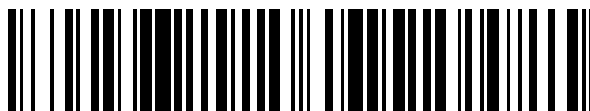


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 640**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/565** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2004** **E 04772408 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013** **EP 1666496**

54 Título: **Complejo de interferón beta**

30 Prioridad:

**25.08.2003 JP 2003299850**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.04.2014**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (50.0%)**  
**1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku**  
**Tokyo 103-8666, JP y**  
**TANIGUCHI, TADATSUGU (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NARUMI, HIDEKI;**  
**TSUSHIMA, YOSHIAKI;**  
**YAMASHITA, KOJI;**  
**SONE, SABUROU;**  
**SATO, MIYUKI y**  
**TANIGUCHI, TADATSUGU**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

**ES 2 452 640 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

Complejo de interferón beta

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un complejo de interferón  $\beta$  que tiene polietilenglicol unido de manera específica a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  y a un procedimiento de producción del mismo.

10

Técnica anterior

Es conocido que los polímeros solubles en agua, tales como el polietilenglicol, cuando se unen a biomoléculas tal como se tipifica para los fármacos de proteínas, confieren utilidad clínica de varias maneras que provocan efectos, tales como una estabilidad física y térmica mejorada, resistencia a proteasa y solubilidad, así como una volumen de distribución *in vivo* disminuida y una retención mejorada en la sangre (véase, Inada y otros, *J. Bioact and Compatible Polymers* 5, 343 (1990); Delgado y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9, 249 (1992); y Katre, *Advanced Drug Delivery Reviews* 10, 91 (1993)).

15

20

Existe un conjunto de procedimientos para unir el interferón  $\beta$  natural o el interferón  $\beta$  que tiene una estructura primaria idéntica a la del interferón  $\beta$  natural a un polímero soluble en agua de polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, Katre y otros han aplicado la modificación del grupo amino de la lisina o similar a la PEGilación del interferón  $\beta$  (véanse, las patentes de Estados Unidos Nos. 4766106 y 4917888 y la publicación internacional No. WO87/00056). De manera específica, han dado a conocer un conjugado obtenido mediante la unión de un polímero soluble en agua (PEG) con un peso molecular de 300 a 100.000 al interferón  $\beta$  recombinante o IL-2 a través de 1 a 10 residuos de lisina en la secuencia de aminoácidos del mismo. De manera alternativa, se ha dado a conocer una técnica para unir PEG a un grupo amino en una linfoquina en "Chemically modified lymphokine and production thereof" ("Linfoquina modificada químicamente y producción de la misma") (véase, publicación de la patente de Japón (Kokai) No. 60-226821A (1985)). Sin embargo, en realidad, el interferón  $\beta$  unido con PEG mediante estos procedimientos presenta una actividad de interferón  $\beta$  disminuida a menos del 10% y no puede ser de uso práctico.

25

30

Previamente no se ha descrito una técnica para unir selectivamente el PEG al grupo amino de una lisina particular en el interferón  $\beta$ . Si es posible seleccionar y modificar de manera específica una lisina que minimiza la tasa de reducción en la actividad biológica del interferón  $\beta$  causada por la unión a PEG, la reducción en la cantidad total de proteínas administradas como un fármaco conduce a menos efectos secundarios para los pacientes y, además, a un control de calidad más sencillo.

35

Por otro lado, también se conoce un procedimiento que utiliza una alquilación reductora sin implicar residuos de lisina para unir de manera selectiva un polímero soluble en agua al extremo amino terminal del interferón a través de una reacción a pH adecuado para la activación selectiva del grupo  $\alpha$ -amino del extremo amino terminal del interferón (véase, la publicación de patente de Japón (Kokai) No. 9-25298A (1997)). Sin embargo, en realidad, la PEGilación del interferón  $\beta$  mediante este procedimiento no proporciona una monoPEGilación y provoca una PEGilación no selectiva en cualquier residuo de lisina o el extremo N terminal, dando lugar a la generación de una mezcla heterogénea sin una actividad antiviral y una actividad inhibidora del crecimiento celular suficientes.

40

45

De manera más destacada, también se conoce que el interferón  $\beta$  purificado unido por el extremo N terminal con PEG presenta una actividad restante (proporción con respecto a la actividad del interferón  $\beta$  antes de la unión) disminuida de manera drástica cuando el PEG tiene un peso molecular superior a 20.000 y carece completamente de actividad cuando el PEG tiene un peso molecular de 40.000, tal como se da a conocer por Pepinsky y otros (véase, Pepinsky y otros, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, volumen 297, págs. 1059-1066, (2001)).

50

En cuanto al interferón  $\alpha$ , Bailon y otros han producido interferón  $\alpha$  monoPEGilado de manera no selectiva en el residuo de lisina con un polímero de PEG ramificado con un peso molecular de 40.000 (Bailon y otros, *Bioconjugate Chem.* 12, 195 (2001)). Sin embargo, han dado a conocer que la actividad restante del interferón  $\alpha$  unido con PEG con un peso molecular, como máximo, de 40.000, disminuye significativamente como en el caso con el interferón  $\beta$  unido por el extremo N terminal con PEG, y es del 7%.

55

A saber, es difícil aplicar de forma directa técnicas (el número y posición del PEG unido) que se han desarrollado para la modificación de un PEG de peso molecular bajo a PEG con un peso molecular elevado. De este modo, se requiere una técnica nueva para producir un complejo de interferón  $\beta$  muy activo unido con PEG con un peso molecular necesario para obtener de manera suficiente efectos, tales como una vida media circulatoria *in vivo* prolongada y unos valores disminuidos de depuración que conducen a la utilidad como fármaco.

60

Tal como se ha descrito anteriormente, hasta ahora no se ha dado a conocer una selección de un residuo de lisina

65

para modificarse para evitar la reducción en la actividad del interferón  $\beta$  unido con un polímero soluble en agua de peso molecular elevado ni una técnica para este objetivo. Además, no se ha dado a conocer que la unión selectiva de un polímero soluble en agua de peso molecular elevado, tal como PEG, a cualquiera de los 11 residuos de lisina presentes en el interferón  $\beta$  produzca un complejo de interferón  $\beta$  muy activo.

5 El documento WO 01/15736 A2 da a conocer un conjugado que muestra una actividad de interferón  $\beta$  y que comprende, como mínimo, un primer grupo no polipeptídico unido de forma covalente a un polipéptido interferón  $\beta$ .

10 El documento WO 01/48052 A1 da a conocer polialquilenglicoles ramificados que tienen un peso molecular que varía de 500 a 1.000.000, así como conjugados de polialquilenglicoles ramificados e interferones, tales como el interferón  $\beta$ .

#### Características de la invención

15 Un objetivo de la presente invención es encontrar una estructura de un complejo de interferón  $\beta$  que no tenga deficiencias en la actividad biológica, incluso mediante la modificación con una sustancia de peso molecular elevado, tal como polietilenglicol, y dar a conocer un procedimiento para producir dicho complejo con una eficacia elevada. De manera particular, un objetivo de la presente invención es obtener un complejo de interferón  $\beta$  en el que se mantenga el 10% o más de la actividad del interferón  $\beta$  incluso mediante la unión de PEG con un peso molecular, como máximo, de 40.000.

20 Los presentes inventores han llevado a cabo un conjunto de estudios para conseguir los objetivos y, en consecuencia, han encontrado que un complejo de interferón  $\beta$ , según la reivindicación 7, logra los objetivos indicados anteriormente.

25 El residuo de lisina localizado en la posición 19 se ha indicado previamente como uno de los residuos de lisina que deben eliminarse cuando el PEG se une al grupo amino del interferón  $\beta$  (véase la publicación internacional No. WO01/15736). Por lo tanto, este sitio de unión no puede esperarse a partir de técnicas convencionales. En cuanto al residuo de lisina localizado en la posición 134, tampoco se ha dado a conocer hasta ahora que la unión selectiva a este sitio de una sustancia modificadora con un peso molecular elevado minimice la reducción en la actividad de interferón  $\beta$ .

30 A saber, la presente invención da a conocer un procedimiento para producir un complejo de interferón  $\beta$  según la reivindicación 1.

35 El complejo de interferón  $\beta$  de la presente invención presenta una solubilidad en sangre, una actividad de interferón  $\beta$  y una estabilidad física y biológica elevadas, y es útil como fármaco en el tratamiento, la prevención y el alivio de todos los síntomas y enfermedades a los que se aplica el interferón  $\beta$ .

#### 40 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra la separación y purificación en una columna Poros HS de un complejo de interferón  $\beta$  que tiene polietilenglicol unido al grupo amino de la lisina localizada en la posición 19. En el dibujo, la flecha superior indica la proporción de disolvente B mezclado y la flecha inferior indica la absorbancia a 280 nm;

45 la figura 2 es un diagrama que muestra el resultado del análisis de los componentes de los picos 1 a 4 (en el dibujo, (i) a (iv)) obtenidos mediante la separación y purificación en una columna Poros HS de un complejo de interferón  $\beta$  que tiene polietilenglicol unido al grupo amino de la lisina localizada en la posición 19, en la que los componentes se separan mediante SDS-PAGE y, a continuación, se analizan mediante tinción con plata;

50 la figura 3 es un diagrama que muestra la separación y purificación en una columna SP-5PW de un complejo de interferón  $\beta$  que tiene polietilenglicol unido al grupo amino de la lisina localizada en la posición 19;

55 la figura 4 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  y los sitios de escisión previstos por la lisil endopeptidasa en la misma;

60 la figura 5 es un diagrama que muestra el mapa peptídico (tratado con lisil endopeptidasa) de los componentes eluidos de los picos 2 a 4 (en el dibujo, indicados por (ii) a (iv)) separados con la columna SP-5PW después de la reacción de unión con PEG con un peso molecular de 40K, así como el mapa peptídico del interferón  $\beta$  (en el dibujo, indicado por Pre en la parte más inferior) antes de la reacción con PEG;

la figura 6 es un diagrama que muestra la retención, en sangre de conejo, del interferón  $\beta$  que tiene PEG con un peso molecular de 40K unido a la lisina localizada en la posición 19;

la figura 7 es un diagrama que muestra la evolución con el tiempo de la inducción de un marcador farmacológico (actividad de 2-5A sintetasa) en un conejo por el interferón  $\beta$  que tiene PEG con un peso molecular de 40K unido a la lisina localizada en la posición 19;

5 la figura 8 es un diagrama que muestra el resultado de analizar las fracciones de los picos obtenidas mediante la separación con la columna TOYOPEARL CM 650 de un complejo de interferón  $\beta$  que tiene polietilenglicol unido al grupo amino de la lisina localizada en la posición 134, en el que las fracciones se analizan mediante SDS-PAGE (A), y la fracción del pico 3 (en el dibujo, (iii)), se analiza adicionalmente con la columna SP-5PW (B) (cada uno de los cromatógrafos se representó de abajo a arriba en el orden de elución);

10 la figura 9 es un diagrama que muestra las actividades de un complejo de interferón  $\beta$  PEGilado de manera múltiple de forma no selectiva con 2 o más moléculas de PEG y un complejo de interferón  $\beta$  monoPEGilado con PEG unido de manera selectiva a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134. En el dibujo, se muestran, con correspondencia entre los mismos, un cromatograma obtenido con la columna TOYOPEARL CM 650(S) (Tosoh) (B), el resultado del análisis SDS-PAGE correspondiente a cada fracción separada (A) y el valor de la actividad antiviral por la cantidad de proteínas de cada fracción y la tasa de retención de la actividad en relación con la actividad específica de IFN- $\beta$  antes de la unión a PEG (C); y

15 la figura 10 es un diagrama que muestra la retención, en sangre, de un complejo de IFN- $\beta$  unido a PEG de peso molecular de 20.000 (20K) o 40.000 (40K), que se ha administrado por vía intravenosa en un conejo.

