación sustancial de la actividad fisiológica del propio receptor. Los procedimientos según este aspecto de la invención pueden comprender una o más etapas, por ejemplo, poner en contacto la célula (que puede hacerse *in vitro* o *in vivo*) con uno o más de los conjugados de la invención en condiciones de forma que el conjugado (es decir, la porción del componente bioactivo del conjugado) se una a un receptor para el componente bioactivo sobre la superficie celular, pero no active sustancialmente el receptor. Tales procedimientos serán útiles en una variedad de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, como el experto apreciará fácilmente.

Kits

[0148] La invención también proporciona kits que comprenden los conjugados y/o composiciones de la invención. Tales kits normalmente comprenden un soporte, tal como una caja, cartón, tubo o similares, que tiene en confinamiento cerrado en su interior uno o más recipientes, tales como viales, tubos, ampollas, botellas, jeringuillas y similares, en el que un primer recipiente contiene uno o más de los conjugados y/o composiciones de la presente invención. Los kits englobados por este aspecto de la presente invención pueden comprender adicionalmente uno o más componentes adicionales (por ejemplo, reactivos y compuestos) necesarios para llevar a cabo una o más aplicaciones particulares de los conjugados y composiciones de la presente invención, tal como uno o más componentes útiles para el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno físico particular (por ejemplo, uno o más compuestos terapéuticos o composiciones adicionales, uno o más reactivos de diagnóstico, uno o más vehículos o excipientes, y similares), uno o más conjugados o composiciones adicionales de la invención, y similares.

[0149] Será rápidamente evidente para un experto habitual en las ciencias relevantes que pueden hacerse otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a los procedimientos y aplicaciones descritas en el presente documento sin apartarse del alcance de la invención o cualquier realización de la misma. Habiendo ahora descrito la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que están incluidos en la presente sólo para los fines de ilustración.

Ejemplos

[0150] La Figura 1 muestra residuos de lisina distribuidos por todas las regiones del sitio de unión 1 y el sitio de unión 2 de interferón- β , mientras que el extremo amino de la cadena de polipéptidos está alejada de las regiones de unión a receptor de la proteína, demostrando que IFN- β es una citocina de NR.

[0151] Estos ejemplos, especialmente como se ilustran gráficamente por la Figura 1, proporcionan una base fácilmente visualizada para el entendimiento de la posible función del impedimento estérico de interacciones proteína-receptor por PEGilación de proteínas de unión a receptor dentro de o adyacentes a dominios de unión a receptor de estos componentes bioactivos. El gran volumen que es ocupado por las cadenas de PEG altamente extendidas y flexibles también impediría estéricamente la asociación de monómeros de ciertas proteínas de unión a receptor en homodímeros u homotrímeros funcionales, si los PEG se acoplaran en regiones que se informan que son requeridas para las interacciones entre los monómeros. Por tanto, la elección como diana de PEGilación para sitios que están remotos de regiones de unión a receptor de proteínas de unión a receptor disminuye la probabilidad de que la PEGilación interfiera con las interacciones intermoleculares que se requieren para su función. Procesando según el procedimiento de la presente invención pueden realizarse más de los beneficios que son esperados de la PEGilación de proteínas de unión a receptor. Los conjugados resultantes combinan los beneficios esperados de solubilidad mejorada, aumento de la biodisponibilidad, mayor estabilidad y disminución de la inmunogenicidad con una retención inesperadamente alta de la bioactividad.

Ejemplo 1: PEGilación de interferón- β -1b por alquilación reductora

[0152] En una serie de realizaciones, los conjugados de interferón- β -1b ("IFN- β -1b;" SEC ID N°: 1) con monometoxi-PEG ("mPEG") se sintetizaron por alquilación reductora con aldehído de mPEG de 20 kDa o 30 kDa usando el complejo de borano-piridina como agente reductor (Cabacungan, J.C. y col., arriba). El interferón- β -1b, libre de proteínas transportadoras y a una concentración de aproximadamente 1,9 mg/ml en una disolución que contenía aproximadamente 3 mg/ml de SDS, se obtuvo de Chiron Corporation (Emeryville, CA). Esta proteína se denomina "BETASERON®" en la formulación que es comercializada por Berlex Laboratories, una filial de EE.UU. de Schering AG, y como "BETA FERON®" en la formulación que es comercializada directamente por Schering. El complejo de borano-piridina (Aldrich 17,975-2, Milwaukee, WI) se diluyó a borano 450 mM en 60% (v/v) de acetonitrilo acuoso. Se disolvió *n*-propionaldehído de mPEG de 20 kDa ("aldehído de PEG;" NOF Corporation, Tokio) en HCl 1 mM a una concentración de 30 mg/ml. Después de la disolución, 0,1 ml de la disolución de PEG-aldehído se añadieron a 0,7 ml de la disolución de IFN- β -1b y se mezclaron. La adición de 0,05 ml de tampón acetato 100 mM, pH 4,6, dio la mezcla de reacción a pH final de 5. A otra mezcla de reacción que contenía 0,1 ml de disolución de aldehído de PEG y 0,7 ml de disolución de IFN- β -1b se añadieron 0,05 ml de una mezcla de ácido acético 200

mM, Na₂HPO₄ 200 mM y NaOH 68 mM dando un pH final de 6,4. A tres alícuotas de 0,85 ml de cada una de estas mezclas se añadieron 0,1 ml de tanto agua, NaCl 1,5 M como 10 mg/ml de SDS. Entonces, el complejo de borano-piridina diluido se añadió a cada mezcla de reacción dando una concentración final de borano 23 mM. Cada una de las mezclas de reacción resultantes se dividió en dos tubos que se incubaron durante 2 días tanto a 4°C como a temperatura ambiente. Las alícuotas de las mezclas de reacción se analizaron por HPLC de exclusión por tamaño en Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,3, que contenía 0,3 mg/ml de SDS, a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min sobre una columna Superose™ 12 (Amersham Biosciences HR 10/30; Piscataway, NJ). La absorbancia del eluato se monitorizó a 214 nm. Con un relación de entrada de aproximadamente 2 moles de PEG por mol de proteína, la especie predominante fue interferón-β-1b monoPEGilado (PEG₁-IFN-β-1b). El rendimiento de PEG₁-IFN-β-1b estuvo entre el 65% y el 72% bajo todas las condiciones de incubación probadas (a pH 5 o pH 6,4; a 4°C o temperatura ambiente; en presencia o ausencia de NaCl o SDS adicional).

[0153] En otros experimentos se usó NaBH₃CN como agente reductor y las muestras se analizaron por HPLC de exclusión por tamaño sobre una columna Superdex 200 HR 30/10 (Amersham Biosciences) en acetato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 4,6, que contenía 1 mg/ml de SDS, a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Los resultados de un experimento tal se muestran en la Figura 2. Las concentraciones de entrada del mPEG de 20 kDa fueron aproximadamente 0,1 mM, 0,2 mM y 0,4 mM (designadas "1x", "2x" y "4x" en la Figura 2, respectivamente) y las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 3 días. La muestra de control (*trazado inferior*) se incubó con sólo el agente reductor. Cuando las mismas muestras se purificaron por cromatografía bajo las mismas condiciones, excepto para la omisión de SDS del tampón de elución, el IFN-β-1b sin PEGilar no se detectó en el eluato. Se obtuvieron resultados similares cuando el n-propionaldehído de mPEG de 30 kDa se substituyó con n-propionaldehído de mPEG de 20 kDa en los procedimientos de este Ejemplo 1. También se obtuvieron resultados similares cuando el n-propionaldehído de mPEG de 10 kDa se substituyó con n-propionaldehído de mPEG de 20 kDa. Alternativamente pueden emplearse los acetaldehídos o butiraldehídos de mPEG. La PEGilación del extremo N selectiva de IFN-β mediante el procedimiento de este ejemplo produce conjugados de potenciada bioactividad si el aminoácido del extremo N es serina, como en IFN-β-1b, metionina, como en IFN-β-1 a, u otro aminoácido.

Ejemplo 2: Determinación del grado de PEGilación del extremo N por escisión oxidativa

[0154] La fracción de PEG acoplado al grupo *alfa*-amino del residuo de serina del extremo N de una proteína, en vez de los grupos *epsilon*-amino de residuos de lisina accesibles, se evaluó por un novedoso procedimiento que implicaba la escisión oxidativa del residuo de serina alquilado. Una mezcla de reacción en la que PEG₁-IFN-β-1b fue la especie predominante (aproximadamente el 70% de la proteína total) se dializó contra 1 mg/ml de SDS en tampón acetato, pH 4,6. Entonces, el pH se ajustó a 7,4 mediante la adición de Na₃PO₄ 10 mM. Se incubaron porciones de esta disolución a 4°C durante hasta 20 horas en ausencia de peryodato de sodio o con concentraciones finales de NaIO₄ 0,1 a 10 mM. Tras la incubación, las mezclas de reacción se purificaron por cromatografía sobre una columna Superose™ 6 en tampón acetato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 4,6, que contenía 1 mg/ml de SDS. Se obtuvieron resultados similares con respecto a la recuperación de IFN-β-1b monoPEGilado sobre una columna Superose 12, con la ventaja de que la columna Superose 12 permitió la redisolución del IFN-β-1b sin modificar del "pico de sal". Una gráfica de las áreas bajo los picos de absorbancia a 214 nm correspondientes a PEG₁-IFN-β-1b frente a concentración de peryodato mostró una brusca disminución en el área de peryodato hasta aproximadamente 1 mM y un nivel casi constante de PEG₁-IFN-β-1b residual de peryodato entre aproximadamente 1 mM y 10 mM. Análisis similares después del tratamiento con peryodato ≥3 mM durante 0,2, 2 ó 7 horas indicaron que la escisión oxidativa del PEG ligado a serina fue sustancialmente completa en el plazo de 2 horas. Los conjugados de PEG residuales sólo contuvieron PEG ligado a serina, enlace que fue estable al tratamiento con peryodato hasta al menos 10 mM. La fracción de los conjugados que sobrevivió a la oxidación con peryodato fue similar a la fracción estimada por degradación de Edman que estaba PEGilada en sitios distintos del extremo amino. Se obtienen resultados similares cuando la distribución de conjugados que son estables o inestables a los procedimientos oxidativos descritos en este ejemplo se evalúa por una variedad de procedimientos analíticos que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de fase inversa, electroforesis capilar, electroforesis en gel, ultracentrifugación, espectroscopía de masas, dispersión de la luz o ultrafiltración.

