

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 121**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2008 E 08704601 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **11.11.2009 EP 2114438**

54 Título: **Un complejo insulínico utilizando un fragmento de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

05.01.2007 KR 20070001662

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.01.2013

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550, Dongtangiheung-ro Dongtan-myeon
Hwaseong-si
Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**SONG, DAE HAE;
LIM, CHANG KI;
SONG, TAE HUN;
KIM, YOUNG HOON;
KWON, SE CHANG;
LEE, GWAN SUN;
JUNG, SUNG YOUB y
CHOI, IN YOUNG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 394 121 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

Un complejo insulínico utilizando un fragmento de inmunoglobulina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un conjugado de un péptido insulínico para una formulación de acción prolongada de un péptido insulínico. Específicamente, la presente invención se refiere a un conjugado de un péptido insulínico modificado que tiene una duración de eficacia *in vivo* notablemente mejorada, generada enlazando covalentemente el péptido insulínico con un polímero no peptídico y una inmunoglobulina Fc, y un método para la preparación del mismo

Antecedentes de la invención

10 Los péptidos tienden a ser fácilmente desnaturalizados debido a su baja estabilidad, degradados por enzimas proteolíticas *in vivo*, perdiendo así la actividad, y tienen un tamaño relativamente pequeño, pasando así fácilmente a través del riñón. Por consiguiente, con el propósito de mantener los niveles en sangre y los títulos de un medicamento que comprende un péptido como componente farmacéuticamente efectivo, es necesario administrar frecuentemente el fármaco peptídico a un paciente para mantener los niveles y los títulos deseados en sangre. Sin embargo, los fármacos peptídicos usualmente se administran en forma de preparaciones inyectables y su administración frecuente ocasiona dolor severo a los pacientes. Para resolver estos problemas, se han hecho muchos esfuerzos. En uno de tales esfuerzos, se ha intentado transferir el fármaco peptídico por medio de inhalación orofaríngea o nasofaríngea, aumentando la trasmisión del fármaco peptídico a través de las membranas biológicas. Sin embargo, con este enfoque todavía es difícil mantener la actividad *in vivo* del fármaco peptídico debido a la baja eficiencia de la transferencia *in vivo*, en comparación con la inyección.

25 Por otra parte, se han hecho muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad del fármaco peptídico en la sangre, y para mantener el fármaco en la sangre en un nivel alto durante un periodo prolongado de tiempo, maximizando así la eficacia farmacéutica del fármaco. La preparación de acción prolongada de tal fármaco peptídico requiere por lo tanto aumentar la estabilidad del fármaco peptídico y mantener los títulos a niveles suficientemente altos sin ocasionar respuestas inmunes en los pacientes.

30 Como un método para estabilizar el péptido, e inhibir la degradación por una enzima proteolítica, se han hecho algunas pruebas para modificar una secuencia específica de aminoácidos que es sensible a la enzima proteolítica. Por ejemplo, GLP-1 (amida 7 - 37 o 7 - 36), que funciona para reducir la concentración de glucosa en la sangre para tratar una diabetes tipo 2, tiene una vida media corta de la actividad fisiológica de aproximadamente 4 minutos, o menos (Kreymann et al., 1987), debido a la pérdida de los títulos del GLP-1 por el corte entre el 8° aminoácido (Ala) y el 9° aminoácido (Asp) causado por una dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). Como resultado, se han hecho varias investigaciones sobre un análogo de GLP-1 que tenga resistencia a DPP IV, y se han hecho pruebas para la sustitución de Ala⁸ con Gly (Deacon et al., 1998; Burcelin et al., 1999), o con Leu o D-Ala (Xiao et al., 2001), aumentando así la resistencia a DPP IV, pero manteniendo la actividad. El aminoácido del terminal N, His⁷ de GLP-35 T, es crítico, para la actividad de GLP-1 y sirve como un objetivo de DPP IV. Por consiguiente, la patente de EE. UU. No. 5.545.618 describe que el terminal N se modifica con un grupo alquilo o acilo, y Gallwitz et al. describen que la 7^a His fue sometida a metilación en N, o metilación en alfa, o se sustituyó toda la His con imidazol para incrementar la resistencia a DPP IV, y para mantener la actividad fisiológica.

40 Además de estas modificaciones, un exendina-4, que es un análogo de GLP-1 purificado de la glándula salival del monstruo de Gila (patente de EE. UU. No. 5.424.686), tiene resistencia a DPP IV, y una actividad fisiológica más alta que GLP-1. Como resultado, tenía una vida media *in vivo* de 2 a 4 horas, que era más larga que aquella de GLP-1. Sin embargo, con el método para aumentar la resistencia a DPP IV únicamente, la actividad fisiológica no es suficientemente sostenida y, por ejemplo, en el caso de un exendina-4 comercialmente disponible (exenatida), se requiere inyectar a un paciente dos veces al día, que todavía es difícil para los pacientes.

45 Estos péptidos insulínicos tienen un problema, usualmente porque el tamaño del péptido es pequeño. De esta manera, no pueden ser recuperados en el riñón, y entonces son descargados fuera del organismo. Por consiguiente, se ha usado un método para añadir químicamente una sustancia polimérica que tiene alta solubilidad, tal como polietilén glicol (PEG), sobre la superficie del péptido para inhibir la pérdida en el riñón.

50 El PEG no se enlaza específicamente a un sitio específico o a diferentes sitios de un péptido objetivo para producir el efecto de incrementar el peso molecular de un péptido, y de esta manera inhibir la pérdida en el riñón, y prevenir la hidrólisis, sin ocasionar ningún efecto secundario. Por ejemplo, la publicación internacional de patente WO 2006/076471 describe que PEG enlaza a un péptido natriurético de tipo B, o BNP, que se enlaza con NPR-A para activar la producción de GMPc, que conduce a una reducción de la presión sanguínea arterial, y como resultado, se usa como un agente terapéutico para la insuficiencia cardiaca congestiva, manteniendo así la actividad fisiológica. La patente de EE. UU. No. 6.924.264 describe que PEG se enlaza al residuo de lisina de una exendina-4 para aumentar su tiempo de residencia *in vivo*. Sin embargo, este método aumenta el peso molecular del PEG, aumentando así el tiempo de residencia *in vivo* del fármaco peptídico, pero conforme aumenta el peso molecular, el

título del fármaco peptídico se reduce notablemente y la reactividad con el péptido también se reduce. Por consiguiente, reduce indeseablemente el rendimiento.

5 La publicación internacional de patente No. WO 02/46227 describe una proteína de fusión preparada acoplando GLP-1, una exendina-4, o un análogo de los mismos con albúmina de suero humano o una región de inmunoglobulina (Fc), usando tecnología de recombinación genética. La patente de EE. UU. No. 6.756.480 describe una proteína de fusión de Fc preparada acoplando una hormona paratiroidea (PTH) y un análogo de la misma con la región Fc. Estos métodos pueden manejar problemas tales como bajo rendimiento de pegilación y falta de especificidad, pero todavía tienen el problema de que el efecto del aumento de la vida media en la sangre no es como se esperaba, y algunas veces los títulos también son bajos. Para maximizar el efecto del aumento de la vida media en la sangre, se usan varios tipos de enlazadores de péptido, pero posiblemente pueden causar una respuesta inmune. Además, si se utiliza un péptido que tiene enlaces disulfuro, tal como BNP, existe una alta probabilidad de plegamiento erróneo. Como resultado, difícilmente se puede usar dicho péptido.

15 Además, un derivado de GLP-1, NN2211, se prepara por sustitución del aminoácido de GLP-1, y se enlaza a una cadena lateral acilo para formar un enlace no covalente con albúmina, aumentando así su tiempo de residencia *in vivo*. Sin embargo, tienen una vida media de 11 a 15 horas, lo que no indica un aumento notable en la vida media, en comparación con la exendina-4. De esta manera, el derivado de GLP-1 todavía requiere ser inyectado una vez al día (Nauck et al., 2004). Además, CJC-1131 es un derivado de GLP-1 que tiene un grupo reactivo de maleimida para enlazar covalentemente al GLP-1 con albúmina en la sangre, y se han hecho esfuerzos por desarrollar el CJC-1131 con la finalidad de aumentar la vida media *in vivo*, pero tales esfuerzos se detuvieron ahora. Una sustancia sugerida posteriormente, CJC-1134, es una exendina-4 que se enlaza covalentemente a una albúmina recombinante, y no exhibió un efecto notable de aumentar la estabilidad en la sangre, siendo la vida media en la sangre de aproximadamente 17 horas (en Rata) (Thibauoleau et al., 2006).

Divulgación de la invención

Problema técnico

25 En consecuencia, los presentes inventores enlazaron una inmunoglobulina Fc y un polímero no peptídico a un péptido insulínico, específicamente en el sitio en un residuo de aminoácido diferente al terminal N por medio de un enlace covalente, y se encontró que el conjugado de la presente invención ejerce una eficacia *in vivo* y una vida media notablemente mejoradas. Especialmente, encontraron que, entre los conjugados de péptidos insulínicos, los conjugados de péptidos tales como Exendina-4, des-amino-histidil exendina-4, en donde el grupo amino del terminal N de la exendina-4 está suprimido, beta-hidroxi-imidazo-propionil-exendina-4 en donde el grupo amino del terminal N de la exendina-4 está sustituido con un grupo hidroxilo, dimetil-histidil-exendina-4 en donde el grupo amino del terminal N de la exendina-4 está modificado con dos grupos metilo, y una imidazo-acetil-exendina-4, en donde el carbono alfa de la primera histidina y el grupo amino del terminal N enlazado al mismo están suprimidos, ejercen una eficacia y una vida media notablemente mejoradas *in vivo*.

35 Solución técnica

Un objetivo de la presente invención es proveer una preparación de acción prolongada del péptido insulínico, que tiene los efectos de mantener la actividad *in vivo* del péptido insulínico y aumentar la vida media en la sangre.

Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de exendina-4(N)-PEG-inmunoglobulina Fc nativa;

La figura 2 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc nativa;

45 La figura 3 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de des-amino-histidil-exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc;

La figura 4 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de (2-hidroxi-3-(1H-imidazol-4-il)propionil) exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc;

La figura 5 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de (2-(1H-imidazol-4-il)acetil)-exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc;

50 La figura 6 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de des-amino-histidil-exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc mutado con Ser12;

La figura 7 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de des-amino-histidil-exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc mutado con Arg12;

La figura 8 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de des-amino-histidil-exendina-4(Lys)-PEG-albúmina de suero humana (HSA);

La figura 9 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de dimetil-histidil-exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc;

- 5 La figura 10 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de GLP-1(N)-PEG-inmunoglobulina Fc;

La figura 11 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de des-amino-histidil GLP-1(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc;

- 10 La figura 12 muestra los resultados de la HPLC de fase reversa para medir la pureza de un conjugado de exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc nativa;

La figura 13 muestra los resultados de la medición de pureza de un conjugado de (2-(1H-imidazol-4-il)acetil)-exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc por medio de SDS-PAGE al 12%; y

La figura 14 muestra los resultados de la medición del efecto reductor de la concentración de glucosa en la sangre de un conjugado de des-amino-histidil exendina-4(Lys)-PEG-inmunoglobulina Fc.

