

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 504 165**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2003 E 03759445 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1572728**

54 Título: **Conjugados de polímeros con antigenicidad disminuida, procedimientos de preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.09.2002 US 414424 P
12.12.2002 US 317092

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MARTINEZ, ALEXA L.;
SHERMAN, MERRY R.;
SAIFER, MARK G. P. y
WILLIAMS, L. DAVID

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 504 165 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de polímeros con antigenicidad disminuida, procedimientos de preparación y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención es sobre los campos de la bioquímica de proteínas y de las ciencias farmacéuticas y médicas. En particular, la invención da a conocer procedimientos para producir conjugados entre polímeros hidrosolubles (p. ej., poli(etilenglicol) y derivados del mismo) y componentes bioactivos, en donde dichos conjugados tienen menos antigenicidad e inmunogenia que los conjugados estándares entre componentes bioactivos y polímeros. La invención también da a conocer los conjugados producidos por tales procedimientos, composiciones que comprenden tales
- 10 conjugados, kits que comprenden tales conjugados y composiciones, y usos de las composiciones para el tratamiento de una serie de afecciones médicas.

Técnica relacionada

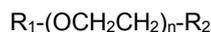
- Dos factores clave han obstaculizado el desarrollo de las proteínas recombinantes como agentes terapéuticos: su semivida en circulación, por lo general breve, y su posible capacidad antigénica e inmunógena. Tal y como se usa en
- 15 la presente memoria y en general en la técnica, la terminología «antigenicidad» hace referencia a la capacidad que tiene una molécula para fijarse a los anticuerpos ya existentes, mientras que la terminología «inmunogenia» hace referencia a la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria *in vivo*, tanto si la respuesta implica la formación de anticuerpos (una «respuesta humoral») como la estimulación de la respuesta inmunitaria celular. Para la administración de proteínas terapéuticas recombinantes, a menudo es deseable administrarlas por vía intravenosa
- 20 (i.v.) para conseguir la mayor actividad en circulación y para disminuir al mínimo los problemas de biodisponibilidad y degradación. Sin embargo, la semivida de las proteínas pequeñas después de la administración i.v. suele ser muy breve (véanse los ejemplos en Mordenti, J. et al., (1991) *Pharm. Res.* 8: 1351-1359; Kuwabara, T. et al., (1995) *Pharm. Res.* 12: 1466-1469). Los riñones sanos suelen retener en el torrente circulatorio las proteínas cuyo radio hidrodinámico excede el de la albúmina sérica, que tiene un radio de Stokes en torno a 36 Å y una masa molecular
- 25 en torno a 66.000 Da (66 kDa). Sin embargo, las proteínas más pequeñas, tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos («G-CSF», por su nombre en inglés) y la ribonucleasa, se eliminan rápidamente del torrente circulatorio por la filtración glomerular (Brenner, B. M. et al. (1978) *Am. J. Physiol* 234: F455-F460; Venkatachalam, M. A. et al. (1978) *Circ Res.* 43: 337-347; Wilson, G. (1979) *J. Gen Physiol* 74: 495-509). Como consecuencia, el mantenimiento de una concentración terapéuticamente útil de las proteínas recombinantes pequeñas en el torrente
- 30 circulatorio resulta problemático después de la administración i.v. Por lo tanto, se debe administrar una concentración más elevada de tales proteínas e inyectarlas con más frecuencia. El elevado ritmo de las dosis incrementa el coste del tratamiento, disminuye la probabilidad de cumplimiento del paciente e incrementa el riesgo de acontecimientos adversos, p. ej., reacciones inmunitarias. Las respuestas inmunitarias humoral y celular pueden reducir la concentración circulante de las proteínas recombinantes inyectadas hasta un nivel que puede imposibilitar la
- 35 administración de una dosis eficaz o que puede conducir a acontecimientos que limiten el tratamiento, tales como la anafilaxia (Pui, C.-H. et al., (2001) *J Clin. Oncol.* 19: 697-704).

- Las vías alternativas de administración, tales como las inyecciones subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.), pueden solventar algunos de estos problemas al proporcionar una liberación más gradual de las proteínas recombinantes al torrente circulatorio. Sin embargo, la biodisponibilidad puede ser realmente baja, lo que pone difícil que se alcance la
- 40 concentración eficaz en circulación de tales fármacos. Otro problema que puede estar relacionado con la poca biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía s.c. o i.m es el incremento de la probabilidad de degradación de la proteína terapéutica en el sitio de la inyección.

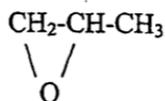
- La modificación de las proteínas recombinantes mediante la unión covalente de derivados de poli(etilenglicol) («PEG») ha sido muy investigado como una manera de abordar los defectos explicados más arriba (revisado en
- 45 Sherman, M. R. et al. (1997) en: *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*, Harris, J. M. et al., eds., American Chemical Society, Washington, D.C., págs. 155-169; Roberts, M. J. et al. (2002) *Adv Drug Deliv Res* 54: 459-476). La unión de derivados de PEG a las proteínas se ha demostrado que estabiliza las proteínas, mejora su biodisponibilidad y/o reduce su inmunogenia *in vivo* (la unión covalente de los derivados de PEG a una proteína u otro sustrato se denomina en la presente memoria «PEGilación», y con el mismo nombre se la conoce en la técnica).
- 50 Además, la PEGilación puede incrementar significativamente el radio hidrodinámico de las proteínas. Cuando una proteína pequeña, tal como una citocina u hormona polipeptídica, está conjugada a una sola cadena larga de PEG (p. ej., que tiene una masa molecular de al menos 18 kDa), el conjugado resultante tiene un radio hidrodinámico más grande que el de la seroalbúmina y se retrasa considerablemente su eliminación a través de los glomérulos renales. Los efectos combinados de la PEGilación (reducción de la proteólisis, reducción del reconocimiento inmunitario y
- 55 reducción de la tasa de eliminación renal) les confieren ventajas sustanciales a las proteínas PEGiladas como agentes terapéuticos.

Desde los años setenta del siglo XX se lleva investigando sobre utilizar la conexión covalente de los polímeros para mejorar la seguridad y la eficacia de diferentes proteínas para el uso farmacéutico (véase, p. ej., la patente de los

- EE.UU. n.º 4.179.337). Algunos ejemplos incluyen la conjugación de PEG o de poli(óxido de etileno) (PEO, por su nombre en inglés) a la adenosina desaminasa (EC 3.5.4.4) para su uso en el tratamiento de enfermedades graves de inmunodeficiencia combinada (Davis, S. et al. (1981) *Clin. Exp. Immunol.* 46: 649-652; Hershfield, M. S. et al. (1987) *N Engl. J. Med.* 316: 589-596). Otros ejemplos incluyen la conjugación de PEG a la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) para el tratamiento de afecciones inflamatorias (Saifer, M. et al., patentes de los EE.UU. n.º 5.006.333 y 5.080.891) y a la urato oxidasa (EC 1.7.3.3) para la eliminación del exceso de ácido úrico de la sangre y de la orina (Inada, Y., solicitud de patente japonesa 55-099189; Kelly, S. J. et al. (2001) *J. Am Soc Nephrol* 12: 10001-10009; Williams, L. D. et al.; publicación PCT de patente internacional WO 00/07629 A3, que corresponde a la patente de los EE.UU. n.º 6.576.235; Sherman, M. R. et al., publicación PCT de patente internacional WO 01/59078 A2).
- 10 Los PEO y los PEG son polímeros compuestos de unidades de óxido de etileno unidas covalentemente. Estos polímeros tienen la estructura general siguiente:



- donde R_2 puede ser un grupo hidroxilo (o un derivado reactivo del mismo) y R_1 puede ser hidrógeno, como en «PEG diol», un grupo metilo, como en el monometoxiPEG («mPEG») u otro grupo alquilo inferior, p. ej., como en el *iso*-propoxiPEG o en el *t*-butoxiPEG. El parámetro n de la estructura general del PEG indica el número de unidades de óxido de etileno del polímero y se denomina «grado de polimerización» en la presente memoria y en la técnica. Los PEG y los PEO pueden ser lineales, ramificados (Fuks, I. et al. (1994) *J Control Release* 30: 27-34) o con forma de estrella (Marrill, E. W. (1993) *J. Biomater Sci Polym Ed* 5: 1-11). Los PEG y los PEO son anfipáticos, esto es, son solubles en el agua y en determinados solventes orgánicos, y se pueden adherir a los materiales que contienen lípidos, entre ellos los virus con envoltura y las membranas de las células bacterianas y de animales. Algunos copolímeros alternantes, al azar, o en bloque, de óxido de etileno (OCH₂CH₂) y óxido de propileno, que tiene la estructura siguiente:



- tienen propiedades que son suficientemente parecidas a las del PEG, que se cree que estos copolímeros son un reemplazo adecuado del PEG en determinadas aplicaciones (véanse, p. ej., las patentes de los EE.UU. n.º 4.609.546 y 5.283.317). La terminología «óxidos de polialquileno» y la abreviatura «PAO» tal y como se utilizan en la presente memoria hacen referencia a tales copolímeros así como a copolímeros de PEG o PEO y poli(oxietileno-oximetileno) (patente de los EE.UU. n.º 5.476.653).

- Es frecuente que varias cadenas (p. ej., 5 a 10) de uno o varios PAG, p. ej., uno o varios mPEG con una masa molecular de unos 5 kDa a unos 10 kDa, se conjuguen a la proteína diana a través de grupos amino primarios (los grupos amino ϵ de los restos de lisina y el grupo amino α del aminoácido del extremo amino). Más recientemente, se han sintetizado conjugados que contienen una sola cadena de mPEG de masa molecular más alta, p. ej., 12 kDa, 20 kDa o 30 kDa. Se ha demostrado que existen correlaciones directas entre las semividas plasmáticas de los conjugados y una creciente masa molecular y/o creciente número de cadenas de PEG conjugado (Clark, R. et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 21969-21977). Por otra parte, a medida que se incrementa el número de cadenas de PEG, de igual forma se incrementa la probabilidad de que se modifique un grupo amino en una región esencial del componente bioactivo (en particular si el componente bioactivo es una proteína), lo cual influirá en su función biológica (p. ej., catálisis mediante una enzima o fijación de una citocina al receptor). Para las proteínas más grandes que contienen muchos grupos amino, y para las enzimas con sustratos de poca masa molecular, este equilibrio entre el incremento de la duración de la acción y la disminución de la actividad específica puede resultar aceptable porque produce un incremento neto de la actividad biológica *in vivo* de los conjugados que contienen PEG. Para las proteínas más pequeñas, tales como las hormonas polipeptídicas y las citocinas, sin embargo, un grado de sustitución relativamente alto probablemente disminuya la actividad funcional hasta el punto de anular la ventaja de la extensión de la semivida en el torrente circulatorio (Clark R. et al., véase más arriba).
- 45 Algunos de los presentes inventores han sido los primeros en realizar una serie de estrategias de PEGilación y las han aplicado a varias proteínas para conseguir la combinación deseable de farmacocinética favorable e incremento de la potencia *in vivo*. Estas proteínas incluyen el factor de estimulación de las colonias de macrófagos y granulocitos («GM-CSF», por su nombre en inglés) (Saifer, M. G. P. et al. (1997) *Polym. Preprints* 38: 576-577; Sherman, M. R. et al., (1997), véase más arriba) y la uricasa de mamífero recombinante (véanse las publicaciones PCT de patente internacional WO 00/07629 y WO 01/59078; Kelly, S. J. et al., véase más arriba; patente de los EE.UU. n.º 6.576.235). Con el GM-CSF como citocina modelo, algunos de los presentes inventores demostraron que la conexión de una o dos cadenas de mPEG de alta masa molecular (aproximadamente 36 kDa) era suficiente para mejorar considerablemente la potencia *in vivo* del GM-CSF murino recombinante (Saifer, M. G. P. et al. (1997), véase más arriba; Sherman, M. R. et al. (1997), véase más arriba).
- 50 También se han llevado a cabo estudios en los que se modificó la urato oxidasa (uricasa) recombinante de mamífero y se exploró como un posible tratamiento para el intestino resistente a los tratamientos (véanse las publicaciones

PCT de patente internacional WO 00/07629, que corresponde a la patente de los EE.UU. n.º 6.576.235, y WO 01/59078). Cuando la PEG-uricasa se utilizó para tratar los ratones sin uricasa (*uox-/-*) que mostraban una profunda nefropatía inducida por el ácido úrico, se encontró que se toleraba bien, y que era eficaz y sustancialmente no inmunógena. Los ratones tratados mostraban una mejoría del funcionamiento renal a lo largo del tratamiento (10
5 semanas) y tenían un número de lesiones renales relacionadas con el ácido úrico sustancialmente menor que los ratones *uox-/-* sin tratar, como se demuestra mediante las imágenes de resonancia magnética al microscopio (Kelly, S. J. et al. (2001), véase más arriba).

La conexión covalente de cadenas de un PAG a una molécula polipeptídica se describe en la patente de los EE.UU. n.º 4.179.337 de Davis, F. F. et al., así como en Abuchowski, A. et al. (1981) en *Enzymes as Drugs*, Holcenberg, J. S.
10 et al. eds., John Wiley and Sons, Nueva York, págs. 367-383. Estas referencias describen que las enzimas y otras proteínas modificadas con mPEG son menos inmunógenas y menos antigénicas, y tienen una vida útil más prolongada en el torrente circulatorio, que las proteínas intactas correspondientes. Las propiedades beneficiosas resultantes de los conjugados modificados químicamente son muy útiles en una serie de aplicaciones terapéuticas.

Para unir covalentemente el PEG o los óxidos de polialquileno a una proteína, al menos uno de los grupos hidroxilo
15 terminales del polímero debe convertirse primero en un grupo funcional reactivo. Este proceso se suele denominar con frecuencia «activación» y el producto se denomina «PEG activado» u óxido de polialquileno activado. Para tales estrategias se utiliza con más frecuencia el monometoxiPEG en el que un extremo está desactivado con un éter de metilo químicamente estable y poco reactivo (el «grupo metoxilo»), y el otro extremo lleva un grupo funcional que reacciona con los grupos amino de una molécula de proteína. Se utilizan con menos frecuencia los denominados
20 mPEG «ramificados», que contienen dos o más grupos metoxilo distales desde un único grupo funcional activado. Un ejemplo es la di-mPEG-lisina, en la cual lo más frecuente es que el grupo carboxilo de la lisina se active mediante la esterificación con *N*-hidroxisuccinimida (Harris, J. M. et al., patente de los EE.UU. n.º 5.932.462).

Los polímeros activados reaccionan con un agente terapéutico que tiene grupos funcionales nucleófilos que sirven
25 como sitios de unión. Un grupo funcional nucleófilo que se utiliza habitualmente como sitio de unión es el grupo amino ϵ de los restos de lisina. También se han utilizado como sitios de unión los grupos libres de ácido carboxílico, los grupos carbonilo adecuadamente activados, los restos glucídicos oxidados y los grupos tioólicos.

El grupo hidroxilo del mPEG se ha activado con cloruro cianúrico y el compuesto resultante se ha conjugado
30 entonces con proteínas (Abuchowski, A. et al., (1977) *J. Biol Chem.* 252: 3582-3586; Abuchowski, A. et al. (1981), véase más arriba; y Davis et al., patente de los EE.UU. n.º 4.179.337). Sin embargo, el uso de este procedimiento tiene desventajas, tales como la toxicidad del cloruro cianúrico y su reactividad inespecífica por las proteínas que tienen grupos funcionales diferentes a las aminas, tales como los restos de cisteína o tirosina accesibles al solvente que pueden ser esenciales para el funcionamiento.

Para solventar estas y otras desventajas, se han introducido PEG activados alternativos, tales como los derivados de
35 succinato de succinimidilo del mPEG («SS-PEG») (Abuchowski, A. et al., (1984) *Cancer Biochem Biophys* 7: 175-186). En condiciones leves, el SS-PEG reacciona rápidamente con las proteínas (en menos de 30 minutos), lo que produce conjugados activos pero muy intensamente modificados.

M. Saifer et al., en la patente de los EE.UU. n.º 5.468.478, describen carbonatos de polialquilenglicol-mono-*N*-
40 succinimidilo y los conjugados producidos de los mismos. S. Zalipsky, en la patente de los EE.UU. n.º 5.612.460, describe procedimientos para la preparación de carbonatos de poli(etilenglicol)-*N*-succinimidilo. Esta forma del polímero («SC-PEG») reacciona con avidez con los grupos amino de las proteínas, así como con los péptidos de poca masa molecular y otros materiales que contienen grupos amino libres, con el cual forma enlaces de uretano.

Los enlaces de uretano (o carbamato) entre los grupos amino de la proteína y el PEG se sabe también en la técnica
45 que se pueden producir a partir de otros derivados de carbonato de PEG (Beauchamp, C. et al. (1983) *Anal Biochem* 131: 25-33; Veronese, F. M. et al. (1985) *Appl Biochem Biotechnol* 11: 141-152). Los intermedios de mPEG reactivos y los procedimientos para su uso también se conocen en la técnica para la síntesis de conjugados de PEG a componentes bioactivos, que quedan unidos mediante enlaces amida, enlaces éster, aminas secundarias y enlaces tioéster, entre otros.

T. Suzuki et al. ((1984) *Biochim Biophys Acta* 788: 248-255) conjugaron covalentemente la inmunoglobulina G («IgG») a
50 mPEG que se había activado mediante cloruro cianúrico. Estudiaron las propiedades biológicas y fisicoquímicas, tales como la actividad de fijación al antígeno y la estructura molecular, el comportamiento cromatográfico de exclusión por tamaño, la actividad superficial, la capacidad de agregación interfacial y la capacidad de agregación por calor, que indujeron la activación inespecífica del complemento mediante los conjugados PEG-IgG. La conjugación del PEG a la IgG incrementó el radio de Stokes aparente y la actividad superficial de la IgG, y estabilizó la IgG frente al calor y/o a la exposición a interfases, mientras que no se observó ninguna desnaturalización estructural de la IgG.
55 La supresión de la capacidad de agregación inespecífica se atribuía principalmente a la inhibición estérica de la asociación entre las moléculas de IgG PEGiladas. Estos resultados indicaron que la IgG conjugada al mPEG era útil como una preparación intravenosa y también sugirió que el PEG era útil como aditivo para estabilizar la IgG sin modificar para el uso intravenoso.