[0155] Se acopló interferón-β-1b a aldehído de PEG de 20 kDa con el complejo de borano-piridina como agente reductor bajo diversas condiciones, como se describen en Ejemplo 1. El IFN-β-1b monoPEGilado se purificó por cromatografía sobre una columna Superose 12 en tampón fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía 0,3 mg/ml de SDS, a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Las porciones de los conjugados PEG₁-IFN-β-1b purificados se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en ausencia o presencia de peryodato de sodio 3 mM. La Figura 3 muestra cromatogramas de las muestras sin tratar y escindidas oxidativamente de PEG₁-IFN-β-1b sobre una columna Superose 12 en Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,3, que contenía 0,3 mg/ml de SDS, ejecutados a 0,5 ml/min. Estos datos indican que aproximadamente el 90% del PEG en PEG₁-IFN-β-1b sintetizado a pH 6,4 se acopló a la serina del extremo N. Este resultado no se alteró significativamente realizando el acoplamiento después de la adición de tanto NaCl 150 mM (*curvas inferiores*) como 1 mg/ml de SDS (*curvas superiores*) a las mezclas de reacción o realizando las reacciones de acoplamiento a pH 5 (resultados no mostrados). Se obtienen resultados similares cuando los n-propionaldehídos de monohidroxi-PEG están substituidos con n-propionaldehídos de mPEG o cuando se emplean aldehídos de PEG distintos de n-propionaldehído. Asimismo, el procedimiento de este ejemplo

mide el grado de proteínas reductivamente alquiladas del extremo N distintas de IFN- β -1b, en las que tales proteínas tienen un residuo de serina o treonina del extremo N. Similarmente, la escisión oxidativa de polímeros ligados por alquilación reductora a residuos de serina o treonina del extremo N se logra usando peryodatos distintos de peryodato de sodio, que incluyen: metaperyodato de sodio (denominado en cualquier parte en el presente documento y conocido en la técnica como peryodato de sodio), metaperyodato de potasio, metaperyodato de litio, peryodato de calcio, peryodato de bario y ácido peryódico.

[0156] Los conjugados de polímero sintetizados por alquilación reductora de otras citocinas a las que son aplicables el procedimiento de este Ejemplo 2 incluyen interleucina-1-*alfa* (Geoghegan, K.F. y col., arriba) y factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (Guerra, P.I. y col., arriba).

Ejemplo 3: Purificación de conjugados y eliminación de PEG y SDS libre por cromatografía de fase inversa

[0157] Se usó cromatografía de fase inversa ("FI") por S. Hershenson y col. (patente de EE.UU. n° 4.894.330) para purificar IFN- β -1b después de su expresión en cultivo de células bacterianas. Los presentes inventores adaptaron los procedimientos de Hershenson y col. para separar las especies PEGiladas individuales sintetizadas como se describe en Ejemplo 1 de la proteína sin modificar. Este procedimiento también resolvió el PEG libre y la mayor parte del SDS de los picos de proteína. La Figura 4 muestra un cromatograma analítico sobre una columna Jupiter™ C4 300Å (15 cm x 4,6 mm; Phenomenex; Torrance, CA) con un gradiente de 20% de acetonitrilo más 0,04% de ácido trifluoroacético al 80% de acetonitrilo más 0,1% de ácido trifluoroacético. Se cargó un décimo de mililitro de la mezcla de reacción y fracciones de 0,5 ml se recogieron a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se detectaron un pico de IFN- β -1b que estaba sin modificar, excepto por la exposición a los reactivos de PEGilación ("PEGilado vacío") y picos de PEG conjugados que contenían una o más cadenas de PEG por molécula de proteína monitorizando la absorbancia a 280 nm (*curva sólida*). En este experimento, la columna se mantuvo a 40°C. Se obtuvieron resultados cualitativamente similares, pero con diferentes tiempos de retención, por cromatografía a temperatura ambiente.

[0158] Los resultados de ensayos de SDS en las fracciones recogidas se muestran por los *triángulos blancos*. Una disolución madre del reactivo de ensayo SDS contuvo 1 mg/ml de un colorante de carbocianina, Stains-All (Sigma, n° E-9379; 3,3'-dietil-9-metil-4,5,4',5'-dibenzotiacarbocianina), en 50% (v/v) de isopropanol acuoso (Rusconi, F. y col., (2001) Anal Biochem 295:31-37). El reactivo de trabajo se preparó justo antes de uso mezclando 2 ml de la disolución madre más 2 ml de N,N-dimetilformamida y 41 ml de agua. La adición de SDS a este reactivo produjo cambios espectrales que son específicos para SDS y produjeron una disminución en el pico de absorbancia a 510-515 nm y la aparición de un pico de absorbancia a 439 nm. Los cambios en la absorbancia a 439 nm tras la adición de 2 mcl de cada fracción de la columna de cromatografía de FI a 250 mcl del reactivo de trabajo en una placa de 96 pocillos se monitorizaron en un lector de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[0159] Los resultados de un ensayo para PEG en las fracciones recogidas se muestran por los *círculos rellenos* en la Figura 4. El reactivo de ensayo de PEG se preparó inmediatamente antes de uso mezclando 1 volumen de 20% (peso/volumen) de cloruro de bario en HCl 1 N con 4 volúmenes de 4 mg/ml de yodo en 1% (peso/volumen) de yoduro de potasio. De cada fracción de la columna de cromatografía de FI (y los patrones de PEG), una alícuota de 10 mcl se añadió a 90 mcl de agua en los pocillos de una placa de 96 pocillos, seguido de 100 mcl de reactivo de ensayo de PEG. Después de mezclarse las muestras y el reactivo y de incubarse a temperatura ambiente durante 15 minutos, la absorbancia a 508 nm se midió en un lector de placas SpectraMax. Las gráficas en la Figura 4 demuestran que la cromatografía de FI bajo estas condiciones separó la proteína PEGilada vacía de conjugados que contenían una o más cadenas de PEG de 20 kDa, mientras que resolvió el PEG sin unir y SDS de los conjugados. Se obtuvieron resultados similares con conjugados que contenían PEG de otros pesos moleculares (por ejemplo, PEG de 10 kDa o 30 kDa) y otros enlaces estables a ácido entre el PEG y el IFN- β -1b.

Ejemplo 4: Análisis cromatográfico y electroforético de fracciones purificadas de HPLC de fase inversa preparativa

[0160] La cromatografía de fase inversa en condiciones similares a aquellas descritas en el Ejemplo 3 se realizó en muestras más grandes (0,3 ó 0,5 ml) de mezclas de reacción de PEGilación sobre la misma columna Jupiter C4 con un gradiente modificado. Cuando se cargaron muestras más grandes, la resolución entre las diversas formas de interferón (PEGilado vacío, PEG₁-IFN- β -1b o conjugados con más de una cadena de PEG) no estuvo tan clara como la mostrada en la Figura 4. Sin embargo, se obtuvieron fracciones que se enriquecieron altamente tanto en proteína PEGilada vacía como en monoPEGilada, como se muestra por recromatografía de pequeñas alícuotas de las fracciones parcialmente purificadas sobre la misma columna de FI (Figura 5). Los cromatogramas se analizaron usando el software EZChrom Elite (Scientific Software, Inc., Pleasanton, CA). De este análisis, la preparación mostrada en la *curva superior* (fracción 53 de la columna de FI preparativa) contuvo aproximadamente el 70-80% de IFN- β -1b PEGilado vacío, mientras que la preparación mostrada en la *curva intermedia* (fracción 51) contuvo aproximadamente el 99% de PEG₁-IFN- β -1b. La *curva inferior* en la Figura 5 muestra un cromatograma de la mezcla de reacción del que se derivaron las fracciones, en el que aproximadamente el 19% de la absorbancia se asoció a la proteína PEGilada vacía, aproximadamente el 61% al pico de PEG₁-IFN, aproximadamente el 12% al pico de PEG₂-IFN marcado y el 5-6% a formas que se eluyeron antes que PEG₂-IFN. Se obtienen resultados cualitativamente

similares cuando se usan columnas de fase inversa de otros fabricantes.

[0161] La misma mezcla de reacción (analizada por cromatografía de FI en la Figura 5) y dos fracciones de PEG-interferón purificadas por cromatografía de FI se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS ("SDS-PAGE"). Los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7. Las muestras por duplicado se incubaron con un agente reductor (Invitrogen, n° NP0004; Carlsbad, CA) o sin agente reductor durante 10 minutos tanto a temperatura ambiente como a 102°C y se sometieron a electroforesis durante 140 minutos a 120 V a través de un gel de 4-12% de Bis-Tris (Invitrogen, n° NP0321B). Los trazados mostrados en las Figuras 6 y 7 fueron de las muestras que ni se redujeron ni se calentaron. Las proteínas en el gel se tiñeron con tinción SYPRO® Ruby (Molecular Probes n° S-12000, Eugene, OR), se iluminaron a 302 nm y se fotografiaron usando un filtro de luz visible Orange/Red (Molecular Probes, n° S-6655) (Figura 6). Las imágenes digitales se analizaron usando el software de análisis de imágenes ID de Kodak (Rochester, NY). El eje horizontal representa la distancia de migración con respecto al frente de colorante (100 unidades) y el eje vertical representa la intensidad relativa de la tinción con proteína fluorescente. Los valores de la referencia para los diversos carriles se han desplazado verticalmente para aclarar la presentación de los resultados. El *trazado inferior* representa una mezcla de proteínas patrón (Mark12™, n° LC5677 de Invitrogen), en la que los picos enumerados 1 a 9 se identifican como proteínas que tienen los siguientes pesos moleculares (todos en kDa): 200, 116, 97,1, 66,3, 55,4, 36,5, 31,0, 21,5 y 14,4. El *segundo trazado desde la parte inferior* muestra el análisis electroforético de la mezcla de reacción. En esta mezcla, los porcentajes de tinción de proteína asociados a cada forma de IFN-β-1b fueron: 14% de PEGilada vacía; 64% de PEG₁-IFN; 20% de PEG₂-IFN y aproximadamente el 2% de formas más grandes que PEG₂-IFN. El tercer *trazado desde la parte inferior* muestra una fracción de columna cromatográfica de FI que contiene 33 ± 1% de PEG₁-IFN; 64 ± 1% de PEG₂-IFN y aproximadamente el 6% de formas más grandes que PEG₂-IFN. La *curva superior* muestra una fracción que contenía 95 ± 1% de PEG₁-IFN, aproximadamente 2% de IFN PEGilado vacío y aproximadamente 2% de formas más grandes que PEG₂-IFN. Los porcentajes indicados anteriormente son la media y la desviación estándar de resultados de cuatro análisis por duplicado de cada muestra. Se obtuvieron resultados cualitativamente similares con PEG de 10 kDa y 30 kDa.