El presente documento comprende contenidos descritos en el documento de la solicitud de patente de Japón No. 2003-299850 que sirve como base para la prioridad de la presente solicitud.

25 Modo óptimo para llevar a cabo la invención

Tal como se ha descrito anteriormente, un procedimiento de la presente invención puede unir de manera eficaz polietilenglicol a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  y separar los productos no unidos y subproductos del mismo.

30 Como interferón  $\beta$  sometido al procedimiento de la presente invención se pueden utilizar el interferón  $\beta$  natural, un interferón  $\beta$  que tiene una cadena de azúcares alterada con respecto a la natural, o un interferón  $\beta$  recombinante con o sin una cadena de azúcares. En el procedimiento de la presente invención, se puede utilizar como dicho interferón  $\beta$  un producto disponible comercialmente. El interferón  $\beta$  natural tiene una asparagina unida a la cadena de azúcares en la posición 80 que está próxima a la lisina localizada en la posición 19 desde el punto de vista de la estructura tridimensional. Cuando se une al mismo un PEG de peso molecular elevado o similar, es preferente utilizar un interferón  $\beta$  recombinante sin una cadena de azúcares porque el posible impedimento estérico reduce la eficacia de la reacción. Como interferón  $\beta$  sometido al procedimiento de la presente invención también se puede utilizar cualquiera de aquéllos que tengan la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  natural con la delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, en el que el complejo de interferón  $\beta$  obtenido mantiene una actividad del 10% o superior de la actividad antiviral del interferón  $\beta$  que no se ha unido a polietilenglicol cuando la actividad antiviral del interferón  $\beta$  se determina mediante un bioensayo utilizando células FL de amniocitos humanos y el virus sindbis o el virus de la estomatitis vesicular combinados.

45 El interferón  $\beta$  de la presente invención también comprende, interferón  $\beta$  natural, interferón  $\beta$  recombinante y una forma alterada de los mismos, en el que el complejo de interferón  $\beta$  obtenido mantiene una actividad del 10% o superior de la actividad antiviral del interferón  $\beta$  que no se ha unido a polietilenglicol cuando la actividad antiviral del interferón  $\beta$  se determina mediante un bioensayo utilizando células FL de amniocitos humanos y el virus sindbis o el virus de la estomatitis vesicular combinados. La forma alterada significa cualquiera de aquéllos obtenidos mediante la alteración o modificación de la secuencia de aminoácidos o la cadena de azúcares del interferón natural tal como se ha descrito anteriormente, en el que el complejo de interferón  $\beta$  obtenido mantiene una actividad del 10% o superior de la actividad antiviral del interferón  $\beta$  que no se ha unido a polietilenglicol cuando la actividad antiviral del interferón  $\beta$  se determina mediante un bioensayo utilizando células FL de amniocitos humanos y el virus sindbis o el virus de la estomatitis vesicular combinados. En el presente documento, la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 está representada por el número de aminoácido para la secuencia de aminoácidos de este interferón  $\beta$  natural (figura 4 y SEQ ID NO: 1). El número de aminoácido de dicha lisina para la forma alterada se cambia de manera que corresponda a la posición de la lisina en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  natural.

50 El interferón  $\beta$  en cualquiera de estas formas se puede obtener mediante cualquier procedimiento, tal como la extracción de tejido, la síntesis de proteínas y la producción biológica utilizando células naturales o recombinantes. El interferón  $\beta$  modificado genéticamente sin una cadena de azúcares está disponible comercialmente y dicho interferón  $\beta$  disponible comercialmente también se puede utilizar en el procedimiento de la presente invención.

El polietilenglicol (PEG) no es dañino para el cuerpo humano y, cuando se administra como un complejo de

interferón  $\beta$  unido al mismo, confiere una solubilidad en agua a un nivel necesario para disolver el complejo en sangre. Es conocido en la técnica que la unión de PEG a una sustancia fisiológicamente activa permite que la sustancia fisiológicamente activa en organismos vivos consiga una estabilidad física y térmica mejoradas, una protección frente a la degradación enzimática, una mayor solubilidad, una vida media circulatoria *in vivo* prolongada y valores disminuidos de depuración. A la vista de dichos efectos, el PEG se utiliza de manera preferente en la presente invención.

Se puede utilizar cualquier procedimiento en la activación terminal del PEG para la unión del PEG al grupo amino del residuo de lisina en el interferón  $\beta$ . Por ejemplo, se puede utilizar un PEG que tenga una estructura reactiva con un grupo amino, tal como una estructura de éster de hidroxisuccinimida o de éster de sulfonato de nitrobenzoceno en el extremo terminal. En el presente documento, a cualquiera de estas estructuras terminales se hace referencia como "grupo funcional reactivo con un grupo amino" y al PEG que tiene cualquiera de estas estructuras terminales se hace referencia como "polietilenglicol activado con un grupo funcional reactivo con un grupo amino". El PEG que tiene cualquiera de estas estructuras se utiliza ampliamente de manera convencional para la unión a un grupo amino y se puede producir con facilidad mediante un procedimiento sintético conocido habitualmente o está disponible comercialmente. En la presente invención, de manera preferente, también se puede utilizar dicho producto disponible comercialmente.

El peso molecular promedio del PEG es de 10.000 o superior y, de manera preferente, es aproximadamente de 10.000 a 60.000, de manera más preferente, aproximadamente de 20.000 a 40.000, desde el punto de vista de permitir que el interferón  $\beta$  en organismos vivos consiga una estabilidad física y térmica, una protección frente a la degradación enzimática, una mayor solubilidad, una vida media circulatoria *in vivo* prolongada y valores disminuidos de depuración.

La reacción de unión entre el interferón  $\beta$  y el PEG se realiza mediante la reacción del interferón  $\beta$  con PEG a pH de 5,0 a 8,5, de manera preferente a pH de 5,0 a 8,0, y en presencia de un agente contra la reducción para la actividad del interferón  $\beta$ , de manera preferente en una solución tampón, tal como soluciones tampón de fosfato o citrato. El agente contra la reducción para la actividad del interferón  $\beta$  no sólo suprime la agregación del interferón  $\beta$  causada por su situación bajo una atmósfera de pH 5,0 a 8,5 adecuado para la reacción, sino que también ayuda en la reacción de la unión específica del PEG a la lisina diana localizada en las posiciones 19 ó 134 o en un sitio próximo a las mismas. El agente contra la reducción para la actividad del interferón  $\beta$  para la unión eficaz del PEG al sitio deseado manteniendo la actividad del interferón  $\beta$  se selecciona del grupo que comprende oligosacáridos con 5 o menos unidades de azúcar, monosacáridos, sus correspondientes alcoholes de azúcar, alcoholes polihídricos C<sub>2-6</sub>. Son particularmente preferentes disacáridos o monosacáridos, tales como glucosa, manitol, sorbitol, sacarosa o trehalosa, sus correspondientes alcoholes de azúcar y alcoholes polihídricos C<sub>2-3</sub>, tales como etilenglicol o glicerol. Estos agentes contra la reducción para la actividad del interferón  $\beta$  se pueden utilizar solos o en cualquier combinación de dos o más de ellos.

La concentración del agente contra la reducción para la actividad del interferón  $\beta$  sometido al procedimiento de la presente invención es del 1 al 50% (en total, cuando se utilizan varios agentes contra la reducción para la actividad del interferón  $\beta$ ; en lo sucesivo especificado de la misma manera), de manera preferente, aproximadamente del 10 al 30%, con respecto al peso total de la mezcla de reacción. La proporción de la mezcla interferón  $\beta$ :PEG no está particularmente limitada y, sin embargo, es habitualmente aproximadamente una proporción molar de 1:1 a 1:400 y, de manera preferente, aproximadamente una proporción molar de 1:4 a 1:100 para el PEG activado con éster succinimidílico. La temperatura de reacción adecuada para el procedimiento de la presente invención es habitualmente de 4 a 40°C, de manera preferente de 4 a 25°C. Aunque el tiempo de reacción se determina aproximadamente según la temperatura de reacción y así sucesivamente, habitualmente son adecuados aproximadamente de 1 hora a 24 horas.

El polietilenglicol se une de manera específica a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$ . El término "específico" o "de manera específica" se refiere a la unión selectiva y preferente del polietilenglicol a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 o al sitio estéricamente próximo a las mismas. Esta unión específica produce un interferón  $\beta$  monoPEGilado homogéneo.

En la reacción de unión con el grupo tiol de la cisteína se utiliza un polímero soluble en agua con una estructura reactiva al grupo tiol, tal como una estructura de disulfuro de ortopiridilo, vinilsulfona, maleimida o yodoacetamida, en el extremo terminal, de manera preferente un polímero soluble en agua con una estructura de maleimida. Para la unión del PEG con un peso molecular particularmente deseado de 10.000 a 60.000 al residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$ , se utiliza, de manera preferente, un interferón  $\beta$  con una cadena de azúcares más pequeña que la del natural, un interferón  $\beta$  del que se ha eliminado una cadena de azúcares, o un interferón  $\beta$  que originalmente no tiene cadenas de azúcares. La utilización de dicho interferón  $\beta$  permite la reacción de unión sin una disociación reductora para proceder con una eficacia elevada en una sola etapa.