K. A. Sharp et al. ((1986) *Anal Biochem* 154: 110-117) investigaron la posibilidad de producir ligandos de afinidad biospecífica para aislar las células de los sistemas acuosos de polímeros de dos fases basándose en los antígenos de la superficie celular. La IgG de conejo contra los eritrocitos humanos se hizo reaccionar con el mPEG, activado con cloruro cianúrico, de masa molecular de aproximadamente 0,2, 1,9 y 5 kDa a diferentes proporciones molares de PEG por grupos de lisina de la proteína. El coeficiente de reparto de la proteína en un sistema de dos fases que contiene dextrano y PEG se incrementó al incrementar el grado de modificación y al incrementar la masa molecular del mPEG. Había una pérdida concomitante de la capacidad para aglutinar los eritrocitos humanos.

R. H. Tullis, en la patente de los EE.UU. n.º 4.904.582, describe conjugados de oligonucleótidos en donde los oligonucleótidos se juntan a través de un brazo conector a un resto hidrófobo, que podría ser un grupo polioxiálquilenos. Los conjugados resultantes se dice que se transportan con más eficacia a través de la membrana, de modo que son capaces de atravesar la membrana y modular con eficacia un sistema transcripcional. De este modo, las composiciones se pueden utilizar *in vitro* e *in vivo* para estudiar los procesos celulares, proteger los hospedadores mamíferos de los patógenos, facilitar la genoterapia y similares.

Sin embargo, el exceso de conjugación de polímeros y/o la conjugación de un resto terapéutico en su centro activo, en donde se hallan los grupos asociados con bioactividad, puede a menudo hacer que se pierda la actividad y, así pues, que se pierda eficacia terapéutica. Este es a menudo el caso con los péptidos de menor masa molecular que tienen pocos sitios de unión que no están asociados a la bioactividad. Por ejemplo, I. Benhar et al. ((1994) *Bioconjug Chem* 5: 321-326) observaron que la PEGilación de una inmunotoxina monocatenaria recombinante daba lugar a que la inmunotoxina perdiera la inmunorreactividad específica de diana. La pérdida de actividad de la inmunotoxina era el resultado de la unión del PEG a dos restos de lisina dentro de la región de la inmunotoxina que se combina con el antígeno.

Aunque la unión covalente de los PAG y los PAO (p. ej., PEG, PEO, etc.) a las proteínas terapéuticas pretende eliminar su inmunorreactividad, las proteínas PEGiladas siguen siendo débilmente inmunógenas. Esta inmunogenia parece deberse, al menos en parte, al hecho de que los polímeros de PEG y PAO son por sí solos algo antigénicos e inmunógenos. Por ejemplo, los conejos se han inmunizado contra diferentes PEG al inyectar en los animales unos conjugados en los que el PEG se conectó a una proteína portadora inmunógena (Richter, A. W. et al. (1983) *Int. Arch Allergy Appl Immunol* 70: 124-131). Además, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal que reacciona con el esqueleto de poliéter del PEG al inyectar en los ratones un conjugado de mPEG con β -glucuronidasa y seleccionar un clon de hibridoma que secreta un anticuerpo anti-PEG (Cheng, T.-L. et al. (1999) *Bioconjug Chem* 10: 520-528; Cheng T.-L. et al. (2000) *Bioconjug Chem* 11: 258-266; Tsai, N.-M. et al. (2001) *Biotechniques* 30: 396-402; Roffler, S. et al., patentes de los EE.UU. n.º 6.596.849 y 6.617.118; cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad). Roberts, M. J. et al., en la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 2003/001704 A1, han descrito recientemente otro anticuerpo monoclonal que reacciona con el esqueleto de poliéter del PEG.

Una serie de investigadores han descrito la preparación de polímeros de PEG «no antigénicos» lineales o ramificados y derivados o conjugados de los mismos (véanse, p. ej., las patentes de los EE.UU. n.º 5.428.128; 5.621.039; 5.622.986; 5.643.575; 5.728.560; 5.730.990; 5.738.846; 5.811.076; 5.824.701; 5.840.900; 5.880.131; 5.900.402; 5.902.588; 5.919.455; 5.951.974; 5.965.119; 5.965.566; 5.969.040; 5.981.709; 6.011.042; 6.042.822; 6.113.906; 6.127.355; 6.132.713; 6.177.087; y 6.180.095; véase también la publicación PCT de patente internacional 95/13090 y las solicitudes de patente de los EE.UU. publicadas n.º 2002/0052443, 2002/0061307 y 2002/0098192). La mayoría de los ejemplos en las patentes y solicitudes de patente anteriores emplean polímeros que contienen una o varias cadenas de mPEG, p. ej., di-mPEG-lisina. Sin embargo, hasta la fecha, no ha habido ninguna descripción de un mecanismo para convertir en no antigénicos el PEG de tales polímeros o conjugados.

Así pues, existe una necesidad de identificar procedimientos para producir conjugados que contienen PAO (p. ej., que contienen PEG y/o PEO), en particular conjugados entre tales polímeros hidrosolubles y proteínas terapéuticas, con una antigenicidad reducida, sustancialmente reducida o indetectable. Tales conjugados tendrán los beneficios, gracias al componente polimérico, de incremento de la estabilidad y biodisponibilidad *in vivo*, pero no desencadenarán ninguna respuesta inmunitaria sustancial en un animal en el cual se han introducido los conjugados con fines terapéuticos o diagnósticos.

Breve resumen de la invención

La presente invención aborda las necesidades identificadas más arriba y da a conocer procedimientos para preparar los conjugados de polímeros hidrosolubles (p. ej., poli(etilenglicol) y derivados del mismo) y componentes bioactivos, en particular componentes bioactivos terapéuticos, tales como proteínas. La invención también da a conocer los conjugados producidos mediante tales procedimientos, en donde dichos conjugados son menos antigénicos y menos inmunógenos que los conjugados del mismo componente bioactivo que contienen alcoxilo preparados con alcoxipeg, p. ej., mPEG. La invención también da a conocer composiciones que comprenden tales conjugados, kits que contienen tales conjugados y composiciones y usos de los conjugados y composiciones en muy diversos regímenes de tratamiento y diagnóstico.

En un aspecto, la invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende un conjugado que comprende uno o varios componentes bioactivos unidos covalentemente a al menos un polialquilenglicol lineal o

ramificado monofuncionalmente activado, de acuerdo con las reivindicaciones. En algunas de tales realizaciones, el conjugado tiene una antigenicidad reducida o sustancialmente reducida en comparación con un conjugado preparado con un alcóxipoli(etilenglicol), p. ej., mPEG, o un polímero ramificado que contiene mPEG, tal como di-mPEG-lisina.

Los polietilenglicoles que se prefieren particularmente son los PEG monofuncionalmente activados (p. ej., los PEG que están activados en un único extremo, entre ellos hidroxipeg-monoaldehídos, hidroxipeg-monovinilsulfonas, ésteres reactivos de ácidos hidroxipeg-monocarboxílicos y derivados con carbonatos de hidroxipeg-monofenilo). Otros intermedios que pueden ser útiles para la síntesis de los derivados de polímeros reactivos incluyen otros hidroxipeg-monoácidos e hidroxipeg-monoacetales.

El polietilenglicol tiene una masa molecular de 10 kDa a 30 kDa. Los conjugados de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender una o varias cadenas de polietilenglicol, en algunas realizaciones preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 cadenas, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 cadenas, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 cadenas, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 cadenas; en otras realizaciones preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 cadenas, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 cadenas y más preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 cadenas por subunidad de proteínas enzimáticas de alta masa molecular. En una realización particularmente preferida, el polietilenglicol utilizado en el conjugado comprende una o dos cadenas de un poli(etilenglicol) monofuncionalmente activado (p. ej., un éster reactivo de un hidroxipeg-monoácido, un hidroxipeg-monoaldehído, un hidroxipeg-monovinilsulfona o un carbonato de hidroxipeg-monofenilo derivado) que tiene una masa molecular de aproximadamente 18 kDa a aproximadamente 22 kDa o de aproximadamente 27 kDa a aproximadamente 33 kDa.

El componente bioactivo para ser usado en los conjugados o composiciones de la invención incluye péptidos, proteínas, glucoproteínas.

La invención también da a conocer procedimientos para producir conjugados entre un compuesto bioactivo y un polietilenglicol monofuncionalmente activado de acuerdo con la reivindicación 8. Por ejemplo, comprende: (a) obtener o preparar un polietilenglicol lineal o ramificado que comprende al menos un grupo bloqueador poco reactivo que se puede retirar posteriormente, tal como uno o varios grupos trifenilmetilo («grupos tritilo»); (b) producir un derivado del polialquilenglicol al hacerlo reaccionar con al menos un compuesto modificador en las condiciones tales que el polietilenglicol queda modificado con un grupo modificador (tal como un grupo carboxilo) en un extremo que carece del grupo o grupos bloqueadores; (c) retirar el grupo o grupos bloqueadores sin retirar el grupo modificador para producir, en una o varias etapas, un polietilenglicol monofuncionalmente activado; y (d) poner en contacto el polietilenglicol monofuncionalmente activado con al menos un componente bioactivo en las condiciones que favorecen la unión covalente del componente bioactivo al polietilenglicol monofuncionalmente activado. Preferiblemente, los conjugados producidos por tales procedimientos tienen una antigenicidad e inmunogenia reducidas, sustancialmente reducidas o indetectables, cuando se compara con los conjugados del agente bioactivo modificados o composiciones de la invención, que se pueden administrar al animal, en especial mamíferos, y lo más especialmente humanos, por vía oral, tópica o parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea.

La invención también da a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de la invención y al menos un excipiente o vehículo que es aceptable para el uso farmacéutico o veterinario.

También se describen procedimientos para prevenir, diagnosticar o tratar trastornos físicos en los animales (tales como mamíferos, entre ellos los humanos) que utilizan los conjugados o composiciones de la invención. Uno de tales procedimientos comprende, por ejemplo, administrar a un animal que padece o es propenso a un trastorno físico (tal como anemia, artritis, cánceres, enfermedad de Alzheimer, deficiencias enzimáticas, cardiovascular patía, hipertensión, enfermedades infecciosas, metabolopatías, neuropatías, neutropenia, hiperuricemia y manifestaciones de la misma (p. ej., gota), enfermedades o trastornos por deficiencias genéticas, y similares) una cantidad eficaz de uno o varios conjugados o composiciones de la invención, que se pueden administrar al animal, en especial mamíferos, y lo más especialmente humanos, por vía oral, tópica o parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea.

También se describen composiciones que comprenden uno o varios conjugados de antigenicidad reducida de la invención que pueden, además, comprender uno o varios componentes o reactivos adicionales, tales como una o varias sales de tamponamiento, uno o varios excipientes glucídicos, una o varias proteínas portadoras, una o varias enzimas, uno o varios detergentes, una o varias moléculas de ácido nucleico, uno o varios polímeros tales como PEG. La invención también da a conocer kits que comprenden los conjugados de antigenicidad reducida y/o las composiciones de la invención.

También se describen PEG-liposomas de inmunorreactividad reducida preparados con polialquilenglicoles monofuncionalmente activados que carecen de metoxilo u otros grupos alcóxilo, en vez de mPEG monofuncionalmente activado. Otras realizaciones preferidas de la presente invención serán evidentes para el experto en la técnica a la luz de los siguientes dibujos y descripción de la invención, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 se muestran los resultados de un análisis inmunoenzimático («ELISA») competitivo. En este ensayo, un

conjugado de una proteína al mPEG se fijó a la placa de ensayo de 96 pocillos, y se midió la inhibición de la fijación de los anticuerpos de conejo a otra proteína conjugada al mPEG que producen las soluciones de mPEG o *t*-butoxiPEG.

5 En la figura 2a se muestran los resultados de un ELISA competitivo, realizado como se describe en la figura 1, con PEG de diferentes tamaños y estructuras que contienen uno o dos grupos metoxilo. Los resultados de la fijación del anticuerpo se representan gráficamente en función de la concentración molar de los grupos metoxilo en cada muestra.

En la figura 2b se muestran los mismos datos que en la figura 2a representados gráficamente en función de la concentración en peso del PEG (microgramo/mililitro) en vez de la concentración molar de los grupos metoxilo.

10 En la figura 3 se muestran algunos de los datos de las figuras 1, 2a y 2b en un formato que muestra que la antigenicidad es directamente dependiente del número de grupos metoxilo por molécula de PEG. Estas muestras incluyen PEG de 10 kDa, uno de los cuales carece de un grupo metoxilo (*t*-butoxiPEG), uno que contiene un grupo metoxilo (mPEG) y uno que contiene dos grupos metoxilo (di-mPEG de 5 kDa-lisina).

15 En la figura 4 se ilustra un ELISA competitivo, como el descrito en la figura 1, en el que un mPEG de 4,8 kDa se compara con tres PEG de la invención que no tienen grupos metoxilo en los extremos del polímero lineal (etiquetados como «PharmaPEG»). El desplazamiento entre las curvas del eje horizontal indica que la antigenicidad de los tres PEG de la invención es aproximadamente 100 veces más baja que la del mPEG, cuando se ensaya con anticuerpos anti-mPEG.

20 En la figura 5a se muestran los resultados de los estudios en donde las muestras de un isómero de anhidrasa carbónica («CA II») y la misma anhidrasa carbónica conjugada a una media de 3-4 cadenas de mPEG de 5 kDa se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio («SDS-PAGE»). Los carriles 1 y 2 del gel muestran los resultados obtenidos al tefir las proteínas con la tinción Ruby de la marca SYPRO® y fotografiarlas en una campana oscura con iluminación a 302 nm. Los carriles 3 y 4 muestran los resultados de una transferencia Western de los conjugados a mPEG y de la enzima sin PEGilar, respectivamente, en donde se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-mPEG de conejo como anticuerpo primario. El carril 5 muestra las posiciones del patrón de masa molecular con proteínas preteñidas.

25 En la figura 5b se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas del gel y de la transferencia Western mostradas en la figura 5a, obtenida con una cámara Kodak y un programa de adquisición de imágenes digitales. El eje horizontal representa la distancia migrada respecto al frente del colorante y el eje vertical representa la intensidad relativa de la tinción de proteínas o de la tinción con anti-mPEG. El trazado inferior muestra las bandas del patrón de proteínas preteñidas con las masas moleculares aparentes, de izquierda a derecha, de 203,8, 110,9, 68,8, 51,5, 40,2, 28,9, 20,7 y 14,9 kDa. El segundo trazado desde abajo es una tinción de la anhidrasa carbónica PEGilada con el anticuerpo anti-mPEG. El tercer trazado desde abajo representa la banda de la anhidrasa carbónica con tinción de proteínas y el trazado superior representa las bandas de los conjugados de mPEG a la anhidrasa carbónica con tinción de proteínas.

35 En las figuras 6a y 6b se muestran los resultados de los análisis por ELISA de los sueros de grupos de tres conejos que se inmunizaron con conjugados de uricasa porcina que contienen un promedio de aproximadamente dos cadenas de mPEG o bien de hidroxipeg («PharmaPEG») por subunidad de uricasa. Los anticuerpos contra la uricasa se midieron con placas de ensayo revestidas con uricasa porcina. Los anticuerpos contra el PEG se midieron con placas revestidas con conjugados de una proteína irrelevante conjugada al mPEG. En la figura 6a se muestran los datos de la segunda sangría de los conejos que habían recibido cuatro inyecciones de PEG-uricasa en el adyuvante incompleto de Freund. En la fig. 6b se muestran los datos de la tercera sangría de los mismos conejos después de que hubiesen recibido cinco inyecciones de PEG-uricasa en el adyuvante incompleto de Freund.

Descripción detallada de la invención

45 A menos que se defina de otra manera, toda la terminología técnica y científica utilizada en la presente memoria tiene los mismos significados que conoce habitualmente el experto en la técnica al cual pertenece la invención. Aunque en la puesta en práctica o en la comprobación de la presente invención se puede utilizar cualquier otro procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación.

50 Definiciones

Aproximadamente: tal y como se utiliza en la presente memoria cuando hace referencia a un valor numérico, la terminología «aproximadamente» significa un valor de $\pm 10\%$ del valor mencionado (p. ej., «aproximadamente 50 °C» abarca un intervalo de temperaturas de 45 °C a 55°C, ambos inclusive; de igual forma, «aproximadamente 100 mM» abarca un intervalo de concentraciones de 90 mM a 110 mM, ambas inclusive).

55 Componente bioactivo: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «componente bioactivo» hace referencia a un compuesto, molécula, resto o complejo que tiene una actividad biológica concreta *in vivo*, *in vitro* o *ex*

vivo en una célula, tejido, órgano u organismo, y al que se le pueden fijar a uno o varios polialquilenglicoles para formar los conjugados de la invención. Los componentes bioactivos preferidos se describen en detalle a continuación.

Fijado: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «fijado» hace referencia a la fijación o unión que puede ser covalente, p. ej., conjugación química, o no covalente, p. ej., interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno, etc. Los enlaces covalentes pueden ser, por ejemplo, éster, éter, fosfoéster, tioéster, tioéter, uretano, amida, peptídico, imida, enlaces azufre-carbono, enlaces fósforo-carbono y similares. La terminología «fijado» es más amplia e incluye terminología tal como «conjugado», «conectado» y «unido».

Conjugado: la terminología «conjugado», tal y como se usa en la presente memoria, hace referencia a la unión mediante enlaces covalentes o mediante interacciones no covalentes fuertes, típica y preferiblemente a la unión mediante enlaces covalentes. En la presente invención se puede utilizar cualquier procedimiento utilizado normalmente por los expertos en la técnica para la conjugación de materiales biológicamente activos.

Enfermedad, trastorno, afección: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «enfermedad» o «trastorno» hace referencia a cualquier afección adversa de un humano o de un animal que incluye tumores, cánceres, alergias, adicción, autoinmunidad, envenenamiento o deterioro de la función corporal o mental óptima. «Afecciones» tal y como se utiliza en la presente memoria incluye enfermedades y trastornos, pero también hace referencia a estados fisiológicos. Por ejemplo, la fecundidad es un estado fisiológico, pero no una enfermedad ni un trastorno. Por lo tanto, las composiciones de la invención adecuadas para impedir el embarazo por disminución de la fecundidad se describirían como un tratamiento de una afección (fecundidad), pero no como un tratamiento de un trastorno o enfermedad. Otras afecciones también las conocen los expertos en la técnica.

Cantidad eficaz: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «cantidad eficaz» hace referencia a una cantidad de un conjugado o una composición dados que es necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Una cantidad eficaz de un conjugado o composición dados de la presente invención sería la cantidad que consigue este resultado seleccionado, y tal cantidad se podría determinar como un trámite convencional por el experto en la técnica. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar una deficiencia del sistema inmunitario podría ser la cantidad necesaria para ocasionar la activación del sistema inmunitario, lo que da lugar al desarrollo de una respuesta inmunitaria específica de antígeno durante la exposición a un antígeno. La terminología también es sinónima de «cantidad suficiente». La cantidad eficaz de cualquier aplicación concreta puede variar según factores tales como la enfermedad o afección a tratar, la composición concreta a administrar, el tamaño del sujeto, y/o la gravedad de la enfermedad o afección. El experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un conjugado o composición concretos de la presente invención sin que tenga que hacer experimentos superfluos.