[0162] La Figura 7 muestra los resultados de análisis de SDS-PAGE como se describen para la Figura 6, excepto que el gel se tiñó para PEG usando 20% (peso/volumen) de BaCl₂ en HCl 1 N combinado con 4 volúmenes de 4 mg/ml de I₂ en 1% (peso/volumen) de KI. El *trazado inferior* representa una mezcla de proteínas patrón previamente teñidas (SeeBlue Plus2™, Invitrogen n° LC5625) en la que los picos enumerados 1 a 9 identifican las proteínas con los siguientes pesos moleculares *aparentes* (en kDa): 204, 111, 68,8, 51,5, 40,2, 28,9, 20,7, 14,9 y c. 6. Los análisis cuantitativos del gel teñido con PEG indican que aproximadamente el 99% del PEG en la fracción 51 de la columna de FI (*curva superior*) está asociado a PEG₁-IFN, mientras que la fracción enriquecida en el conjugado de diPEG (*segunda curva desde la parte superior*) contuvo 25 ± 1% de PEG₁-IFN y aproximadamente el 3% de formas más grandes que PEG₂-IFN, además de aproximadamente el 71% de PEG₂-IFN. En la estimación de las cantidades relativas de las diversas formas de IFN-β-1b teñido para PEG, el área bajo el pico de PEG₂-IFN se dividió entre 2. En la mezcla de reacción (*segunda curva desde la parte inferior*), aproximadamente el 50% de tinción de PEG se asoció a PEG sin unir, aproximadamente el 35% a PEG₁-IFN, aproximadamente el 14% a PEG₂-IFN y aproximadamente el 1% a formas mayores que PEG₂-IFN.

Ejemplo 5: Oxidación del extremo N selectiva de interferón-β-1b y acoplamiento a un carbazato de bajo peso molecular

[0163] Se usó un procedimiento alternativo de acoplamiento de mPEG al extremo amino de IFN-β-1b para aumentar la selectividad aparente para este sitio a aproximadamente el 100% desde el valor de aproximadamente el 90% obtenido por alquilación reductora como se describe en los Ejemplos 1 y 2. La primera etapa en este procedimiento de PEGilación se basa en un principio similar a la escisión oxidativa de PEG-IFN-β-1b reductivamente alquilado descrito en el Ejemplo 2. Este enfoque aprovecha la sensibilidad única de un residuo de serina o treonina del extremo N a escindirse a un aldehído por peroxidato, como se informa por H.B.F. Dixon (arriba) y por K.F. Geoghegan y col., ((1992) Bioconjug Chem 3:138-146; Geoghegan, K.F., patente de EE.UU. n° 5.362.852; Drummond, R.J. y col., patente de EE.UU. n° 6.423.685). Cuando el residuo de serina del extremo N de IFN-β-1b se oxidó máximamente, por ejemplo, después de tratamiento con NaIO₄ 3 mM durante 2 horas a temperatura ambiente, el pico resultante de la absorbancia de la proteína apareció ancho tras la cromatografía de exclusión por tamaño preliminar sobre una columna Superose 6. El posterior análisis sobre una columna Superose 12 en acetato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 4,6, que contenía 0,3 mg/ml de SDS resolvió claramente la proteína oxidada en dos formas que se dedujeron que eran monómeros y dímeros de la proteína. Las identidades de estos dos picos se confirmaron por SDS-PAGE, realizada como se describe en el ejemplo 4.

[0164] Los análisis por cromatografía de fase inversa documentaron adicionalmente el descubrimiento de que la oxidación preferencial de la serina del extremo N se logró con oxidación mínima de al menos un residuo de metionina esencial. L.S. Lin y col. ((1996) Pharm Biotechnol 9:275-301) y L. Lin ((1998) Dev Biol Stand 96:97-104) mostraron que la cromatografía de FI resolvió preparaciones de IFN-β-1b en un componente principal ("pico B") y un componente secundario que se eluyó antes ("pico A"). Lin ((1998) arriba) demostró adicionalmente que el pico A contuvo IFN-β-1b en el que una metionina funcionalmente activa (Met 61 de BETASERON) se oxidó a un sulfóxido.

Los presentes inventores han descubierto condiciones bajo las que puede lograrse la oxidación casi completa de la serina del extremo N con oxidación mínima de Met 61, como se refleja en el porcentaje de pico A en cromatogramas de FI. La oxidación de Met 61, como se mide por cromatografía de FI, se usó como un marcador sustituto para la oxidación de los otros residuos de metionina de IFN-β-1b (Met 35 y Met 116 de BETASERON).

[0165] Los estudios del grado de oxidación de Met 61 en función del pH y el tiempo de incubación con NaIO₄ 0,25 mM a 4°C se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Efectos del pH y el tiempo de exposición a peryodato sobre el grado de oxidación de metionina, como se mide por el área del pico A después de la cromatografía de fase inversa.

Tiempo de exposición a NaIO ₄ 0,25 mM	Porcentaje de pico A a pH 6,9	Porcentaje de pico A a pH 7,7
0	4,9	4,8'
2 horas	5,1	5,2
6 horas	5,6	5,0
18 horas	7,3	5,4
9 días	21,2	15,7

[0166] La demostración de la formación de aldehído por la oxidación del extremo N de IFN-β-1b se facilitó por su conjugación con carbazato de 9-fluorenilmetilo ("carbazato de Fmoc", también conocido en la técnica como "hidrazida de Fmoc") (Fluka 46917; Zhang, R.-E. y col., (1991) Anal Biochem 195:160-167). Los espectros de absorbancia característicos de aductos de carbazato de Fmoc de IFN-β-1b permitieron su discriminación de las formas sin conjugar correspondientes de la proteína sin el uso de un detector de fluorescencia. El interferón-β-1b se oxidó por tratamiento con diversas concentraciones de NaIO₄ a pH 7,8 durante diversos periodos de tiempo (0,5 a 2 horas a temperatura ambiente o hasta varios días en frío). En los experimentos mostrados en la Figura 8, la proteína se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con NaIO₄ 0,5 mM. La reacción se terminó mediante la adición de glicerol. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, el pH se redujo mediante la adición de ácido acético a una concentración final de 19 mM. A cada ml de mezcla resultante se añadieron 182 mcl de carbazato de Fmoc 15 mM en metanol dando una concentración final de carbazato de Fmoc 2,3 mM. Esta mezcla de reacción se incubó durante la noche a 4-8°C antes del análisis por cromatografía de fase inversa.

[0167] La Figura 8 ilustra los efectos sobre el comportamiento cromatográfico de FI de la incubación de IFN-β-1b con NaIO₄ 0,5 mM durante 1 hora a temperatura ambiente y del acoplamiento de los productos de oxidación con carbazato de Fmoc. Una comparación de los resultados para la muestra de control (*curva superior*) con aquellas para la muestra oxidada (*curva intermedia con círculos abiertos*) muestra que los tiempos de retención de tanto el componente principal como del pico A (que reflejan la presencia de aproximadamente el 5% de IFN-β-1b con un residuo de metionina oxidado) aumentan de 0,2 a 0,3 minutos por oxidación. Como se mide por el porcentaje de pico A, en comparación con el pico A', menos del 1% de la oxidación de metionina se detectó después de la incubación con NaIO₄ bajo estas condiciones.

[0168] Los resultados de bioensayos que se describen en el Ejemplo 8 proporcionan pruebas adicionales de que la oxidación controlada (por ejemplo, durante hasta 2 horas en frío) con peryodato 0,1 a 0,3 mM preservó la integridad de los residuos de aminoácidos de la proteína que son esenciales para la bioactividad.

[0169] Como se muestra en la *curva inferior con triángulos rellenos* en la Figura 8, las pruebas de la formación de aductos de Fmoc se proporcionó por el desplazamiento hacia tiempos de retención más largos para tanto el componente principal como el pico A' (derivado de aldehído del extremo N del pico A). Además, hubo un aumento del 50% en la relación de absorbancia a 278 nm con respecto a la de 214 nm para los picos desplazados. Para ambas formas de la proteína, los aumentos en los tiempos de retención debidos a la formación de los aldehídos del extremo N correspondientes (0,2-0,3 minutos) fueron mucho más pequeños que los aumentos resultantes de la formación de los derivados de Fmoc correspondientes (1,0-1,2 minutos).

Ejemplo 6: Síntesis de aductos de carbazato de PEG del interferón-β-1b oxidado en el extremo N

[0170] El interferón-β-1b, oxidado selectivamente en el extremo amino como se describe en el Ejemplo 5, también se acopló a un derivado de carbazato de PEG por una adaptación de los procedimientos descritos por R.J. Drummond y col. (publicación PCT nº WO 99/45026; patente de EE.UU. nº 6.423.685) y por S. Zalipsky y col. (publicación PCT nº WO 92/16555 A1 y en Harris, J.M y col., eds., (1997) Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol), pág. 318-341, Washington, D.C., American Chemical Society). El carbazato de PEG se sintetizó por la reacción de hidracina con un derivado de carbonato de p-nitrofenilo de PEG de 20 kDa ("NPC-PEG" de NOF Corporation). Después de la incubación de la proteína a temperatura ambiente en ausencia de peryodato o en presencia de NaIO₄ 0,125 mM durante 0,5, 1 ó 2 horas, las muestras se diluyeron con 4 volúmenes de carbazato de PEG de 20 kDa en tampón acetato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 4,6, que contenía 1 mg/ml de SDS, y se incubaron durante 1 día a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño sobre una columna Superose 12 en Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,3, que contenía 0,3 mg/ml de SDS. Como se muestra

en la Figura 9, la oxidación de la proteína durante hasta 2 horas antes de la reacción con carbazato de PEG produjo una disminución progresiva en la concentración de la proteína sin modificar (eluida en un tiempo de retención de aproximadamente 25 minutos) y un aumento progresivo en la proporción de absorbancia asociada al conjugado PEG₁-IFN-β-1b (eluido en un tiempo de retención de aproximadamente 20 minutos). Por este procedimiento se han obtenido rendimientos de PEG₁-IFN-β-1b que superan el 80%. Se obtuvieron resultados similares usando derivados de monocarbazato de PEG de 10 kDa o 30 kDa.