- 15 Mejor modo de llevar a cabo la invención

En una realización de la presente invención, se provee un conjugado del péptido insulínico de acción prolongada, en el cual un péptido insulínico y un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo en ambos terminales del mismo están enlazados covalentemente entre sí.

- 20 El péptido insulínico de la presente invención es un péptido que posee una función insulínica para promover la síntesis y la expresión de insulina en una células beta pancreática. Estos péptidos incluyen un precursor, un agonista, un derivado, un fragmento, y una variante, y preferiblemente GLP (péptido de tipo glucagón)-1, exendina 3 y exendina 4.

- 25 GLP-1 es una hormona que es secretada por el intestino delgado, generalmente promueve la biosíntesis y secreción de insulina, inhibe la secreción de glucagón y promueve la absorción de glucosa en las células. En el intestino delgado, un precursor del glucagón se descompone en tres péptidos, es decir, glucagón, GLP-1 y GLP-2. Aquí, el GLP-1 significa GLP-1 (1 - 37), que originalmente está en la forma que no tiene función insulínica. Pero es luego procesado y convertido en la forma GLP-1 activada (7 - 37). La secuencia del aminoácido GLP-1 (7 - 37) es la siguiente:

GLP-1 (7 - 37)

- 30 HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFAIW LVKGR G

El derivado de GLP-1 significa un péptido que exhibe una homología de secuencia de aminoácidos de por lo menos 80% con aquella de GLP-1, puede estar en la forma químicamente modificada, y exhibe una función insulínica que es por lo menos equivalente o mayor a aquella de GLP-1.

- 35 El fragmento de GLP-1 significa uno en la forma en la cual uno o más aminoácidos son añadidos o suprimidos en un terminal N o un terminal C de un GLP-1 nativo, en donde el aminoácido añadido posiblemente es un aminoácido de origen no natural (por ejemplo, un aminoácido tipo D).

La variante de GLP-1 significa un péptido que posee una función insulínica, que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de aquellos de un GLP-1 nativo.

- 40 El exendina 3 y exendina 4 son péptidos insulínicos que consisten en 39 aminoácidos, que tienen un 53% de homología de secuencia de aminoácido con GLP-1. Las secuencias de aminoácidos de la exendina-3 y de la exendina-4 son las siguientes:

Exendina-3

HSDGT FTSDL SKQME EAVR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS

Exendina-4

- 45 HGET FTSDL SKQME EAVR LFIEW LKNGG PSSGAPPS

El agonista de exendina significa un compuesto que reacciona con receptores *in vivo* y que tiene una actividad biológica igual a aquella de la exendina, que es irrelevante para la estructura de la exendina. El derivado de exendina significa un péptido que tiene por lo menos 80% de homología de secuencia de aminoácidos con la

exendina nativa, que puede tener algunos grupos sobre en el residuo de aminoácidos químicamente sustituido (por ejemplo, metilación en alfa, hidroxilación en alfa), suprimidos (por ejemplo, desaminación), o modificados (por ejemplo, metilación en N), y tiene una función insulínica.

5 El fragmento de exendina significa un fragmento que tiene uno o más aminoácidos añadidos o suprimidos en el terminal N o en el terminal C de la exendina nativa, en el cual pueden añadirse aminoácidos de origen no natural (por ejemplo, un aminoácido tipo D), y tiene una función insulínica.

La variante de exendina significa un péptido que tiene al menos una secuencia de aminoácidos diferente de aquella de la exendina nativa, en la cual tiene una función insulínica.

10 Cada uno de los métodos de preparación para el agonista, derivado, el fragmento y la variante de exendina, pueden ser utilizados individualmente o en combinación. Por ejemplo, la presente invención incluye un péptido insulínico que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un aminoácido diferente de aquellos del péptido insulínico nativo, y que tiene el residuo de aminoácido en el terminal N desaminado.

15 En una realización específica, el péptido insulínico nativo usado en la presente invención, y el péptido insulínico modificado pueden ser sintetizados usando un método de síntesis en fase sólida, y la mayoría de los péptidos nativos, incluyendo un péptido insulínico nativo, pueden ser producidos mediante una tecnología recombinante.

Además, el péptido insulínico usado en la presente invención se puede enlazar al polímero no peptídico en diferentes sitios.

20 El conjugado peptídico preparado de acuerdo con la presente invención puede tener una actividad que varía dependiendo de los sitios que se van a enlazar al péptido insulínico.

25 Por ejemplo, se puede acoplar con un terminal N, y el otro terminal diferente del terminal N, tal como un terminal C, respectivamente, lo que indica una diferencia en la actividad *in vitro*. El grupo reactivo aldehído se enlaza selectivamente a un terminal N a un pH bajo, y se puede enlazar a un residuo de lisina para formar un enlace covalente a un pH alto, tal como pH 9,0. Se deja que proceda una reacción de pegilación variando el pH, y después se puede separar un isómero posicional de la mezcla de reacción usando una columna de intercambio iónico.

Si el péptido insulínico se va a acoplar en un sitio diferente del terminal N, que es un sitio importante para la actividad *in vivo*, se puede introducir un grupo reactivo tiol en el sitio del residuo de aminoácido que va a ser modificado en la secuencia nativa de aminoácidos, para formar enlace covalente usando un enlazador de maleimida en el polímero no peptídico.

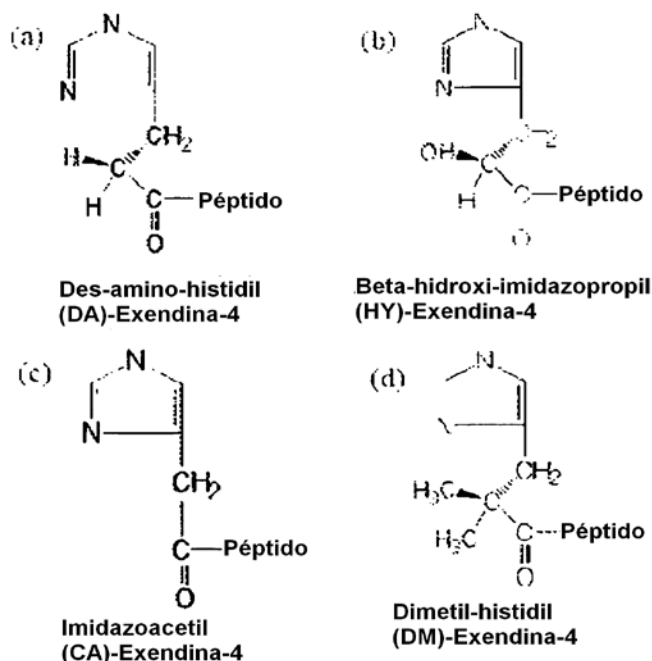
30 Si el péptido insulínico se va a acoplar en un sitio diferente del terminal N, que es un sitio importante para la actividad *in vivo*, se puede introducir un grupo reactivo amino en el sitio del residuo de aminoácido que va a ser modificado en la secuencia nativa de aminoácidos, para formar un enlace covalente, usando un enlazador de aldehído en el polímero no peptídico.

35 Cuando se usa el enlazador de aldehído en el polímero no peptídico, reacciona con un grupo amino en el terminal N y el residuo de lisina, y se puede usar una forma modificada del péptido insulínico para aumentar selectivamente el rendimiento de la reacción. Por ejemplo, se puede retener en un sitio deseado solo un grupo amino que va a reaccionar, usando un método de bloqueo del terminal N, un método de sustitución del residuo de lisina, un método para introducir un grupo amino en un terminal carboxilo, o similar, aumentando así el rendimiento de las reacciones de pegilación y acoplamiento. Los métodos para proteger el terminal N incluyen desmetilación, así como también metilación, desaminación, acetilación, etc., pero no se limitan a estos métodos de alquilación.

En una realización preferida, el conjugado de péptido insulínico de la presente invención es un conjugado de péptido insulínico, en el cual una región Fc de inmunoglobulina se enlaza específicamente a un grupo amina diferente de aquellos en el terminal N del péptido insulínico.

45 En una realización específica, los presentes inventores indujeron una pegilación de un exendina-4 nativa pH 9,0, para acoplar selectivamente el PEG al residuo de lisina del péptido insulínico. Alternativamente, para pegar en el residuo de Lys, la pegilación de los derivados de exendina-4 que tienen el terminal N suprimido o protegido se realizó a un pH de 7,5. La pegilación en el terminal N se bloqueo, ya sea suprimiendo el grupo amino alfa de la histidina del terminal N, por medio de la sustitución del grupo amino del terminal N, con un grupo hidroxilo, modificando el grupo amino alfa de la histidina del terminal N con dos grupos metilo, o por medio de la supresión del carbono alfa del primer aminoácido (histidina) y el grupo amino del terminal N enlazado al mismo, para dejar el grupo
50 imidazo - acetilo, etc. Tales derivados se representan mediante las siguientes Fórmulas Químicas:

Fórmula Química 1



A diferencia del acoplamiento en el terminal N, cuando el PEG se acopló con el residuo de lisina en lugar del terminal N, la actividad *in vitro* se mantuvo aproximadamente en el 8.5% (Tabla 1). Además, incluso si los conjugados de Fc de des-amino-histidil-exendina-4 (en adelante, denominado como DA-exendina-4), preparados mediante la supresión el grupo amino del terminal N de la exendina-4, beta-hidroxi-imidazol-propionil-exendina-4 (en adelante, denominado como HY-exendina-4), preparados mediante la sustitución del grupo amino del terminal N de exendina-4 con un grupo hidroxilo, dimetil-histidil-exendina-4 (en adelante, denominado como DM-exendina-4), preparado mediante la modificación del grupo amino del terminal N de la exendina-4 con dos grupos metilo, e imidazolacetil-exendina-4 (en adelante, denominado como CA-exendina-4), preparado mediante la supresión del carbono alfa de la primera histidina de la exendina-4 y el grupo amino del terminal N enlazado al mismo, mostraron una actividad *in vitro* y una vida media en sangre comparables con el conjugado de exendina-4 nativa (Tabla 1), estos conjugados mostraron inesperadamente una duración de la eficacia *in vivo* inesperadamente alta (figura 14). El conjugado DM-exendina-4-inmunoglobulina Fc, el conjugado DA-exendina-4-inmunoglobulina Fc, el conjugado CA-exendina-4-inmunoglobulina Fc, y el conjugado HY-exendina-4-inmunoglobulina Fc, preparados de acuerdo con la presente invención, mostraron una vida media en sangre incrementada, de 50 horas o más. La reducción del título también se minimizó por medio del acoplamiento al residuo de Lys que no afecta la actividad del péptido. Además, se observó una actividad reductora de glucosa inesperadamente alta mediante la remoción del grupo amino o el carbono alfa del terminal N.