Respuesta inmunitaria: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «respuesta inmunitaria» hace referencia a una respuesta inmunitaria humoral (a saber, la formación de anticuerpos) y/o una respuesta inmunitaria celular que conduce a la activación o proliferación de linfocitos B y/o linfocitos T y/o células presentadoras de antígeno. En algunos casos, sin embargo, la respuesta inmunitaria puede ser de baja intensidad y volverse detectable sólo cuando se utiliza al menos una sustancia de acuerdo con la invención. «Inmunógeno» hace referencia a un agente que es capaz de estimular el sistema inmunitario de un organismo vivo, de manera que se incrementan una o varias funciones del sistema inmunitario y se dirigen contra el agente inmunógeno.

Uno, un o una: cuando la terminología «uno», «un» o «una» se utilizan en esta descripción, significan «al menos uno» o «uno o varios», a menos que se indique de otra manera.

Polipéptido: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «polipéptido» hace referencia a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) conectados linealmente mediante enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). Esto indica una cadena de moléculas de aminoácidos y no hace referencia a una longitud específica del producto. Así pues, los dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, péptidos de longitud inespecífica y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Esta terminología también pretende hacer referencia a los productos por modificación postraduccional del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Un polipéptido puede ser recombinante o proceder de una fuente biológica natural, pero no necesariamente traducirse de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluida la síntesis química.

Proteína y glucoproteína: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología proteína hace referencia a un polipéptido que por lo general tiene un número de aminoácidos por encima de aproximadamente 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1000 o más o 2000 o más. Las proteínas tienen por lo general una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente la necesitan, y a menudo se dice que están plegadas, a diferencia de los péptidos y polipéptidos, que a menudo no poseen una estructura tridimensional definida, sino que más bien pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes y se dice que están desplegados. Los péptidos, sin embargo, también podrían tener una estructura tridimensional definida. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología glucoproteína hace referencia a una proteína que contiene al menos un resto de azúcar unido a la proteína a través de una cadena lateral de un aminoácido que contiene oxígeno o que contiene nitrógeno, p. ej., serina o asparagina.

Purificado: tal y como se utiliza en la presente memoria, cuando la terminología «purificado» se utiliza en referencia a una molécula, significa que la concentración de la molécula que se purifica ha aumentado respecto a las moléculas que aparecen asociadas a ella en su medio natural, o en el medio en el que se produjo, halló o sintetizó. Las moléculas asociadas de forma natural incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares, pero generalmente no incluyen agua, tampones y reactivos añadidos para mantener la integridad o facilitar la purificación de la molécula a purificar. Por ejemplo, incluso si una proteína dada en un extracto bruto se diluye con un disolvente acuoso durante la cromatografía en columna, las moléculas de las proteínas se considera que se purifican mediante esta cromatografía si los ácidos nucleicos, las proteínas indeseables y otras moléculas biológicas que llevan asociadas de forma natural se han apartado de las moléculas de proteína en cuestión. De acuerdo con esta definición, una sustancia puede tener una pureza del 5% o más, del 10% o más, del 20% o más, del 30% o más, del 40% o más, del 50% o más, del 60% o más, del 70% o más, del 80% o más, del 90% o más, del 95% o más, del 98% o más, del 99% o más, o del 100%, cuando se considera respecto a sus contaminantes.

Resto: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «resto» hace referencia a un aminoácido específico, normalmente deshidratado como resultado de su intervención en uno o varios enlaces peptídicos, en un esqueleto o cadena lateral del polipéptido.

Tratamiento: tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «tratamiento», «tratar», «tratado» o «que se trata» hace referencia a profilaxis y/o terapia. Cuando se utiliza para referirse a una enfermedad infecciosa, por ejemplo, la terminología puede hacer referencia a un tratamiento profiláctico que incrementa la resistencia de un sujeto a una infección con un microorganismo patógeno o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto se infecte con el microorganismo patógeno o de que muestre signos de enfermedad atribuibles a la infección, así como a un tratamiento para luchar contra la infección después de que el sujeto se haya infectado, p. ej., para reducir o eliminar la infección o para impedir que empeore.

Visión general

Una serie de investigadores ya han descrito la preparación de polímeros de PEG no antigénicos lineales o ramificados, o conjugados de los mismos (véanse, p. ej., las patentes de los EE.UU. n.º 5.428.128; 5.621.039; 5.622.986; 5.643.575; 5.728.560; 5.730.990; 5.738.846; 5.811.076; 5.824.701; 5.840.900; 5.880.131; 5.900.402; 5.902.588; 5.919.455; 5.951.974; 5.965.119; 5.965.566; 5.969.040; 5.981.709; 6.011.042; 6.042.822; 6.113.906; 6.127.355; 6.132.713; 6.177.087 y 6.180.095; véase también la publicación PCT de patente internacional WO 95/13090 y las solicitudes de patente de los EE.UU. publicadas n.º 2002/0052443, 2002/0061307 y 2002/0098192. Sin embargo, el PEG y los conjugados en estos informes anteriores permanecen al menos débilmente inmunógenos, lo que puede conducir a la consecuencia indeseable del desarrollo de anticuerpos contra el componente de PEG de los conjugados cuando los conjugados se introducen en un animal con fines profilácticos, diagnósticos o terapéuticos. Tales anticuerpos pueden conducir a una eliminación rápida de los conjugados bioactivos que contienen PEG, lo que reduce la biodisponibilidad de las composiciones terapéuticas (Cheng, T.-L. et al. (1999), véase más arriba), y también podrían inducir un trastorno mediado por el complejo inmunitario. Además, como todavía no ha habido ninguna descripción de un mecanismo para convertir los PEG reivindicados o sus conjugados en sustancialmente no antigénicos o no inmunógenos.

La presente invención ha superado estas limitaciones de la técnica. En general, la invención da a conocer composiciones estables y procedimientos que son útiles para la prevención, diagnóstico y tratamiento de una serie de trastornos físicos. Más en particular, la invención da a conocer procedimientos para producir polímeros reactivos de antigenicidad reducida y conjugados de proteínas con polímeros estabilizados, en particular proteínas terapéuticas, que tienen una antigenicidad reducida o sustancialmente reducida o que tienen una antigenicidad indetectable. En otras realizaciones, la invención da a conocer conjugados producidos por estos procedimientos de la invención, y composiciones, en particular composiciones farmacéuticas, que comprenden tales conjugados. En otras realizaciones, la invención da a conocer procedimientos de uso de tales conjugados y composiciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de una serie de trastornos físicos. La invención también da a conocer kits que comprenden uno o varios conjugados y/o composiciones de la invención.

Preparación de conjugados de antigenicidad reducida

En un aspecto, la presente invención da a conocer procedimientos para preparar conjugados de antigenicidad reducida, antigenicidad sustancialmente reducida o antigenicidad indetectable, mediante la unión covalente de polímeros hidrosolubles a uno o varios compuestos o componentes bioactivos, tal como una o varias proteínas y en particular una o varias proteínas terapéuticas. En tales conjugados, los polímeros escogidos serán por sí mismos de antigenicidad reducida, antigenicidad sustancialmente reducida o antigenicidad indetectable, en comparación con los polímeros estándares típicamente utilizados para preparar los conjugados de proteína y polímero. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «antigenicidad reducida» hace referencia a un polímero (p. ej., un PAO o PAG, en particular un PEG, y más en particular un PEG monofuncionalmente activado) o un conjugado o composición que comprende o se sintetiza con tal polímero, en donde la capacidad del polímero para reaccionar con los anticuerpos formados contra los polímeros más antigénicos (p. ej., mPEG) se ha reducido en cierta medida. Preferiblemente, la antigenicidad se reduce hasta al menos aproximadamente el 30%, más preferiblemente se reduce hasta al menos aproximadamente el 50%, y lo más preferiblemente se reduce hasta más de aproximadamente el

75%, en comparación con el polímero más antigénico. Por extensión, entonces, un polímero (o conjugado o composición que lo comprende o que se sintetiza con tal polímero) se dice que es de «antigenicidad sustancialmente reducida» si el polímero (o conjugado o composición) tiene aproximadamente o menos del 20%, más preferiblemente aproximadamente o menos del 15%, aún más preferiblemente aproximadamente o menos del 10%, y lo más preferiblemente aproximadamente o menos del 1%, de la antigenicidad del correspondiente polímero antigénico (p. ej., mPEG). Finalmente, un polímero (o conjugado o composición que lo comprende o que se sintetiza con tal polímero) se dice que tiene una «antigenicidad indetectable» si el polímero, conjugado o composición no tiene una antigenicidad detectable cuando se ensaya con los procedimientos conocidos en la técnica (p. ej., ELISA u otros procedimientos para detectar la antigenicidad, tales como los conocidos en la técnica y que se describen en los ejemplos de la presente memoria).

Polímeros

Los polialquilenglicoles que se utilizan para preparar los conjugados de la invención son poli(etilenglicoles); se prefieren particularmente los PEG, y se prefieren más particularmente los hidroxipeg monofuncionalmente activados (p. ej., hidroxipeg activados en un solo extremo, que incluyen ésteres reactivos de ácidos hidroxipeg-monocarboxílicos, hidroxipeg-monoaldehídos, hidroxipeg-monoaminas, hidroxipeg-monohidrazidas, hidroxipeg-monocarbazatos, hidroxipeg-monoyodoacetamidas, hidroxipeg-monomaleimidias, disulfuros de hidroxipeg-monoortopiridilo, hidroxipeg-monooximas, carbonatos de hidroxipeg-monofenilo, glioxales de hidroxipeg-monofenilo, hidroxipeg-monotiazolidin-2-tionas, hidroxipeg-monotioésteres, hidroxipeg-monotioles, hidroxipeg-monotriazinas e hidroxipeg-monovinilsulfonas).

Polímeros particularmente preferidos para ser usados en la preparación de los conjugados de la presente invención, que tienen antigenicidad reducida, antigenicidad sustancialmente reducida o antigenicidad indetectable, son los PEG monofuncionalmente activados que no contienen grupos metoxilo, ni otros grupos alcoxilo ni grupos ariloxilo. La sustitución de tales PEG monofuncionalmente activados en lugar de mPEG monofuncionalmente activado en la síntesis de conjugados de la invención confiere a los conjugados resultantes una antigenicidad inesperadamente disminuida, a saber, una disminución de la capacidad para interactuar con anticuerpos desarrollados contra los conjugados de mPEG del mismo componente bioactivo. Los conjugados resultantes también presentan una inmunogenia disminuida, a saber, una disminución de la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria.

En un aspecto de la invención, los PEG monofuncionalmente activados se pueden sintetizar con los derivados adecuados del grupo activador reversiblemente bloqueados como iniciadores para la polimerización del óxido de etileno (Akiyama, Y. et al., (2000) *Bioconjug Chem*, 11: 947-950). Akiyama et al. dan a conocer las condiciones para la síntesis de un monohidroxilo de PEG, modificado con monoacetal, mediante 3,3-dietoxipropanolato de potasio como iniciador para la polimerización de óxido de etileno. Ya que Akiyama et al. no identificaron que este intermedio tenía las antigenicidad o inmunogenia más deseablemente reducidas, procedieron a convertir el grupo hidroxilo del extremo en un tiol mediante la terminación de la polimerización por la adición de cloruro de metanosulfonilo, con lo que se produce un PEG heterobifuncional, en vez de un derivado de PEG de esta invención. Como una prueba más de que este grupo de investigadores no se dieron cuenta la utilidad de un PEG monofuncionalmente activado terminado en hidroxilo, publicaron y patentaron los procedimientos para la síntesis de PEG heterobifuncionales alternativos a partir de monohidroxil-PEG monofuncionalmente activados y, en algunos casos, han incluso protegido el extremo de los hidroxipeg con grupos metoxilo. De igual forma, Bentley, M. D. et al., en la solicitud de patente de los EE.UU. publicada n.º 2002/0072573 A1, describen composiciones de polímeros y procedimientos que no reflejan ninguna identificación de la ventaja inmunitaria de los polímeros monofuncionalmente activados con extremo hidroxilo y enseñan que es deseable convertir los grupos hidroxilo terminales de tales polímeros en grupos metoxilo.

En un aspecto alternativo de la presente invención, los PEG monofuncionalmente activados se pueden sintetizar mediante el control de la extensión de la activación de los PEG lineales que contienen grupos hidroxilo en ambos extremos («PEG dioles») para limitar la cantidad de PEG *bis*-activado a un nivel aceptablemente bajo, p. ej., < 5%, preferiblemente < 2% o más preferiblemente < 1%, como alternativa al procedimiento mostrado en el ejemplo 5. En un aspecto particularmente preferido, los PEG monofuncionalmente activados se pueden sintetizar a partir de PEG monofuncionales de los cuales se puede retirar un grupo bloqueador poco reactivo después de la modificación con el PEG, sin retirar el grupo modificador. Un ejemplo de un PEG modificado es un ácido PEG-carboxílico y los ejemplos de grupos de bloqueo poco reactivos que se pueden retirar después de la modificación son grupos ariloxilo (Bentley, M. D. et al., publicación PCT de patente internacional WO 01/26692 A1), grupos tritilo (Kocienski, P. J., (1994) *Protecting Groups*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, págs. 54-58) y grupos *t*-butoxilo. El ácido *t*-butoxiPEG-carboxílico se puede activar, p. ej., con *N*-hidroxisuccinimida. Finalmente, el grupo *t*-butoxilo se puede retirar mediante acidólisis anhidra para producir un derivado de ácido carboxílico de PEG activado que tiene un grupo hidroxilo en vez de un grupo metoxilo en el extremo distal del polímero. En una realización más preferida, el ácido *t*-butoxiPEG-carboxílico se puede convertir en ácido hidroxipeg-carboxílico por acidólisis antes de la activación del grupo carboxilo con *N*-hidroxisuccinimida. En otra realización de esta invención, se sintetizan *t*-butoxiPEG-acetales al poner en contacto el *t*-butoxiPEG con un haloacetal y la conversión del producto en un hidroxipeg-acetal o hidroxipeg-aldehído mediante la acidólisis anhidra selectiva para retirar el grupo *t*-butoxilo. El acetal se puede convertir en un aldehído (o un hidrato de aldehído) en la preparación para su conjugación a un compuesto que contiene amina por alquilación reductora (Bentley, M. D. et al., patente de los EE.UU. n.º 5.990.237). En otra realización, un grupo protector ariloxilo que es distal al extremo reactivo del polímero se puede retirar mediante hidrogenólisis catalítica, lo que produce un

hidroxiPAG monoactivado de esta invención. Alternativamente, el bloqueo reversible de todos salvo uno de los grupos hidroxilo terminales, tal y como se describe en el ejemplo 6, se puede emplear en la síntesis de hidroxiPAG monofuncionalmente activados.

Los polímeros de PAG utilizados para preparar los conjugados de la presente invención pueden ser polímeros lineales, o pueden estar ramificados en uno o varios puntos dentro de la molécula del polímero. Además, los polímeros utilizados para formar los conjugados de la invención pueden ser homopolímeros, en los que varias unidades de un sólo tipo de monómero se unen entre sí para formar el polímero, tal como poli(etilenglicol) o pueden ser heteropolímeros o copolímeros (en los que las unidades monoméricas de dos o más estructuras se unen entre sí para formar el polímero, tal como un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno). Tales copolímeros pueden ser copolímeros aleatorios, copolímeros de bloqueo o copolímeros alternantes.

Los polímeros utilizados de acuerdo con la invención pueden ser polímeros poco reactivos o polímeros reactivos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «polímeros poco reactivos» son los polímeros que no se unirán covalentemente a una proteína. Ejemplos de tales «polímeros poco reactivos» incluyen, pero sin limitarse a ellos, mPEG, que es un polímero lineal de unidades de óxido de etileno con un grupo hidroxilo en un extremo y un grupo metoxilo en el otro extremo, y el PEG diol, que es un polímero lineal de unidades de óxido de etileno con grupos hidroxilo en ambos extremos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, los «polímeros reactivos» son los polímeros que pueden hacer reaccionar con grupos nucleófilos accesibles al solvente, p. ej., grupos tiol o grupos amino en un componente bioactivo (tal como una proteína), entre ellos el grupo amino α o los grupos amino ϵ de los restos de lisina. Ejemplos de «polímeros reactivos» incluyen los PEG en los que un grupo hidroxilo del extremo se ha convertido en, o se ha reemplazado por, un grupo electrófilo, tal como el ácido succinimidilpropiónico (como en «SPA-PEG») o un carbonato de *p*-nitrofenilo (como en «NPC-PEG») o un aldehído como en el PEG-aldehído. Además de los óxidos de polialquileño, los polímeros adecuados pueden incluir alcoholes de polivinilo, copolímeros de poli(oxietileno-oximetileno), poliamidas (p. ej., Rose, K, publicación PCT de patente internacional WO 00/12587), policarboxilatos, poli(vinilpirrolidonas) (von Specht, B.-U. et al., (1973) *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 354: 1659-1660), poli D-aminoácidos y/o poli L-aminoácidos, poliacriloilmorfolina (Rocca, M. et al., (1996) *Int. J Artif Organs* 19: 730-734) y dextranos (Iakunitskaya, L. M. et al. (1980) *Prikl Biokhim Mikrobiol* 16: 232-237). Los derivados de los PEG, PEO y otros PAO que reaccionan más o menos selectivamente con diferentes sitios de los componentes bioactivos de diana se conocen bien en la técnica y se pueden adquirir de proveedores tales como Fluka (Milwaukee, WI); NOF Corporation (Tokio, Japón); Shearwater Corporation (Huntsville, AL), filial de Nektar Therapeutics (San Carlos, CA); Sigma Chemical Company (St Louis, MO) o SunBio, Inc. (Anyang City, Corea del Sur).

Las formas activadas de los polímeros que son adecuados para el uso en los procedimientos y las composiciones que se describen en la presente memoria pueden incluir cualquier forma monofuncionalmente activa que termine en hidroxilo de los polímeros que se conocen en la técnica. Por ejemplo, son adecuados los PEO lineales o ramificados de diferentes tamaños, entre ellos los que tienen masas moleculares (excluida la masa del grupo activador) en el intervalo de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa. Los intervalos idóneos de la masa molecular incluyen de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 60 kDa; de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 30 kDa; de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa; de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 20 kDa; y de aproximadamente 18 kDa a aproximadamente 60 kDa; de aproximadamente 20 kDa o de aproximadamente 30 kDa. En el caso de los PEG lineales, el intervalo de masa molecular de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 30 kDa corresponde a un grado de polimerización (n) en el intervalo de aproximadamente 450 a aproximadamente 680 unidades monoméricas de óxido de etileno. Se debe advertir que las ventajas de conjugar una proteína terapéutica a polímeros que tiene este último intervalo relativamente elevado de masas moleculares (a saber, > 20-30 kDa) se observaron primero mucho antes de que se reconociese la inmunogenia del mPEG (Saifer, M. et al., publicación de PCT 89/01033, publicada el 9 de febrero de 1989).