Ejemplo 7 Bioensayo de interferón-β-1b monoPEGilado, purificado por HPLC de fase inversa

[0171] El uso de células Daudi humanas de linfoma de Burkitt (ATCC nº CCL-231, Manassas, VA) para ensayos antiproliferativos de interferón-β-1a y diversas muteínas se describió por L. Runkel y col. ((2000) *Biochemistry* 39:2538-2551). La Figura 10 representa los resultados de ensayos de las actividades antiproliferativas sobre células Daudi de IFN-β-1b sin tratar y un conjugado monoPEGilado del extremo N que se purificó parcialmente por cromatografía de FI. Las células se cultivaron en medio RPMI1640 complementado (Gibco nº 11875-093, Grand Island, NY) con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Irvine Scientific nº 3000, Santa Ana, CA). Cien mil células se inocularon en 250 µl de medio en cada pocillo de una placa de 48 pocillos y se dejó que se cultivaran a 37°C con 5% de CO₂ durante 4 horas antes de mezclarse con un volumen igual de medio precalentado o diluciones de IFN-β-1b o un conjugado de PEG en medio. Durante 3 días, el número de células diluido sólo con medio aumentó a 590 +/- 24% (d.e.) del número en el tiempo cero basándose en cifras de células con un contador Coulter (modelo Z1, Miami, FL). En condiciones de inhibición máxima del crecimiento por IFN-β-1b o sus conjugados de PEG, el número de células aumentó a 283 +/- 8% del número en el tiempo cero. Por tanto, el porcentaje de inhibición máximo del crecimiento observado en este experimento fue del 48%. Los datos en la Figura 10 para diversas concentraciones de dos preparaciones de IFN-β-1b se expresan como un porcentaje del crecimiento celular inhibible.

[0172] La Figura 10 muestra los resultados de un estudio usando diluciones de la disolución madre de IFN-β-1b y de fracciones del experimento de cromatografía de fase inversa preparativa descrito en el Ejemplo 4 que contenía tanto conjugado de monoPEG casi puro, como se muestra en las Figuras 5-7 (fracción 51), como IFN-β-1b PEGilado vacío casi puro (fracción 53 de la columna mostrada en la Figura 5). Las muestras se diluyeron, por triplicado, a 1 mcg/ml en medio complementado con suero bovino fetal y se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros. De cada una de las diluciones iniciales se hizo una dilución de 32 ng/ml y posteriores diluciones seriadas. A partir de los datos en la Figura 10 se calculó la concentración de cada preparación requerida para la inhibición del 50% del crecimiento celular inhibible ("CI₅₀"). Los resultados mostraron que el IFN-β-1b monoPEGilado (CI₅₀ = c. 40 pg/ml) fue aproximadamente 6 veces tan potente como el de IFN-β-1b sin modificar (CI₅₀ = c. 250 pg/ml). Los aumentos medios en las potencias antiproliferativas de conjugados con PEG de diversos tamaños, probados en una serie de experimentos similar a la mostrada en la Figura 22, tuvo un intervalo de aproximadamente 2,5 veces (para PEG de 10 kDa) a aproximadamente 5 veces (para PEG de 30 kDa).

[0173] Sorprendentemente, la preparación PEGilada vacía mostrada en la Figura 10 tuvo una CI₅₀ de aproximadamente 80 pg/ml, que fue intermedia entre aquellas de la disolución madre de IFN-β-1b y la preparación monoPEGilada. Aunque no se pretende quedar ligado a teoría o explicación mecanística particular alguna, es posible que la potencia antiproliferativa potenciada de la preparación PEGilada falsa refleje la eliminación durante la cromatografía de fase inversa de algún material inhibidor que está presente en la disolución madre de IFN-β-1b. Esta interpretación está de acuerdo con los resultados de cromatografía de exclusión por tamaño sobre una columna de Superose 6 en un tampón que contenía SDS (como se describe en el Ejemplo 1), que reveló un pico de absorbancia tanto a 214 nm como a 280 nm que se eluyó entre las posiciones de elución de IFN-β-1b y el "pico de la sal". Se realizaron experimentos de bioensayo similares a aquellos mostrados en la Figura 10 en la fracción 49 de la columna de FI que contuvieron una mezcla de PEG₂- y PEG₁-IFN-β-1b (véanse las Figuras 6 y 7). Como en el caso de la muestra PEGilada vacía, la muestra múltiplemente PEGilada tuvo potencia antiproliferativa que fue mayor que la de la disolución madre de IFN-β-1b, pero inferior a la del conjugado monoPEGilado. En otros experimentos, el aumento en la potencia observada con IFN-β-1b monoPEGilado osciló de seis veces a diez veces. Se observaron aumentos similares en la potencia con los aductos de carbazato descritos en el Ejemplo 6 empleando PEG de 10, 20 y 30 kDa.

[0174] Las potencias antiproliferativas en células Daudi obtenidas con los conjugados de la presente invención pueden compararse con las actividades específicas informadas de tres formas farmacéuticas de interferón-β medidas en un ensayo antivírico. Según los prospectos respectivos, las actividades son 32 x 10⁶ UI/mg para BETASERON[®] de Berlex (IFN-β-1b), 200 x 10⁶ UI/mg para AVONEX[®] (formulación de Biogen de IFN-β-1a) y 270 x 10⁶ UI/mg para REBIF[®] (formulación de Sero de IFN-β-1a). Por consiguiente, el aumento de al menos seis veces en la potencia de BETASERON monoPEGilado en el ensayo antiproliferativo ilustrado en la Figura 10 indica que la PEGilación del extremo N de BETASERON por los procedimientos de la presente invención ha aumentado su potencia hasta el intervalo esperado en comparación con las preparaciones glucosiladas comercialmente disponibles, AVONEX y REBIF.

[0175] Previamente, la solubilidad de interferón-β no glucosilado (expresado en *Escherichia coli*) ha sido potenciada por el uso de disoluciones ácidas (Hanisch, W.H. y col., patente de EE.UU. nº 4.462.940) o por la adición

de SDS (Thomson, J.W., patente de EE.UU. n° 4.816.440). Sin pretender quedar ligado a teoría, un mecanismo por el que la PEGilación puede aumentar la eficacia antiproliferativa de IFN- β -1b medida *in vitro* es disminuyendo su tendencia a autoasociarse en el medio de cultivo. Por consiguiente, la observación de que la muestra enriquecida en PEG₂-IFN- β -1b fue menos eficaz que PEG₁-IFN- β -1b indica que los efectos positivos de la disminución de la agregación pueden vencerse por el efecto negativo de la excesiva PEGilación sobre la capacidad de esta citocina para unirse a sus receptores y/o parar iniciar la transducción de señales responsable de su actividad antiproliferativa.

Ejemplo 8 Bioensayos de interferón- β -1b selectivamente oxidado

10 **[0176]** Los ensayos de la actividad antiproliferativa en células Daudi de IFN- β -1b oxidado a diversos grados se
 realizaron como se describe en el Ejemplo 7. Las muestras probadas incluyeron la disolución madre de IFN- β -1b y
 muestras que habían sido tratadas durante varios días a 4°C con peryodato 0,1, 0,3 ó 3 mM. Las muestras se
 diluyeron como se describe en el Ejemplo 7 y se mezclaron con un volumen igual de suspensión de células Daudi 4
 15 horas después de la inoculación de las células. Las células se cultivaron durante 2 días a 37°C con 5% de CO₂ y
 luego se contaron con un contador Coulter. La actividad antiproliferativa de IFN- β -1b no se afectó o aumentó por
 tratamiento con NaIO₄ 0,075-0,5 mM en las condiciones probadas. Se obtuvieron resultados similares en los
 ensayos antiproliferativos de 3 días, como se describe en el Ejemplo 7. La potencia antiproliferativa se potenció
 adicionalmente por conjugación de IFN- β -1b selectivamente oxidado con carbazato de PEG, como se describe en el
 Ejemplo 6. Se obtienen resultados similares a aquellos obtenidos con carbazato de PEG con productos de
 20 conjugación de IFN- β -1b selectivamente oxidado a hidrazida de PEG. A diferencia, el efecto antiproliferativo sobre
 células Daudi se suprimió o se abolió completamente por el tratamiento de IFN- β -1b con mayores concentraciones
 de peryodato, por ejemplo, 1-3 mM. Estas altas concentraciones de NaIO₄ indujeron la dimerización de la proteína,
 que se detectó por HPLC de exclusión por tamaño sobre una columna Superose 12 como se describe en el Ejemplo
 2, y la oxidación de metionina, como se detectó por cromatografía de fase inversa, como se describe en el Ejemplo 3
 25 (resultados no mostrados).

[0177] Las bioactividades de los conjugados de la presente invención pueden medirse por ensayos
 antiproliferativos y antivíricos conocidos en la técnica basados en diversas líneas celulares o cultivos primarios, en
 los que las células llevan receptores de la superficie de la célula para IFN-*beta*. Alternativamente, pueden
 30 monitorizarse respuestas a IFN-*beta* que incluyen la inducción de neopterinina (Pepinsky, R.B. y col., arriba), β_2 -
 microglobulina (Pepinsky, R.B. y col., arriba), o 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (Bruchelt, G. y col., (1992) Eur J. Clin
 Chem Clin Biochem 30:521-528) o proteínas indicadoras operativamente ligadas a los promotores de proteínas que
 son inducibles por IFN-*beta*. Procedimientos adicionales para ensayar la bioactividad de conjugados de polímero de
 IFN-*beta* incluyen ensayos de transducción de señales y ensayos de activación génica (por ejemplo, Pungor, E. y
 35 col., (1998) J Interferon Cytokine Res 18:1025-1030).

LISTA DE SECUENCIAS

[0178]

5 <110> Mountain View Pharmaceuticals, Inc.
3475-S Edison Way
Menlo Park, California 94025
Estados Unidos de America

10 <120> CONJUGADOS DE POLÍMERO DE INTERFERÓN-BETA CON POTENCIA BIOLÓGICA
POTENCIADA

<130> 2057.012PC01/JAG/BJD
 15 <140> (por asignar)
 <141> (con la presente)

<150> US 60/479.914
 <151> 20/06/2003

20 <150> US 60/479.913
 <151> 20/06/2003
 <150> US 60/436.020
 <151> 26/12/2002

25 <160> 2

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
 30 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