La región Fc de inmunoglobulina es segura de usar como un portador del fármaco porque es un polipéptido biodegradable que es metabolizado *in vivo*. También, la región Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo en comparación con las moléculas completas de inmunoglobulina, y de esta manera es ventajosa en la preparación, purificación, y rendimiento del conjugado. Puesto que la región Fc de inmunoglobulina no contiene un fragmento Fab, cuya secuencia de aminoácidos difiere de acuerdo con las subclases de anticuerpo y que de esta manera es altamente no homogéneo, se puede esperar que la región Fc de inmunoglobulina pueda aumentar mucho la homogeneidad de las sustancias y ser menos antigénica.

El péptido insulínico usado en la presente invención se enlaza con una sustancia portadora y un polímero no peptídico.

La sustancia que sirve como vehículo que puede ser utilizada en la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en una región Fc de inmunoglobulina, una albúmina, una transferrina, y un PEG, y preferiblemente una región Fc de inmunoglobulina.

El término "región Fc de inmunoglobulina", como se usa aquí, se refiere a la región constante 2 de cadena pesada (C_{H2}) y la región constante 3 de cadena pesada (C_{H3}) de una inmunoglobulina, y no las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante 1 de cadena pesada (C_{H1}) y la región constante 1 de cadena ligera (C_{L1}) de la inmunoglobulina. Además, puede incluir una región de bisagra en la región constante de cadena pesada. También, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede contener una parte o toda la región Fc que incluye la región constante 1 de cadena pesada (C_{H1}) y/o la región constante 1 de cadena ligera (C_{L1}), excepto por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, siempre que tenga una función fisiológica sustancialmente

similar o mejor que la proteína nativa. También, la región Fc de Ig puede ser un fragmento que tiene una supresión en una porción relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de C_{H2} y/o C_{H3}. Esto es, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede comprender 1) un dominio C_{H1}, un dominio C_{H2}, un dominio C_{H3} y un dominio C_{H4}, 2) un dominio C_{H1} y un dominio C_{H2}, 3) un dominio C_{H1} y un dominio C_{H3}, 4) un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3}, 5) una combinación de uno más dominios y una región de bisagra de inmunoglobulina (o una porción de la región de bisagra), y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de cadena pesada y la región constante de cadena ligera.

La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención incluye una secuencia nativa de aminoácidos, y una secuencia derivada (mutante) de la misma. Un derivado de una secuencia de aminoácidos es una secuencia que es diferente de la secuencia nativa de aminoácidos debido a una supresión, una inserción, una sustitución conservadora o no conservadora, o combinaciones de los mismos, de uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, en una Fc de IgG, los residuos de aminoácido que se sabe son importantes en el enlazamiento, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331, se pueden usar como un objetivo adecuado para modificación. También son posibles otros diversos derivados, incluido uno en el cual se suprime una región capaz de formar un enlace disulfuro, o ciertos residuos de aminoácido se eliminan en el terminal N de la forma Fc nativa o se añade un residuo de metionina a la misma. Además, para remover funciones efectoras, puede ocurrir una supresión en un sitio de enlazamiento del complemento, tal como un sitio de enlazamiento de C1q y un sitio de ADCC (citotoxicidad mediada por células que depende del anticuerpo). Las técnicas para preparar tales derivados de la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se divulgan en las publicaciones internacionales de patente Nos. WO 97734631 y WO 96/32478.

Los intercambios de aminoácidos en proteínas y en péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las moléculas son conocidos en el arte (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios que ocurren más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly, en ambas direcciones.

Si se desea, la región Fc se puede modificar por medio de fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, etcétera.

Los derivados de Fc anteriormente mencionados son derivados que tienen una actividad biológica idéntica a la región Fc de la presente invención, o estabilidad estructural mejorada, por ejemplo contra el calor, pH, o similares.

Además, estas regiones Fc se pueden obtener a partir de formas nativas aisladas de humanos y de otros animales que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y conejillos de indias, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos a partir de células animales o microorganismos transformados. Aquí, se pueden obtener de una inmunoglobulina nativa por medio del aislamiento de inmunoglobulinas completas de organismos humanos o animales y tratándolas con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en regiones Fab y Fc, y el tratamiento con pepsina conduce a la producción de los fragmentos pF_c y F(ab)₂. Estos fragmentos pueden ser sometidos, por ejemplo, a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF_c.

Preferiblemente, una región Fc derivada de humano es una región Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene de un microorganismo.

Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede estar en la forma que tiene cadenas de azúcar nativas, mayor cantidad de cadenas de azúcar en comparación con una forma nativa, o menor cantidad de cadenas de azúcar en comparación con la forma nativa, o puede estar en una forma desglucosilada. El incremento, reducción o eliminación de las cadenas de azúcar de Fc de inmunoglobulina se puede lograr mediante métodos comunes en el arte, tales como un método químico, un método enzimático y un método de modificación por ingeniería genética usando un microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de una región Fc da como resultado una reducción aguda en la afinidad de enlazamiento con la parte C1q del primer componente C1 del complemento, y una reducción o pérdida de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo o de citotoxicidad dependiente del complemento, no induciendo así respuestas inmunes innecesarias *in vivo*. En este sentido, una región Fc de inmunoglobulina en una forma desglucosilada o aglicosilada puede ser más adecuada para el objetivo de la presente invención como portador del fármaco.

Como se usa aquí, el término "desglucosilación" se refiere a la eliminación enzimática de fracciones de azúcar de una región Fc, y el término "aglicosilación" significa que se produce una región Fc en una forma no glicosilada por parte de un procarionta, preferiblemente *E. coli*.

Por otra parte, la región Fc de inmunoglobulina se puede derivar de humanos u otros animales que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y conejillos de indias, y preferiblemente humanos. Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que es elaborada por combinaciones de las mismas o de híbridos de las mismas. Preferiblemente, se deriva de IgG o IgM, que están entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y más preferiblemente de IgG, que se sabe incrementa las vidas medias de proteínas de enlazamiento del ligando.

- 5 Por otra parte, el término "combinación", como se usa aquí, significa que polipéptidos que codifican regiones Fc de inmunoglobulina de una sola cadena» del mismo origen, están enlazados a un polipéptido de una sola cadena de un origen diferente para formar un dímero o un multímero. Esto es, un dímero o multímero pueden formarse a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste de fragmentos de Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD, Fc de IgE.
- 10 El término "híbrido", como se usa aquí, significa que están presentes secuencias que codifican dos o más regiones Fc de inmunoglobulina de origen diferente en una región Fc de inmunoglobulina de una sola cadena. En la presente invención, son posibles diferentes tipos de híbridos. Esto es, los híbridos de dominio pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste de C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4} de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA Fc de IgE y Fc de IgD, y pueden incluir la región de bisagra.
- 15 Por otra parte, IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente invención incluye combinaciones e híbridos de las mismas. Se prefieren las subclases IgG2 e IgG4, y la más preferida es la región Fc de IgG4 que raramente tiene funciones efectoras tales como CDC (citotoxicidad que depende del complemento).
- 20 Esto es, como el portador del fármaco de la presente invención, la región Fc de inmunoglobulina más preferida es una región Fc no glicosilada derivada de IgG4 humana. La región Fc derivada de humano es mas preferible que una región Fc derivada de un animal no humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y provocar respuestas inmunes indeseables, tales como la producción de un anticuerpo nuevo contra el antígeno.
- 25 El término "polímero no peptídico", como se usa aquí, se refiere a un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades repetidas enlazadas entre sí por medio de cualquier enlace covalente, excluyendo un enlace peptídico.
- 30 El polímero no peptídico que puede ser usado en la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste de polietilén glicol, polipropilén glicol, copolímeros de etilén glicol y propilén glicol, polioles polioxiethylados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables tales como PLA (ácido poliláctico) y PLGA (ácido glicólico-poliláctico), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos, y se prefiere polietilén glicol. También se incluyen en el alcance de la presente invención derivados de los mismos bien conocidos en el arte y que son fácilmente preparados en la práctica normal de la técnica.
- 35 El enlazador de péptido que se usa en la proteína de fusión obtenida por un método convencional de fusión en el marco tiene las desventajas de que es fácilmente escindido *in vivo* por una enzima proteolítica, y por lo tanto no puede obtenerse como se esperaba un efecto suficiente de incremento de vida media de actividad del fármaco en la sangre por medio de un portador. Sin embargo, en la presente invención se puede usar un polímero que tiene resistencia a la enzima proteolítica para mantener la vida media en sangre del péptido similar a la del portador. Por lo tanto, cualquier polímero no peptídico que puede ser utilizado en la presente invención puede ser usado sin ninguna limitación, siempre que sea un polímero que tenga la función anteriormente mencionada, esto es, un polímero que tenga resistencia a la enzima proteolítica *in vivo*. Preferiblemente, el polímero no peptídico tiene un peso molecular en el rango de 1 a 100 kDa, y preferiblemente de 1 a 20 kDa. También, el polímero no peptídico de la presente invención enlazado con la región Fc de inmunoglobulina, puede ser un polímero o una combinación de diferentes tipos de polímeros.
- 40 El polímero no peptídico usado en la presente invención tiene un grupo reactivo capaz de unirse a la región Fc de inmunoglobulina y el fármaco proteico.
- 45 El polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de un grupo aldehído reactivo, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimido, y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, hidroxisuccinimidilo, carboximetilsuccinimidilo, o carbonato de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptídico tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos, es efectivo en el enlazamiento en ambos extremos con un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina, con reacciones no específicas mínimas. Un producto final generado por alquilación reductiva por medio de un enlace aldehído es mucho más estable que cuando se enlaza por medio de un enlace amida. El grupo aldehído reactivo se enlaza selectivamente a un terminal N a un pH bajo, y puede enlazarse a un residuo de lisina para formar un enlace covalente a un pH alto, tal como pH 9,0.
- 50 Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede tener un grupo maleimida en un extremo y en el otro extremo un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído. Cuando se utiliza un polietilenglicol que tiene un grupo hidroxil reactivo en ambos extremos del mismo, como polímero no peptídico, el grupo hidroxil puede ser activado para varios grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o se puede usar un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo modificado que se encuentra comercialmente disponible a fin de preparar el conjugado de péptido insulínico de la presente invención.
- 55 El conjugado de péptido insulínico de la presente invención mantiene las actividades convencionales *in vivo* del péptido insulínico, tales como la promoción de la síntesis y secreción de insulina, control del apetito, pérdida de

peso, aumento de la sensibilidad de las células beta a la glucosa en sangre, promoción de la proliferación de células beta, retardo del vaciado gástrico, y supresión de glucagón, e incrementa notablemente además la vida media en sangre del péptido insulínico, y por lo tanto el efecto de sostenimiento de la eficacia *in vivo* del péptido, es útil para tratar la diabetes, obesidad, síndrome coronario agudo, o síndrome del ovario poliquístico.

5 En otra realización, la presente invención provee un método para preparar un conjugado de péptido insulínico, que comprende las etapas de:

(1) enlazar covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste de derivados de aldehído, de maleimida, y de succinimida en ambos extremos del mismo, con un grupo amino o un grupo tiol del péptido insulínico;

10 (2) aislar un conjugado que comprende al péptido insulínico de la mezcla de reacción de (1), en donde el polímero no peptídico está enlazado covalentemente a un sitio diferente del terminal N; y

(3) enlazar covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del conjugado aislado, para producir un conjugado de péptido que comprende la región Fc de inmunoglobulina y el péptido insulínico, que están enlazados a cada extremo del polímero no peptídico.