Después de la reacción de unión, el interferón  $\beta$  y el PEG no reaccionados y los subproductos se pueden extraer mediante cualquiera de los procedimientos, o cualquier combinación de los mismos, tales como un cromatograma

utilizando un portador de intercambio iónico, un portador de filtración de gel o un portador hidrofóbico o hidrofílico, para purificar o concentrar el complejo de interferón  $\beta$  deseado que tiene PEG unido a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134.

5 Este es el procedimiento más eficaz para purificar y concentrar el complejo de interferón  $\beta$  que tiene PEG unido a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134. El portador de intercambio iónico utilizado es, de manera preferente, un portador de intercambio catiónico, de manera más preferente, un portador en el que un grupo sulfopropilo, ácido sulfónico o carboximetilo está unido a un material base, y cualquiera de estos portadores de intercambio iónico están disponibles comercialmente. Por ejemplo, cuando se utilizan HiTrap SP HP (Amersham Pharmacia), Poros HS  
10 (Applied Biosystems) o SP-5PW (Tosoh), un complejo de interferón  $\beta$  diPEGilado presente en cantidades de trazas en la solución de reacción se eluye inicialmente mediante un gradiente de concentración de sales. Posteriormente, se eluye el complejo de interferón  $\beta$  deseado que tiene PEG unido a la lisina localizada en la posición 19 en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  en una proporción del 40% o más de las fracciones totales eluidas, seguido de la elución y fraccionamiento de los complejos que tienen PEG unido al grupo amino N-terminal o a la lisina localizada en las posiciones 33, 46 ó 108 como isómeros menores de los sitios unidos a PEG, y del interferón  $\beta$   
15 no reaccionado. En este procedimiento, se puede aislar a la vez el complejo de interferón  $\beta$  que tiene PEG unido a la lisina localizada en la posición 134.

20 La unión al portador de intercambio catiónico se realiza mediante el ajuste de la solución de reacción a la fuerza iónica adecuada para la unión a un pH de 3,0 a 8,0. En este caso, el portador de intercambio catiónico se puede cargar en una columna o suspenderse en la solución de reacción. Sin embargo, cuando la agregación de un polímero hidrofílico que no ha reaccionado en el portador de intercambio catiónico reduce la eficacia de separación del complejo deseado, es preferente cargar el portador en la columna después de la suspensión y la unión para realizar la elución. La elución del portador de intercambio catiónico se puede llevar a cabo mediante la realización de un gradiente por etapas o una elución isocrática con concentraciones crecientes de sales o incrementos del pH en una solución tampón compuesta de citrato, acetato, fosfato, o similares.

El sitio unido a PEG en el complejo de interferón  $\beta$  fraccionado y eluido se puede analizar, tal como se describe en el ejemplo 3, mediante un mapeo peptídico, seguido del análisis o secuenciación de los aminoácidos del fragmento  
30 unido a PEG obtenido.

La actividad antiviral del complejo de interferón  $\beta$  que tiene PEG único a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 producido de este modo se puede medir con facilidad mediante un procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, Armstrong, J. A., *Methods In Enzymology*, 78, 381-387, (1981); Rubinstein y otros, *J. Virol.* 37, 755 (1981);  
35 y Borden y otros, *Canc. Res.* 42, 4948 (1982)). El interferón  $\beta$  que tiene PEG con un peso molecular de 40.000 unido a la lisina localizada en la posición 19 mantiene el 10% o más de la actividad antes de la unión, y esta actividad es equivalente a la actividad del interferón  $\beta$  unido a PEG con un peso molecular de 20.000. De manera alternativa, el interferón  $\beta$  que tiene PEG con un peso molecular de 40.000 unido a la lisina localizada en la posición 134 mantiene del 70 al 100% de la actividad antes de la unión. Se ha descrito previamente que la actividad restante de un complejo que tiene PEG con un peso molecular de 40.000 unido al extremo N-terminal del interferón  $\beta$  es del 0% (Pepinsky y otros, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, volumen 297, págs. 1059-1066, (2001)). Por consiguiente, esto demuestra que la utilización de la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 como el sitio del interferón  $\beta$  unido a PEG de peso molecular elevado es extremadamente útil.

45 Además, el procedimiento de la presente invención se puede aplicar a la inmovilización del interferón  $\beta$  sobre un conjunto de soportes, por ejemplo, la superficie plana o gránulos de un material de azúcar, vidrio o resina. A saber, la utilización de la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 como punto de unión entre el interferón  $\beta$  y cualquiera de un conjunto de soportes permite la inmovilización del interferón  $\beta$  sin reducir su actividad. Este procedimiento de inmovilización requiere la introducción de un agente reticulante que tenga un grupo funcional similar reactivo al grupo amino o la unión previa del agente reticulante al soporte.  
50

El complejo entre el interferón  $\beta$  y el PEG de la presente invención se puede utilizar en el tratamiento de un conjunto de enfermedades que explotan la actividad biológica del IFN. Por ejemplo, el complejo se puede utilizar en el tratamiento de la hepatitis B activa crónica, la hepatitis C crónica y otras enfermedades virales; un conjunto de neoplasmas malignos, tales como glioblastoma, meduloblastoma, astrocitoma y melanoma maligno de piel; y enfermedades autoinmunes, tales como esclerosis múltiple. Además, se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades que acompañan a la vascularización, por ejemplo, enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumática o psoriasis), enfermedades oculares (por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, glaucoma neovascular, síndrome de Stevens-Johnson y su enfermedad relacionada, penfigoide ocular y su enfermedad relacionada, quemadura química de la córnea, o tracoma) y cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata, melanoma maligno, cáncer renal, tumores de cerebro o sarcoma de Kaposi).  
60

El complejo de interferón  $\beta$  de la presente invención se puede administrar a través de una vía oral o parenteral, ya sea de forma directa o como una composición farmacéutica preparada mediante la mezcla del complejo con un portador o excipiente farmacológicamente aceptable conocido en la técnica. Sin embargo, es preferente la  
65

administración realizada mediante inyección hipodérmica, intramuscular o intravenosa.

5 Entre los ejemplos concretos de una forma de dosificación para la administración oral se incluyen comprimidos, pastillas, cápsulas, gránulos, jarabes, emulsiones y suspensiones. Dichas formas de dosificación se producen mediante un procedimiento *per se* conocido en la técnica y contienen un portador o excipiente utilizado habitualmente en el sector farmacéutico.

10 Entre los ejemplos del portador o excipiente para comprimidos se incluyen lactosa, maltosa, sacarosa, almidón y estearato de magnesio. Entre los ejemplos de una forma de dosificación para la administración parenteral se incluyen gotas oculares, pomadas, inyecciones, cataplasmas, supositorios, agentes de absorción transnasal, agentes de absorción transpulmonar, agentes de absorción transdérmica y agentes de liberación prolongada de manera local.

15 Se pueden preparar preparaciones líquidas mediante un procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la disolución o suspensión del complejo de interferón  $\beta$  en una solución acuosa estéril utilizada habitualmente para inyecciones o mediante el emulsionado o la introducción en un liposoma del complejo de interferón  $\beta$ .

20 Se pueden preparar preparaciones sólidas mediante un procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la adición de un excipiente, tal como manitol, trehalosa, sorbitol, lactosa, o glucosa, al complejo de interferón  $\beta$  para producir un producto liofilizado. Este producto liofilizado adicionalmente se puede administrar como polvo, o de otro modo, este polvo se puede mezclar y solidificar con ácido poliláctico o ácido glicólico para su utilización.

25 Se pueden preparar agentes gelificantes mediante un procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la disolución del complejo de interferón  $\beta$  en un espesante o polisacárido, tal como glicerina, polietilenglicol, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, ácido hialurónico o sulfato de condroitina. Cualquiera de estas preparaciones se puede complementar con albúmina de suero humano, inmunoglobulina humana,  $\alpha$ 2-macroglobulina, aminoácido, o similares, como estabilizantes, y se puede complementar con alcohol, alcohol de azúcar, un surfactante iónico, un surfactante no iónico, o similares, como dispersante o promotor de absorción en un intervalo que no afecta a la actividad biológica del IFN. De manera alternativa, también se pueden añadir al mismo, de manera opcional, trazas de metales o una sal de un ácido orgánico.

35 La dosis del complejo de la presente invención se determina de manera apropiada según la edad y el peso corporal de un paciente, la enfermedad o síntomas a tratar, la forma y vía de administración, el peso molecular del PEG, y así sucesivamente. Sin embargo, en general, el complejo de la presente invención se administra en un intervalo de una dosis/mes a una dosis/día, de manera preferente de una dosis/mes a una dosis/semana, con 1.000 unidades a 100 millones de unidades/dosis, de manera preferente, de 10.000 unidades a 18 millones de unidades/dosis.

#### 40 Ejemplos

En lo sucesivo se describirá la presente invención de forma más completa haciendo referencia a los ejemplos.

[Ejemplo 1]

45 Efecto del aditivo en la reacción de unión de polietilenglicol activado con éster de hidroxisuccinimida al grupo amino en interferón  $\beta$  recombinante:

50 Se añadió glucosa, glicerol o etilenglicol a cada concentración final de 1, 5, 10 y 20% a interferón  $\beta$  humano recombinante (concentración final: 200  $\mu$ g/ml; que se expresó y purificó con *Escherichia coli* recombinante según el procedimiento de Goeddel y otros, Nucleic Acid. Res. Volumen 8, 4057-4074 (1980)) almacenado en cloruro de sodio 0,5 M y una solución de tampón acetato 100 mM (pH 5,0). Se ajustó el pH de estas soluciones y un control libre de aditivo a pH 7,8 utilizando una solución de hidrogenofosfato de disodio 1 M. Se mezcló polietilenglicol (peso molecular promedio: 40K; fabricado por Shearwater Polymers, INC y adquirido de NOF Corp) activado con éster de hidroxisuccinimida en una proporción molar de aproximadamente 10 por mol de interferón  $\beta$  con cada una de las soluciones resultantes, seguido de la reacción de unión durante la noche a 4°C. Después de la reacción, se extrajo el interferón  $\beta$  no reaccionado, y se midió la actividad de interferón  $\beta$  en cada una de las soluciones de reacción preparadas.