35

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

5 <210> 2
<211> 166
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar la potencia biológica *in vitro* de un interferón-beta no glucosilado que comprende acoplar selectivamente, en presencia de un tensioactivo, uno o más polímeros solubles en agua sintéticos al aminoácido del extremo amino de dicho interferón-beta, en el que dicho aminoácido del extremo amino está localizado remotamente del (de los) dominio(s) de unión a receptor de dicho interferón-beta, y en el que
- 5
- (i) el polímero soluble en agua lleva un único grupo aldehído y el acoplamiento comprende alquilación reductora de una base de Schiff formada con el polímero soluble en agua y reducción de la base de Schiff con un agente reductor suave, o
- 10
- (ii) el acoplamiento comprende acoplar una hidrazida, hidracina, semicarbazida u otro polímero soluble en agua que contiene amina a un residuo de serina o treonina del extremo N del interferón-beta que ha sido escindido oxidativamente a un aldehído con peryodato, y
- 15
- en el que el polímero soluble en agua es un polialquilenglicol seleccionado del grupo constituido por poli(etilenglicol), monometoxipoli (etilenglicol) y monohidroxipoli (etilenglicol).
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que (i) comprende formar una mezcla del interferón-beta y el polímero soluble en agua a un pH de 5,6 a 7,6.
- 20
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que en (i) el agente reductor suave comprende cianoborohidruro de sodio.
4. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que en (i) el agente reductor suave comprende piridina-borano.
- 25
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 llevado a cabo de forma que se minimice la oxidación de al menos un residuo de metionina esencial sobre el interferón-beta.
- 30
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha potencia biológica se mide en un ensayo de cultivo celular que responde a interferón-beta.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho interferón-beta tiene la secuencia de aminoácidos de interferón-β-1b especificada en SEC ID N°: 1.
- 35
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho interferón-beta tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos en SEC ID N°: 1.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho polímero está covalentemente acoplado al grupo *alfa*-amino de dicho aminoácido del extremo amino.
- 40
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho acoplamiento covalente de dicho polímero con dicho grupo *alfa*-amino es por un enlace amina secundaria.
- 45
11. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho polialquilenglicol es un monometoxipoli(etilenglicol).
12. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho polialquilenglicol es un monohidroxipoli(etilenglicol).
- 50
13. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho polialquilenglicol tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa, ambos incluidos.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho polialquilenglicol tiene un peso molecular de entre aproximadamente 8 kDa y aproximadamente 14 kDa, ambos incluidos.
- 55
15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho polialquilenglicol tiene un peso molecular de entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 30 kDa, ambos incluidos.
- 60
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicho polialquilenglicol tiene un peso molecular de entre aproximadamente 18 kDa y aproximadamente 22 kDa, ambos incluidos.
- 65
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que dicho polialquilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

18. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho polialquilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa.
- 5 19. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el acoplamiento de dicho polímero con dicho interferón-*beta* en dicho aminoácido del extremo amino imita los efectos de glucosilación o hiperglucosilación beneficiosos de dicho interferón-*beta*.
20. Un conjugado obtenible por el procedimiento de cualquier reivindicación precedente.
- 10 21. Un conjugado según la reivindicación 20 que comprende un interferón-*beta* no glucosilado covalentemente acoplado en su aminoácido del extremo amino a uno o más polímeros solubles en agua sintéticos, en el que la potencia biológica *in vitro* de dicho conjugado de interferón-*beta* aumenta en comparación con el mismo interferón-*beta* con el que uno o más de los mismos polímeros solubles en agua sintéticos se ha acoplado al azar con residuos de lisina accesibles al disolvente, y en el que el polímero soluble en agua es un polialquilenglicol seleccionado del grupo que consiste en un poli(etilenglicol), un monometoxipoli(etilenglicol) y un monohidroxipoli(etilenglicol).
- 15 22. El conjugado de la reivindicación 21, en el que la potencia biológica de dicho conjugado se mide en un ensayo de cultivo celular que responde a interferón-*beta*.
- 20 23. El conjugado de la reivindicación 21, en el que dicho interferón-*beta* tiene la secuencia de aminoácidos de interferón- β -1b especificada en SEC ID N°: 1.
24. El conjugado de la reivindicación 23, en el que la potencia biológica *in vitro* de dicho interferón- β -1b aumenta a aproximadamente la potencia del interferón- β -1a que tiene la secuencia de aminoácidos especificada en SEC ID N°: 2 y que está glucosilado sobre el residuo de asparagina 80.
- 25 25. El conjugado de la reivindicación 22, en el que dicho ensayo de cultivo celular sensible a interferón-*beta* está seleccionado del grupo que consiste en un ensayo antiproliferativo, un ensayo antivírico, un ensayo de transducción de señales y un ensayo de activación génica.
- 30 26. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 27. Un kit que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25.
28. Un kit que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 26.
29. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25 para su uso en la prevención, diagnóstico o tratamiento de un trastorno físico sensible a interferón-*beta* en un animal que padece o está predispuesto a dicho trastorno físico.
- 40 30. La composición farmacéutica de la reivindicación 26 para su uso en la prevención, diagnóstico o tratamiento de un trastorno físico sensible a interferón-*beta* en un animal que padece o está predispuesto a dicho trastorno físico.
- 45 31. El conjugado de la reivindicación 29, en el que dicho animal es un mamífero.
32. La composición farmacéutica de la reivindicación 30, en la que dicho animal es un mamífero.
- 50 33. El conjugado de la reivindicación 31 o la composición farmacéutica de la reivindicación 32, en el que dicho mamífero es un ser humano.
34. El conjugado de la reivindicación 29, en el que dicho trastorno físico sensible a interferón-*beta* está seleccionado del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno autoinmunitario y un trastorno genético.
- 55 35. El conjugado de la reivindicación 34, en el que dicho cáncer está seleccionado del grupo que consiste en un cáncer de mama, un cáncer uterino, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer testicular, un cáncer de pulmón, una leucemia, un linfoma, un cáncer de colon, un cáncer gastrointestinal, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de hueso, un cáncer neurológico, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de piel, un carcinoma, un sarcoma, un adenoma y un mieloma.
- 60 36. El conjugado de la reivindicación 34, en el que dicha enfermedad infecciosa sensible a interferón-*beta* está seleccionada del grupo que consiste en una hepatitis vírica, una enfermedad producida por un virus cardiopático y VIH/SIDA.
- 65

37. El conjugado de la reivindicación 34, en el que dicho trastorno neurodegenerativo sensible a interferón-*beta* es esclerosis múltiple.
- 5 38. El conjugado de la reivindicación 37, en el que dicha esclerosis múltiple está seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple recurrente-remitente, progresiva primaria y progresiva secundaria.
39. La composición farmacéutica de la reivindicación 30, en el que dicho trastorno físico sensible a interferón-*beta* está seleccionado del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno autoinmunitario y un trastorno genético.
- 10 40. La composición farmacéutica de la reivindicación 39, en el que dicho cáncer está seleccionado del grupo que consiste en un cáncer de mama, un cáncer uterino, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer testicular, un cáncer de pulmón, una leucemia, un linfoma, un cáncer de colon, un cáncer gastrointestinal, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de hueso, un cáncer neurológico, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de piel, un carcinoma, un sarcoma, un adenoma y un mieloma.
- 15 41. La composición farmacéutica de la reivindicación 39, en la que dicha enfermedad infecciosa sensible a interferón-*beta* está seleccionada del grupo que consiste en una hepatitis vírica, una enfermedad producida por un virus cardiotrópico y VIH/SIDA.
- 20 42. La composición farmacéutica de la reivindicación 39, en la que dicho trastorno neurodegenerativo sensible a interferón-*beta* es esclerosis múltiple.
43. La composición farmacéutica de la reivindicación 42, en la que dicha esclerosis múltiple está seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple recurrente-remitente, progresiva primaria y progresiva secundaria.
- 25 44. Un procedimiento para la escisión oxidativa selectiva de un residuo de serina o treonina del extremo N de una proteína bioactiva sin oxidar residuos de aminoácidos funcionalmente esenciales de dicha proteína bioactiva, que comprende:
- 30 a) ajustar la concentración de ión hidrógeno de una disolución de dicha proteína bioactiva a un pH entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8;
- b) mezclar dicha disolución de proteína bioactiva con aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 moles de un peryodato por mol de proteína bioactiva; y
- 35 c) incubar dicha mezcla durante al menos una hora a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 40°C.
45. El procedimiento de la reivindicación 44, en el que dicha proteína bioactiva es un interferón-*beta*.
- 40 46. El procedimiento de la reivindicación 45, en el que dicho interferón-*beta* es interferón-β-1b que tiene la secuencia de aminoácidos especificada en SEC ID N°: 1.