Opcionalmente, un polímero lineal puede tener un grupo reactivo en un extremo o en ambos extremos, con lo que se crea un «polímero reactivo». En algunas realizaciones de esta invención, puede ser deseable utilizar el éster de succinimidilo del derivado de PEG con ácido monopropiónico, como se describe en Harris, J. M. et al., patente de los EE.UU. n.º 5.672.662, u otros ácidos PEG-carboxílicos activados con succinimida. En algunas otras realizaciones, puede ser deseable utilizar bien los derivados de succinimidilcarbonato de PEG («SC-PEG»), tal y como se describe en Saifer, M. et al., patentes de los EE.UU. n.º 5.006.333; 5.080.891; 5.283.317 y 5.468.478, o el derivado de carbonato de *p*-nitrofenilo de PEG, como se describe en Kelly, S. J. et al. (2001), véase más arriba; publicación PCT de patente internacional WO 00/07629 A2, véase más arriba, y la correspondiente patente de los EE.UU. n.º 6.576.235, y la publicación PCT de patente internacional WO 01/59078 A2, véase más arriba. Además, se pueden utilizar otros tipos de grupos reactivos para sintetizar conjugados de polímeros de proteínas. Estos derivados incluyen derivados aldehídicos de PEG (Royer G. P., patente de los EE.UU. n.º 4.002.531; Harris, J. M. et al., patente de los EE.UU. n.º 5.252.714), derivados de PEG con amina, carbonato de bromofenilo, carbonilimidazol, carbonato de clorofenilo, carbonato de fluorofenilo, hidrazida, carbazato, yodoacetamida, maleimida, disulfuro de ortopiridilo, oxima, fenilglioxal, tiazolidina-2-tiona, tioéster, tiol, triazina y vinilsulfona.

En ciertas realizaciones de la invención es deseable disminuir al mínimo la formación de entreconexiones intramoleculares e intermoleculares entre polímeros, tales como el PEG, durante la reacción en la que el polímero se conjuga al componente bioactivo para producir los conjugados de la invención. Esto se puede llevar a cabo con el uso de polímeros que están activados sólo en un extremo (denominados en la presente memoria «PEG

monofuncionalmente activados» o «PAG monofuncionalmente activados») o preparaciones de polímeros en las que el porcentaje de polímeros bifuncionalmente activados (denominados, en el caso de los PEG lineales, «PEG dioles bis-activados») es de menos del 30%, o más preferiblemente de menos del 10% o lo más preferiblemente de menos del 2% (p/p). El uso de los polímeros activados que son predominantemente monofuncionales puede disminuir al

5 mínimo la formación de todo lo siguiente: entreconexiones intramoleculares dentro de cada molécula de proteína, estructuras «de mancuerna», en las que una cadena del polímero conecta dos moléculas de proteína, y agregados más grandes o geles. Cuando se utilizan polímeros activados que reaccionan con los grupos amino, el número máximo teórico de cadenas de polímero que se pueden unir a una molécula de proteína corresponde al número total

10 de grupos amino. El número real de grupos amino que son accesibles sobre la superficie de una proteína en cualquier condición particular de conjugación de polímeros puede ser más pequeño que el máximo teórico.

Los conjugados de la invención pueden comprender una o varias cadenas de polietilenglicol, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 cadenas, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 cadenas por subunidad de enzima terapéutica, y de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 cadenas, y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 cadenas por subunidad de citocinas, factores de crecimiento, hormonas

15 proteicas y factores estimuladores de colonias que se fijan a receptores. En una realización particularmente preferida, el polietilenglicol utilizado para preparar el conjugado comprende 1 o 2 cadenas de poli(etilenglicol) (en particular un carboxiPEG, un hidroxipeG, un dihidroxipeG o un PEG-acetal). El polietilenglicol lineal o ramificado tiene una masa molecular de aproximadamente 10 kDa a 30 kDa.

Componentes bioactivos

20 Tal y como se señaló más arriba, los conjugados de la invención comprenden una o varias cadenas de PEG unidas covalentemente a uno o varios componentes bioactivos. Los componentes bioactivos a los cuales se han unido covalentemente uno o varios polímeros (o cadenas de los mismos) se denominan en la presente memoria de modo diferente y equivalentemente como «componentes bioactivos conjugados» o «componentes bioactivos modificados». Esta terminología se debe distinguir en la presente memoria de los «componentes bioactivos sin conjugar»,

25 «componentes bioactivos iniciales» o «componentes bioactivos sin modificar», en donde toda esta terminología hace referencia a componentes bioactivos que no han tenido uno o varios polímeros covalentemente unidos a éstos. En otro aspecto, la presente invención da a conocer procedimientos y composiciones para estabilizar las soluciones de componentes bioactivos mediante la mezcla de polímeros con éstas. Sin embargo, se debe saber que un componente bioactivo «sin conjugar», «sin modificar» o «inicial» puede contener otras conjugaciones o

30 modificaciones no poliméricas cuando se comparan con una molécula nativa o de tipo silvestre, y se seguirá considerando que están «sin conjugar», «sin modificar» o «iniciales» de acuerdo con la presente invención, ya que el componente bioactivo estaría «sin conjugar», «sin modificar» o «inicial» con respecto a la unión de los polímeros.

La terminología «estabilizar» un componente bioactivo (o «procedimientos de estabilización» o «componente bioactivo estabilizado» o «estabilización del componente bioactivo») indica que se ha estabilizado un componente

35 bioactivo de acuerdo con los procedimientos de esta invención (a saber, un componente bioactivo al cual se le ha unido covalentemente un polímero o con el que se ha mezclado de acuerdo con los procedimientos de la invención). Tales componentes bioactivos estabilizados mostrarán alteraciones en determinadas características bioquímicas y biofísicas cuando se comparan con un componente bioactivo que no se ha estabilizado (a saber, un componente bioactivo al cual no se ha unido covalentemente ni se le mezclado un polímero). Incluidos entre tales parámetros

40 bioquímicos y biofísicos alterados, en particular para proteínas tales como las enzimas, pueden disminuir la autólisis y en particular el mantenimiento de la actividad enzimática de una proteína durante la incubación en condiciones experimentales o medioambientales duras. En ciertas realizaciones de la invención, la alteración de los parámetros bioquímicos y biofísicos pueden incluir, por ejemplo, un incremento de la semivida en la circulación *in vivo*, incremento de la biodisponibilidad y similares.

45 Los componentes bioactivos incluyen proteínas, péptidos. Los componentes bioactivos también incluyen fragmentos, variantes y derivados de tales proteínas, péptidos, en particular tales fragmentos, variantes y derivados que tienen actividad biológica (a saber, fisiológica, bioquímica o farmacéutica).

El componente bioactivo puede ser un agente cardiovascular, antineoplásico, antiinfeccioso, antimicótico tales como nistatina y amfotericina B, ansiolítico, agente digestivo, un agente activo en el sistema nervioso central, analgésico,

50 agente de fecundidad, anticonceptivo, antiinflamatorio, corticoide, antiuricémico, vasodilatador, vasoconstrictor.

Los péptidos, proteínas, y glucoproteínas adecuadas que son útiles como componentes bioactivos en la presente invención incluyen cualquier péptido, polipéptido, enzima u otra proteína, etc., que tiene disponible al menos un grupo amino, grupo tiol u otro grupo al cual se pueden unir los polímeros. Tales componentes incluyen materiales que tienen actividad fisiológica o farmacológica, así como los que pueden catalizar reacciones en solventes orgánicos.

55 Los péptidos, polipéptidos y proteínas de interés incluyen, pero sin limitarse a ellos, hemoglobina, proteínas séricas, tales como factores de coagulación sanguínea, p. ej., factores VII, VIII y IX, inmunoglobulinas, insulina, citocinas, tales como interleucinas, p. ej., de IL-1 hasta IL-18, interferones (p. ej., IFN- α , IFN- β , IFN- γ e IFN consenso), factores de estimulación de colonias, entre ellos, sin limitación, GM-CSF, G-CSF, factor estimulador de las colonias de macrófagos, trombopoyetina, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos, eritropoyetina, factor del crecimiento derivado de las plaquetas, proteína activadora de fosfolipasa («PLAP», por su nombre en inglés), factor

60

inhibidor de la leucemia («LIF», también conocido en la técnica como «Factor Steel»), factores neurotróficos y factor de las células madre, y peptidomiméticos de los mismos. Los antagonistas de los agentes bioactivos que se fijan al receptor son por sí mismos adecuados para el uso como componentes bioactivos de la presente invención. Otras proteínas de interés biológico o terapéutico generales incluyen insulina, proteínas vegetales, tales como lectinas y
 5 ricinas, factores de necrosis tumoral y proteínas relacionadas, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento transformante, p. ej., TGF- α o TGF- β , factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de hepatocitos, hormonas, somatomedinas, eritropoyetina, hormonas pigmentarias, factores de liberación hipotalámica, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, folitropina, tirotropina, prolactina, activador del plasminógeno tisular, antagonistas de su proteína de fijación al
 10 receptor, y similares. Muchas de tales proteínas existen en la forma glucosilada y sin glucosilar. Las formas sin glucosilar pueden deberse a su producción con técnicas recombinantes en los procariotas. Tales productos sin glucosilar se encuentran entre los péptidos y las proteínas que son componentes bioactivos adecuados de la presente invención.

Las enzimas de interés incluyen enzimas específicas de glúcidos, enzimas proteolíticas, oxidorreductasas,
 15 transferasas, hidrolasas, liasas, isomerazas y ligasas. Los ejemplos de las enzimas de interés incluyen asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, superóxido dismutasa, endotoxinasas, catalasa, quimotripsina, lipasas, uricasas, adenosina difosfatasa, tirosinasas y bilirrubina oxidasa. Las enzimas específicas de los glúcidos de interés incluyen glucosa oxidasas, glucosidasas, galactosidasas, glucocerebrosidasas, glucuronidasas.

Las proteínas o porciones de las mismas se pueden preparar o aislar con las técnicas conocidas por los expertos en
 20 la técnica, tales como síntesis química, cultivo celular, de tejido u órganos, extracción de fuentes animales, o mediante metodologías de ADN recombinante. También se contemplan las fuentes transgénicas de las secuencias de aminoácidos, polipéptidos y proteínas. Tales materiales se pueden obtener de animales transgénicos, p. ej., ratones, conejos, cerdos, cabras y vacas, en donde las proteínas se expresan en la leche, la sangre o los tejidos, o en los huevos de pájaros transgénicos. Los insectos transgénicos y los sistemas de expresión fúngica o de baculovirus también se contemplan como fuentes. Además, las versiones mutantes de las proteínas también están
 25 dentro del alcance de la invención.

Otras proteínas de interés son proteínas alergénicas tales como ambrosía, antígeno E, veneno de abeja, alérgeno de ácaros. Lo antedicho es ilustrativo de las proteínas que son adecuadas para la presente invención. Se debe saber que otros péptidos, polipéptidos o proteínas, o fragmentos de los mismos, que no se mencionan específicamente en
 30 la presente memoria, pero que tienen disponibles uno o varios grupos amino o grupos tiol adecuados para la conjugación con uno o varios polímeros de acuerdo con la invención, también son destinatarios y están dentro del alcance de la presente invención.

En un aspecto preferido de la invención, el compuesto que es capaz de conjugarse al polímero es un compuesto biológicamente activo que es adecuado para el uso medicinal o diagnóstico para el tratamiento de animales, p. ej.,
 35 mamíferos, entre ellos humanos, contra las afecciones para las cuales se desea tal tratamiento. La lista antedicha pretende ilustrar los compuestos que se pueden modificar. Los expertos en la técnica se darán cuenta que otros compuestos similares se pueden modificar de igual forma sin una experimentación innecesaria. También se ha de saber que los materiales biológicamente activos que no se han mencionado específicamente, pero que tienen uno o varios grupos nucleófilos disponibles, tales como los grupos amino o tioles que son accesibles para la conjugación
 40 con uno o varios polímeros de acuerdo con la invención, también son destinatarios y están dentro del alcance de la presente invención.

Conviene señalar que los componentes bioactivos adecuados para la incorporación en los conjugados de la invención pueden ser sustancias o compuestos que no son activos por sí mismos, mientras están en el conjugado o inmediatamente después de la liberación hidrolítica del conjugado, pero que pueden volverse activos después de
 45 someterse a un procesamiento o reacción químicos adicionales. Por ejemplo, un fármaco antineoplásico que se administra en el torrente circulatorio en forma de un conjugado de la presente invención puede permanecer inactivo hasta que entra en una célula tumoral o cancerosa, en donde se activa mediante un proceso químico que se produce dentro de la célula cancerosa o tumoral, p. ej., mediante una reacción enzimática única o especialmente eficaz de esa célula.

Tal y como apreciará el experto en la técnica, cualquier componente bioactivo y fácilmente disponible en la técnica es adecuado para la conjugación con polímeros monofuncionales que tienen antigenicidad reducida, antigenicidad sustancialmente reducida o antigenicidad indetectable, de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con determinados aspectos de la invención, estos componentes bioactivos iniciales se utilizan para producir conjugados en los que uno o varios PAG o PAO se unen covalentemente a la molécula bioactiva. Los sitios sobre las moléculas
 55 del componente bioactivo inicial a las cuales se pueden unir ventajosamente los polímeros incluyen restos de lisina que se hallan en moléculas peptídicas, en donde dichos restos tienen cada uno dos grupos amino. Uno de estos grupos amino (el grupo amino α) participa en la formación de enlaces peptídicos (excepto cuando la lisina es el resto del extremo amino de la proteína), lo que deja el otro grupo amino (el grupo amino ϵ) disponible para la conjugación del polímero. Otros sitios en las moléculas proteicas o peptídicas a los cuales se pueden unir ventajosamente los
 60 polímeros incluyen, entre otros, el grupo amino α en el resto del extremo amino del polipéptido; los grupos sulfhidrido de los restos de cisteína de la proteína o péptido (Braxton, S. M., patente de los EE.UU. n.º 5.766.897), a los cuales

se pueden conjugar los polímeros activados con vinilsulfona, maleimida, yodoacetamida, bromoacetamida o disulfuro de ortopiridilo, entre otros grupos tiólicos reactivos conocidos en la técnica; los grupos guanido de los restos de arginina de la proteína o del péptido (Sano, A. et al., patente de los EE.UU. n.º 5.093.531), a los cuales se pueden conjugar los polímeros activados con fenilgloxal; el grupo carboxilo α del resto del extremo carboxilo, los grupos carboxilo β de los restos de aspartato de la proteína o del péptido, y los grupos carboxilo γ de los restos de glutamato de la proteína o del péptido (Sakane, T. et al., (1997) *Pharm Res.* 14: 1085-1091), a los cuales se pueden conjugar por amino o hidrazida los derivados del polímero. Por supuesto, otros sitios adecuados de la molécula de la proteína o del péptido al cual uno o varios óxidos de polialquileno se pueden unir ventajosamente serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, en particular tras la consideración de las estructuras primaria y terciaria del péptido y las descripciones en la presente memoria.

Antes de conjugar un polímero a un componente bioactivo diana (p. ej., una proteína), puede ser ventajoso purificar el componente para retirar los contaminantes; de lo contrario, el análisis de la extensión de la modificación del componente intacto se puede complicar por la formación de conjugados de polímero de los fragmentos del componente y de otros contaminantes. La purificación del componente bioactivo puede ser ventajosa independientemente de si la proteína a conjugar se ha obtenido de fuentes naturales o se ha producido mediante procedimientos recombinantes, ya que se pueden esperar contaminantes de las preparaciones de cualquier origen. La purificación de un componente bioactivo dado se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica que será familiar para el experto en la técnica, que incluyen electroforesis, diálisis, extracción con sales (tal como precipitación con sulfato de amonio), cromatografía (tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alta resolución («HPLC», por su nombre en inglés), cromatografía líquida rápida de proteínas («FPLC», por su nombre en inglés)) o una combinación de los mismos. Sin embargo, se ha de saber que la purificación de un componente bioactivo dado no es esencial para la preparación de los conjugados de polímeros al componente bioactivo de la presente invención, ya que los componentes bioactivos (en especial las proteínas) de las preparaciones brutas también se pueden conjugar ventajosamente con polímeros de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

Conjugación de polímeros a componentes bioactivos

Los PEG empleados para llevar a la práctica la presente invención que, como se indicó anteriormente, se activan preferiblemente mediante la reacción con un grupo conjugador, se pueden unir a cualquiera de los muchos grupos que pueden estar presentes en la molécula del componente bioactivo, p. ej., grupos carboxilo o grupos amino que no intervienen en enlaces peptídicos, grupos tiol y grupos hidroxilo fenólicos. Para determinados péptidos o proteínas se prefiere que los PAG activados se conjuguen al grupo amino α del extremo amino y/o a los grupos amino de los restos de lisina y/o a los grupos sulfhidrilo de los restos de cisteína.

El componente bioactivo bruto o purificado (p. ej., proteína) se puede incubar con polímero activado en un tampón que tiene un pH en el margen de aproximadamente 11 o el pH más alto en el cual se puede invertir toda inactivación de la proteína ocasionada por la alcalinidad, bajarlo hasta pH 5, o el pH más bajo en el cual se puede invertir toda inactivación de la proteína ocasionada por la acidez (véase Arakawa, T. et al., (1990) *Biopolymers* 29: 1065-1068). Tal y como se conoce en la técnica, y como el experto en la técnica reconocerá fácilmente, el uso de un pH bajo para la conjugación de polímeros a proteínas puede ser deseable para determinadas proteínas o químicas de enlace. Sin embargo, el uso de un pH más alto puede ser ventajoso para otras determinadas proteínas y determinadas químicas de conjugación, lo que depende de los efectos del pH sobre la solubilidad y la estabilidad de la proteína, y de la velocidad de inactivación del polímero activado (bien espontánea o catalizada por la propia proteína) respecto a la velocidad de unión del polímero a la proteína diana de acuerdo con los procedimientos que se conocen en la técnica.