60 La medición de la actividad se llevó a cabo utilizando una técnica de anticuerpos y enzimas (inmunoensayo sándwich) (véase Eiji Ishikawa, "Enzyme Immunoassay" ("Inmunoensayo con enzimas") 3ª edición, pág. 180, Igaku-shoin). De manera específica, se inmovilizaron anticuerpos contra interferón  $\beta$  de conejo en una inmunoplaaca, a la que se añadieron, a continuación, junto con la muestra, anticuerpos monoclonales de ratón marcados con la enzima que reconocían sólo las estructuras de interferón  $\beta$  activo. Después del lavado de los productos no unidos, se añadió un sustrato de color a la inmunoplaaca para calcular la actividad de interferón  $\beta$  de la muestra mediante la comparación con el valor de la coloración de un patrón (se confirmó que el resultado en la actividad de interferón  $\beta$

era igual al resultado obtenido mediante un procedimiento de medición de actividad biológica basado en la actividad antiviral de las células cultivadas). Paralelamente, la adición de un surfactante Tween 80 o HCO-60 de la misma manera indicada anteriormente suprimió la agregación de interferón  $\beta$  y, sin embargo, también suprimió de manera amplia la progresión de la reacción de unión del PEG, conduciendo a una medición no satisfactoria de la actividad del conjugado.

Tal como se muestra en la tabla 1, se observó un efecto evidente de mejora de la actividad en la solución de reacción que contenía una cantidad adecuada de glucosa, glicerol o etilenglicol, en comparación con el control (actividad del complejo PEG-interferón  $\beta$  obtenida mediante la reacción de unión de PEG en ausencia del aditivo).

[Tabla 1]

	Aditivo	Concentración (%)	Actividad del interferón $\beta$ (10E+7 IU)	
			Por solución de reacción	Por peso de proteína
1	Glucosa	1	1,79	1,62
2		5	1,95	2,46
3		10	2,49	4,96
4		20	2,62	5,03
5	Glicerol	1	2,28	1,73
6		5	2,19	1,87
7		10	2,53	1,81
8		20	2,51	2,24
9	Etilenglicol	1	1,74	1,37
10		5	2,24	1,68
11		10	2,77	2,04
12		20	2,96	2,37
13	Ausente		1,70	1,09

[Ejemplo 2]

Separación y purificación del complejo de interferón  $\beta$  que tiene polietilenglicol unido al grupo amino de la lisina localizada en la posición 19:

Se añadió etilenglicol a la concentración final del 20% a interferón  $\beta$  humano recombinante (concentración final: 200  $\mu\text{g/ml}$ ) almacenado en cloruro de sodio 0,5 M y una solución de tampón acetato 100 mM (pH 5,0), seguido del ajuste del pH hasta 7,6 utilizando una solución de hidrogenofosfato de disodio 1 M. Se mezcló con la solución resultante polietilenglicol (peso molecular promedio: 40K; adquirido de NOF Corp) activado con éster de hidroxisuccinimida, seguido de la reacción de unión durante la noche a 4°C. La solución de reacción se dializó durante la noche a 4°C frente a una solución de tampón acetato 20 mM (pH 4,5) que contenía NaCl 10 mM-Tween 20 al 0,05%. La solución dializada se aplicó a una columna de intercambio catiónico Poros HS con 1,7 ml de gel (fabricada por Applied Biosystems) o SP-5PW (Tosoh). Se realizó la elución mediante el incremento de la proporción del disolvente B (solución de tampón acetato 20 mM (pH 4,5 a 4,7) que contenía NaCl 1 M) mezclado con disolvente A (solución de tampón acetato 20 mM (pH 4,5 a 4,7) que contenía NaCl 10 mM). De manera específica, la elución se realizó mediante un incremento por etapas de la proporción del disolvente B hasta el 30, 40, 50 y 100% en la columna Poros HS y mediante la utilización de un gradiente continuo del 0 al 100% en la columna SP-5PW. En la figura 1 se muestra un cromatograma de absorbancia obtenido mediante la elución con la columna Poros HS. Los componentes en el cromatograma de absorbancia eluidos mediante el incremento por etapas de la proporción de disolvente B hasta el 30, 40, 50 y 100% se designan como los picos 1 a 4 (en el dibujo, (i) a (iv)), respectivamente.

En la figura 2 se muestra el resultado de analizar cada componente de los picos (1 a 4) mediante tinción con plata después de una separación con SDS-PAGE. El complejo de interferón  $\beta$  deseado que tiene PEG con un peso molecular de 40K unido al residuo de lisina localizado en la posición 19 se pudo obtener en el pico 2. Los isómeros menores de sitios unidos a PEG que no se pudieron controlar de forma completa mediante reacción se pudieron separar como subproductos, los cuales incluyen un complejo de interferón  $\beta$  que tiene PEG unido al residuo de lisina localizado en la posición 33 (en el pico 3) y un complejo de interferón  $\beta$  que tiene PEG unido al grupo amino N-terminal o a un residuo de lisina localizado en las posiciones 108 ó 134 (en el pico 4). El interferón  $\beta$  no reaccionado y el interferón  $\beta$  diPEGilado se pudieron separar en los picos 4 y 1, respectivamente.

En la figura 3 se muestra un cromatograma de absorbancia obtenido mediante la elución con la columna SP-5PW. La columna SP-5PW era capaz de una separación similar a la separación con la columna Poros HS. El complejo de interferón  $\beta$  deseado que tiene PEG con un peso molecular de 40K unido al residuo de lisina localizado en la posición 19 justifica, como el pico 2, aproximadamente el 65% de la cantidad total de proteínas (su proporción era del 65% o más con respecto a todos los complejos PEGilados, a excepción del interferón  $\beta$  no reaccionado).



## [Ejemplo 3]

Confirmación del sitio unido a polietilenglicol del interferón  $\beta$  recombinante:

5 Cada fracción de los picos separada con la columna SP-5PW en el ejemplo 2 se desaló y concentró con un cartucho de extracción en fase sólida (OASIS HLB; Waters) y, a continuación, se desecó con un evaporador centrífugo. El producto resultante se disolvió en una solución de tampón Tris (pH 9) que contenía guanidina 6 mol/l, seguido de la reducción de Cys con ditioneol y la carboxiamidometilación con yodoacetamida. Después de la adición de lisil endopeptidasa, la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 5 horas para realizar una digestión específica de la estructura. La reacción enzimática se terminó con ácido acético para producir una muestra pretratada para el análisis.

15 Esta muestra se sometió a un análisis por HPLC de fase inversa bajo las siguientes condiciones: columna: Cadenza CD-C (184,6 x 150); longitud de onda de detección: 214 nm (UV); temperatura de la columna: 40°C; caudal: 0,8 ml/min; fase móvil A: ácido acético/TFA/agua destilada (1/0,2/1000); fase móvil B: ácido acético/TFA/acetonitrilo/agua destilada (0,9/0,2/800/200); gradiente: 5% a 70% de fase móvil B en 80 minutos, seguido de 70% a 100% de fase móvil B en 5 minutos; y ciclo de análisis: 120 minutos.

20 En las figuras 4 y 5 (pre) se muestran los picos (K1 a K12) en el cromatograma de HPLC correspondientes a los fragmentos de digestión con la lisil endopeptidasa del interferón  $\beta$  antes de la reacción de unión PEG. Las flechas en la figura 4 indican los sitios de escisión con la lisil endopeptidasa. Los fragmentos peptídicos generados mediante escisión se designaron como K1 a K12. Los símbolos K1 a K12 en la figura 5 corresponden a los fragmentos peptídicos K1 a K12 en la figura 4, respectivamente. En cambio, tal como se muestra en la figura 5-2 (en el dibujo, (ii); en lo sucesivo especificado de la misma manera), en el mapa peptídico del pico 2 se observó una disminución destacable de los fragmentos peptídicos K1 y K2. Esto es probablemente debido a que la introducción de PEG en el grupo amino en la cadena lateral de la lisina localizada en la posición 19 permitía a este sitio evitar la digestión con la lisil endopeptidasa, dando lugar a la no generación de los fragmentos peptídicos K1 y K2. A partir de este resultado, se estimó que el sitio en el que se introducía el PEG era la lisina localizada en la posición 19.

30 El mapa peptídico del pico 3 produjo el resultado mostrado en la figura 5-3, en el que se observó la ausencia destacable del fragmento peptídico K2. Esto es probablemente debido a que la introducción de PEG en el grupo amino en la cadena lateral de la lisina localizada en la posición 33 permitía a este sitio evitar la digestión con la lisil endopeptidasa, dando lugar a la no generación del fragmento peptídico K2. A partir de este resultado, se estimó que el sitio principal en el que se introducía el PEG era la lisina 33.

35 Debido a que se observó una disminución en el fragmento peptídico K1 en el pico 4 tal como se muestra en la figura 5-4, se estimó la presencia de un conjugado N-terminal. Además, disminuyó una mitad el fragmento peptídico K10, sugiriendo que probablemente contenía un isómero con Lys134 o Lys123.

40 A continuación, se sometió a un análisis de la secuencia de aminoácidos un fragmento del conjugado PEG-peptido que aparecía como un pico alrededor del minuto 75 en el análisis de picos mediante HPLC de fase inversa. Este resultado e información obtenidos a partir del mapa peptídico demostraron que el pico 2, un producto principal de la reacción, es el complejo deseado que tiene PEG unido a la lisina localizada en la posición 19. Como subproductos minoritarios se separaron en los picos 3 y 4, respectivamente, un isómero posicional que tiene PEG unido a la lisina localizada en la posición 33 y un isómero posicional que tiene PEG unido a la lisina localizada en las posiciones 134 ó 108 o en el extremo N-terminal

## [Ejemplo 4]

50 Medición de la actividad restante del complejo de interferón  $\beta$  que tiene PEG con un peso molecular de 40K o 20K unido de manera selectiva al residuo de lisina localizado en la posición 19:

55 Se sintetizó, aisló y purificó mediante el procedimiento del ejemplo 2, un complejo de interferón  $\beta$  humano recombinante que tenía PEG con un peso molecular de 40K o 20K unido de manera selectiva al residuo de lisina localizado en la posición 19, seguido de la comparación de la actividad con el interferón  $\beta$  humano recombinante antes de la unión a PEG. La comparación de la actividad del interferón  $\beta$  se realizó midiendo la actividad antiviral. De manera específica, la valoración se realizó mediante un bioensayo utilizando células FL de amniocitos humanos en combinación con el virus sindbis o el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Armstrong, J. A., Methods In Enzymology, 78, 381-387, (1981)).