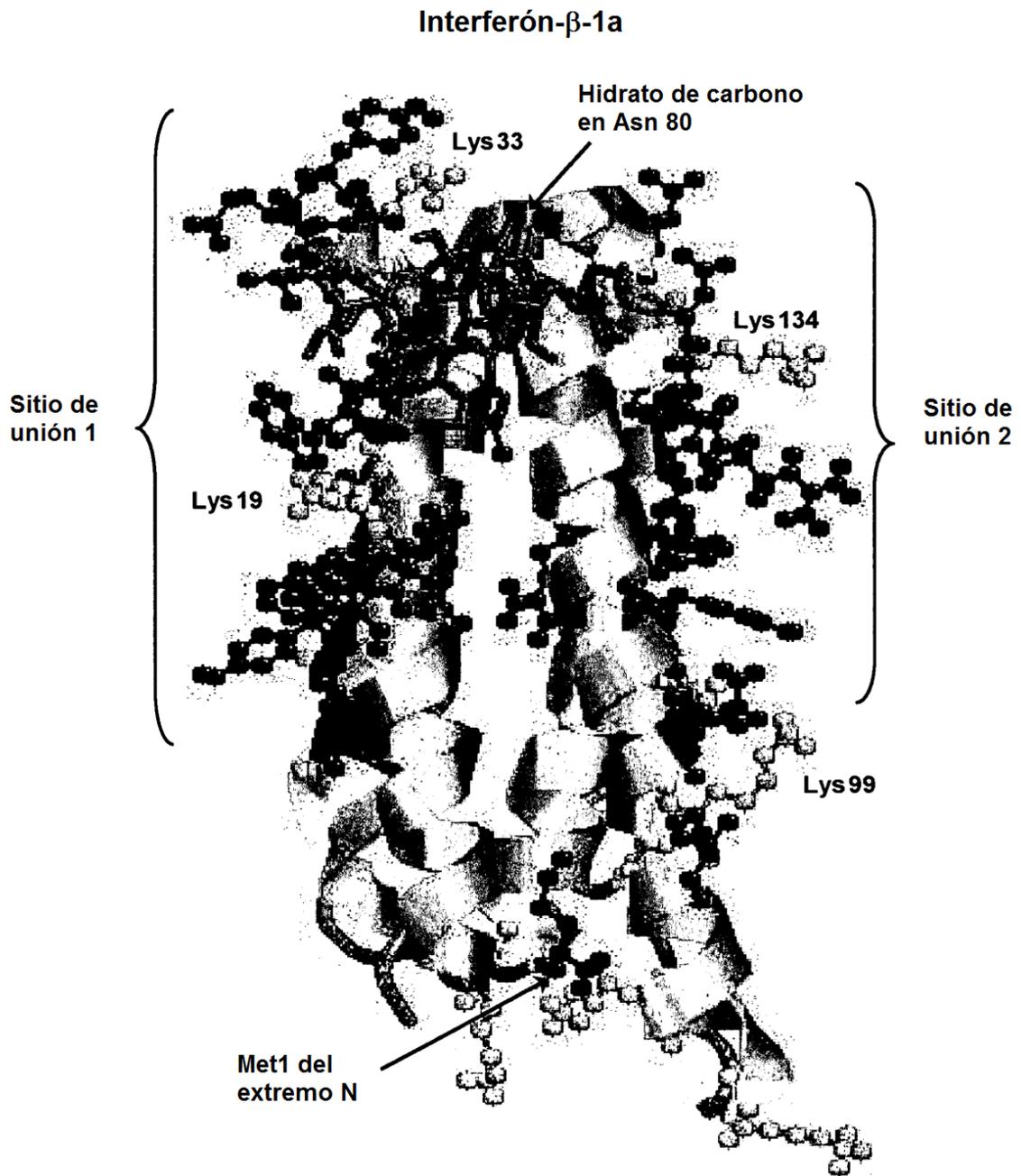


Figura 1

HPLC de exclusión por tamaño de interferón- β -1a y conjugados de PEG de 20 kDa

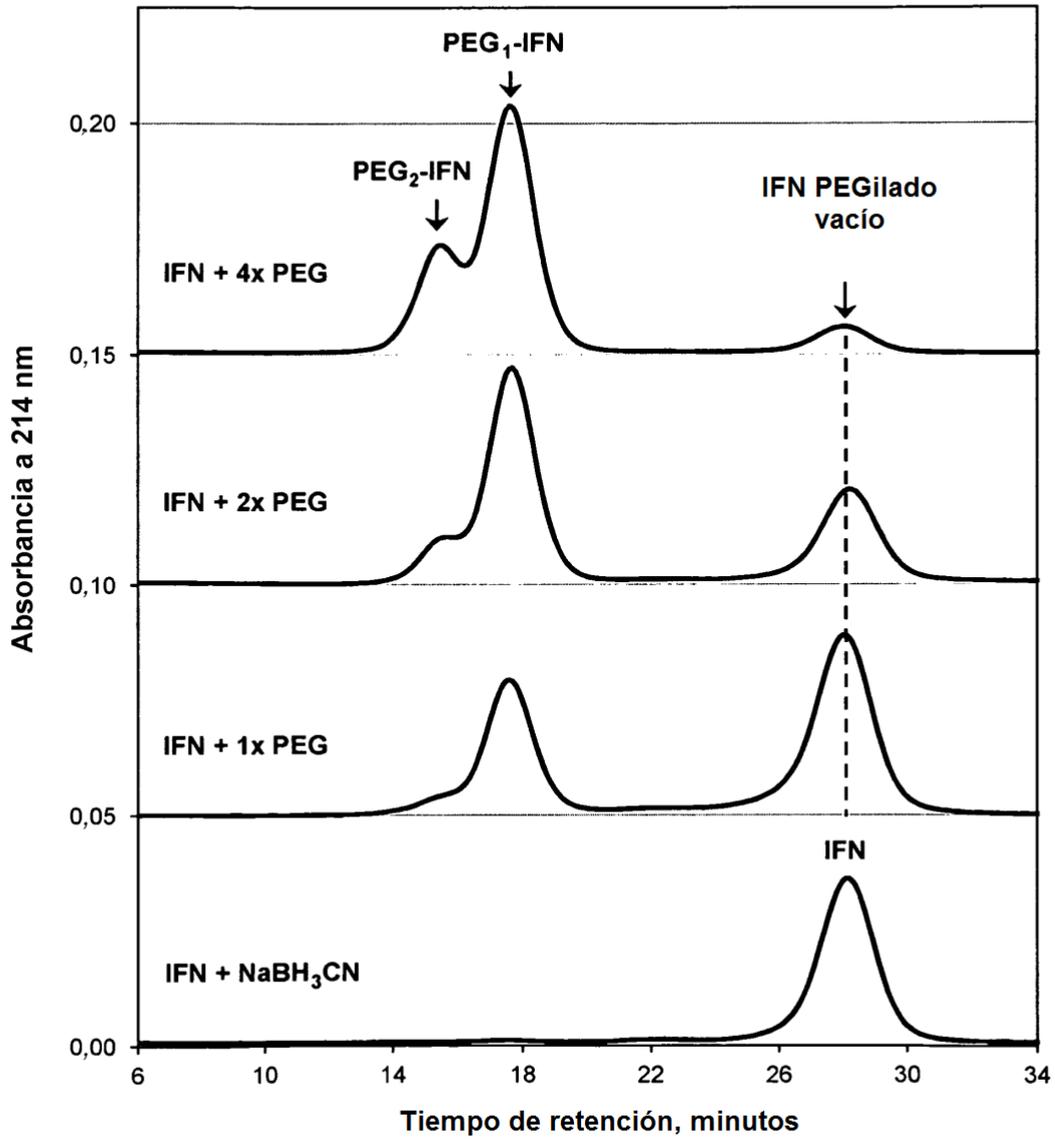


Figura 2

HPLC de exclusión por tamaño de PEG₁-interferón-β-1b sintetizado a pH 6,4 +/- SDS o NaCl, antes y después de la escisión oxidativa con NaIO₄ 3 mM

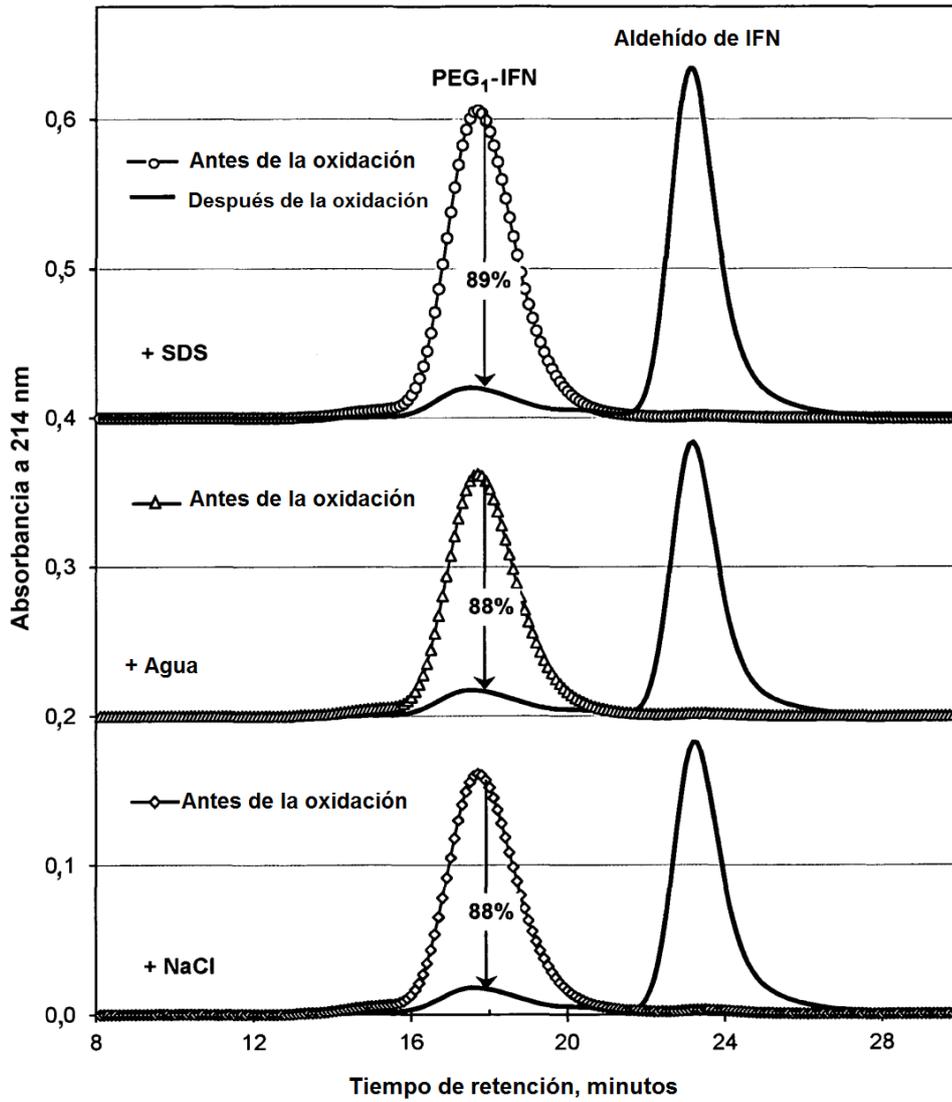


Figura 3

Separación de interferón- β -1b PEGilado de PEG sin unir y SDS por cromatografía de fase inversa