15 El término "conjugado", como se usa aquí, se refiere a un intermediario preparado enlazando covalentemente el polímero no peptídico con el péptido insulínico, y posteriormente enlazando la región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico.

En una realización preferida, la presente invención provee un método para preparar un conjugado de péptido insulínico, que comprende las etapas de:

20 (1) enlazar covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos del mismo, con el residuo de lisina del péptido insulínico;

(2) aislar un conjugado que comprende al péptido insulínico de la mezcla de reacción de (1), en el cual el polímero no peptídico está enlazado covalentemente al residuo de lisina; y

25 (3) enlazar covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del conjugado aislado, para producir un conjugado de proteína que comprende la región Fc de inmunoglobulina y el péptido insulínico, que están enlazados a cada extremo del polímero no peptídico. Más preferiblemente, el polímero no peptídico de (1) y el residuo de lisina del péptido insulínico se enlazan a un pH 7,5 o superior.

En una realización adicional, la presente invención provee una composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes, que comprende al conjugado del péptido insulínico de la presente invención.

30 La composición farmacéutica que comprende al conjugado de la presente invención puede incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. Para administración oral, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir un aglutinante, un lubricante, un desintegrador, un excipiente, un solubilizante, un agente de dispersión, un estabilizador, un agente de suspensión, un agente colorante, y un perfume. Para preparaciones inyectables, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente amortiguador, un agente preservante, un analgésico,
35 un solubilizante, un agente isotónico, y un estabilizador. Para preparaciones para administración tópica, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante, y un agente preservante. La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una variedad de formas de dosificación en combinación con los portadores farmacéuticamente aceptables anteriormente mencionados. Por ejemplo, para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en tabletas, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la composición farmacéutica se puede formular en una ampollita como una forma de dosificación de una sola dosis o una forma de dosis unitaria, tal como un contenedor de dosis múltiples. La composición farmacéutica también se puede formular en soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

45 Por otra parte, los ejemplos del portador, el excipiente, y el diluyente adecuados para las formulaciones farmacéuticas incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir también rellenos, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes y antisépticos.

50 El conjugado de acuerdo con la presente invención es útil para tratar diabetes, obesidad, síndrome coronario agudo, o síndrome de ovario poliquístico. Por lo tanto, se puede administrar una composición farmacéutica que comprende al conjugado para el tratamiento de las enfermedades.

El término "administración" como se usa aquí, significa la introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia a un paciente por medio de un cierto método adecuado. El conjugado de la presente invención se puede

administrar por medio de cualquiera de las vías comunes, siempre que sean capaces de alcanzar un tejido deseado. Se contempla una variedad de formas de administración que incluyen administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos de formas de administración. Sin embargo, puesto que los péptidos son digeridos después de administración oral, los ingredientes activos de una composición para administración oral se deben recubrir o formular para protegerlos contra la degradación en el estómago. Preferiblemente, la presente composición puede ser administrada en forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar usando un cierto aparato capaz de transportar los ingredientes activos dentro de una célula objetivo.

La frecuencia y dosis de administración de la composición farmacéutica de la presente invención pueden ser determinadas por medio de diferentes factores relacionados, que incluyen los tipos de enfermedades que van a ser tratadas, vías de administración, la edad, el género, el peso y la severidad de la enfermedad del paciente, así como por medio de los tipos del fármaco como componente activo. Puesto que la composición farmacéutica de la presente invención tiene una excelente duración de eficacia y título *in vivo*, puede reducir notablemente la frecuencia de administración y la dosis de los fármacos de la presente invención.

Se puede lograr una mejor comprensión de la presente invención por medio de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no se consideran como limitantes de la presente invención.

Modo para la invención

Ejemplo 1. Pegilación de exendina-4 y aislamiento del isómero posicional

Se sometieron a pegilación 3.4K PropionALD(2) PEG (teniendo PEG dos grupos propionaldehído, IDB Inc., Corea del Sur) y el terminal N de la exendina-4 (AP, EE. UU.), haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4°C durante 90 min en una proporción molar de 1 : 15, con una concentración de péptido de 3 mg/mL. En este momento, la reacción se realizó en un amortiguador de NaOAc a pH 4.0 a una concentración de 100 mM, y se añadió SCB 20 mM (NaCNBH₃) como agente reductor, para realizar la reacción. Se sometieron 3.4K PropionALD(2) PEG y el residuo de lisina (Lys) de la exendina-4 a pegilación haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4°C durante 3 horas con una proporción molar de 1 : 30, con una concentración de péptido de 3 mg/mL. En este momento, la reacción se realizó en un amortiguador de fosfato de Na a un pH de 9,0 y una concentración de 100 mM, y se agregó SCB 20 mM como agente reductor para llevar a cabo la reacción. Se purificó un péptido monopegilado de cada una de las soluciones de la reacción usando SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences), y se aislaron los isómeros usando SOURCE S (XK 16 ml, Amersham Biosciences). Se encontró que un pico para el terminal N pegilado se encontraba antes, y luego se encontraron a su vez dos picos para los residuos de lisina pegilados. Las regiones pegiladas de los picos eluidos se confirmaron mediante un método de mapeo de l péptido. El conjugado Lys12-pegilado eluyó primero, el conjugado Lys27-pegilado eluyó en la última porción, y un isómero posicional del terminal N y un isómero posicional de Lys-12 se aíslan completamente uno de otro.

Columna: SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences)

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min

Gradiente: A 0 -> 40% 80 min B (A: Tris 20 mM, pH 8,5, B: A + NaCl 0,5 M)

Columna: SOURCE S (XK 16 ml, Amersham Biosciences).

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min

Gradiente: A 0 -> 100% 50 min B (A: ácido cítrico 20 mM, pH 3,0, B: A + KCl 0,5 M)

Ejemplo 2. Preparación del conjugado de exendina-4(N)-PEG-inmunoglobulina Fc.

Usando el mismo método descrito en el Ejemplo 1, se hicieron reaccionar 3.4K PropionALD(2) PEG y el terminal N de la exendina-4, y únicamente se purificaron los isómeros del terminal N, y después se acoplaron con Fc inmunoglobulina. La reacción se realizó a una proporción de péptido : Fc de inmunoglobulina de 1 : 8, y una concentración total de proteína de 50 mg/ml, a 4°C durante 17 horas. La reacción se realizó en una solución de K-P 100 mM (pH 6,0), y a esta se le añadió SCB 20 mM como agente reductor. La solución de reacción de acoplamiento se purificó usando dos columnas de purificación. En primer lugar se usó SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences) para remover una gran cantidad de Fc de inmunoglobulina que no había participado en la reacción de acoplamiento. Usando Tris 26 mM (pH 7,5) y NaCl 1 M con gradientes salinos, se eluyó primero la Fc de inmunoglobulina que tiene poder de enlazamiento relativamente débil, y después se eluyó exendina-4-inmunoglobulina Fc. Por medio de este primer procedimiento de purificación, la Fc de inmunoglobulina se removió hasta cierto grado, pero ya que la Fc de inmunoglobulina y la exendina-4-inmunoglobulina Fc tienen poderes de enlazamiento similares entre si en la columna de intercambio iónico, no pudieron separarse completamente una de la otra. Por consiguiente, se llevó a cabo una purificación secundaria usando la hidrofobicidad de cada uno de los dos materiales. Usando Tris 20 mM (pH 7,5) y sulfato de amonio 1,5 M en SOURCE ISO (HR 16 ml, Amersham

Biosciences), se acoplaron las primeras muestras purificadas y se eluyó la muestra reduciendo gradualmente la concentración de sulfato de amonio. En la columna HIC, la Fc de inmunoglobulina que tiene una potencia de enlazamiento más débil se eluyó primero, y después se eluyó la muestra de exendina-4-inmunoglobulina Fc que tiene una potencia de enlazamiento más fuerte. Puesto que tienen hidrofobicidad notablemente diferente, pueden ser separadas más fácilmente una de otra que en la columna de intercambio iónico. Sin embargo, como se usan cantidades excesivas de Fc de inmunoglobulina debido a la diferencia de proporción molar, no se obtuvo una pureza alta usando solo una columna de HIC. La pureza medida por HPLC de fase reversa fue de 91,6 % (Fig. 1).

Columna: SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences)

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min

10 Gradiente: A 0 -> 25% 70 min B (A: Tris 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)

Columna: SOURCE ISO (HR 16 ml, Amersham Biosciences)

Velocidad de flujo: 7,0 ml/min

Gradiente: B 100 -> 0% 60 min B (A: Tris 20 mM pH 7,5, B: A + sulfato de amonio 1,5 M)

Ejemplo 3. Preparación del conjugado de exendina-4(Lys27)-PEG-inmunoglobulina Fc

15 Usando el mismo método descrito en el Ejemplo 1, se hizo reaccionar 3,4K PropionALD(2) PEG y la lisina(Lys) de la exendina-4, y únicamente se purificaron los isómeros de Lys, y después se acoplaron con inmunoglobulina Fc. Entre los dos picos de isómero, el último pico del isómero (isómero posicional de Lys27), que tiene más reacción y que es fácilmente distinguible de los picos del isómero del terminal N, se usó para la reacción de acoplamiento. La reacción se realizó a una proporción de péptido : inmunoglobulina Fc de 1 : 8, a una concentración total de proteína de 50 mg/ml a 4°C durante 16 horas. La reacción se realizó en una solución de K-P 100 mM (pH 6,0), y se añadió SCB 20 mM como agente reductor. Después de la reacción de acoplamiento, el proceso de purificación de dos etapas usando SOURCE Q 16 ml y SOURCE ISO 16 ml, fue igual que en el Ejemplo 2. La pureza medida por HPLC de fase reversa fue de 91,7 % (Fig. 2).

Ejemplo 4. Preparación del conjugado des-amino-histidil-exendin-4(Lys27)-PEG-inmunoglobulina Fc

25 Para pegar 3.4K PropionALD(2) PEG con el residuo de lisina(Lys) de la des-amino-histidil-exendina-4 (DA-exendina-4, AP, EE. UU.), la pegilación se realizó haciendo reaccionar el péptido y 3,4K PropionALD(2) a 4°C durante 12 horas, a una proporción molar de 1 : 30, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. La solución de la reacción estaba en un amortiguador de fosfato de sodio, pH 7,5, a 100mM, y se añadió SCB 20 mM como agente reductor. Un péptido pegilado se purificó mediante el proceso de purificación de dos etapas usando SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences) y SOURCE S (XK 16 ml, Amersham Biosciences). Entre los dos picos de isómero, el último pico de isómero (isómero posicional de Lys27), que tiene más reacción y que es fácilmente distinguible de los picos del isómero del terminal N, se fue utilizado para la reacción de acoplamiento. La reacción se realizó a una proporción de péptido : inmunoglobulina Fc de 1 : 8, a una concentración total de proteína de 60 mg/ml, a 4°C durante 20 horas. La reacción se realizó en K-P 100 mM (pH 6,0) y se añadió SCB 20 mM como agente reductor. El proceso de purificación de dos etapas usando SOURCE Q 16 ml y SOURCE ISO 16 ml después del acoplamiento, fue igual al que se describe en el Ejemplo 2.