60 Como resultado, la actividad del interferón  $\beta$  humano recombinante antes de la unión a PEG fue de  $1,22 \times 10^8$  MIU/mg, mientras que el conjugado que tenía PEG de 40K presentaba una actividad antiviral de  $5,5 \times 10^7$  MIU/mg y un valor de actividad restante, como máximo, del 45%. La actividad restante del conjugado que tenía PEG de 20K medida de la misma manera fue del 38,7%.

65

## [Ejemplo 5]

Análisis farmacocinético del complejo de interferón  $\beta$  que tenía PEG con un peso molecular de 40K unido de manera selectiva al residuo de lisina localizado en la posición 19 y evaluación de su actividad de inducción del marcador farmacodinámico:

Se sintetizó, aisló y purificó mediante el procedimiento del ejemplo 2, un complejo de interferón  $\beta$  humano recombinante que tenía PEG con un peso molecular de 40K unido de manera selectiva al residuo de lisina localizado en la posición 19. Se administró el complejo de interferón  $\beta$  a 9 MIU/kg a un conejo (NZW, macho). Se recogió sangre del conejo antes de la administración y después de 15 minutos, 1,5 horas, 3,5 horas, 8 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y 7 días de la administración para medir la actividad antiviral en plasma y la actividad de la 2-5A sintetasa en la sangre completa. La actividad antiviral se midió mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1, mientras que la actividad de la 2-5A sintetasa se midió utilizando el kit 2-5A "Eiken" (Eiken Chemical) según el protocolo especificado. La evolución con el tiempo de la actividad restante del interferón  $\beta$  en sangre basado en la medición de la actividad antiviral se muestra en forma de gráfico en la figura 6. La evolución con el tiempo de la actividad de 2-5A sintetasa que se usa como marcador farmacodinámico se muestra en forma de gráfico en la figura 7. La unión de PEG que tenía un peso molecular de 40K dio lugar a un incremento de 20,8 veces en la actividad restante (AUC) del interferón  $\beta$  en sangre. Este incremento condujo a un aumento en la actividad de inducción del marcador farmacodinámico (se incrementó la AUC en 7,6 veces por la unión de PEG y superó el valor más elevado de la inducción del marcador farmacodinámico por el interferón  $\beta$  no modificado incluso después de 7 días después de la administración).

## [Ejemplo 6]

Separación y purificación del complejo de interferón  $\beta$  que tiene polietilenglicol unido al grupo amino de la lisina localizada en la posición 134:

Se complementó una solución de reacción de la unión entre el interferón  $\beta$  humano recombinante y el PEG obtenida de la misma manera que el ejemplo 2 con un volumen de 5 veces de una solución de tampón acetato 10 mM (pH 4,5) y se aplicó a una columna de intercambio catiónico (TOYOPEARL CM 650 (S) (Tosoh)) equilibrada con la misma solución tampón.

Se eluyeron las proteínas con la misma solución tampón que contenía cloruro de sodio 1M mediante el incremento de la proporción de la solución tampón mezclada a partir del 0 al 65% en un gradiente continuo y, a continuación, se fraccionó. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE y con una columna SP-5PW (Tosoh). Los resultados respectivos se muestran en las figuras 8-A y 8-B.

Como resultado, se obtuvieron tres picos como en el ejemplo 2. Sin embargo, cuando la fracción contenida en el tercer pico (pico (iii) en la figura 8-A) se analizó por separado con la columna SP-5PW, se observó que la fracción estaba separada adicionalmente en varios componentes (figura 8-B). Entre estos componentes, se analizó, de la misma manera que en el ejemplo 3, la fracción que contenía un pico (flecha en la figura 8-B) que constituía el porcentaje más elevado del tercer pico y se eluyó el último. Como resultado, se aisló de la misma un complejo de IFN- $\beta$  que tenía PEG unido a la lisina localizada en la posición 134.

## [Ejemplo 7]

Comparación de la actividad entre el complejo de PEG e interferón  $\beta$  obtenido mediante la reacción de unión no selectiva de PEG a lisina y el complejo de PEG e interferón  $\beta$  obtenido mediante la reacción de unión selectiva de los mismos:

Se añadió etilenglicol a la concentración final del 20% a interferón  $\beta$  humano recombinante o interferón natural almacenado en una solución de cloruro de sodio 0,5 M y tampón acetato 100 mM (pH 5,0), seguido del ajuste del pH hasta 5,5 (condición de reacción 1) o hasta aproximadamente 7,6 (condición de reacción 2) utilizando una solución de hidrogenofosfato de disodio 1 M, del mismo modo que en el ejemplo 2. Se mezcló polietilenglicol (peso molecular promedio: 10K, 20K o 40K; fabricado por Shearwater Polymers, INC y adquirido de NOF Corp) activado con éster de hidroxisuccinimida en una cantidad de 45 veces en relación con una molécula de interferón  $\beta$  con la solución resultante, seguido de la reacción de unión durante la noche a 4°C.

Al mismo tiempo, se añadió SDS a la concentración final del 0,1% a una solución de interferón  $\beta$  humano recombinante o interferón  $\beta$  natural, seguido del ajuste del pH de la solución de reacción hasta 9,0 (condición de reacción 3). Se mezcló polietilenglicol (peso molecular promedio: 10K, 20K o 40K) activado con éster de hidroxisuccinimida en una cantidad de 45 veces en relación con una molécula de interferón  $\beta$  con la solución resultante, seguido de la reacción de unión durante la noche a 4°C.

Se evaluó la actividad del interferón  $\beta$  en cada una de las soluciones después de la reacción mediante el mismo

procedimiento de medición de la actividad antiviral que en el ejemplo 4. La progresión de la reacción de unión en cada una de las soluciones se confirmó mediante SDS-PAGE.

5 Tal como se muestra en la tabla 2, la actividad del interferón  $\beta$  disminuyó hasta el 10% o menos independientemente del peso molecular de PEG en la condición de reacción 3 que no aseguraba la selectividad de unión de PEG a lisina. Por otro lado, se confirmó que se mantenía, como mínimo, el 10% o superior de la actividad del interferón  $\beta$  independientemente del peso molecular de PEG en las condiciones de reacción 1 y 2 que aumentaban la selectividad de unión de PEG a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134.

10 [Tabla 2]

Tipo de IFN $\beta$	IFN $\beta$ natural (unido a cadenas de azúcares)			IFN $\beta$ recombinante de <i>E. coli</i>		
Peso molecular de PEG	40K	20K	10K	40K	20K	10K
Condición de reacción 1	100%	86%	94%	94%	54%	61,9%
Condición de reacción 2	54%	29%	15%	48%	21%	22%
Condición de reacción 3	1%	2%	1%	2,8%	0,7%	1,5%

[Ejemplo 8]

15 Comparación de la actividad entre el complejo de interferón  $\beta$  PEGilado de manera múltiple de forma no selectiva con 2 o más moléculas de PEG y el complejo de interferón  $\beta$  monoPEGilado con PEG unido de manera selectiva a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134:

20 Después de la reacción de unión de PEG de la misma manera que en el ejemplo 6, se separaron con una columna TOYOPEARL CM 650 (S) (Tosoh) una fracción que contenía un complejo de interferón  $\beta$  PEGilado de manera múltiple de forma no selectiva con 2 o más moléculas de PEG y una fracción que contenía un complejo de interferón  $\beta$  monoPEGilado con PEG unido de manera selectiva a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 para medir sus actividades del interferón  $\beta$  mediante el procedimiento de medición de la actividad antiviral descrita en el ejemplo 4. Como resultado, tal como se muestra en la figura 9, el complejo de interferón  $\beta$  PEGilado de manera múltiple de forma no selectiva con 2 o más moléculas de PEG mantuvo solamente aproximadamente el 1% de la actividad, mientras que el complejo de interferón  $\beta$  monoPEGilado con PEG de 40K unido de manera selectiva a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 mantuvo el 10% o más de la actividad.

[Ejemplo 9]

30 Comparación de la retención en sangre entre el complejo de IFN- $\beta$  unido con PEG con un peso molecular de 20.000 y el complejo de IFN- $\beta$  unido con PEG con un peso molecular de 40.000:

35 Se marcaron IFN- $\beta$  unido con PEG con un peso molecular de 20.000 ó 40.000 e IFN- $\beta$  no PEGilado con 125I y se administraron por vía intravenosa a un conejo. Se recogió sangre del conejo de manera cronológica hasta 6 días. Se midió la cantidad de cada interferón  $\beta$  restante en sangre midiendo la radioactividad con un contador  $\gamma$ . La evolución con el tiempo de cada interferón  $\beta$  restante en sangre se muestra en la figura 10 con una radioactividad en el momento de la administración del 100%. La integral de la cantidad de interferón  $\beta$  restante en sangre para el IFN- $\beta$  unido con PEG con un peso molecular de 40.000 hasta 6 días produjo un incremento 5,5 veces mayor que el del IFN- $\beta$  no PEGilado. La integral de la cantidad de interferón  $\beta$  restante en sangre para el IFN- $\beta$  unido con PEG con un peso molecular de 20.000 se quedó en un incremento 1,5 veces mayor que el del IFN- $\beta$  no PEGilado. Este resultado demostró que es importante para la retención del complejo de IFN- $\beta$  en sangre unir a IFN- $\beta$  un PEG con un peso molecular de 20.000 o superior, manteniendo la actividad.

45 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en el presente documento se incorporan en el mismo por referencia en su totalidad.