La reacción entre el PEG y el componente bioactivo se suele llevar a cabo en solución, preferiblemente una solución acuosa de tampón que proporciona un pH en el margen de aproximadamente 5 a aproximadamente 11. Para conjugar un PEG a un componente bioactivo proteínico (p. ej., un polipéptido, péptido, proteína o fragmentos de los mismos) son particularmente preferidos los valores de pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. En otras realizaciones, se prefieren los valores de pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5. Los ejemplos de soluciones tamponantes que proporcionarán valores de pH en estos intervalos a 25 °C incluyen:

50 ml de dihidrogenofosfato de potasio a 0,1 M + 5,6 a 46,1 ml de NaOH a 0,1 M, diluido a 100 ml

50 ml de borato a 0,025 M + 2,0 a 20,5 ml de HCl a 0,1 M, diluido a 100 ml

50 ml de borato a 0,025 M + 0,9 a 18,3 ml de NaOH a 0,1 M, diluido a 100 ml

50 ml de bicarbonato de sodio a 0,05 M + 5,0 a 10,7 ml de NaOH a 0,1 M, diluido a 100 ml

50 ml de ácido acético a 0,05 M + 5,0 a 30 ml de NaOH a 0,1 M, diluido a 100 ml

55 50 ml de Tris HCl a 0,05 M + 10 a 50 ml de Tris base a 0,1 M, diluido a 100 ml

El ajuste preciso de la cantidad de ácido o base a utilizar para proporcionar un pH deseado concreto lo podrán

determinar con facilidad los expertos en la técnica.

Si, en un ejemplo dado, fuera necesario el uso de un tampón biológico, se puede emplear uno de los siguientes:

Ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico («HEPES»)

Ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico («MOPS»)

5 Ácido 3-(*N*-morfolino)-2-hidroxiopropanosulfónico («MOPSO»)

Piperazina-*N,N'*-bis(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico) («POPSO»)

La reacción entre el PEG y el componente bioactivo normalmente se realizará en las condiciones que no darán lugar a la inactivación ni a la desnaturalización, p. ej., a temperaturas en las que el componente bioactivo conserva una bioactividad sustancial y se somete solo a la agitación necesaria para asegurar que los reactivos se mezclan adecuadamente. La reacción entre el PEG y las proteínas bioactivas se llevará a cabo preferiblemente a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 40 °C. Más preferiblemente, la reacción se llevará a cabo a entre aproximadamente 4 °C y 8 °C o a temperatura ambiente, a saber, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. Las reacciones entre el PEG y los agentes bioactivos no proteicos, p. ej., péptidos, se pueden llevar a cabo a unas temperaturas más altas o más bajas que son compatibles con la estabilidad de la sustancia química orgánica bioactiva concreta que se está conjugando al PEG.

Los expertos en la técnica sabrán sin esfuerzo que la cantidad de PEG empleada respecto a la cantidad del componente bioactivo dependerá del grado de conjugación que se desee obtener entre el polímero y el componente bioactivo. Por ejemplo, cuando se desea hacer reaccionar un PEG con una fracción concreta de los restos de lisina accesibles al solvente (en los casos en los que el componente bioactivo es un polipéptido), se requerirá una concentración molar de PEG al menos igual a la de las lisinas a conjugar. Claramente, si se han de modificar menos sitios de reacción accesibles al solvente de los que hay disponibles sobre la molécula del componente bioactivo, se requerirá, como corresponde, menos PEG. En general, sin embargo, cuando se utiliza un exceso molar de PEG, los presentes inventores han determinado que se puede preferir un exceso molar del orden de 2 a 10.

El tiempo necesario para que ocurra la reacción dependerá de una serie de factores, tales como la temperatura de la reacción, la concentración de los reactantes y la extensión de modificación deseada. El transcurso de la reacción se puede vigilar con los medios convencionales, tales como el análisis periódico de las muestras mediante cromatografía de exclusión por tamaño o la electroforesis en gel. La reacción se puede finalizar convenientemente cuando se desee mediante la adición de un compuesto de masa molecular baja que tiene un grupo reactivo, p. ej., glicina, para depurar el exceso de PEG aminorreactivo o mediante fraccionamiento cromatográfico. A temperatura ambiente se necesitará típicamente un tiempo de reacción de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas para hacer reaccionar el PEG con los grupos de fijación de los componentes más bioactivos (p. ej., los grupos lisina de las cadenas polipeptídicas). Se podría necesitar un tiempo de reacción mayor a una temperatura más baja. El experto en la técnica será consciente de que el tiempo de conjugación, así como la cantidad y el tipo de PEG, no debe ser tales que inactiven el componente bioactivo que se está empleando, a saber, no deben dar lugar a una pérdida sustancial de la actividad biológica del componente bioactivo. Con «no da lugar a que el componente bioactivo pierda sustancialmente la actividad biológica» se quiere decir que el componente bioactivo conjugado a PEG muestra al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 20%, 35%, 50%, 75%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más del nivel de bioactividad (p. ej., actividad enzimática; capacidad de fijación al receptor; actividad antineoplásica; etc.) que se ha demostrado *in vitro* o *in vivo* mediante el mismo componente bioactivo que no se ha conjugado con un PEG.

La purificación del componente bioactivo conjugado al polímero se puede efectuar con los medios empleados corrientemente por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración o diálisis. Las soluciones del producto de la reacción pueden, sin se desea, concentrarse con un rotavapor y el producto se puede obtener en estado seco por liofilización.

45 Según el componente bioactivo concreto que se ha utilizado y la extensión a la cual se hace reaccionar con el PEG, se espera que el aducto resultante sea útil diagnóstica o terapéuticamente, y que muestre, en comparación con el componente bioactivo que no reacciona, una disminución de la antigenicidad y de la inmunogenia, un incremento de la vida en circulación, y un incremento de la estabilidad, al mismo tiempo que mantiene un nivel útil de actividad biológica.

50 El componente bioactivo se puede hacer reaccionar con polímeros ramificados de poli(etilenglicol) monofuncionalmente activados que se han explicado más arriba (en particular, uno o varios dihidroxipeg ramificados monofuncionalmente activados, p. ej., dihidroxipeg-lisina) en un medio de reacción acuoso que puede estar tamponado, según los requisitos de pH del nucleófilo y del polímero activado. El pH óptimo para la reacción está generalmente entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5, y preferiblemente a aproximadamente 7,4, para mantener la solubilidad y la estabilidad de la mayoría de los polipéptidos. El pH óptimo para conjugar un PAG activado, p. ej., NPC-PEG, a una uricasa de mamífero, es de aproximadamente pH 10, mientras que el pH óptimo para conjugar selectivamente determinados PAG activados al grupo amino α del extremo amino de una proteína o

péptido se encuentra en el margen de aproximadamente 4 a aproximadamente 7. Las condiciones de reacción óptimas que se necesitan para mantener la estabilidad del componente bioactivo, la eficacia de la reacción, etc., se encuentran dentro de los conocimientos del experto en la técnica. El intervalo de temperatura preferido se encuentra entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 40 °C. La temperatura de la reacción no debe exceder a la temperatura a la cual el nucleófilo puede desnaturalizarse o descomponerse. Se prefiere que el nucleófilo reaccione con un exceso del polímero ramificado activado. Tras la reacción, el conjugado se recupera y se purifica, por ejemplo, mediante diafiltración, cromatografía en columna, o combinaciones de las mismas.

El uso de la modelización molecular puede facilitar una estrategia para optimizar la conjugación del polímero a una proteína. Por ejemplo, los datos cristalográficos de rayos X se pueden utilizar para generar imágenes computerizadas de las superficies proteicas accesibles al disolvente (Sayle, R. A. et al., (1995) *Trends Biochem Sci* 20: 374-376). Los análisis estructurales que se basan en las mediciones de resonancia magnética nuclear también pueden ser útiles en este sentido. La fracción de los sitios accesibles de la superficie con los cuales puede reaccionar un polímero activado concreto, y la distribución de las cadenas de polímero entre los diferentes sitios, se puede modular por la selección del grupo de activación adecuado, la proporción molar de polímero por proteína, y las condiciones adecuadas de la reacción de conjugación (p. ej., pH, temperatura, concentraciones de los reactivos, duración de la incubación). En determinadas circunstancias puede ser ventajoso unir el polímero a los restos que están suficientemente lejos del sitio activo de una enzima para disminuir al mínimo cualquier efecto adverso sobre la bioactividad. Por ejemplo, la superficie de la proteinasa K contiene muchos posibles sitios de unión para los polímeros que están activados con diferentes químicas. Sin embargo, el descubrimiento anterior por algunos de los presentes inventores de que la mayoría de los restos de lisina de la proteinasa K accesibles al disolvente se localizan exclusivamente en una región de la enzima que está relativamente lejos del sitio catalítico hace que el uso de los polímeros aminoreactivos sean especialmente deseables para esta enzima concreta (véase la solicitud de patente de los EE.UU. en tramitación con la presente por los mismos autores n.º 10/183.607, registrada el 28 de junio de 2002).

En algunas realizaciones (p. ej., en el caso de enzimas en las cuales el dominio catalítico contiene grupos amino (tales como los descritos más arriba) con los cuales puede reaccionar el polímero activado), puede ser deseable para proteger el sitio activo del contacto con el polímero activado. En tales casos, la enzima se puede fijar fuertemente, pero de forma reversible, a un análogo de sustrato o un inhibidor competitivo que es suficientemente grande para obstaculizar el acceso del polímero activado a los restos reactivos dentro o cerca del sitio activo (véase, p. ej., Nahri, L. O. et al., (1991) *J Protein Chem* 10: 385-389). Otra alternativa es que tales análogos o inhibidores se pueden fijar a una matriz sólida a la cual la proteína se puede absorber posteriormente. Mientras está fijada a la «matriz de afinidad» resultante, la proteína se puede hacer reaccionar con el polímero activado. Esta estrategia puede disminuir al mínimo la conjugación del polímero reactivo con los sitios donde tal conjugación podría inhibir la catálisis. La proteína modificada selectivamente se puede liberar posteriormente desde la matriz de afinidad, mediante los procedimientos que conocen los expertos en la técnica (véase Wilchek, M. et al., (1984) *Methods Enzymol* 104: 3-55). Los conjugados resultantes pueden incluir moléculas de proteína a las cuales el polímero se une preferiblemente en los sitios donde no interfiere con la bioactividad de la proteína.

Tras la reacción de conjugación, los conjugados que se han modificado en distinta extensión se pueden separar unos de los otros por cromatografía de exclusión por tamaño y/o cromatografía de intercambio iónico, como se describe en Sherman, M. R. et al. (1997), véase más arriba. Por ejemplo, la cromatografía en una columna HR 10/30 de marca Superdex® 75 o una columna HR 10/30 de marca Superdex® 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) permite separar las moléculas de proteína que están PEGiladas en diferente grado, así como su separación del PEG libre residual y de la mayoría de subproductos de la reacción de conjugación (véase la solicitud de patente de los EE.UU. en tramitación con la presente por los mismos autores, n.º 10/183.607, más arriba).

Composiciones

La invención da a conocer la estabilización de conjugados de componentes bioactivos PEGilados de antigenicidad disminuida que se generan con los procedimientos de esta invención. En aspectos relacionados, la invención también da a conocer composiciones que comprenden uno o varios de tales conjugados. Las composiciones de acuerdo con este aspecto de la invención comprenderán uno o varios (p. ej., uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, etc.) de los conjugados de la invención descritos más arriba. En determinados aspectos, las composiciones pueden comprender uno o varios componentes más, tales como una o varias sales tamponantes, uno o varios caótopos, uno o varios detergentes, una o varias proteínas (p. ej., una o varias enzimas), uno o varios polímeros, y similares. Las composiciones de este aspecto de la invención pueden ser de cualquier forma, entre ellas sólido (p. ej., polvo seco) o solución (en particular en forma de una solución salina tamponada fisiológicamente compatible que comprende uno o varios de los conjugados de la invención).

55 Composiciones farmacéuticas

Determinadas composiciones de la invención se formulan en particular para ser usadas como composiciones farmacéuticas para ser usadas en aplicaciones profilácticas, diagnósticas o terapéuticas. Tales composiciones comprenderán típicamente uno o varios de los conjugados de la invención y uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La terminología «vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un material de relleno atóxico sólido, semisólido o líquido, diluyente,

material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo que puede tolerar bien un animal destinatario, entre ellos un humano u otro mamífero, en el cual se introduce la composición farmacéutica, sin que se produzcan efectos adversos como consecuencia de esta adición.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a un destinatario a través cualquier vía de administración adecuada, tal como por vía oral, rectal, parenteral, intrasistémica, vaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, ungüentos, gotas o parche transdérmico), bucal, como un aerosol nasal u oral, o por inhalación. La terminología «parenteral», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a las vías de administración que incluyen la inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracisternal, subcutánea e intraarticular, y la infusión.

10 Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer por la presente invención para la inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas, o no acuosas, y estériles farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso. Los ejemplos de excipientes, diluyentes, solventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, poli(etilenglicol) y similares),
15 carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, o mediante el uso de tensioactivos.

20 Tales composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, humectantes, emulsionantes o dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de distintos agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, alcohol benzílico, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes que mantienen la presión osmótica, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede conseguir mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales
25 como el monoesterato de aluminio, los hidrogeles y la gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de los fármacos, es deseable enlentecer la absorción de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo poco soluble en los líquidos corporales acuosos. La velocidad de absorción del fármaco dependerá entonces de la velocidad a la que se disuelva, que, a su vez, puede depender de su forma física. Otra
30 posibilidad es que la absorción retrasada de la forma farmacéutica administrada por vía parenteral se lleve a cabo por disolución o suspensión del fármaco en un vehículo oleoso.

Las formas de liberación lenta inyectables se fabrican mediante la formación de matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglucólido. Según la proporción de fármaco por polímero vehicular y la naturaleza del polímero vehicular concreto que se emplea, se puede controlar el ritmo de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos)
35 biocompatibles. También se preparan formulaciones inyectables de liberación lenta mediante el atrapamiento del fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, o mediante la incorporación de esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se
40 pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas farmacéuticas sólidas, los compuestos activos se mezclan con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) sustancias de relleno o aditivos, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por
45 ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la solución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, g) humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, e i)
50 lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, poli(etilenglicoles) sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica puede también comprender tamponantes.

Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como sustancias de relleno para las cápsulas de gelatina blandas y duras con el uso de excipientes tales como la lactosa (azúcar de la leche), así como
55 PEG de alta masa molecular.

Las formas farmacéuticas sólidas de los comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con revestimientos y envolturas tales como revestimientos entéricos o cronomodulantes y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener optativamente opacificantes y también

pueden ser de tal composición que liberan solo, o preferiblemente, el ingrediente o ingredientes activos en una determinada parte del tubo digestivo, optativamente, de una manera lenta. Los ejemplos de composiciones impregnantes que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden ser en forma microencapsulada, cuando es adecuado, con uno o varios de los excipientes mencionados anteriormente.

Las formas de dosificación líquida para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes que se utilizan con frecuencia en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, solubilizantes, y emulsionantes, tales como etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla del algodón, cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y ajonjolí), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, PEG y ácidos grasos esterificados a sorbitano, y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden también incluir adyuvantes, tales como humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, saborizantes y aromatizantes.

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

La administración tópica incluye la administración en la piel o en las mucosas, que incluye la superficie del pulmón y del ojo. Las composiciones para la administración tópica, entre ellas las que son para la inhalación, se pueden preparar como un polvo seco que se puede presurizar o no presurizar. En las composiciones de polvo no presurizado, los ingredientes activos troceados en polvo fino se pueden utilizar en mezcla con un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable de tamaño más grande que comprende partículas que tienen un tamaño, por ejemplo, de hasta 100 μm de diámetro. Los excipientes inertes adecuados incluyen azúcares, tales como lactosa y sacarosa. Es deseable que al menos el 95% en peso de las partículas del ingrediente activo tengan un tamaño de partícula eficaz en el intervalo de 0,01 a 10 μm .

Otra alternativa es que la composición farmacéutica se pueda presurizar y que contenga un gas comprimido, tal como nitrógeno, o un propulsor de gas licuado. El medio del propulsor licuado, y de hecho toda la composición, puede ser preferiblemente tal que los ingredientes activos no se disuelvan en ésta en ninguna cantidad sustancial. La composición presurizada puede también contener un tensioactivo. El tensioactivo puede ser un tensioactivo no iónico sólido o líquido, o puede ser un tensioactivo aniónico sólido. Es preferible utilizar el tensioactivo aniónico sólido en forma de una sal de sodio.

Una forma más de administración tópica es en el ojo. En este modo de administración, los conjugados o composiciones de la invención se administran en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de tal manera que los compuestos activos se mantienen en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los compuestos atraviesen la conjuntiva o las regiones de la córnea e internas del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede, por ejemplo, ser un ungüento, un aceite vegetal o un material de encapsulación.

Las composiciones para la administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que se pueden preparar mediante la mezcla de los conjugados o composiciones de la invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados, tales como mantequilla de cacao, PEG o un supositorio de cera, que son sólidos a la temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan los fármacos.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en los presentes procedimientos terapéuticos también se pueden administrar en forma de liposomas. Tal y como se conoce en la técnica, los liposomas suelen obtenerse de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas se forman mediante cristales líquidos hidratados monolaminares o multilaminares que están dispersos en un medio acuoso. Se puede utilizar cualquier lípido atóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Además de uno o varios de los conjugados o composiciones de la invención, las presentes composiciones farmacéuticas en la forma liposómica puede también contener uno o varios estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los procedimientos para formar liposomas se conocen en la técnica (véase, p. ej., Zalipsky, S., et al., patente de los EE.UU. n.º 5.395.619). Los liposomas que comprenden los fosfolípidos que se conjugan al PEG, con mucha frecuencia fosfatidiletanolamina conjugada al mPEG, tienen propiedades ventajosas, que incluyen una vida útil prolongada en el torrente sanguíneo de los mamíferos (Fisher, D., patente de los EE.UU. n.º 6.132.763). Más ventajosamente, los hidroxipeg de la presente invención pueden ser sustitutos del mPEG para formar tales PEG-liposomas. Más ventajosamente, los hidroxipeg monofuncionalmente activados de la presente invención pueden ser sustitutos de los mPEG activados en la síntesis del PEG-diacilglicerol que se ha de incorporar en los PEG-liposomas.