La pureza medida por HPLC de fase reversa fue del 95,8% (figura 3).

Columna: SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences)

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min

40 Gradiente: A 0 -> 20% 70 min B (A: Tris 20 mM pH 9,0; B: A + NaCl 1 M)

Columna: SOURCE S (XK 16 ml, Amersham Biosciences)

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min

Gradiente: A 0 -> 50% 50 min B (A: ácido cítrico 20 mM pH 3,0, B: A + KCl 1 M)

Ejemplo 5. Preparación del conjugado de hidroxil-imidazo-propionil-exendina-4(Lys27)-PEG-inmunoglobulina Fc

45 Usando el mismo método descrito en el Ejemplo 4, se hizo reaccionar 3.4K PropionALD(2) PEG con el residuo de lisina (Lys) de la beta-hidroxi-imidazo-propionil-exendina-4 (HY-exendina-4, AP, EE. UU.). Entre los dos picos de isómero, se utilizó el último pico de isómero (isómero posicional de Lys27), que tiene más reacción y que es fácilmente distinguible de los picos del isómero del terminal N, para la reacción de acoplamiento. La reacción se realizó con una proporción de péptido : inmunoglobulina Fc de 1 : 8, y una concentración total de proteína de 60 mg/ml, a 4 °C y durante 20 horas. La reacción se realizó en K-P 100 mM (pH 6,0), y se añadió SCB 20 mM como

50

agente reductor. Después de la reacción de acoplamiento se realizó el proceso de purificación de dos etapas usando SOURCE Q 16 ml y SOURCE ISO 16 ml, como se describe en el Ejemplo 2. La pureza medida por HPLC de fase reversa fue de 93,9% (Fig. 4).

Ejemplo 6. Preparación del conjugado de imidazo-acetil exendina-4(Lys27)-PEG-inmunoglobulina Fc

5 Usando el mismo método descrito en el Ejemplo 4, se hizo reaccionar 3,4K PropionALD(2) PEG con el residuo de lisina (Lys) de la imidazo-acetil exendina-4 (CA-exendina-4, AP, EE. UU.). Entre los dos picos de isómero, se utilizó el último pico del isómero (isómero posicional de Lys27), que tiene más reacción y que es fácilmente distinguible de los picos del isómero del terminal N, para la reacción de acoplamiento. La reacción se realizó a una proporción de péptido : inmunoglobulina Fc de 1 : 8, y una concentración total de proteína de 60 mg/ml, a 4° C durante 20 horas.
10 La reacción se realizó en K-P 100 mM (pH 6,0) y se añadió SCB 20 mM como agente reductor. Después de la reacción de acoplamiento, se realizó el proceso de purificación de dos etapas usando SOURCE Q 16 ml y SOURCE ISO 16 ml, como se describe en el Ejemplo 2. La pureza medida por HPLC de fase reversa fue de 95,8% (Fig. 5).

Ejemplo 7. Preparación del conjugado de DA exendina-4(Lys27)-PEG-inmunoglobulina Fc mutada con Ser12

15 3,4K PropionALD(2) PEG y el residuo de lisina (Lys) de la DA exendina-4 mutada con Ser12 fueron sometidos a pegilación por reacción del péptido y del 3,4K PropionALD(2) a 25°C durante 3 horas, a una proporción molar de 1 : 30 con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En este momento la reacción se realizó en amortiguador de fosfato de Na a pH 7,5 a una concentración de 100 nM, y se añadió SCB 20 mM como agente reductor para efectuar la reacción. Se realizó el proceso de purificación de un péptido monopegilado usando SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences) sin utilizar SOURCE S (XK 16 ml, Amersham Biosciences) como se describe en el Ejemplo
20 4. La reacción se realizó con una proporción de péptido : inmunoglobulina Fc de 1 : 8, y una concentración total de proteínas de 60 mg/ml a 4°C y durante 20 horas. La reacción se realizó en una solución de K-P 100 mM (pH 6,0) y se añadió SCB 20 mM como agente reductor. Debido a que la DA exendina-4 mutada con Ser12 tiene propiedades aniónicas más fuertes, las cantidades excesivas de inmunoglobulina Fc que no participaron en la reacción se eliminaron eficientemente mediante el proceso de purificación, usando solo SOURCE Q. Por consiguiente, se omitió el proceso de purificación usando SOURCE ISO, y la condición del proceso de purificación usando SOURCE Q fue la misma que en el Ejemplo 2. La pureza medida por HPLC de fase reversa fue de 92,5% (Fig. 6).

Ejemplo 8. Preparación del conjugado de DA exendina-4(Lys27)-PEG-inmunoglobulina Fc mutada con Arg12

30 Usando el mismo método descrito en el Ejemplo 7, se hizo reaccionar 3,4K PropionALD(2) PEG con el residuo de lisina (Lys) de la DA exendina-4 (AP, EE. UU.) mutada con Arg12, y purificada. Después se procedió al proceso de acoplamiento. La reacción se realizó con una proporción de péptido : inmunoglobulina Fc de 1 : 8, y una concentración total de proteínas de 60 mg/ml a 4°C durante 20 horas. La reacción se realizó en una solución de K-P 100 mM (pH 6,0) y se añadió SCB 20 mM como agente reductor. Después de la reacción de acoplamiento, se realizó el proceso de purificación de dos etapas usando SOURCE Q 16 ml y SOURCE ISO 16 ml, igual que en el Ejemplo 2. La pureza medida por HPLC de fase reversa fue del 99,2% (Fig. 7).

35 **Ejemplo 9.** Preparación del conjugado de des-amino-histidil exendina-4(Lys27)-PEG-albúmina

Usando el mismo método descrito en el Ejemplo 4, se hizo reaccionar 3,4K PropionALD(2) PEG con el residuo de lisina (Lys) de la des-amino-histidil exendina-4 (AP, EE. UU.), y se purificó. La reacción se realizó con una proporción de péptido : albúmina derivada de sangre humana (Green Cross, Corea del Sur) como sustancia portadora de 1 : 7, y una concentración total de proteínas de 50 mg/ml, a 4°C durante 24 horas. La reacción se realizó en una solución de K-P 100 mM (pH 6,0) y añadió SCB 20 mM como agente reductor. Después de la reacción de acoplamiento, se realizó el proceso de purificación de dos etapas usando SOURCE Q 16 ml y SOURCE ISO 16 ml, igual que en el Ejemplo 2. La pureza medida por HPLC de fase reversa fue de 90,3% (Fig. 8).

Ejemplo 10. Preparación del conjugado de dimetil-histidil exendina-4(Lys27)-PEG-inmunoglobulina Fc

45 Usando dimetil-histidil exendina-4 (DM exendina, AP, EE. UU.), se preparó el conjugado de dimetil-histidil exendina-4 (Lys27)-inmunoglobulina Fc con el mismo método descrito en el Ejemplo 4. La pureza medida por HPLC en fase reversa fue de 96,4% (Fig. 9).

Ejemplo 11. Preparación del conjugado GLP-1 (N)-PEG-inmunoglobulina Fc

50 Se sometieron a pegilación 3,4K ButyrALD(2) PEG (PEG que tiene dos grupos butiraldehído, Nektar, EE. UU.) y el terminal N del GLP-1 (AP, EE.UU.), haciendo reaccionar el péptido y el PEG a 4°C durante 90 min con una proporción molar de 1 : 5, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En ese momento, la reacción se realizó en una solución de K-P 100 mM (pH 6,0), y se añadió SCB 20 mM (NaCNBH₃) como agente reductor. Después, la reacción se realizó con una proporción molar de péptido : inmunoglobulina Fc de 1 : 10, y una concentración total de proteínas de 50 mg/ml, a 4°C durante 16 horas. La reacción se llevó a cabo en una solución de K-P 100mM (pH 6,0), y se añadió SCB 20 mM como agente reductor. Después de la reacción de acoplamiento se realizó el proceso de purificación de dos etapas usando SOURCE Q 16 ml y SOURCE ISO 16 ml, igual que en el Ejemplo 2. La pureza
55 medida por HPLC en fase reversa fue de 91% (Fig. 10).

EJEMPLO 12. Preparación del conjugado de des-amino-histidil-GLP-1 (Lys27)-PEG-inmunoglobulina Fc

Se sometieron a pegilación 3,4K PropionALD(2) PEG y el residuo de lisina (Lys) del des-amino-histidil-GLP-1 (AP, EE. UU.), haciendo reaccionar el péptido y el 3.4 PropionALD(2) a 4 °C durante 4 horas con una proporción molar de 1 : 30, con una concentración de péptido de 3 mg/ml. En ese momento la reacción se realizó en un amortiguador de fosfato de Na a pH 7,5 con una concentración de 100 mM, y se añadió SCB 20 mM como agente y reductor para realizar la reacción. Se realizó el proceso de purificación de un péptido monopegilado usando SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences). La reacción se realizó con una proporción de péptido : inmunoglobulina Fc de 1 : 6, y una concentración total de proteínas de 60 mg/ml, a 4°C durante 16 horas. La reacción se realizó en una solución de K-P 100 mM (pH 6,0), y se añadió SCB 20 mM como agente reductor. Después de la reacción de acoplamiento, se realizó el proceso de purificación en dos etapas utilizando SOURCE Q 16 ml y SOURCE ISO 16 ml de la misma forma que en el Ejemplo 2. Sin embargo, la resolución en SOURCE ISO 16 ml se declinó porque la diferencia de hidrofobicidad entre el conjugado de GLP-1-inmunoglobulina Fc e inmunoglobulina Fc, es menor que aquella entre exendina-4-inmunoglobulina Fc e inmunoglobulina Fc. Por consiguiente, se realizó el proceso de purificación usando la columna SOURCE ISO 16ml, adicionalmente al proceso de purificación anterior. La pureza medida por HPLC en fase reversa fue de 91,9% (figura 11).

Ejemplo 13. Preparación del conjugado usando ButyrALD-enlazador-PEG

Usando 3,4K ButyrALD(2) PEG (PEG que tiene dos grupos butiraldehído, Nektar, EE.UU.), se preparó 3,4K-exendina-4 con el mismo método que se describe en el Ejemplo 1. Se acopló la inmunoglobulina Fc con el mismo método que se describe en el ejemplo 3. La pureza medida por HPLC en fase reversa fue de 92,3 (figura 12).

Ejemplo 14. Medición de la actividad *in vitro* de exendina-4 de liberación sostenida

Para medir la eficacia de una preparación acción prolongada de exendina-4, se utilizó un método para medir la actividad celular *in vitro*. Típicamente, para medir la actividad *in vitro* de GLP-1, se separaron células de insulinooma o islotes de Langerhans, y se determinó si los AMPc en la célula se incrementaron después de tratamiento de GLP-1.