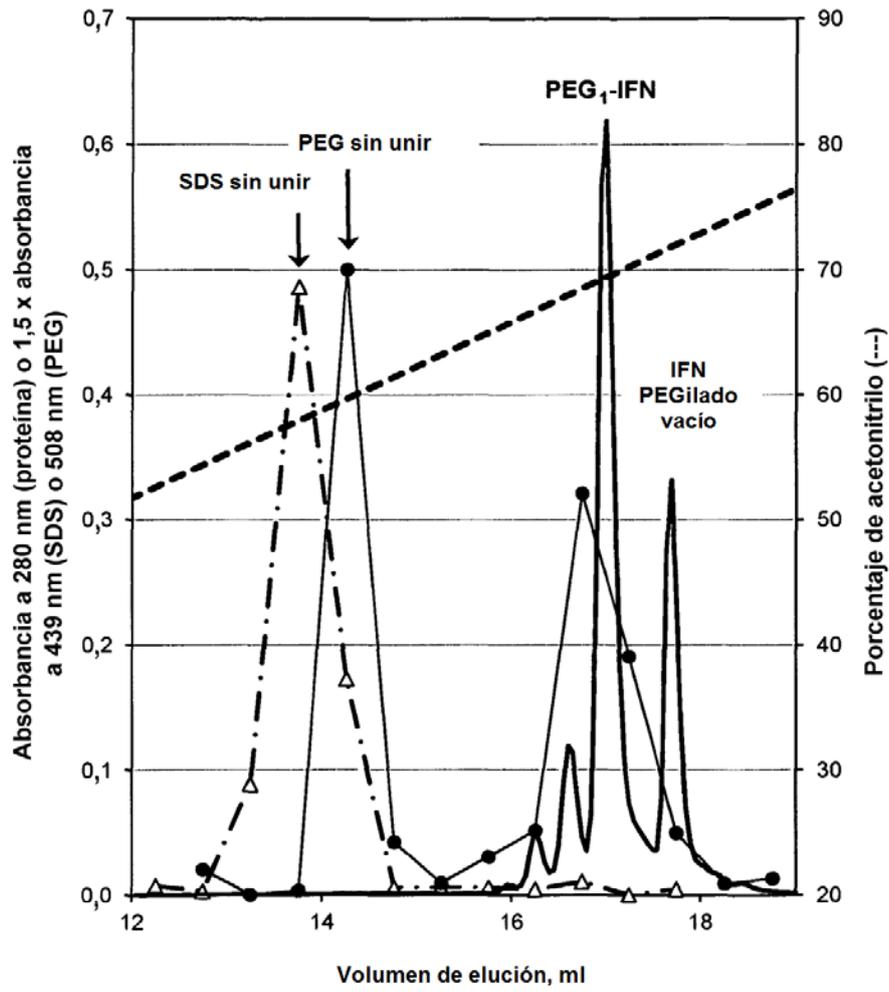


Figura 4

Purificación de interferón-β-1b monoPEGilado por HPLC de fase inversa

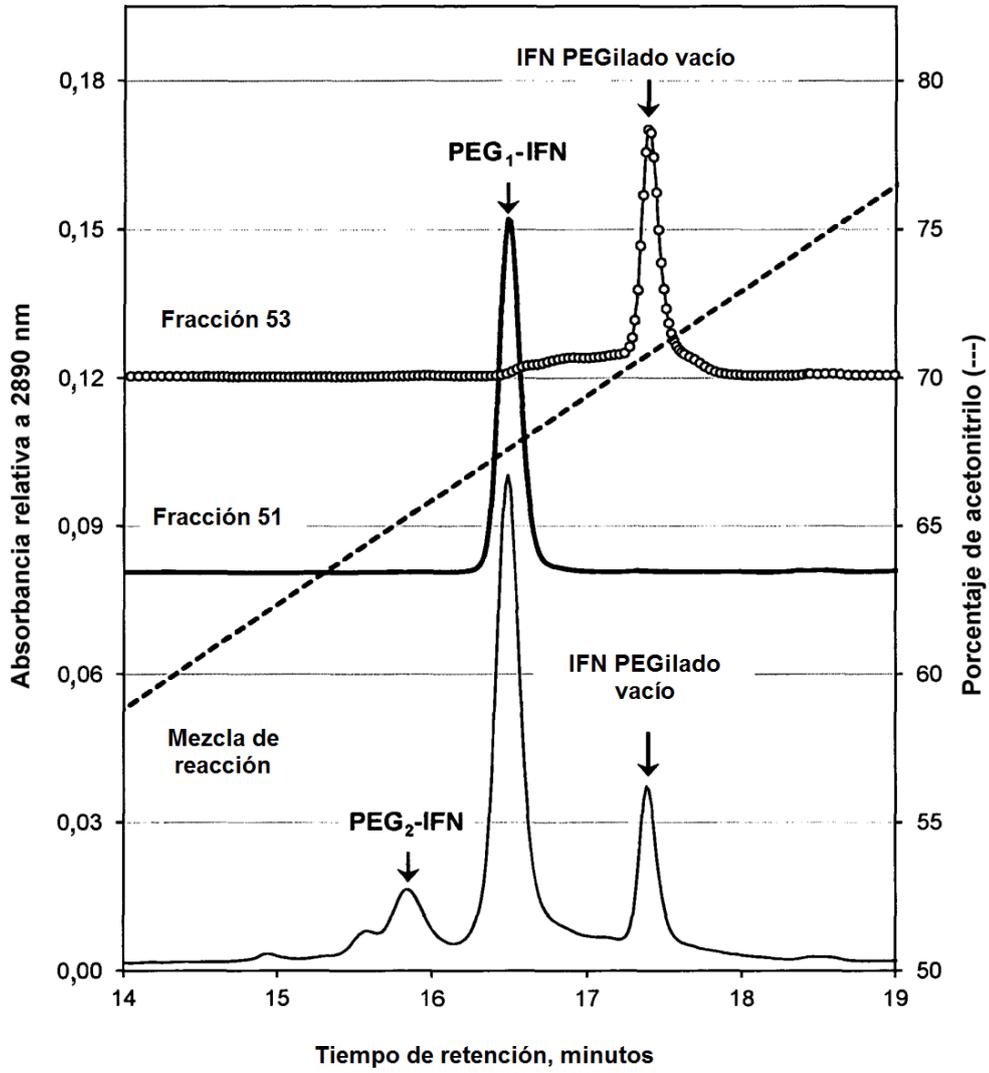


Figura 5

Análisis de SDS-PAGE de interferón- β -1b PEGilado y fracciones de cromatografía de fase inversa (tinción de proteína)

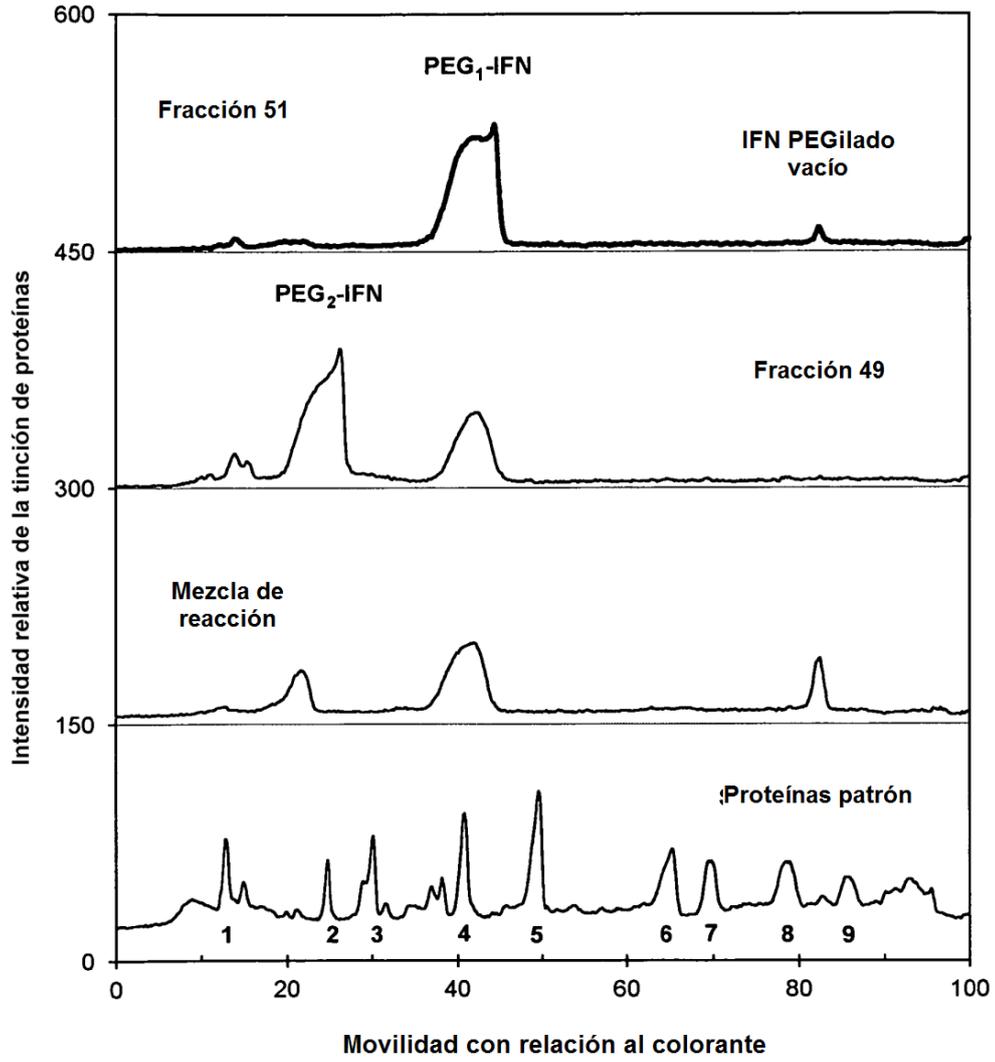


Figura 6

Análisis de SDS-PAGE de interferón- β -1b PEGilado y fracciones de cromatografía de fase inversa (tinción de proteína)