Aplicación industrial

50 Según la presente invención, el polietilenglicol se puede unir de manera específica a la lisina localizada en las posiciones 19 ó 134 en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$ . Un complejo de interferón  $\beta$  producido mediante el procedimiento de la presente invención mantiene una actividad elevada, teniendo a la vez una solubilidad y estabilidad física y biológica suficientes, así como unos valores excelentes de vida media circulatoria y depuración, en los organismos vivos. De este modo, el complejo de interferón  $\beta$  de la presente invención produce

menos efectos secundarios y es útil como fármaco muy eficaz.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Toray Industries Inc.  
 <120> Complejo de interferón beta  
 <130> PH-2231-PCT  
 10 <140>  
 <141>  
 <150> JP2003-299850  
 15 <151> 2003-08-25  
 <160> 1  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 20 <210> 1  
 <211> 166  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <220>  
 <223> Inventor: Narumi, Hideki  
 Inventor: Tsushima, Yoshiaki  
 Inventor: Yamashita, Koji  
 30 Inventor: Sone, Saburou  
 Inventor: Sato, Miyuki  
 <400> 1  
 35 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln  
 1 5 10  
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
 20 25 30  
 40 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln  
 35 40 45  
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
 50 55 60  
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
 65 70 75 80  
 50 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
 85 90 95  
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr  
 100 105 110  
 55 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
 115 120 125  
 60 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
 130 135 140  
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu  
 145 150 155 160  
 65 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
 165

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un complejo de interferón  $\beta$  que tiene un polietilenglicol unido de manera específica y covalente a un residuo de lisina en las posiciones 19 ó 134 en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  o en la correspondiente posición a las mismas en una secuencia de aminoácidos de un mutante del interferón  $\beta$ , que comprende: unir de manera específica y covalente polietilenglicol, que tiene un peso molecular de 10.000 o superior y está activado con un grupo funcional reactivo con un grupo amino, a un residuo de lisina del interferón  $\beta$  según la SEQ ID NO: 1 o un mutante del interferón  $\beta$  según la SEQ ID NO: 1 que presenta una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, en presencia, como mínimo, de un aditivo a una concentración del 1-50% en peso seleccionado del grupo que comprende oligosacáridos que tienen 5 o menos unidades de azúcar, monosacáridos, sus correspondientes alcoholes de azúcares y alcoholes polihídricos C<sub>2-6</sub>, a pH 5,0-8,5; y extraer, después de la reacción de unión, el interferón  $\beta$  no reaccionado, el polietilenglicol y los subproductos mediante la utilización de un portador de intercambio iónico para purificar y concentrar el complejo de interferón  $\beta$  que tiene polietilenglicol unido de manera específica y covalente a un residuo de lisina en las posiciones 19 ó 134 en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  o en la correspondiente posición a las mismas en una secuencia de aminoácidos de un mutante del interferón  $\beta$ , en el que el complejo interferón  $\beta$  mantiene una actividad del 10% o superior de la actividad antiviral del interferón  $\beta$  que no se ha unido a un polietilenglicol, cuando la actividad antiviral del interferón  $\beta$  se determina mediante un bioensayo utilizando células FL de amniocitos humanos y el virus sindbis o el virus de la estomatitis vesicular combinados.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el aditivo se selecciona del grupo que comprende disacáridos, monosacáridos, sus correspondientes alcoholes de azúcares y alcoholes polihídricos C<sub>2-3</sub>.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que el aditivo se selecciona del grupo que comprende glucosa, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, etilenglicol y glicerol.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el interferón  $\beta$  es natural o es interferón  $\beta$  recombinante.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular de 10.000 a 60.000.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grupo funcional reactivo con un grupo amino tiene una estructura de éster de hidroxisuccinimida o de éster de sulfonato de nitrobenzono.
7. Complejo de interferón  $\beta$ , en el que el polietilenglicol que tiene un peso molecular de 10.000 o superior está unido de manera específica y covalente a un residuo de lisina en las posiciones 19 ó 134 en la secuencia de aminoácidos del interferón  $\beta$  según la SEQ ID NO: 1 o en la correspondiente posición a las mismas en una secuencia de aminoácidos de un mutante del interferón  $\beta$  según la SEQ ID NO: 1, que presenta una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos, en el que el complejo interferón  $\beta$  mantiene una actividad del 10% o superior de la actividad antiviral del interferón  $\beta$  que no se ha unido a un polietilenglicol, cuando la actividad antiviral del interferón  $\beta$  se determina mediante un bioensayo utilizando células FL de amniocitos humanos y el virus sindbis o el virus de la estomatitis vesicular combinados.
8. Complejo de interferón  $\beta$ , según la reivindicación 7, en el que el interferón  $\beta$  es natural o es interferón  $\beta$  recombinante.
9. Complejo de interferón  $\beta$ , según la reivindicación 7 u 8, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular de 10.000 a 60.000.
10. Composición farmacéutica que comprende un complejo de interferón  $\beta$ , según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