Para el método de medición de la actividad *in vitro* usada en el presente análisis, se usaron células RIN-m5F (ATCC), que se conocen como células de insulinooma de Rata. Estas células tienen receptores GLP-1, y por lo tanto son a menudo utilizadas en los métodos para la medición de la actividad *in vitro* en la familia GLP-1. Se trataron las células RIN-m5F con GLP-1, exendina-4, y materiales de prueba en diferentes concentraciones. Se midió la ocurrencia de los AMPc, que son moléculas de señalización en las células, por medio de los materiales de prueba, y por lo tanto, los valores de EC50, y se compararon entre sí. El resultado se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Materiales de prueba	Vida media en sangre (horas)	Título <i>in vitro</i> (%)
Exendina-4	0,7	100
Exendina-4(N)-PEG-Fc	62	<0,2
Exendina-4(Lys27)-PEG-Fc	61	13,2
DM exendina-4(Lys27)-PEG-Fc	69	2,6
DA exendina-4(Lys27)-PEG-Fc	54	13,2
HY exendina-4(Lys27)-PEG-Fc	52	7,6
CA exendina-4(Lys27)-PEG-Fc	52	8,5
Ser12 DA exendina-4(Lys27)-PEG-Fc	N.D.	2,6
DA exendina-4(Lys27)-PEG-albúmina		<u>2,0</u>

(continuación)

Materiales de prueba	Vida media en sangre (horas)	Título <i>in vitro</i> (%)
DA GLP-1 (Lys20, 28)-PEG-Fc	27	2,0
<ul style="list-style-type: none"> - DM exendina-4: Dimetil-histidil exendina-4 - DA exendina-4: Des-amino-histidil exendina-4 - HY exendina-4: Beta-hidroxi-imidazo-propionil exendina-4 - CA exendina-4: imidazo-acetil exendina-4 - Ser12 DA exendina-4: DA exendina-4 en donde el 12^{avo} residuo de lisina de la exendina-4 está sustituido con Serina - DA GLP-1: des-amino-histidil-GLP-1 - Exendina-4 (N)-PEG-Fc: Conjugado en el cual el terminal N de la exendina-4 y la región Fc se enlazaron a PEG - Exendina-4 (Lys27)-PEG-Fc: Conjugado en el cual el 27^{avo} residuo de lisina de la exendina-4, y la región Fc se enlazaron a PEG - DM exendina-4 (Lys27)-PEG-Fc: Conjugado en el cual el 27^{avo} residuo de lisina de la dimetilhistidil-exendina-4, y la región Fc se enlazaron a PEG - DA exendina-4 (Lys27)-PEG-Fc: Conjugado en el cual el 27^{avo} residuo de lisina de la des-amino-histidil exendina-4, y la región Fc se enlazaron a PEG - HY exendina-4 (Lys)-PEG-Fc: Conjugado en el cual el 27^{avo} residuo de lisina de la beta-hidroxi-imidazo-propionil exendina-4, y la región Fc, se enlazaron a PEG - CA exendina-4 (Lys)-PEG-Fc: Conjugado en el cual el 27^{avo} residuo de lisina de la imidazo-acetil exendina-4 y la región Fc se enlazaron a PEG - Ser12 DA exendina-4 (Lys27)-PEG-Fc: Conjugado en el cual el 27^{avo} residuo de lisina de la Ser12 des-amino-histidil exendina-4 en donde 12^{avo} residuo de lisina de la exendina-4 se sustituye por Serina, y la región Fc se enlazaron a PEG - DA exendina-4 (Lys27)-PEG-Albúmina: Conjugado en el cual el 27^{avo} residuo de lisina de la des-amino-histidil exendina-4, y albúmina, se enlazaron a PEG - DA GLP-1 (Lys20, 28)-PEG-Fc: Conjugado en el cual el residuo de lisina de la des-amino-histidil GLP-1 y la región Fc se enlazaron a PEG. 		

Ejemplo15. Prueba de la eficacia *in vivo* de la exendina-4 de acción prolongada

5 Para medir la eficacia *in vivo* de la preparación de acción prolongada de la exendin-4, se usó un método para medir el efecto de la reducción de la concentración de glucosa en la sangre para ratones db/db como modelo diabéticos. Se administraron 100 mcg/kg de la preparación de exendina-4 de acción prolongada una vez durante un periodo de 2 semanas, y se administraron 100 mcg/kg de exendina-4 nativa por día, a ratones de modelo diabético de aproximadamente 6 a 7 semanas de edad, sin limitar el suministro de alimento. Después de administrar los

10 materiales de prueba, se recolecto sangre diariamente, y se midió el cambio de nivel de glucosa en sangre. Especialmente, en el caso de la exendina-4 nativa, se midió la concentración de glucosa en sangre después de 1 hora de la administración (Fig. 14). Los conjugados de los derivados de exendina-4 mantuvieron la reducción de la concentración de glucosa en sangre durante 10 días o más, incluso cuando se administraron una vez, mientras que la actividad reductora de glucosa de los conjugados de la exendina-4 nativa desapareció después de 8 días.

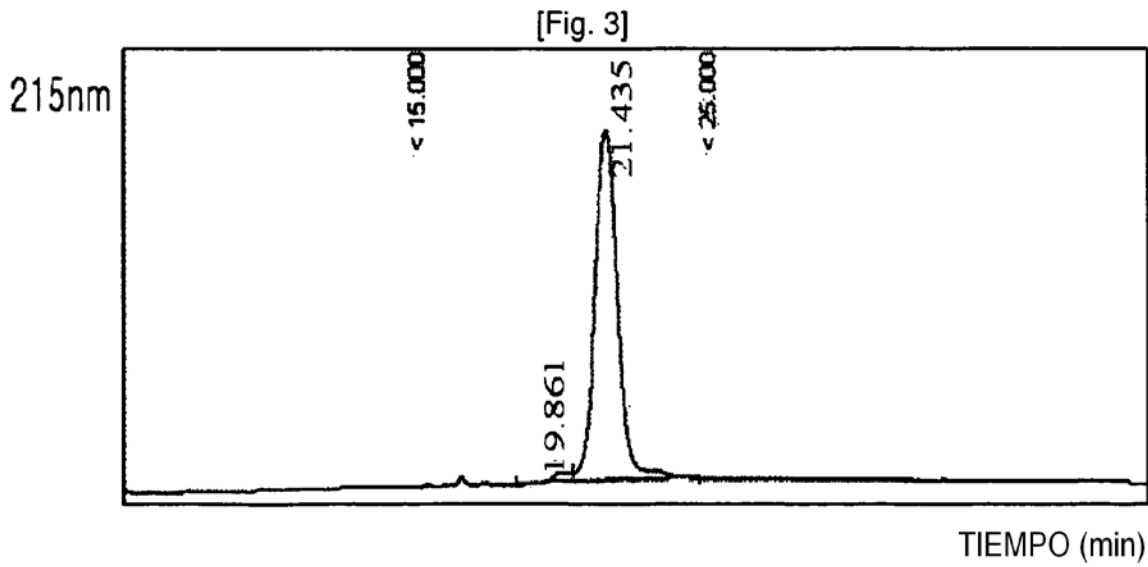
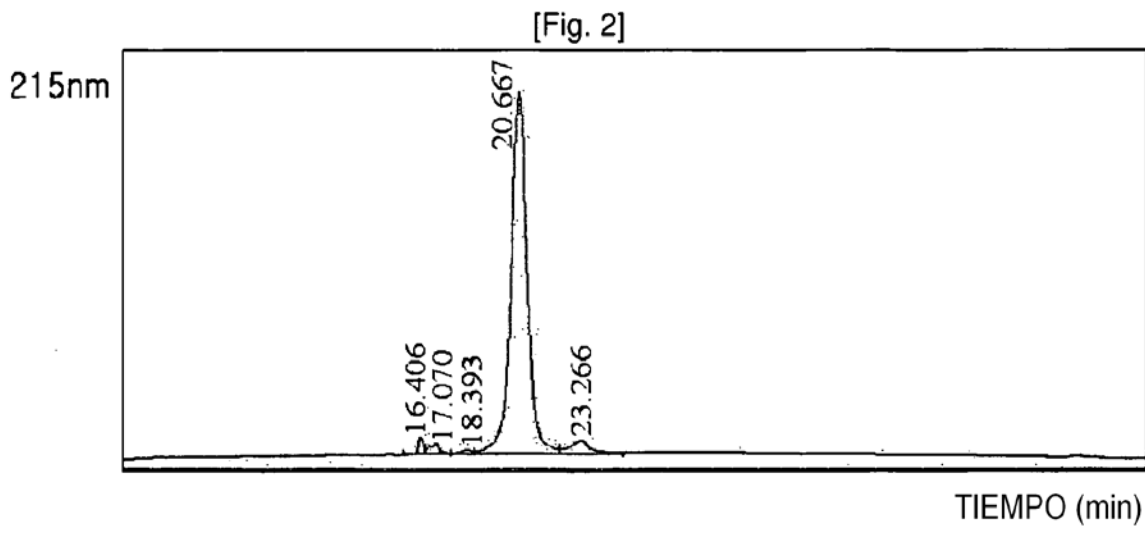
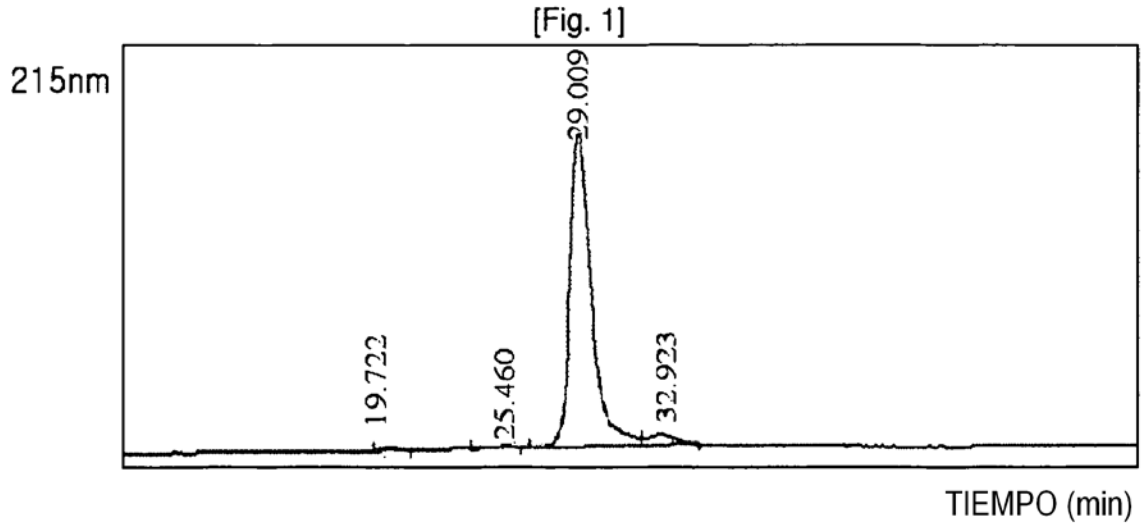
15 Aplicabilidad industrial