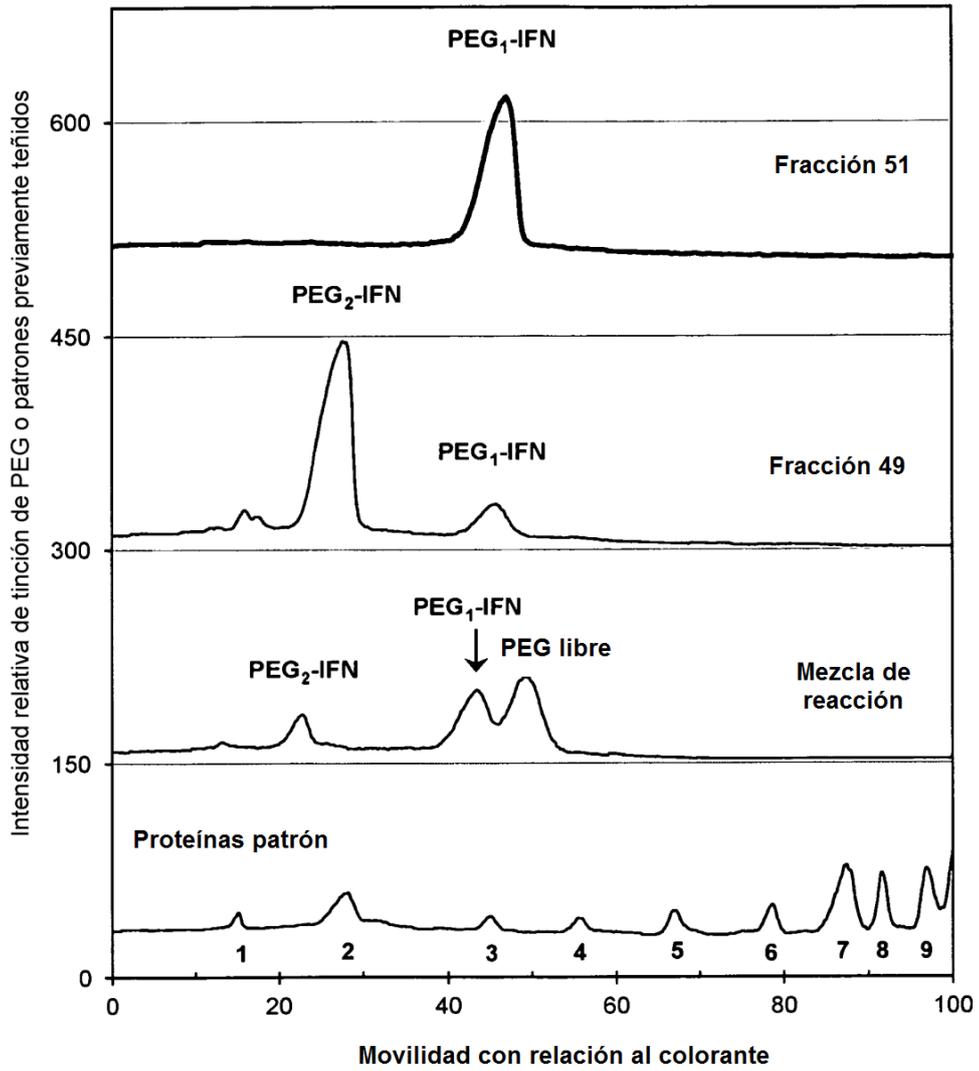


Figura 7

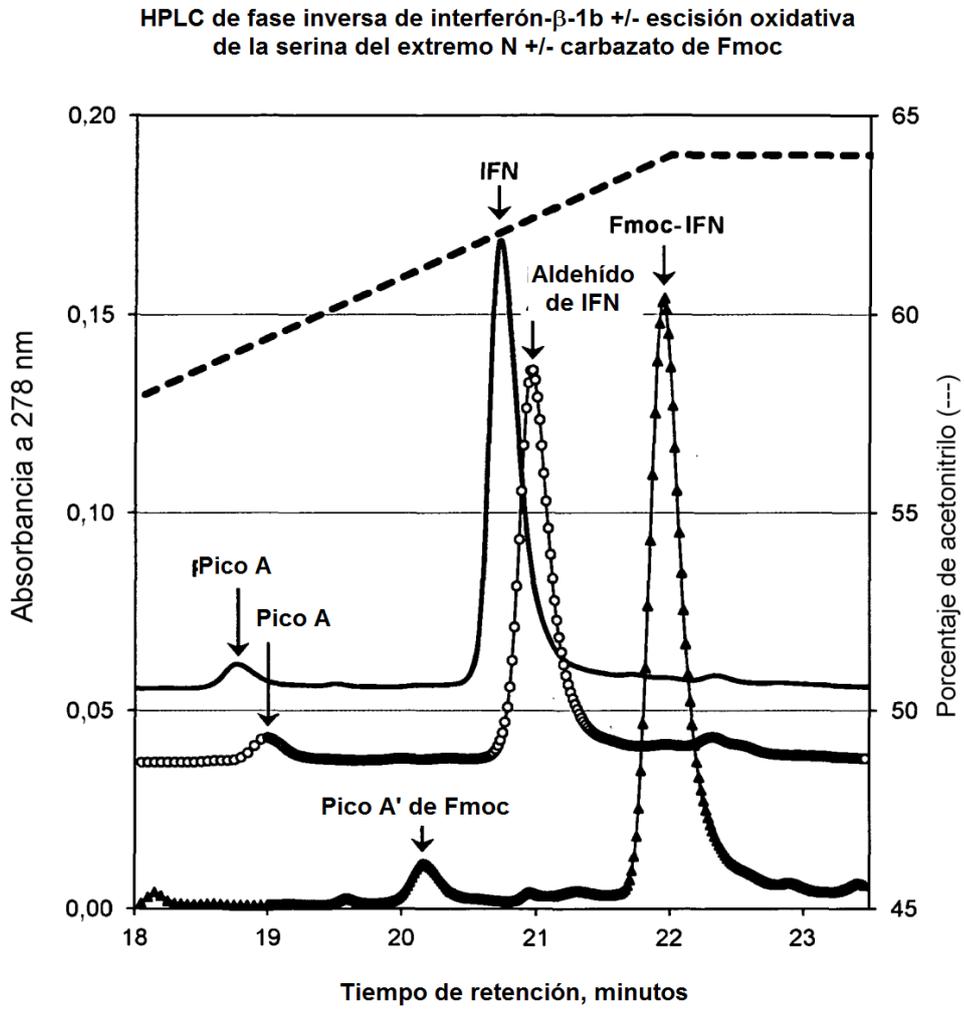


Figura 8

Transcurso de tiempo de la oxidación de interferón-β-1b antes de la reacción con carbazato de PEG, mostrado por HPLC de exclusión por tamaño

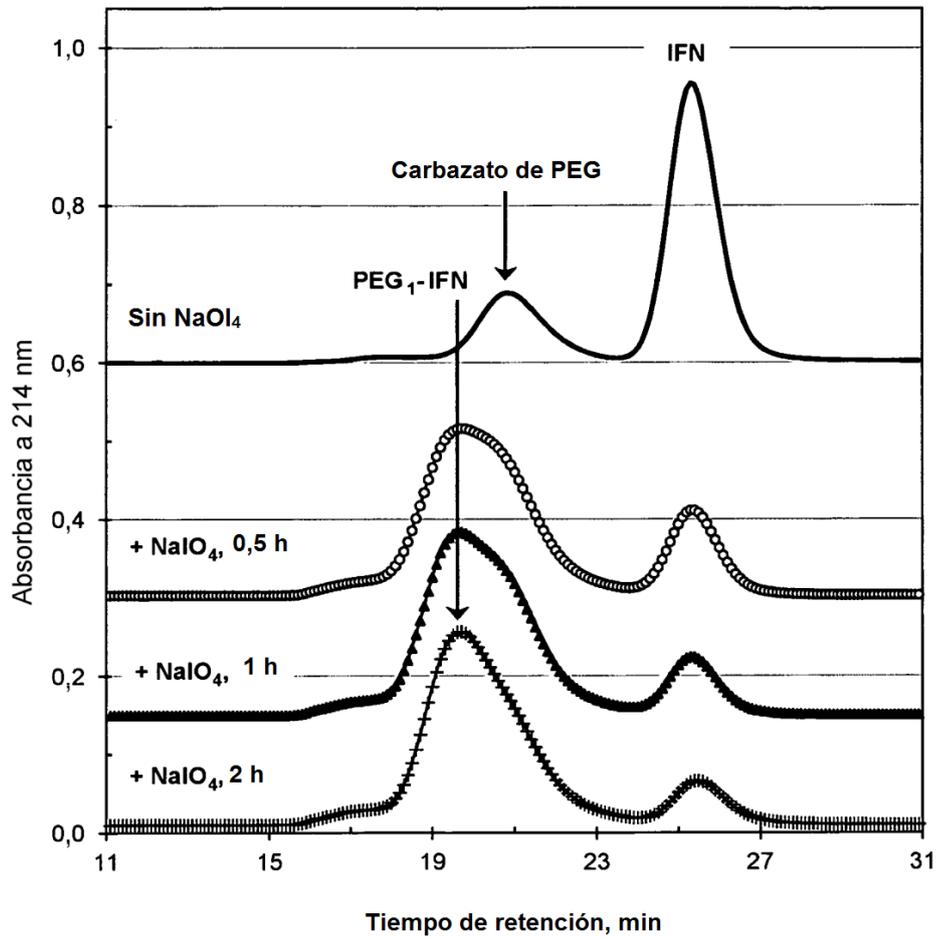


Figura 9

Inhibición del crecimiento de células Daudi por IFN- β -1b sin tratar y por fracciones de HPLC de fase inversa que contienen IFN- β -1b PEGilado vacío o monoPEGilado

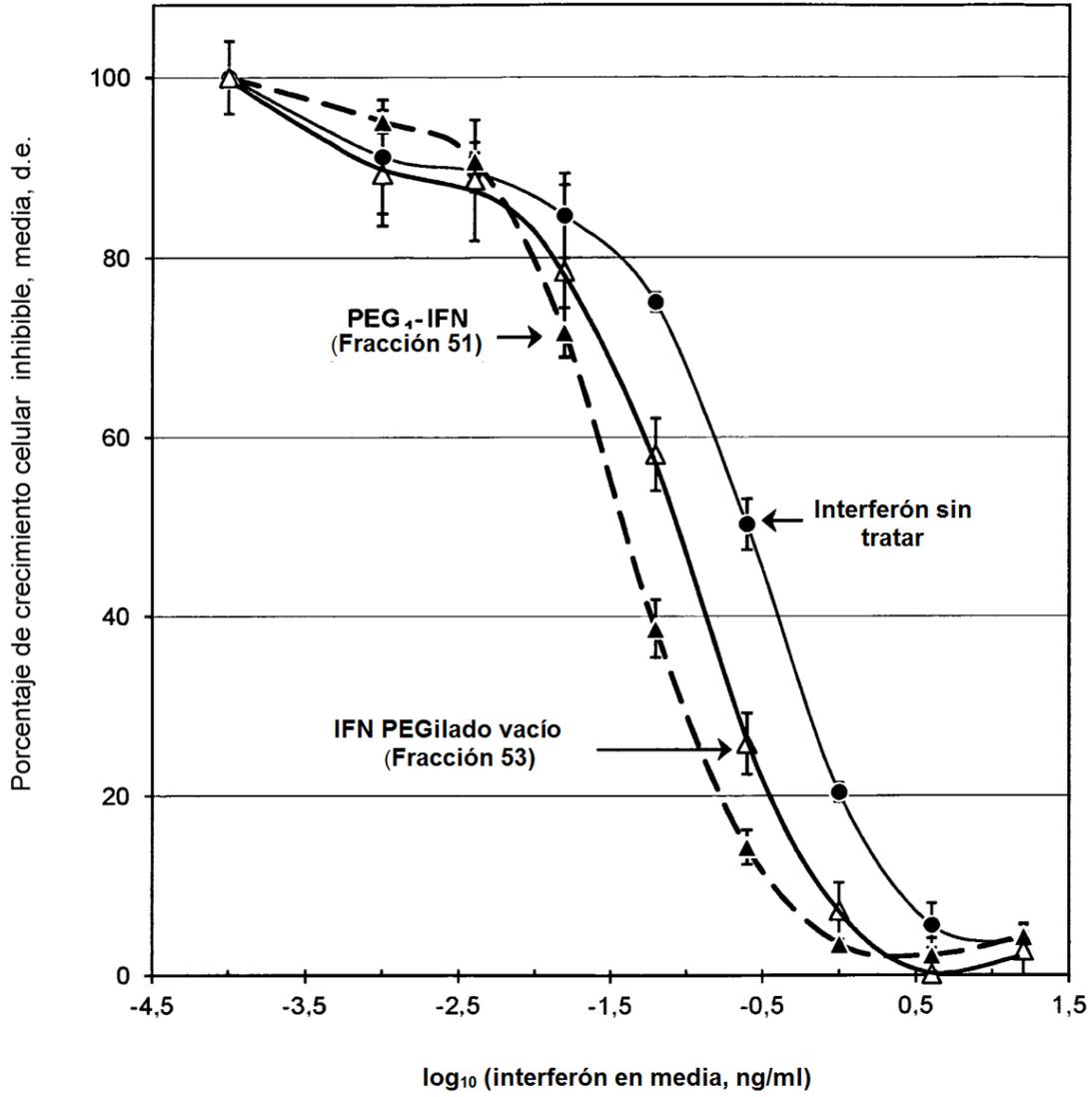


Figura 10