Posologías de las dosis

Los conjugados o composiciones de la invención se pueden administrar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* a las células para estimular la respuesta celular a uno o varios compuestos activos. El experto en la técnica apreciará que las cantidades eficaces de un compuesto activo dado, conjugado o composición se puede determinar empíricamente y se puede emplear en forma pura o, cuando tales formas existen, en una formulación o forma de profármaco farmacéuticamente aceptables. Los compuestos, conjugados o composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente animal o humano que lo necesita como composiciones veterinarias o farmacéuticas en combinación con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Hay que ser consciente de que, cuando se administran a un paciente humano, el uso diario, semanal o mensual total de los compuestos y composiciones de la presente invención lo decidirá el médico especialista dentro del alcance del criterio médico acertado. El nivel de la dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente concreto dependerá de una serie de factores, entre ellos el tipo y el grado de la respuesta celular a conseguir; la identidad y/o actividad de uno o varios compuestos, conjugados o composiciones específicos empleados; la edad, la masa corporal o el área de la superficie, la salud general, el sexo, la dieta y el nivel de actividad del paciente; el momento de la administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto o compuestos activos; la duración del tratamiento; otros fármacos utilizados en combinación o de manera coincidente con el o los compuestos, conjugados o composiciones específicos; y factores parecidos que conocen bien los expertos en las técnica farmacéutica y médica. Por ejemplo, se encuentra bien dentro de los conocimientos de la técnica el comenzar las dosis de un compuesto, conjugado o composición dados de la invención a una concentración más baja de lo necesario para conseguir el efecto terapéutico deseado e ir incrementando gradualmente las dosis hasta que se consigue el efecto deseado.

Las posologías de las dosis también se pueden disponer de una manera específica para el paciente para proporcionar una concentración predeterminada en la sangre de un compuesto activo dado, concentración que se determina mediante los métodos aceptados y corrientes en la técnica, p. ej., HPLC de exclusión por tamaño, de intercambio iónico o de fase inversa. Así pues, las posologías de las dosis del paciente se pueden ajustar para conseguir una concentración en la sangre relativamente constante, que se mide mediante HPLC, de acuerdo con los procedimientos que son corrientes y familiares para los expertos en la técnica médica, farmacéutica y/o farmacológica.

Usos diagnóstico y terapéutico

Un uso diagnóstico de un conjugado de la invención podría ser para localizar un resto antigénico, p. ej., un cáncer, dentro del cuerpo de un animal, en especial un humano, mediante la administración de un anticuerpo conjugado a polímero de la invención, en donde el conjugado está marcado en la proteína o bien en el componente de polímero para permitir la detección, p. ej., mediante detección óptica, radiométrica, fluorescente o resonante como se explica más adelante.

Los conjugados de PEG con el compuesto bioactivo (administrados preferiblemente como composiciones que comprenden tales conjugados) de la presente invención se espera que tenga *in vivo* una semivida en circulación mucho más larga y una antigenicidad e inmunogenia reducidas. Estas propiedades alivian o mejoran la eliminación rápida de la circulación que se observa cuando muchos compuestos terapéuticos (en particular los compuestos bioactivos tales como los que se usan como componentes en los conjugados de la presente invención) se introducen en un animal, en especial en un humano u otro mamífero, con fines terapéuticos. El uso de los conjugados y de las composiciones de la invención también reduce o elimina las preocupaciones sobre repetir la administración de un compuesto o componente bioactivo concreto, lo que, si no, provocaría una respuesta inmunitaria en el paciente. Las respuestas inmunitarias problemáticas incluyen las que neutralizan la bioactividad y/o incrementan el ritmo de eliminación del compuesto bioactivo desde el torrente circulatorio (con lo que se disminuye la eficacia del procedimiento diagnóstico o terapéutico) y los que ocasionan efectos adversos en el paciente.

Así pues, en otro aspecto de la invención, los conjugados y composiciones de la invención se pueden utilizar en los procedimientos diagnósticos o terapéuticos, por ejemplo, para diagnosticar, tratar o prevenir una serie de trastornos físicos de un animal, en particular de un mamífero, tal como un humano, predispuesto a tal trastorno o que lo padece. En tales estrategias, el objetivo del tratamiento es el de retrasar o impedir el desarrollo del trastorno, y/o curar o inducir una remisión del trastorno, y/o disminuir o mitigar los efectos secundarios de otras posologías terapéuticas. Así pues, los conjugados y composiciones con el PEG unido al componente bioactivo de la presente invención se pueden utilizar para la protección, supresión o tratamiento de trastornos físicos, tales como infecciones o enfermedades. La terminología «protección» contra un trastorno físico, tal y como se utiliza en la presente memoria, abarca «prevención», «supresión», y «tratamiento». «Prevención» implica la administración de un conjugado o composición de la invención antes de la inducción de la enfermedad o del trastorno físico, mientras que «supresión» implica la administración del conjugado o composición antes de la aparición clínica de la enfermedad; así pues, la «prevención» y la «supresión» de un trastorno físico se llevan a cabo típicamente en un animal que está predispuesto o es susceptible al trastorno, pero que todavía no lo padece. El «tratamiento» de un trastorno físico, sin embargo, implica la administración del conjugado o composición terapéutico tras la aparición de la enfermedad. Se debe saber que en la medicina humana y veterinaria no siempre es posible distinguir entre «prevención» y «supresión» de un trastorno físico. En muchos casos, el acontecimiento o acontecimientos inductivos finales pueden ser desconocidos o latentes, y ni el paciente ni el médico podrían ser conscientes del acontecimiento inductor hasta bastante después de

su aparición. Por lo tanto, se utiliza con frecuencia la terminología «profilaxis» como diferente de «tratamiento» para abarcar tanto la «prevención» como la «supresión», según están definidos en la presente memoria. La terminología «protección», utilizada de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, por lo tanto, pretende incluir la «profilaxis».

5 Los procedimientos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender una o varias etapas que permiten al médico conseguir los objetivos terapéuticos descritos más arriba. Uno de tales procedimientos de la invención puede comprender, por ejemplo:

(a) identificar un animal (preferiblemente un mamífero, tal como un humano) que padece o tiene predisposición a un trastorno físico; y

10 (b) administrar al animal una cantidad eficaz de uno o varios compuestos o composiciones de la invención que se describen en la presente memoria, en particular uno o varios conjugados de PEG a un componente bioactivo (o una o varias composiciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados), de tal forma que la administración de los compuestos o composiciones previene, retrasa o diagnostica el desarrollo, o cura o induce la remisión, del trastorno físico del animal.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un animal que está «predispuesto a» un trastorno físico se define como un animal que no muestra el abanico de síntomas físicos patentes del trastorno, pero que desde el punto de vista genético, fisiológico u otro, corre el riesgo de desarrollar el trastorno. En los presentes procedimientos, la identificación de un animal (tal como un mamífero, entre ellos un humano) que está predispuesto a un trastorno físico determinado, o que corre el riesgo de padecerlo, o que lo padece, se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos estándares conocidos en la técnica con los que estará familiarizado el médico experto, entre ellos, por ejemplo, ensayos radiológicos, ensayos bioquímicos (p. ej., ensayos de la concentración relativa de determinados péptidos, proteínas, electrolitos, etc., en una muestra obtenida de un animal), procedimientos quirúrgicos, escrutinio genético, antecedentes familiares, palpación física, pruebas anatomopatológicas o histológicas (p. ej., evaluación al microscopio de muestras o extensiones de tejidos o de líquido corporal, ensayos inmunitarios, etc.), pruebas de líquidos corporales (p. ej., sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, semen y similares), diagnóstico por imagen (p. ej., radiológica, fluorescente, óptica, resonante (p. ej., con resonancia magnética nuclear (RMN) o resonancia espín de electrones (REE)), etc. Una vez que se ha identificado un animal por uno o varios de tales procedimientos, el animal se puede tratar de forma agresiva y/o proactiva para prevenir, suprimir, retrasar o curar el trastorno físico.

30 Los trastornos físicos que se pueden prevenir, diagnosticar o tratar con los conjugados, composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen cualquier trastorno físico para lo cual el componente bioactivo del conjugado se puede utilizar para la prevención, el diagnóstico o el tratamiento. Tales trastornos incluyen una serie de cánceres (p. ej., cánceres de mama, cánceres uterinos, cánceres de ovario, cánceres de próstata, cánceres testiculares, leucemias, linfomas, cánceres de pulmón, cánceres neurológicos, cánceres de piel, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de huesos, cánceres de colon y otros cánceres digestivos, cánceres de páncreas, cánceres de vejiga, cánceres de riñón y otros carcinomas, sarcomas, adenomas y mielomas); enfermedades infecciosas (p. ej., enfermedades bacterianas, enfermedades micóticas, enfermedades víricas (entre ellas hepatitis y VIH/sida), enfermedades parasitarias); trastornos genéticos (p. ej., fibrosis quística, esclerosis lateral amiotrófica, distrofia muscular, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Pompe, trastorno de inmunodeficiencia combinada grave), anemia, neutropenia, hemofilia y otros trastornos sanguíneos; trastornos neurológicos (p. ej., esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer); trastornos enzimáticos (p. ej., gota, uremia, hipercolesterolemia); trastornos de origen incierto (p. ej., enfermedad cardiovascular, hipertensión); y otros trastornos de importancia médica con los que el experto en la técnica estará fácilmente familiarizado. Las composiciones y los procedimientos de la presente invención también se pueden utilizar para prevenir la progresión de la enfermedad, tal como la quimioprevención de la progresión de una lesión premaligna hacia una lesión maligna.

Así pues, los procedimientos terapéuticos de la invención usan uno o varios conjugados de la invención, o una o varias composiciones farmacéuticas de la invención, que se pueden administrar a un animal que lo necesita mediante una serie de vías de administración, entre ellas, oral, rectal, parenteral (que incluye la inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracisternal, subcutánea y intraarticular, o mediante infusión), intrasistémica, vaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, ungüentos, gotas o parche transdérmico), bucal, como un aerosol oral o nasal, o mediante inhalación. Gracias a la invención, se puede administrar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* una cantidad eficaz de los conjugados o composiciones a las células o a los animales que padecen, o que están predispuestos a tenerlo, un trastorno particular, por lo que se previene, retrasa, diagnostica o trata el trastorno del animal. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «una cantidad eficaz de un conjugado (o composición)» hace referencia a una cantidad tal que hace que el conjugado lleve a cabo la actividad biológica del componente bioactivo del conjugado, con lo que se previene, retrasa, diagnostica, trata o cura el trastorno físico del animal al cual se ha administrado el conjugado de la invención. El experto en la técnica apreciará que se pueden determinar empíricamente las cantidades eficaces de los conjugados o composiciones de la invención, de acuerdo con los procedimientos estándares bien conocidos por los expertos en las técnicas farmacéutica y médica; véase, p. ej., Beers, M. H. et al., eds. (1999) *Merck Manual of Diagnosis & Therapy*, 17.^a edición, Merck and Co., Rahway, NJ; Hardam, J. G. et al., eds. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10.^a edición, McGraw-Hill

Professional Publishing, Elmsford, NY; Speight, T. M. et al., eds. (1997) *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 4.^a edición, Blackwell Science, Inc., Boston; Katzung, B. G. (2000) *Basic and Clinical Pharmacology*, 8.^a edición, Appleton and Lange, Norwalk, CT.

- Se debe tener en cuenta que, cuando se administra a un paciente humano, la dosis diaria, semanal o mensual total de los conjugados y composiciones de la presente invención la decidirá el médico especialista dentro del alcance del criterio médico acertado. Por ejemplo, se obtienen resultados satisfactorios mediante la administración de algunos conjugados o composiciones de la invención en las dosis apropiadas según el compuesto bioactivo específico utilizado, en donde dichas dosis serán fácilmente familiares para el experto en la técnica o se pueden determinar con facilidad de forma empírica sólo con la experimentación habitual. De acuerdo con este aspecto de la invención, los conjugados o composiciones se pueden administrar una vez o en varias dosis, p. ej., dos veces al día o a la semana o al mes. Las posologías de dosis adecuadas para los distintos modos de administración (p. ej., parenteral, subcutánea, intramuscular, intraocular, intranasal, etc.) también se pueden determinar con facilidad de forma empírica sólo con la experimentación habitual o serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica, según la identidad del componente bioactivo.
- 15 En otras aplicaciones, los conjugados y composiciones de la invención se pueden utilizar para dirigir específicamente un agente diagnóstico o terapéutico a una célula, tejido, órgano u organismo que expresa un receptor para el componente bioactivo del conjugado, se fija a él, lo incorpora o, si no, lo puede captar. Los procedimientos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto la célula, tejido, órgano u organismo con uno o varios conjugados de la invención, en donde dichos conjugados comprenden adicionalmente uno o varios agentes diagnósticos o terapéuticos (preferiblemente unidos covalentemente al componente PEG del conjugado), de tal forma que el conjugado es captado por la célula, tejido, órgano u organismo mediante algún mecanismo (p. ej., mediante endocitosis mediada por receptor, pinocitosis, fagocitosis, difusión, etc.), con lo que se administra el agente diagnóstico o terapéutico a la célula, tejido, órgano u organismo. El agente diagnóstico o terapéutico utilizado de acuerdo con este aspecto de la invención puede ser, pero sin limitarse a ellos, al menos un agente seleccionado de un ácido nucleico, un compuesto orgánico, una proteína, un anticuerpo, una enzima, una glucoproteína, una lipoproteína, un elemento, un lípido, un sacárido, un isótopo, un glúcido, un contraste, una sonda detectable, o cualquier combinación de los mismos, que también se puede marcar detectablemente como se describe en la presente memoria. Un agente terapéutico utilizado en este aspecto de la presente invención puede tener un efecto terapéutico sobre la célula (o tejido, u órgano u organismo) diana, en donde el efecto se selecciona entre, pero sin limitarse a ellos, la corrección de un gen o proteína defectuosos, una acción farmacológica, un efecto tóxico, un efecto estimulante del crecimiento, un efecto inhibidor del crecimiento, un efecto metabólico, un efecto catabólico, un efecto anabólico, un efecto antiviral, un efecto antimicótico, un efecto antibacteriano, un efecto hormonal, un efecto neurohumoral, un efecto estimulante de la diferenciación celular, un efecto inhibidor de la diferenciación celular, un efecto neuromodulador, un efecto antineoplásico, un efecto antitumoral, un efecto inhibidor o estimulante de la insulina, un efecto estimulante de la médula ósea, un efecto estimulante de las células madre pluripotentes, un efecto estimulante del sistema inmunitario y cualquier otro efecto terapéutico conocido que puede estar generado por un agente terapéutico administrado a una célula (o tejido, u órgano u organismo) mediante un sistema de administración de acuerdo con este aspecto de la presente invención.

- Tales agentes terapéuticos adicionales, que pueden además comprender un conjugado o composición bioactivos de la presente invención, se puede seleccionar de compuestos y composiciones nuevos y conocidos que incluyen antibióticos, corticoides, agentes citotóxicos, fármacos vasoactivos, antibióticos y otros agentes terapéuticos. Los ejemplos de tales agentes incluyen antibióticos y otros fármacos utilizados para el tratamiento del choque septicémico; tales como gentamicina, tobramicina, nafcilina, cefalosporinas parenterales, etc.; corticoides suprarrenales y análogos de los mismos, tales como dexametasona, que mitigan la lesión celular ocasionada por las endotoxinas; fármacos vasoactivos, tales como un bloqueante del receptor adrenérgico α (p. ej., fenoxibenzamina), un agonista del receptor adrenérgico β (p. ej., isoproterenol) y dopamina.

- Los conjugados y composiciones de la invención también se pueden utilizar para el diagnóstico de la enfermedad y para monitorizar la respuesta terapéutica. En algunos de tales procedimientos, los conjugados de la invención pueden comprender uno o varios marcadores detectables (tales como los descritos en otra parte de la presente memoria). En tales procedimientos específicos, estos conjugados de la invención con marcación detectable se pueden utilizar para detectar células, tejidos, órganos u organismos que expresan receptores, o que, si no, captan, el componente bioactivo de los conjugados. En un ejemplo de tal procedimiento, la célula, tejido, órgano u organismo se pone en contacto con uno o varios de los conjugados de la invención con marcación detectable en las condiciones que favorecen la captación del conjugado por la célula, tejido u organismo (p. ej., mediante la fijación del conjugado a un receptor de la superficie celular o mediante pinocitosis o difusión del conjugado al interior de la célula) y, a continuación, detectar el conjugado fijado o incorporado en la célula mediante los medios de detección específicos para el marcador utilizado (p. ej., detección de fluorescencia para los conjugados marcados con fluorescencia; resonancia magnética para conjugados marcados magnéticamente; radiografía para los conjugados radiomarcados; etc.). Otros usos de tales conjugados con marcación detectable pueden incluir, por ejemplo, tomar imágenes de una célula, tejido, órgano u organismo, o la estructura interna de un animal (incluido un humano), mediante la administración de una cantidad eficaz de una forma marcada de uno o varios conjugados de la invención, y medir la radiación detectable asociada a la célula, tejido, órgano u organismo (o animal). Los procedimientos para detectar los diferentes tipos de marcadores y sus usos en la radiografía diagnóstica y terapéutica los conoce bien el experto en la

técnica, y se describen en otro lugar de la presente memoria.

- En otro aspecto, los conjugados y composiciones de la invención se pueden utilizar en los procedimientos para modular la concentración o actividad de un receptor específico para el componente bioactivo del conjugado sobre la superficie de una célula que expresa tal receptor. Con «modular» o «modulación» de la actividad de un receptor dado se quiere decir que el conjugado, tras fijarse al receptor, o bien activa o bien inhibe la actividad fisiológica (p. ej., la cascada de la señalización intracelular) que desencadena el receptor. Aunque no se pretende apoyar ninguna explicación mecanística concreta para la actividad reguladora de los conjugados de la presente invención, tales conjugados pueden antagonizar la actividad fisiológica de un receptor celular mediante la fijación al receptor a través del componente bioactivo del conjugado, con lo que se bloquea la fijación del agonista natural (p. ej., el componente bioactivo sin conjugar) y se impide la activación del receptor por el agonista natural, mientras que no se induce una activación sustancial de la actividad fisiológica del propio receptor. Los procedimientos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender una o varias etapas, por ejemplo, poner en contacto la célula (lo que se puede hacer *in vitro* o *in vivo*) con uno o varios conjugados de la invención, en tales condiciones que el conjugado (a saber, la porción del componente bioactivo del conjugado) se fija a un receptor para el componente bioactivo sobre la superficie celular, pero no activa sustancialmente el receptor. Tales procedimientos serán útiles en una serie de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, como el experto en la técnica apreciará fácilmente.

Kits

- La invención también da a conocer kits que comprenden conjugados y/o composiciones de la invención. Tales kits típicamente comprenden un vehículo, tal como una caja, cartón, tubo o similar, que tiene en un confinamiento cerrado uno o varios contenedores, tales como viales, tubos, ampollas, botellas y similares, en donde un primer contenedor contiene uno o varios de los conjugados y/o composiciones de la presente invención. Los kits abarcados por este aspecto de la presente invención pueden además comprender uno o varios componentes adicionales (p. ej., reactivos y compuestos) necesarios para llevar a cabo una o varias aplicaciones concretas de los conjugados y composiciones de la presente invención, tal como uno o varios componentes útiles para el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno físico concretos (p. ej., uno o varios compuestos terapéuticos o composiciones adicionales, uno o varios reactivos diagnósticos, uno o varios vehículos o excipientes y similares), uno o varios conjugados adicionales o composiciones de la invención, y similares.