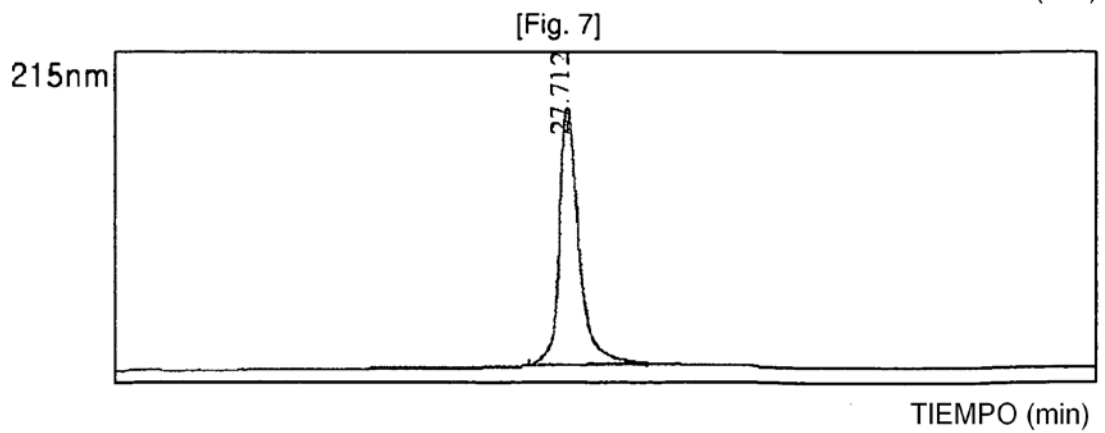
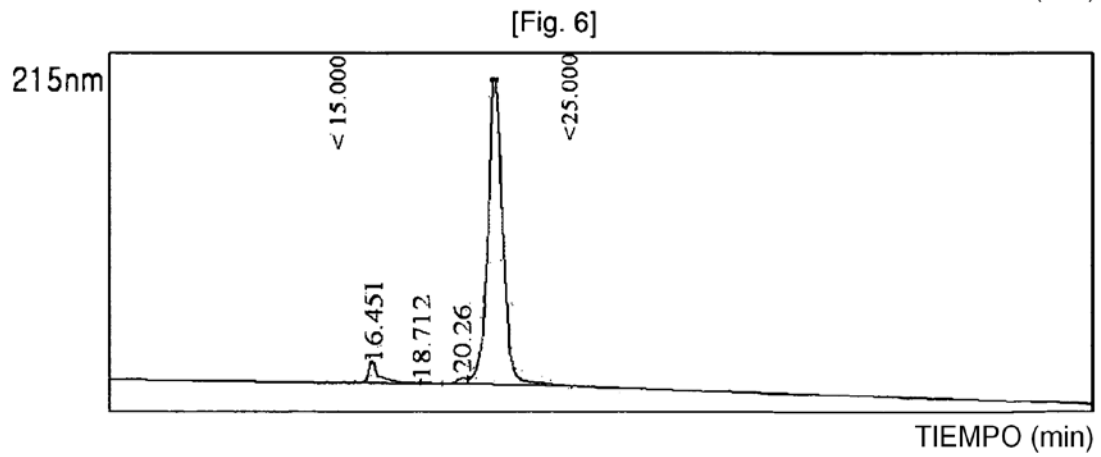
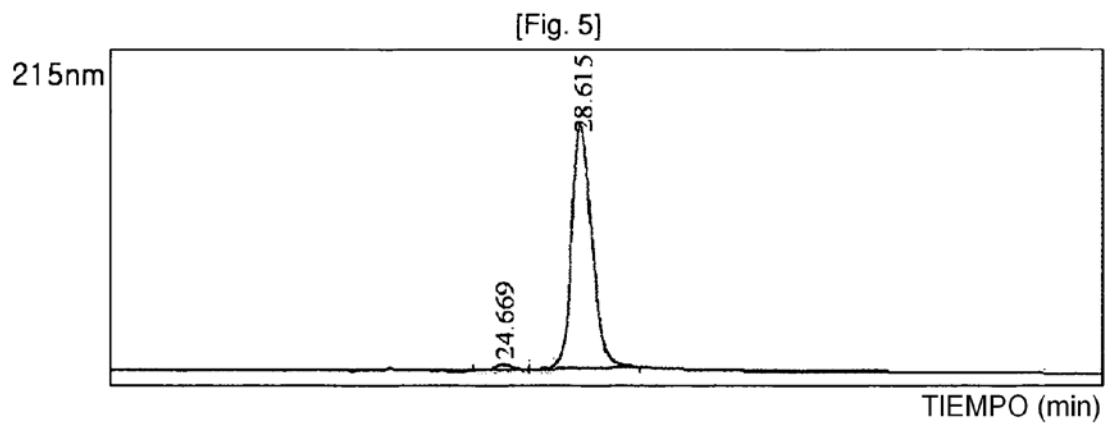
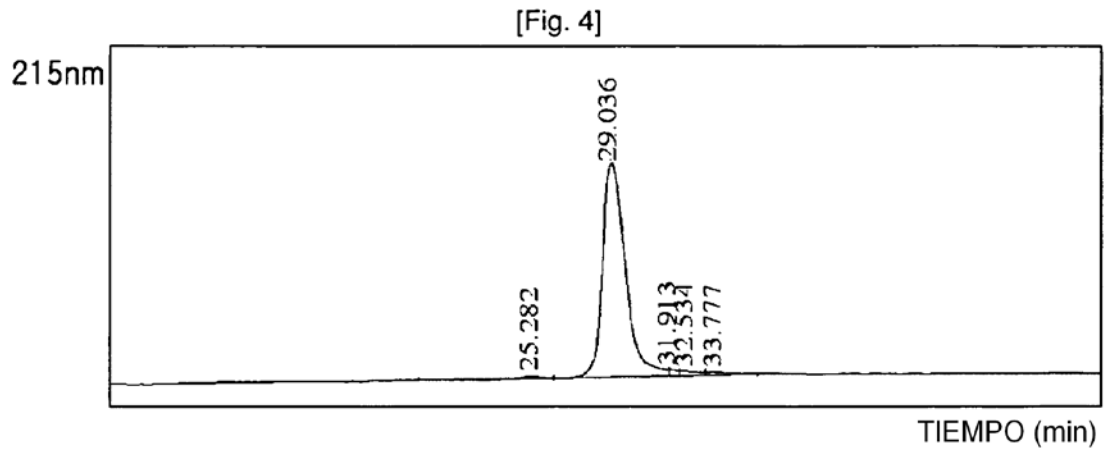
El conjugado de péptido insulínico de la presente invención tiene una actividad *in vivo* que se mantiene relativamente alta, y tiene una vida media en sangre notablemente incrementada, y por lo tanto se puede usar convenientemente en el desarrollo de formulaciones de acción prolongada de diferentes fármacos peptídicos.

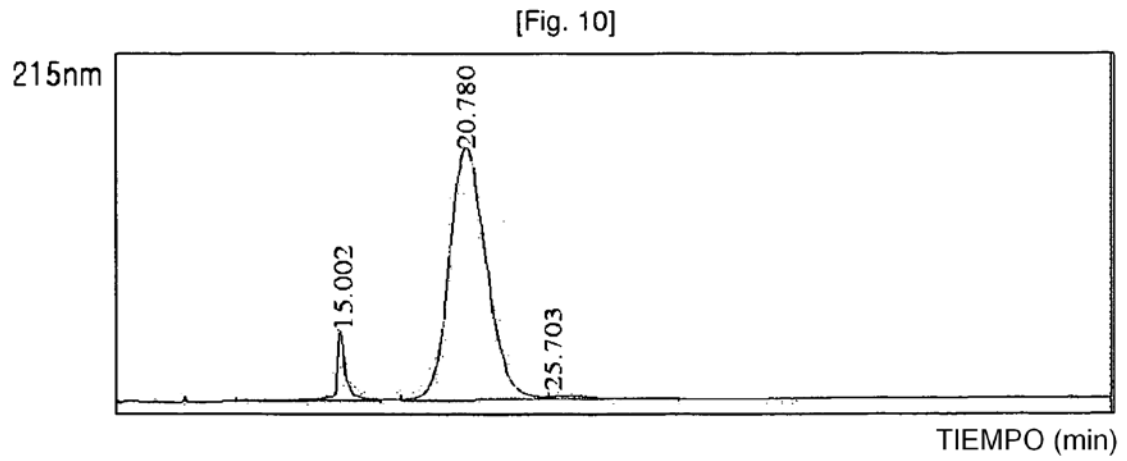
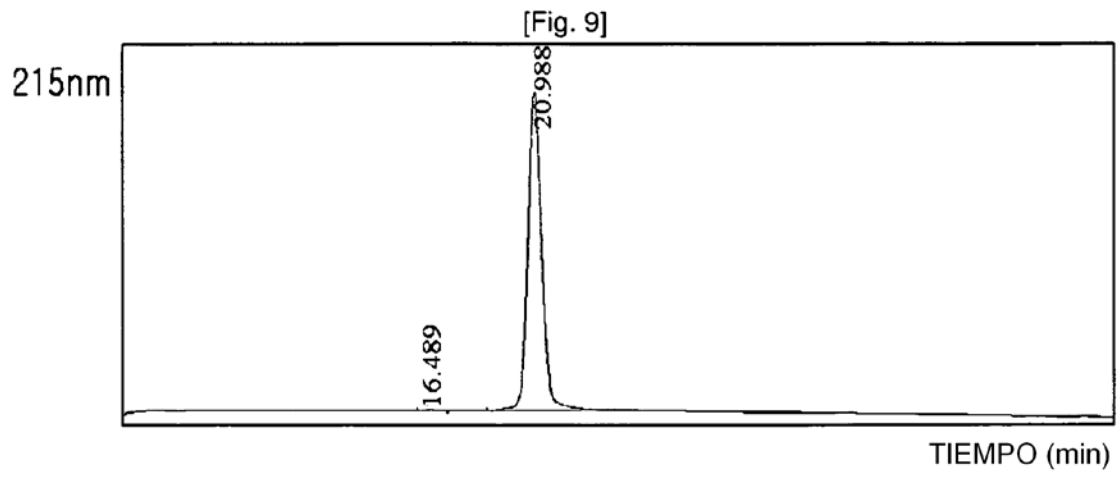
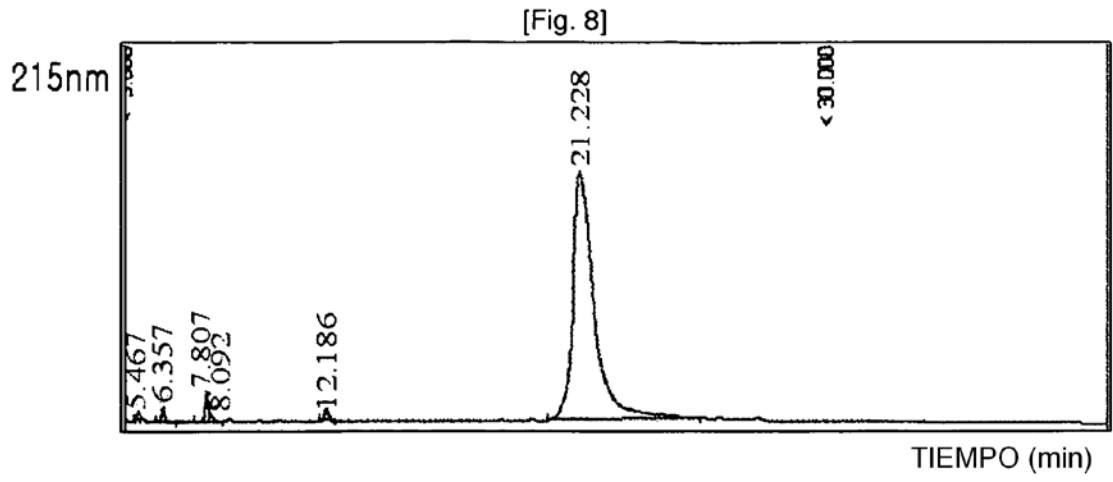
REIVINDICACIONES