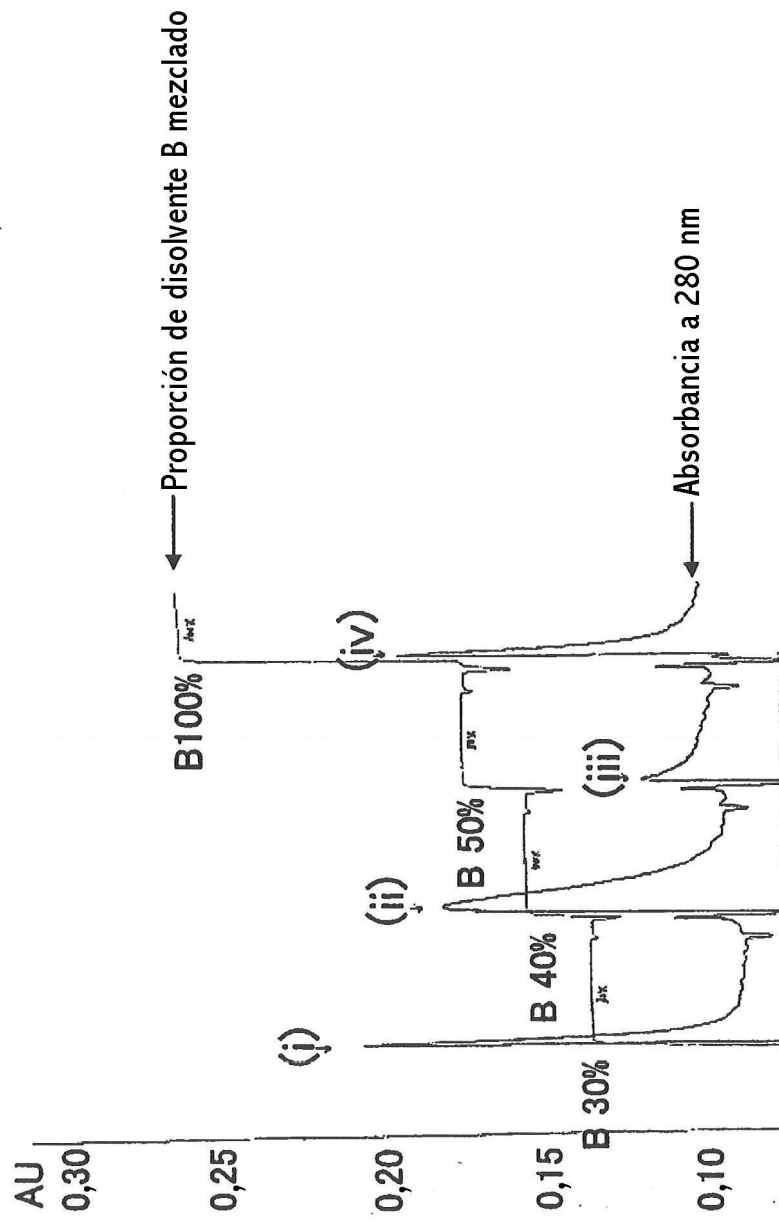


Fig. 2

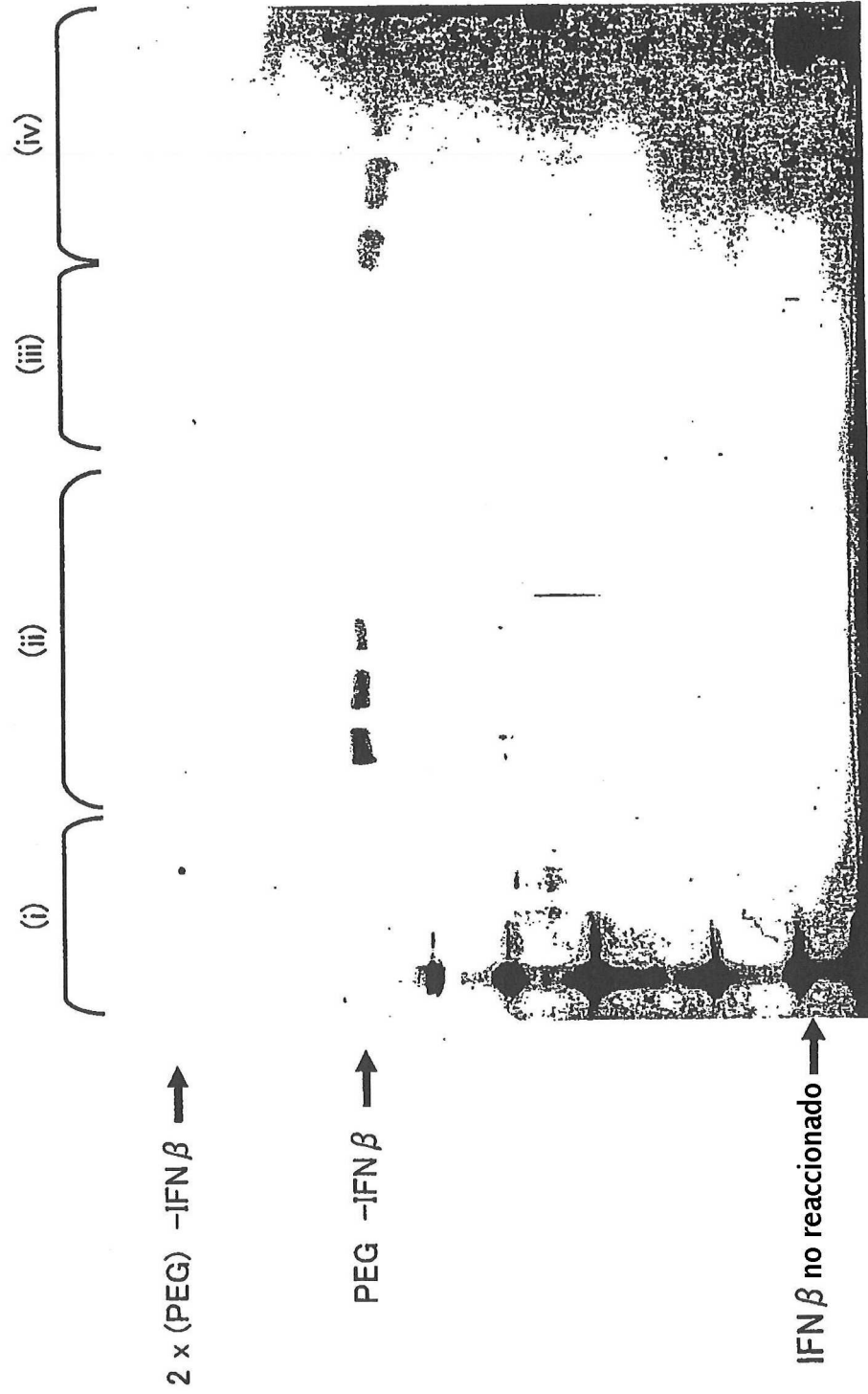


Fig. 3

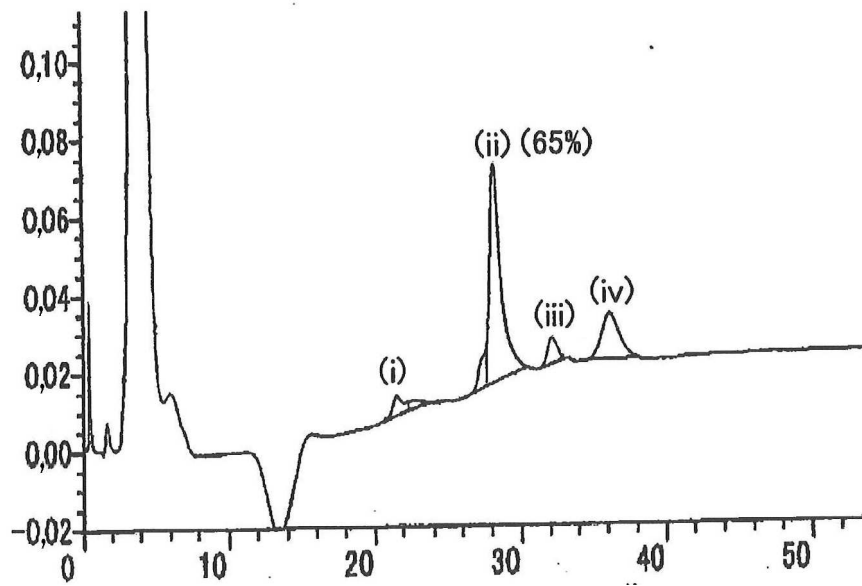




Fig. 4

	K1		↓	K2		
n-	MSYNLLGFLQ	RSSNFQCQKL		LWQLNGRLEY	30	
	↓ K3		↓ K4	↓ K5		
	CLKDRMNFDI	PEEIQKLOQF		QKEDAALTIY	60	
	EMLQNIFAIF	RQDSSSTGWN		ETNIVELLAN	90	
	↓ K6	K7 ↓	↓ K8	↓ K9		
	VYHQINHLKT	VLEEKLEKED		FTRGKLMSSL	120	
	↓ K10	K11 ↓	↓ K12			
	HLKRYYGRIL	HYLKAKEYSH		CAWTIVRVEI	150	
	LRNFYFINRL	TGYLRN				