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación y comprobación de los anticuerpos contra el monometoxiPEG

- Se ha descrito previamente que se pueden inmunizar los conejos contra varios PEG mediante la inmunización de los animales con conjugados en los que el PEG se conjugó a una proteína transportadora inmunógena (Richter, A. W. et al., (1983) *Int. Arch Allergy Appl Immunol* 70: 124-131). Se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal que reacciona con el esqueleto de poliéter de PEG mediante la inyección de un conjugado de mPEG con β -glucuronidasa a los ratones y la selección de los clones de hibridoma que producen anticuerpos contra el PEG (Cheng T.-L. et al. (1999), véase más arriba; Cheng, T.-L. et al. (2000) véase más arriba; Tsai, N.-M. et al. (2001), véase más arriba; Roffler, S. et al., solicitud de patente de los EE.UU. publicada n.º 2001/0028881 A1 y patentes de los EE.UU. n.º 6.596.849 y 6.617.118. Otro anticuerpo monoclonal que reacciona con el esqueleto de poliéter del PEG ha sido descrito recientemente por Roberts, M. J. et al., solicitud de patente de los EE.UU. n.º 2003/001704 A1.

- Para desarrollar procedimientos sensibles para la detección de PEG en los conjugados de PEG-proteína, los anticuerpos policlonales contra el PEG se prepararon como se describe a continuación. Ya que casi todos los conjugados de PEG con proteínas terapéuticas descritos en la técnica se han sintetizado con mPEG, los presentes inventores investigaron la función que el grupo metoxilo tiene en la inmunorreactividad de los conjugados que contienen el mPEG. La modificación del mPEG de 10 kDa con carbonato de *p*-nitrofenilo se sintetizó por encargo en Shearwater Corporation (Huntsville, AL), una filial de Nektar Therapeutics (San Carlos, CA). Se preparó un conjugado por enlace uretano de mPEG a una uricasa de mamífero recombinante que contenía el número mínimo de cadenas de este mPEG de 10 kDa necesario para solubilizar la proteína al pH fisiológico (aproximadamente dos cadenas de PEG o mPEG por subunidad de uricasa de 35 kDa). Esta cantidad de PEG no era suficiente para suprimir la inmunogenia inusualmente alta de la uricasa (véase Sherman, M. R. et al., publicación PCT de patente internacional WO 01/59078 A2 y Kelly, S. J. et al. (2001), véase más arriba, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad). Esta preparación de PEG-uricasa en adyuvante de Freund se inyectó repetidamente en tres conejos, y los conejos se desangraron para preparar los antisueros que contenían los anticuerpos policlonales contra la uricasa, contra los conjugados PEG-uricasa y contra el PEG.

- A cada conejo se le inyectó la preparación de PEG-uricasa una vez en el adyuvante completo de Freund y cinco veces, a intervalos de una a cuatro semanas, en el adyuvante incompleto de Freund. Se tomaron muestras de la sangre aproximadamente dos semanas después de cada una de las tres últimas inyecciones. Se preparó suero de cada una de las nueve muestras de sangre y se analizó un pequeño volumen del suero frente a los anticuerpos contra el PEG mediante un ensayo inmunoenzimático («ELISA»), en placas de 96 pocillos que se revistieron con mPEG conjugado a una proteína que no tiene ninguna relación estructural con la uricasa.

Cada sangría de prueba produjo un antisuero que reaccionaba con el PEG en el análisis por ELISA. Cada uno de los tres conejos respondieron a la inmunización con PEG con una cinética cualitativamente parecida y con una especificidad parecida contra el grupo metoxilo del extremo del mPEG, según se midió mediante un ELISA competitivo. Inicialmente, se realizó un análisis de transferencia puntiforme para determinar la sensibilidad de los anticuerpos anti-PEG del suero de conejo. Las soluciones de los PEG de diferentes tamaños y estructuras, y la solución de PEG-uricasa que se utilizó para inmunizar los conejos, se depositaron en una membrana de transferencia de difluoruro de polivinilideno (Invitrogen, Carlsbad, CA; n.º de catálogo LS2002). Después de bloquear la membrana con una solución de leche desnatada en polvo al 2% (p/v), la membrana se incubó con una dilución del antisuero de conejo contra la PEG-uricasa que se preparó como se describe más arriba. A continuación, una dilución de anticuerpos contra la IgG de conejo producidos en cabra y conjugados a fosfatasa alcalina (Calbiochem, San Diego, CA; catálogo n.º 401371) se aplicó como anticuerpo secundario. La actividad de la fosfatasa alcalina que había en la transferencia se detectó con una combinación de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo y azul de nitrotetrazolio (Sigma, catálogo n.º B-1911) tal y como se ha descrito previamente (Blake, M. S. et al. (1984) *Anal Biochem* 136: 175-190, cuyas descripciones se incorporan en la presente por mediante referencia en su totalidad). Los anticuerpos anti-PEG de los conejos detectaron con una gran sensibilidad y especificidad las soluciones de PEG y el conjugado mPEG-proteína que se analizaron.

Ejemplo 2: demostración de la importancia del grupo metoxilo en la antigenicidad del mPEG

Inesperadamente, los presentes inventores han encontrado que los anticuerpos anti-PEG preparados según se describe en el ejemplo 1 estaban dirigidos predominantemente contra el grupo metoxilo del extremo del componente mPEG del antígeno. En la figura 1 se describen los resultados de un ensayo por ELISA competitivo en el cual las placas de 96 pocillos se revistieron con mPEG conjugado a una proteína que no tiene ninguna relación estructural con la uricasa. Después de bloquear la placa con suero de cabra al 2%, se le añadieron soluciones a concentraciones crecientes de mPEG de 4,8 kDa (Polymer Laboratories, n.º de catálogo 6570-5010), mPEG de 10 kDa (Union Carbide, catálogo n.º MPEG-10,000) o *t*-butoxiPEG de 10 kDa (Polymer Laboratories, catálogo n.º 29999997) y se incubaron con una dilución 1:1000 del antisuero de conejo formado contra el conjugado mPEG-uricasa. Tras retirar la solución, se midió espectrofotométricamente la cantidad de anticuerpo anti-PEG unido al conjugado mPEG-proteína sobre la placa con el uso de un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (anti-IgG de conejo de cabra, Calbiochem®, San Diego, CA, catálogo n.º 401393) y después se le añadió el sustrato de la peroxidasa, el dihidrocloruro de *o*-fenilendiamina (Sigma, St Louis, MO; catálogo n.º P-9781). Para cada muestra, la velocidad de reacción inicial (en unidades de miliabsorbancia por minuto) que se observa en ausencia de un competidor se designó como el 100%. El solapamiento de las curvas de las dos soluciones de mPEG sugiere que la longitud del esqueleto de PEG no es el determinante predominante de su antigenicidad. La curva para el *t*-butoxiPEG está desplazada hacia la derecha aproximadamente 2 unidades logarítmicas, lo que indica que el *t*-butoxiPEG tiene una afinidad aproximadamente 100 veces más baja que el mPEG por los anticuerpos generados contra un conjugado mPEG-proteína. Sin embargo, en experimentos previos de algunos de los presentes inventores que no se han publicado se encontró que el *t*-butoxiPEG muestra una inmunogenia significativa cuando se conjuga con una proteína inmunógena. Así pues, mientras que en la figura 1 se muestra que hay muy poca reactividad cruzada del *t*-butoxiPEG con los anticuerpos generados contra el mPEG, el uso del *t*-butoxiPEG en lugar del mPEG para la generación de proteínas terapéuticas PEGiladas no solucionaría el problema de la inmunogenia del componente PEG.

Los resultados descritos en la figura 1 sugieren que el grupo metoxilo del mPEG es el grupo antigénico predominante de la molécula del polímero. Para confirmar esta inferencia, los anticuerpos generados según se describe en el ejemplo 1 se sometieron a un análisis de ELISA competitivo, realizado como se describe para la figura 1, con el uso de PEG de distintos tamaños y estructuras que contienen uno o dos grupos metoxilo. La figura 2a muestra los resultados de la fijación del anticuerpo, representado gráficamente en función de la concentración molar de los grupos metoxilo en cada muestra. La concentración del competidor que da lugar a una inhibición del 50% de la fijación («IC₅₀») se calculó con la ecuación para una curva sigmoide de 5 parámetros y el programa SigmaPlot®, (SPSS Science, Chicago, IL).

Tal y como se muestra en la figura 2a, los siguientes PEG tenían todos la misma antigenia en función de la molaridad: los PEG lineales con un grupo metoxilo («mPEG de 10 kDa»), preparado por hidrólisis del mPEG-NPC (PEG-Shop) y «mono-mPEG de 20 kDa-lisina», sintetizados mediante conjugación de la lisina al NPC-PEG de 20 kDa (Shearwater, catálogo n.º M-NPC-20,000); un PEG lineal con dos grupos metoxilo («bis-mPEG de 2 kDa» (Sigma-Aldrich, catálogo n.º 81314)), y un PEG grande y «ramificado» que contiene dos grupos metoxilo («di-mPEG de 20 kDa-lisina» (Shearwater, catálogo n.º PEG2-NHS-40K)). Por el contrario, la curva para los PEG «ramificados» más pequeños con dos grupos metoxilo («di-mPEG de 5 kDa-lisina» (Shearwater, catálogo n.º 2Z3X0L01)) estaba desplazado entre 0,5 y 0,6 unidades logarítmicas hacia la derecha de la media de los resultados para las otras muestras, lo que indica que esta forma de mPEG «ramificado» es de tres a cuatro veces más antigénica que las otras muestras analizadas en este experimento. En la figura 2b se muestran los datos de la figura 2a en función de la concentración en peso del mPEG (µg/ml) en vez de la concentración molar de los grupos metoxilo, lo que corrobora la conclusión de que el grupo metoxilo es el decisivo para la interacción del mPEG con los anticuerpos anti-mPEG.

En la figura 3 se muestra un subconjunto de los datos de las figuras 1, 2a y 2b en un formato que demuestra la existencia de una dependencia directa entre la antigenicidad y el número de grupos metoxilo por molécula de PEG. Estas muestras representan los PEG de 10 kDa sin ningún grupo metoxilo («*t*-butoxiPEG de 10 kDa»), con un grupo

metoxilo («mPEG de 10 kDa») o con dos grupos metoxilo («di-mPEG de 5 kDa-lisina»). Los resultados indican que la antigenicidad de un polímero dado, y así pues de un conjugado de la invención producido con este polímero, es directamente dependiente del número de grupos metoxilo contenidos en la molécula del polímero de PEG. Cuanto mayor es el número de grupos metoxilo, mayor es la afinidad del polímero por los anticuerpos generados contra un conjugado mPEG-proteína.

En conjunto, estos resultados indican que la inhibición completa de la fijación de los anticuerpos de conejo a un conjugado de mPEG se podría llevar a cabo mediante la competición con soluciones de PEG y en especial de mPEG. Además, la capacidad que tienen las soluciones de mPEG para bloquear la fijación de los anticuerpos anti-PEG de conejo a los conjugados de mPEG con una proteína sin relación está correlacionada con su contenido de grupos metoxilo. Basándose en la concentración por peso, los mPEG de poca masa molecular eran competidores más potentes que los mPEG de masa molecular más alta, como se muestra en la figura 2b. Esta conclusión es coherente con el hecho de que la proporción de la masa de grupos metoxilo entre la masa total del polímero disminuye a medida que se incrementa la masa molecular del polímero. Entre los PEG que se analizaron, los antígenos más potentes (en función de la molaridad) eran los PEG «ramificados» que contenían dos grupos metoxilo, que a veces se denominan de tipo paraguas o «U-PEG» (por su nombre en inglés) (Martínez, A. et al., patente de los EE.UU. n.º 5.643.575) o «Y-PEG» (Greenwald, R. B., et al., solicitud de patente publicada de los EE.UU. n.º 2002/0052443 A1).

Ejemplo 3: comprobación de los anticuerpos anti-PEG contra los PEG que carecen de grupos metoxilo

La terminología «PharmaPEG» se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a PEG lineales o ramificados sin un grupo antigénico en el extremo o extremos que está o están distales con respecto al extremo que está activado o que se puede activar. A partir de los ejemplos anteriores, se puede inferir que la antigenicidad de un polímero y, por lo tanto, de un conjugado de polímero con un agente bioactivo, depende de la cantidad de grupos metoxilo del polímero. Para comprobar adicionalmente esta inferencia, se realizaron análisis de ELISA competitivos, como se describe en la figura 1, con los que se comparó la capacidad que tienen los anticuerpos anti-mPEG para fijarse al mPEG («mPEG de 4,8 kDa») y a los PharmaPEG de 12 kDa, 20 kDa y 35 kDa, que no tienen grupos metoxilo ni ningún otro grupo alcoxilo en un extremo de los polímeros lineales. Los resultados se muestran en la figura 4. El desplazamiento de las tres curvas de los PharmaPEG respecto a la curva del mPEG que se observa en la figura 4 indica que la antigenicidad de los PharmaPEG es aproximadamente 100 veces más baja que la del mPEG, cuando se analizaron con los anticuerpos anti-mPEG. Así pues, los polímeros que carecen de grupos metoxilo (p. ej., PharmaPEG) tienen una antigenicidad reducida o sustancialmente reducida cuando se comparan con los polímeros que se utilizaron tradicionalmente para la bioconjugación de sustancias farmacéuticas, p. ej., mPEG.

Tal y como se observó más arriba, en función del peso, la potencia competitiva de los mPEG es inversamente proporcionales a su masa molecular. Sin embargo, los PEG que carecían de grupos metoxilo tenían sólo aproximadamente el 1% de la potencia competitiva de los mPEG, independientemente de su masa molecular. Estos resultados apoyan la conclusión de que los polímeros monofuncionalmente reactivos que carecen de grupos metoxilo son particularmente idóneos para el uso en la preparación de conjugados a polímero de agentes bioactivos que tienen una antigenicidad reducida, sustancialmente reducida o ninguna antigenicidad, en comparación con los conjugados producidos con el mPEG, en especial los mPEG «ramificados», tales como di-mPEG-lisina.

Ejemplo 4: detección de conjugados de la proteína PEGilada mediante transferencia Western con anticuerpos anti-mPEG

Los conjugados entre el monometoxiPEG y la anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1; «CA II») se utilizaron como modelo para analizar de la capacidad que tienen los anticuerpos anti-mPEG para detectar los conjugados de la proteína PEGilada tras la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio («SDS-PAGE»). Los geles se electrotransfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno y las transferencias se incubaron con anticuerpos anti-mPEG de conejo (diluido 1:200), luego se incubaron con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo de cabra) conjugado a la fosfatasa alcalina, y al final se expone a un sustrato que forma un precipitado coloreado. Este procedimiento de detección inmunitaria de proteínas o de conjugados polímero-proteína transferidos desde un gel electroforético a una membrana se suele denominar una «transferencia Western» (Tsang, V. C. W. et al., (1984) *Anal Biochem* 143: 304-307). El procedimiento de detección y los reactivos eran los mismos que los descritos para las transferencias puntiformes del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 5a. Los carriles 1 y 2 muestran un gel teñido para proteínas mediante el uso de la tinción Ruby de marca SYPRO® (Molecular Probes, Eugene, OR, catálogo n.º S-12000) y fotografiado con una cámara digital Kodak, con el uso de un filtro de luz visible naranja/rojo (Molecular Probes, catálogo n.º S-6655) en una campana oscura con iluminación a 302 nm. Los carriles 3 y 4 muestran los resultados de una transferencia Western de las mismas muestras. Los anticuerpos anti-mPEG se ven en las posiciones de todas las especies PEGiladas (carril 3), pero no en la de la anhidrasa carbónica sin modificar (carril 4).

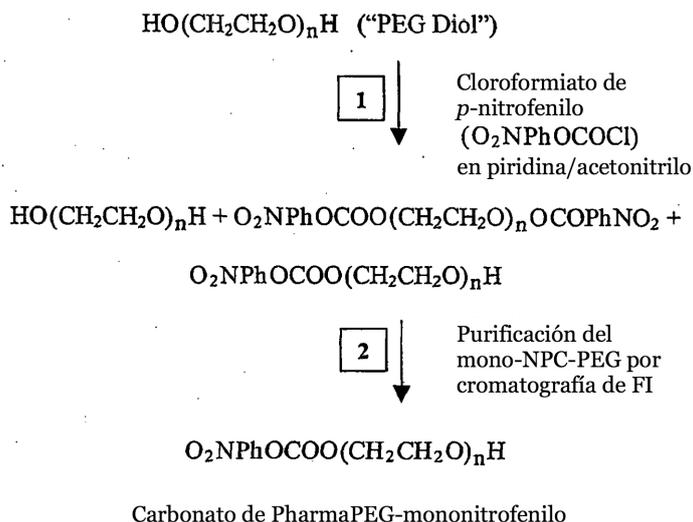
En la figura 5b se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas en el gel y en la transferencia Western que se muestran en la figura 5a, obtenida con el programa informático Kodak ID Imaging Analysis (Kodak, Rochester, NY). El eje horizontal representa la distancia de la migración respecto al frente del colorante y el eje vertical representa la intensidad relativa de la tinción de proteínas o de la tinción con anti-mPEG. El trazado inferior muestra las bandas del estándar de proteínas preteñidas de marca SeeBlue Plus2™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA; catálogo n.º

LC5625), en las que los picos numerados de 1 a 8 identifican proteínas con las siguientes masas moleculares aparentes (en kDa): 204, 111, 68,8, 51,5, 40,2, 28,9, 20,7 y 14,9, respectivamente. El segundo trazado desde abajo es una tinción de la anhidrasa carbónica PEGilada con los anticuerpos anti-mPEG. El tercer trazado desde abajo representa la banda teñida de la proteína de la anhidrasa carbónica y el trazado superior muestra los conjugados de mPEG y anhidrasa carbónica teñidos para proteínas. Los números que hay sobre los picos de la figura 5b indican el número de cadenas de mPEG conjugadas a la anhidrasa carbónica en el uno o varios conjugados del pico. PEG₀ indica la posición de la anhidrasa carbónica que no está conjugada a ningún PEG.