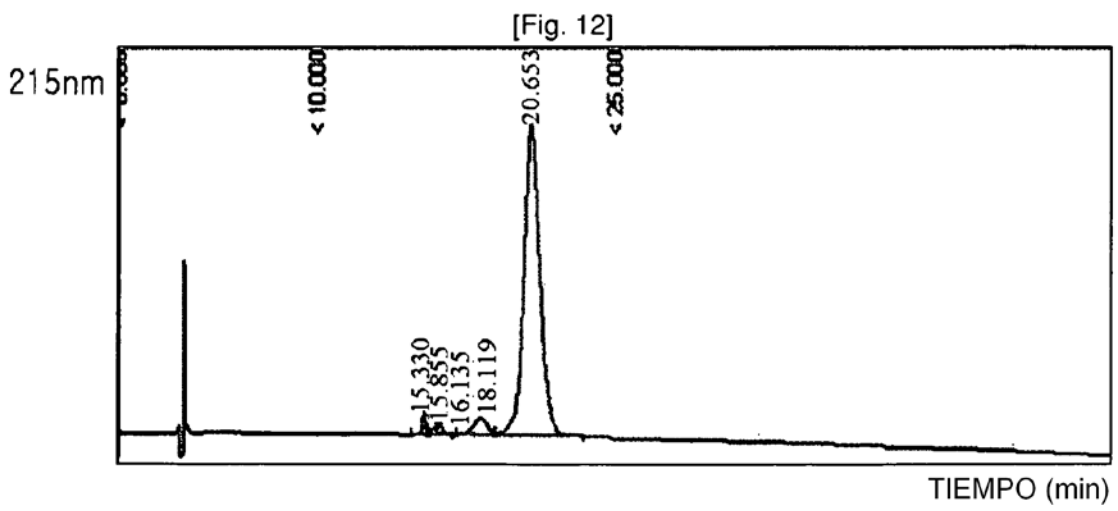
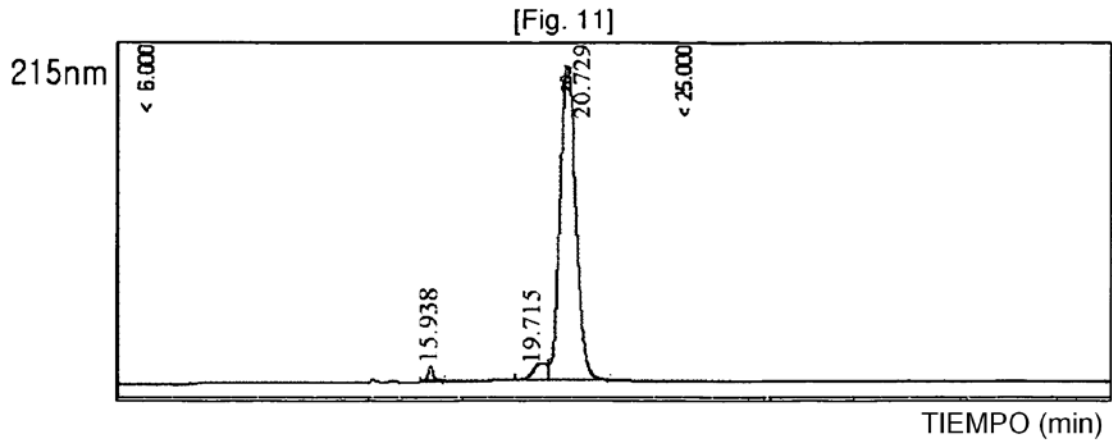
1. Un conjugado de péptido insulíntrópico que comprende un péptido insulíntrópico y una región Fc de inmunoglobulina, que están enlazados por medio de un polímero no peptídico, en donde el péptido insulíntrópico se selecciona del grupo que consiste de una exendina-4, des-amino-histidil exandina-4, beta-hidroxi-imidazo-propionil exendina-4, dimetil-histidil exendina-4, o imidazo-acetil exendina-4, en donde el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste de polietilén glicol, polipropilén glicol, copolímeros de etilenglicol y propilén glicol, polioles polioxi-etilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, éter polivinil-etílico, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico, y combinaciones de los mismos, y en donde un extremo del polímero no peptídico se enlaza a un residuo de amino ácido diferente del terminal N del péptido insulíntrópico.
2. El conjugado de péptido insulíntrópico de conformidad con la reivindicación 1, en donde el derivado insulíntrópico está representado por la siguiente Fórmula Química 1:
- $$R_1-X-Y-Z-R_2 \quad \text{<Fórmula 1>}$$
- en donde
- R₁ se selecciona del grupo que consiste de histidina, del grupo des-amino-histidilo, el grupo N-dimetil-histidilo, el grupo beta-hidroxi imidazo-propilo y el grupo 4-imidazoacetilo;
- R₂ se selecciona del grupo que consiste de -NH₂, -OH y -Lys;
- X se selecciona del grupo que consiste de
- Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-R₃-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-R₄-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser,
- y
- Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-R₃-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-R₄-Asn-Gly-Gly;
- R₃ se selecciona del grupo que consiste de Lys, Ser y Arg;
- R₄ se selecciona del grupo que consiste de Lys, Ser y Arg;
- Y es polietilén glicol, polipropilén glicol, copolímeros de etilén glicol y propilén glicol, polioles polioxi-etilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, éter polivinil-etílico, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico, y combinaciones de los mismos; y
- Z es una región Fc de inmunoglobulina
3. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polímero no peptídico tiene ambos extremos, cada uno enlazando a un grupo amino o un grupo tiol de la región Fc de inmunoglobulina, y al péptido insulíntrópico
4. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región Fc de inmunoglobulina está desglucosilada.
5. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región Fc de inmunoglobulina está compuesta de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste de los dominios C_H1, C_H2, C_H3 y C_H4.
6. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la región Fc de inmunoglobulina incluye además una región de bisagra.
7. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
8. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde cada dominio de la región Fc de inmunoglobulina es un híbrido del dominio de un origen diferente derivado de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
9. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o un multímero (una combinación de inmunoglobulina Fc) compuesto de inmunoglobulinas de una sola cadena del mismo origen.

10. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.
11. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 desglucosilada humana.
- 5 12. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el grupo reactivo del polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste de un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimido, y un derivado de succinimida.
13. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el derivado de succinimida se selecciona del grupo que consiste de propionato de succinimidilo, succinimidilcarboximetilo, hidroxil succinimidilo, o carbonato de succinimidilo.
- 10 14. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el polímero no peptídico tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos.
15. El conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el polímero no peptídico es polietilén glicol.
- 15 16. Un método para preparar un conjugado de péptido insulíntrópico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- (1) enlazar covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste de derivados de aldehído, de maleimida, y de succinimida en ambos extremos del mismo, con un grupo amino o un grupo tiol de un péptido insulíntrópico seleccionado del grupo que consiste de una exendina-4, des-amino-histidil exandina-4, beta-hidroxi-imidazo-propionil exendina-4, dimetil-histidil exendina-4, o imidazo-acetil exendina-4;
- 20 (2) aislar un conjugado que comprende al péptido insulíntrópico de la mezcla de reacción de (1), en donde el polímero no peptídico está enlazado covalentemente a un amino ácido diferente al amino ácido en el terminal N; y
- (3) enlazar covalentemente una región Fc de inmunoglobulina con el otro extremo del polímero no peptídico del conjugado aislado, para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de inmunoglobulina y el péptido insulíntrópico, que están enlazados a cada extremo del polímero no peptídico.
- 25 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende las etapas de:
- (1) enlazar covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos del mismo, con el residuo de lisina de un péptido insulíntrópico seleccionado del grupo que consiste de una exendina-4, des-amino-histidil exandina-4, beta-hidroxi-imidazo-propionil exendina-4, dimetil-histidil exendina-4, o imidazo-acetil exendina-4, a pH de 7,5 o más;
- 30 (2) aislar un conjugado que comprende al péptido insulíntrópico de la mezcla de reacción de (1), en el cual el polímero no peptídico está enlazado covalentemente al residuo de lisina; y
- (3) enlazar covalentemente una región Fc de inmunoglobulina con el otro extremo del polímero no peptídico del conjugado aislado, para producir un conjugado de proteína que comprende la región Fc de inmunoglobulina y el péptido insulíntrópico, que están enlazados a cada extremo del polímero no peptídico. Más preferiblemente, el polímero no peptídico de (1) y el residuo de lisina del péptido insulíntrópico se enlazan a un pH 7,5 o superior.
- 35 18. El método de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde el péptido insulíntrópico es des-amino-histidil exendina-4.
- 40 19. El método de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde el péptido insulíntrópico es beta-hidroxi-imidazo-propionil exendina-4.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde el péptido insulíntrópico es imidazo-acetil exendina-4.
- 45 21. El método de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde el péptido insulíntrópico es dimetil-histidil exendina-4.
22. El método de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde el polímero no peptídico es propilén glicol.
23. Una composición farmacéutica, que comprende el conjugado de péptido insulíntrópico de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de la diabetes, obesidad, síndrome coronario agudo, o síndrome de ovario poliquístico.

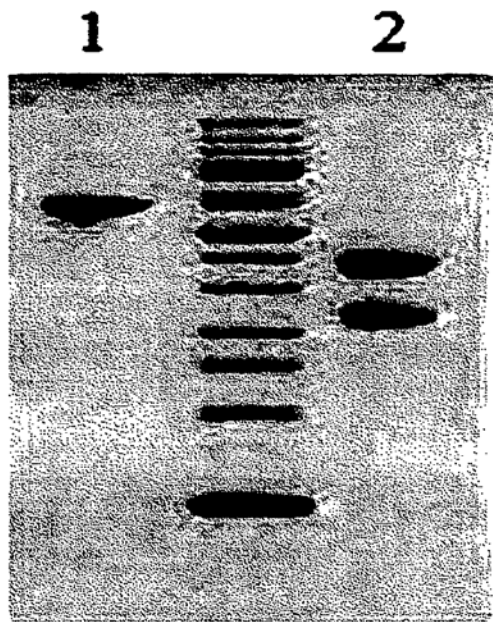








[Fig. 13]



1: Condición no reductora
2: Condición reductora

[Fig. 14]