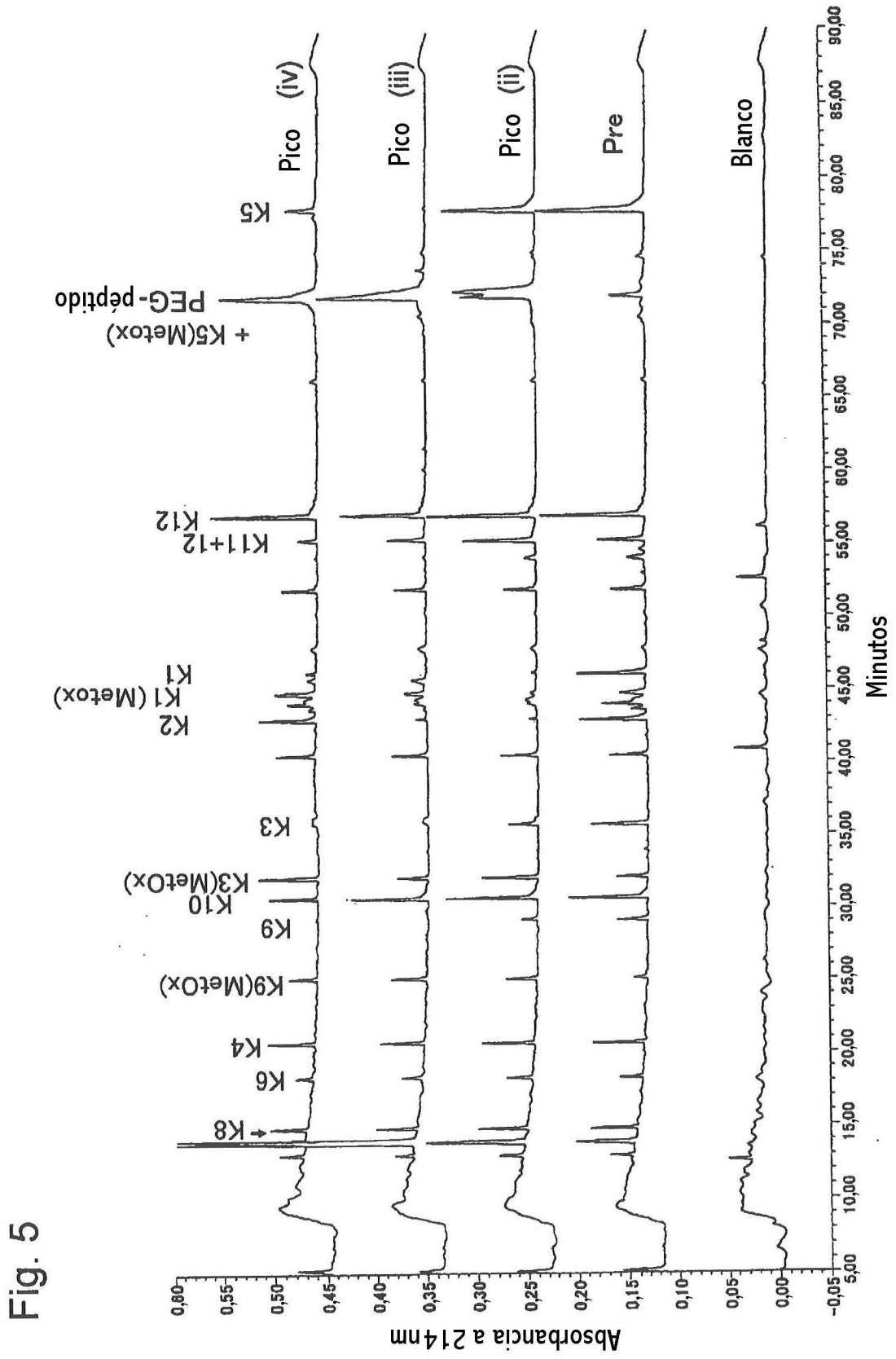


Fig. 5

Fig. 6

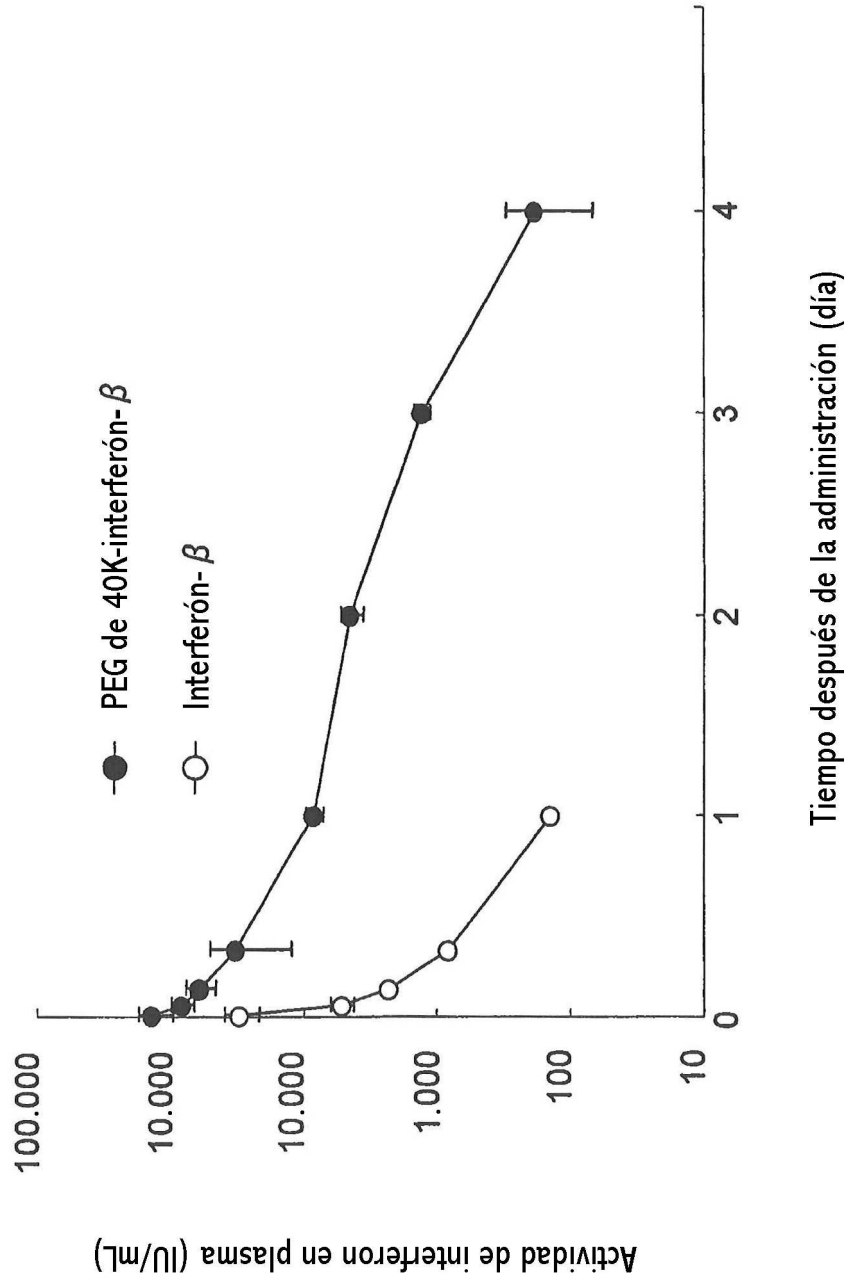


Fig. 7

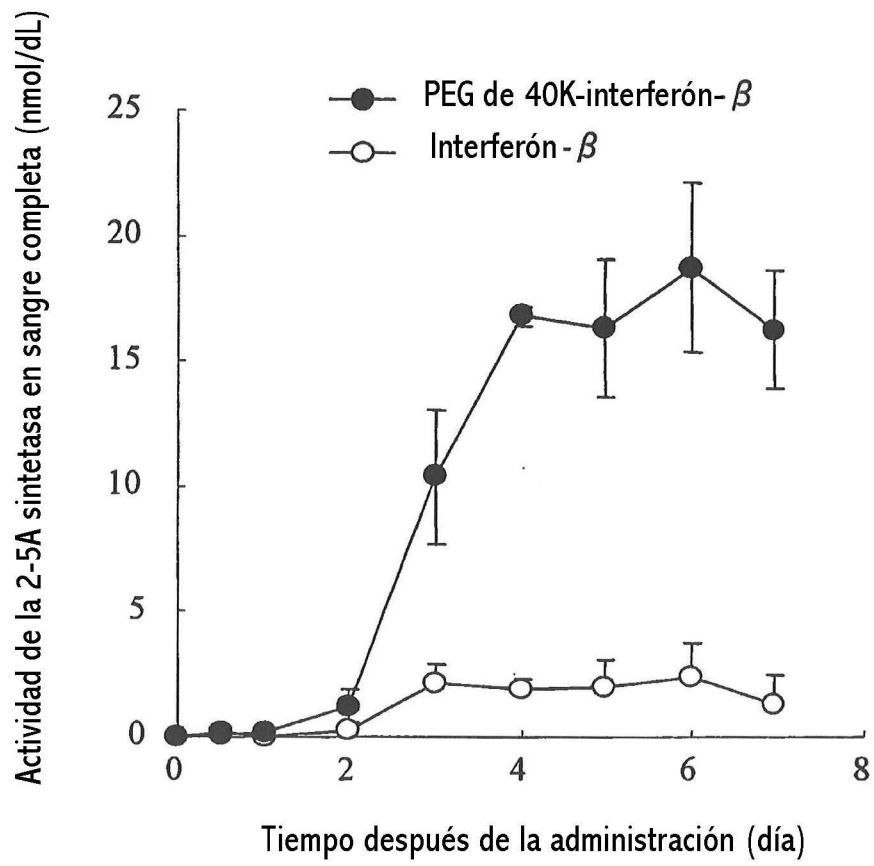
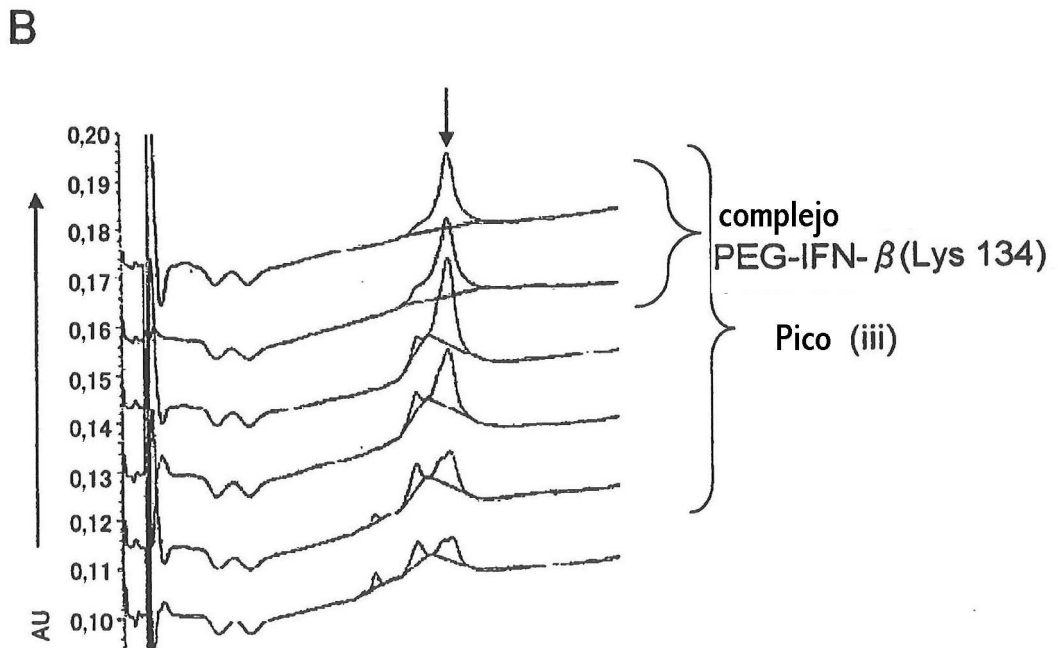
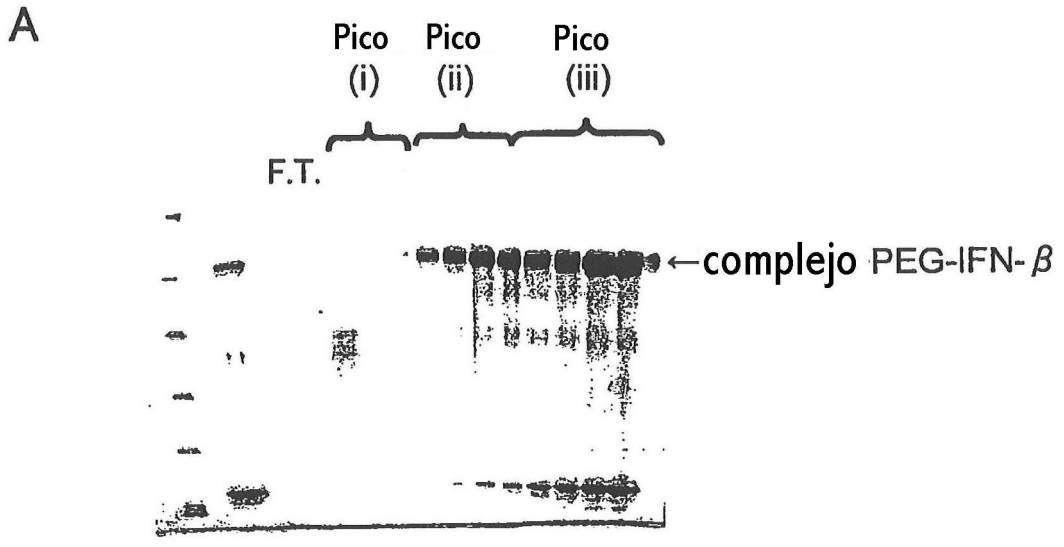


Fig. 8



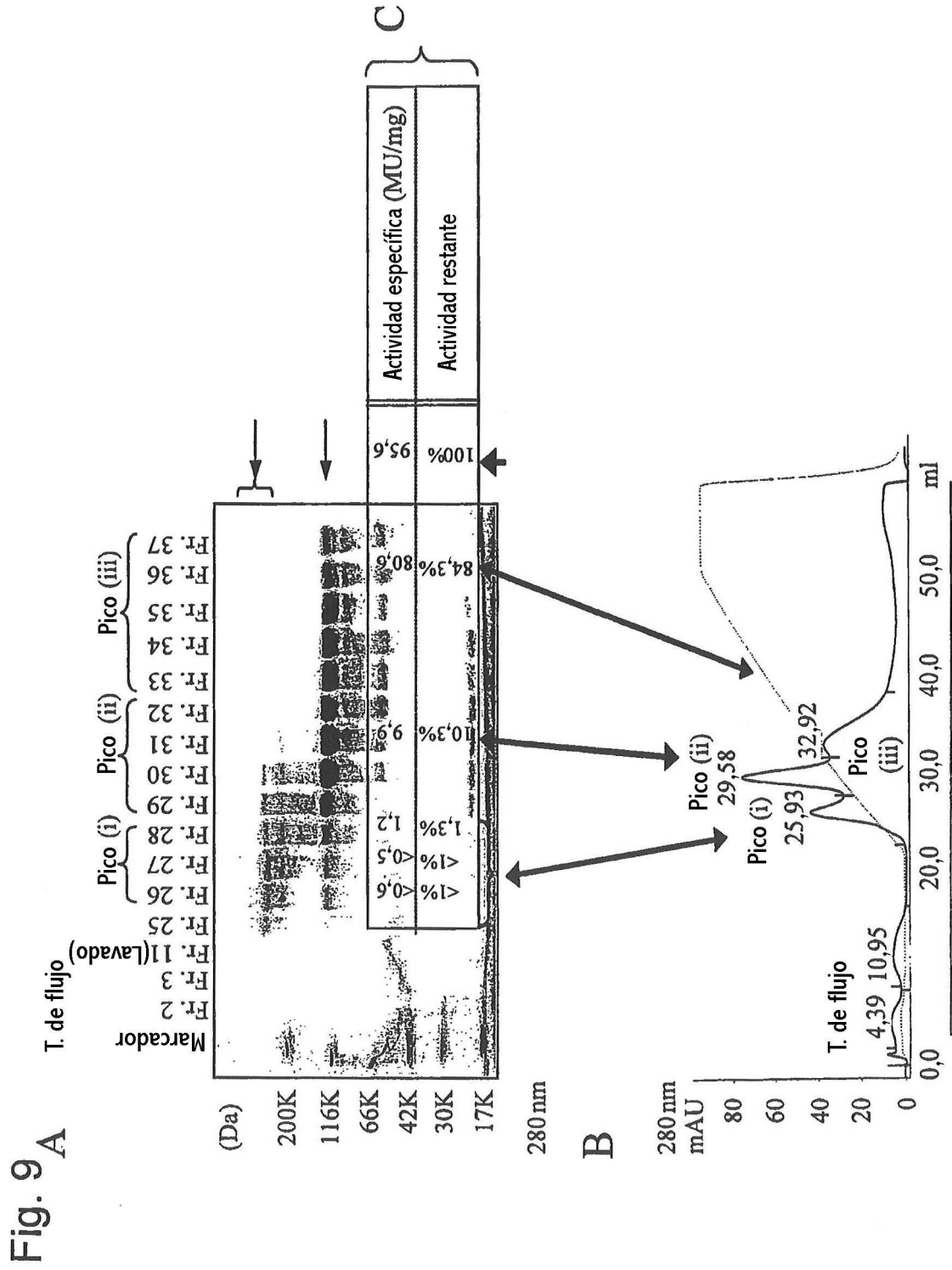


Fig. 10