En conjunto, estos resultados indican que los anticuerpos anti-mPEG son capaces de formar complejos con facilidad con las proteínas PEGiladas preparadas con una forma reactiva de mPEG y, mediante lo cual, permiten su detección sensible y selectiva. Cuando tales conjugados se introducen en un animal con fines diagnósticos, profilácticos o terapéuticos, la inducción de los anticuerpos anti-mPEG contribuirían a acelerar el ritmo de eliminación del agente desde el torrente circulatorio, con lo que se limita la eficacia de estos conjugados y conduce potencialmente a efectos adversos mediados por la formación de complejos inmunitarios.

Ejemplo 5: síntesis del carbonato de PharmaPEG-mononitrofenilo

- 15 Un requisito para preparar PharmaPEG monofuncionalmente activado a partir de PEG diol es que, en alguna etapa de la síntesis, uno de los grupos terminales del PEG debe tener propiedades que permiten la separación de los PEG que contienen una cantidad diferente de este grupo terminal. Tal grupo podría ser más hidrófobo que el PEG o bien que el PEG activado, lo que permitiría la separación mediante cromatografía de fase inversa («cromatografía FI»).
- 20 Otra posibilidad es que tal grupo podría estar cargado, lo que permitiría la separación mediante cromatografía de intercambio iónico. Tal grupo podría ser parte de una fase sólida, lo que permitiría la separación de fase desde los líquidos en los que el PEG sin unir está disuelto. Si el grupo activador se puede utilizar como la base de la separación, como en el caso del NPC-PEG descrito en este ejemplo 5, entonces la unión del grupo activador es la única reacción de síntesis que se necesita. Si un grupo bloqueador retirable, p. ej., un grupo *t*-butilo o trifenilmetilo («tritol»), proporciona la base de la separación, el grupo bloqueador se puede añadir antes o bien después de la unión del grupo activado o activable, tal y como se describe en el ejemplo 6. En teoría, la etapa de purificación utilizada para aislar el PEG que contiene el número deseado de grupos de bloqueo se puede realizar en cualquier momento después de unir el grupo bloqueador. En la práctica, la inestabilidad relativa de los enlaces entre el esqueleto del polímero y el grupo bloqueador y entre el esqueleto del polímero y el grupo activador (o activable) pueden dictar la secuencia óptima de las etapas.
- 30 La síntesis del NPC-PEG monofuncionalmente activado a partir del dihidroxiPEG se resume en el siguiente diagrama, en el cual *Ph* hace referencia a un grupo fenilo y *n* hace referencia al número de unidades de óxido de etileno del polímero, que es de aproximadamente 227 para el PEG de 10 kDa.



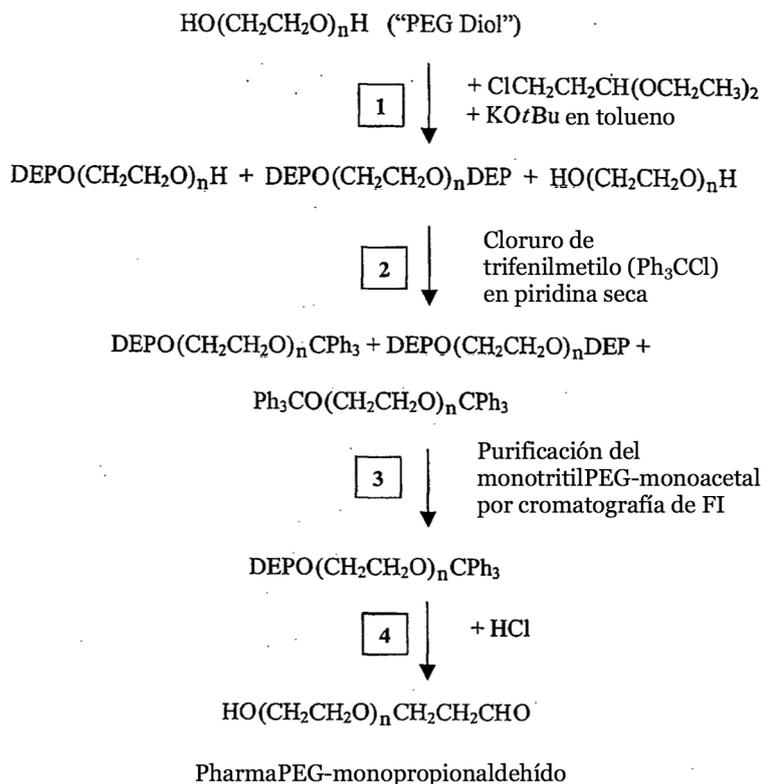
- 35 A los PEG dioles de distintos proveedores, todos los cuales se marcó que tenían una masa molecular de 10 kDa, se les analizó la pureza y la homogeneidad. Ninguno de ellos contenía más del 90% de PEG con una masa molecular de aproximadamente 10 kDa. Por lo tanto, el PEG diol de 10 kDa (Fluka Chemical Group, Milwaukee, WI, catálogo n.º 81280) se fraccionó de contaminantes de menor masa molecular mediante cromatografía de fase inversa en una columna Amberchrom MD-P CG-300SD (7,5 mm x 15 cm, TosoHaas, Montgomeryville, PA). Se cargó el PEG en la columna como una solución en acetoneitrilo al 5% (v/v) en agua y se eluyó con un gradiente lineal de acetoneitrilo del 5% al 35% en agua. Se analizaron las fracciones mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna HR10/30 de marca Superdex® 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NY) en acetato de sodio a 20 mM que contenía NaCl a 150 mM, pH 4,6. Se agruparon y liofilizaron las fracciones de la columna Amberchrom en la que más del 98% de la señal del índice de refracción («IR») debido al PEG estaba en el pico que corresponde al PEG de

aproximadamente 10 kDa.

El PEG diol seco y purificado (530 mg) se combinó con 61,4 mg de cloroformiato de *p*-nitrofenilo (Aldrich, Milwaukee, WI, catálogo n.º 16021-0) y se disolvió en 4 ml de acetonitrilo en un tubo de vidrio de 13 x 100 mm cerrado a rosca, lo que da una concentración final de aproximadamente 12,5 mM de PEG diol y de aproximadamente 75 mM de cloroformiato de *p*-nitrofenilo. Se añadió piridina (0,25 g) y la mezcla de reacción se incubó durante una noche a 36 °C. Se paró la reacción por agitación de la mezcla en 33 ml de ácido clorhídrico a 0,1 M enfriado en hielo. La solución se filtró para retirar un ligero precipitado de *p*-nitrofenol y se dializó durante un día en frío contra cuatro cambios de 1 l de agua. Se añadió el acetonitrilo a la solución dializada para llevar la concentración al 5% (v/v). La mitad de la mezcla producida en la etapa 1 (24 ml), que contenía aproximadamente 265 mg del PEG diol de 10 kDa purificado, se cargó en la columna Amberchrom y las especies de PEG se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo del 5% al 65% en agua. Las fracciones se analizaron como antes mediante cromatografía de exclusión por tamaño, con seguimiento del índice de refracción y la absorbancia a 280 nm. El dihidroxiPEG, que no absorbía a 280 nm, se eluyó primero, seguido por el PEG modificado con un sólo grupo de *p*-nitrofenilo («mono-NPC PEG»), seguido por el di-NPC PEG, para el cual la proporción de la absorbancia a 280 nm por el índice de refracción era el doble del del mono-NPC-PEG. Dos fracciones en el centro del intervalo de elución del mono-NPC PEG se combinaron para dar aproximadamente 110 mg de mono-NPC PEG, lo que corresponde a un rendimiento de aproximadamente el 42%. El producto de la etapa 2 se pudo secar para conservarlo en un desecador y/o un congelador o se utilizó directamente para la conjugación a un compuesto bioactivo que contiene amina o a un conector que contiene dos o más grupos amino para la preparación de PEG ramificados, p. ej., diPEG-lisina, que no contenía ningún grupo alcoxilo.

20 Ejemplo 6: síntesis de un PharmaPEG-monaldehído a partir del PEG diol

La síntesis de la modificación con monopropionaldehído del PharmaPEG se resume en el diagrama siguiente, en el que KO^tBu hace referencia a *t*-butóxido de potasio y DEP hace referencia al grupo 3,3-dietoxipropilo.



Preferiblemente, el dihidroxiPEG que se utiliza como material de partida para la etapa 1 tendrá una masa molecular que se encuentra dentro del 10% de su masa molecular nominal y tendrá un índice de polidispersidad de <1,05. El índice de polidispersidad se define como la razón de la masa molecular media en masa («M_w») por la masa molecular media en número («M_n»). Los dos parámetros, M_w y M_n, se pueden medir por cromatografía de exclusión por tamaño, mediante el uso de un estándar formado por moléculas de PEG de masa molecular conocida y del programa informático de cromatografía de permeación en gel tal como el programa informático EZChrom *Elite* Client/Server, versión 2.8.3 (Scientific Software, Inc, Pleasanton, CA). Otra alternativa es que la polidispersidad de los PEG se mida mediante espectroscopia de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo («MALDI-TOF») (Marie, A. et al., (2000) *Anal Chem* 72: 5106-5114), con el programa informático tal como Voyager Software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para la preparación de productos farmacéuticos que contienen PEG covalentemente unido, el material de partida del PEG tendrá preferiblemente una polidispersidad de

<1,02 y más preferiblemente <1,01, cuando se mide mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF. El material de partida se puede obtener de Aldrich Chemical Co., Fluka Chemicals (Buchs, Suiza), de Shearwater Corporation o de Sigma Chemical Co., entre otros proveedores que conocen los expertos en la técnica. Si el material de partida no es lo suficientemente homogéneo, se puede fraccionar mediante una adaptación del procedimiento descrito en el ejemplo 5.

Una mezcla de modificaciones del PEG diol con dietilacetal de monopropionaldehído y de dipropionaldehído se puede sintetizar con el dietilacetal de 3-cloro-propionaldehído (Aldrich catálogo n.º C6.900-4), como se describe para el dietilacetal de acetaldehído por Harris, J. M. et al., ((1984) *J. Polym Sci* 22: 341-352) (véase la etapa 1). También se describen procedimientos parecidos en Bentley, M. D. et al. ((1998) *J Pharm Sci*. 87: 1446-1449) y que posteriormente fueron patentados por Bentley, M. D. et al. (patente de los EE.UU. n.º 5.990.237).

A la mezcla producida en la etapa 1 se le añade una cantidad suficiente de cloruro de trifetilmetilo (clorotrifetilmetano o cloruro de tritilo, Ph₃CCl, p. ej., Aldrich, catálogo n.º T8.380-1) disuelto en piridina para que, en las condiciones de la reacción, el Ph₃CCl reaccione con todos los grupos hidroxilo del material de partida del PEG que no están conjugados al dietilacetal de propionaldehído (Kocienski, P. J., véase más arriba). Para completar la etapa 2 se recupera la mezcla después de la precipitación mediante la adición de un mal disolvente del PEG (p. ej., éter) o mediante la evaporación del disolvente o mediante otros procedimientos que se conocen en la técnica.

La mezcla recuperada de la etapa 2 se disuelve en agua antes o después de la adición de acetonitrilo al 5% (v/v) y la solución se carga en una columna de fase inversa que se espera, a partir de los principios conocidos en la técnica, que sea capaz de unir los derivados de tritilo del PEG. La columna puede contener derivados alquilo o arilo de sílice o de un sustrato polimérico, o puede ser un polímero a base de estireno (p. ej., Amberchrom MD-P CG-300), como en el ejemplo 5. El PEG diol y los derivados con tritilo se pueden eluir en un modo de fase inversa con un gradiente creciente de solvente orgánico, como en el ejemplo 5, o en un modo de desplazamiento de muestra al continuar cargando la columna hasta que se ha eluido al menos una porción de las especies deseadas (Agner, E. et al., publicación PCT de patente internacional WO 00/23798 A1) o en modo de desplazamiento (Cramer, S. M., patente de los EE.UU. n.º 6.239.262), o en una combinación de estos modos. En general, el derivado de PEG que carece de grupos tritilo se eluirá primero, el derivado con monotritilo se eluirá el segundo y el ditritilPEG se eluirá el tercero. Un rendimiento óptimo del producto deseado se obtiene cuando las proporciones de estas tres especies son 1:2:1. Para mejorar el rendimiento y/o pureza del producto de monotritil PEG deseado, puede ser deseable someter una porción del eluyente de la columna a cromatografía de reciclado, como se conoce bien en la técnica cromatográfica. Para completar la etapa 3, se separa la porción del eluido que contiene al menos una porción del derivado monitritílico, se concentra y se seca mediante los procedimientos que se conocen en la técnica.

En condiciones ligeramente ácidas y a una temperatura baja, el acetal se puede convertir en aldehído a la vez que se conservan la mayoría de los enlaces con tritilo en el extremo distal del PEG. En algunas aplicaciones de este ejemplo, puede ser ventajoso hacer reaccionar el monoaldehído del monotritilPEG con un resto diana antes de retirar el grupo tritilo. Tales realizaciones se contemplan en la presente invención y están incluidas en ella.

Ejemplo 7: demostración de la disminución de la inmunogenia de los conjugados preparados con hidroxipeg en comparación con los preparados con metoxipeg

Al proceder como se describe para la inmunización con conjugados de mPEG a la uricasa, como en el ejemplo 1, los grupos de tres conejos se inmunizaron con conjugados de mPEG o bien con conjugados de hidroxipeg de la misma preparación de uricasa porcina, en donde cada uno contiene una media de aproximadamente dos cadenas de PEG de 10 kDa por subunidad de uricasa. El número medio de cadenas de polímero unidas a cada preparación de conjugados se confirmó por análisis de HPLC de exclusión por tamaño y mediante SDS-PAGE, en la que los geles se tiñeron para las proteínas, como en el ejemplo 4, y para el PEG, con el procedimiento descrito en la solicitud de patente de los EE.UU. 10/183.607 de los mismos autores tramitada con la presente, registrada el 28 de junio de 2002. A cada conejo se le inyectó una de las preparaciones de PEG-uricasa una vez que están en el adyuvante completo de Freund y cinco veces, a intervalos de una a cuatro semanas, en el adyuvante incompleto de Freund. Se les extrajo sangre dos semanas después de la cuarta y la quinta inyecciones en el adyuvante incompleto de Freund, y se prepararon los sueros. Cuando se analizaron diluciones seriadas a un cuarto de los sueros de estos conejos mediante ensayos ELISA, como en el ejemplo 2, la concentración de los anticuerpos anti-PEG que se indujo mediante los conjugados preparados con hidroxipeg se encontró que estaba por debajo del 5% de la inducida por los conjugados preparados con mPEG (véanse las figuras 6a y 6b). En cambio, la inducción de los anticuerpos antiuricasa por los conjugados preparados con los dos tipos de PEG era similar en los dos grupos de conejos. Ninguno de los sueros de estos conejos antes de la inmunización contenía anticuerpos anti-PEG detectables.

Discusión y conclusiones

Se ha descrito en la técnica que el PEG terminado en un grupo metoxilo (mPEG) y el PEG terminado en un grupo hidroxilo (*bis*-hidroxipeg o PEG diol) son equivalentes para el uso en la bioconjugación o, más a menudo, que los mPEG y otros PEG con alcoxilos inferiores son mejores que los PEG dioles. Además, los dioles *bis*-activados pueden actuar como agentes de interconexión, lo que puede ser indeseable para producir bioconjugados solubles de acción prolongada con una inmunogenia y antigenicidad bajas. Sorprendentemente, los resultados de los presentes estudios

indican que los mPEG son significativamente antigénicos, y que los anticuerpos inducidos contra el grupo metoxilo del mPEG se fija a conjugados proteicos PEGilados que se han preparado con mPEG. Así pues, inesperadamente y contrariamente a los resultados anteriores, el mPEG *no* es equivalente al hidroxipePEG y el mPEG *no* es el preferido para preparar conjugados de polímeros con componentes bioactivos (tales como proteínas) que se pretende que 5 tengan unas mayores biodisponibilidad y estabilidad en el torrente circulatorio, y una inmunogenia mínima.

Basándose en los presentes resultados, está claro que el uso de PEG monofuncionalmente activado que no contiene un grupo metoxilo ni ningún otro grupo alcoxilo para la síntesis de conjugados de proteínas da lugar a unos conjugados menos inmunorreactivos. Los conjugados resultantes se ha demostrado que han disminuido su antigenicidad, a saber, han disminuido su capacidad para interaccionar con los anticuerpos generados contra los 10 conjugados de mPEG de la misma proteína, y han disminuido la inmunogenia, a saber, han disminuido la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria contra el componente PEG. Como corolario, los conjugados preparados con PEG ramificados que contienen dos o más grupos metoxilo se espera que sean más inmunógenos que los conjugados preparados de PEG ramificados que carecen de los grupo alcoxilo.

Finalmente, sobre la base de los presentes hallazgos, se espera que, para la síntesis de PEG-liposomas, el uso de 15 PEG monofuncionalmente activado que no contiene un grupo metoxilo ni ningún otro grupo alcoxilo, en vez de mPEG monofuncionalmente activado, confiera a los PEG-liposomas resultantes una disminución de la inmunorreactividad, que incluye una disminución de la tendencia a desencadenar la activación del complemento en la sangre, y una disminución de la tendencia a inducir la dificultad respiratoria aguda o las reacciones anafilactoides y pseudoalérgicas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Composición farmacéutica que comprende un conjugado que comprende uno o varios componentes bioactivos seleccionados del grupo que consiste en un péptido, una proteína y una glucoproteína covalentemente unida a al menos un polietilenglicol lineal o ramificado, en donde dicho polietilenglicol, si es lineal, tiene un grupo hidroxilo en el extremo que no está unido al componente o componentes bioactivos («el extremo distal») o, si es ramificado, tiene un grupo hidroxilo en cada extremo distal, y en donde dicho polietilenglicol está unido a un solo componente bioactivo en un solo sitio en el polietilenglicol, y
- 5 un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, caracterizado por que
- el conjugado está puro al 95% o más, preferiblemente al 98% o más, más preferiblemente al 99% o más, o al 100%, y en donde dicho al menos un polietilenglicol lineal o ramificado tiene una masa molecular de 10 kDa a 30 kDa.
- 10 2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho conjugado tiene una antigenicidad reducida o sustancialmente reducida en comparación con un conjugado que comprende el mismo componente o componentes bioactivos unidos al mismo sitio o sitios del componente o componentes bioactivos con el mismo número de polietilenglicoles del mismo tamaño y estructura lineal o ramificada que contiene uno o varios grupos alcoxilo terminales.
- 15 3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la unión de dicho polietilenglicol a dicho componente o componentes bioactivos se lleva a cabo con un reactivo modificado de al menos un polietilenglicol seleccionado del grupo que consiste en dihidroxiPEG lineales («PEG dioles»), hidroxiPEG-monoacetales e hidroxiPEG-monoácidos.
- 20 4. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la unión de dicho polietilenglicol a dicho componente o componentes bioactivos se lleva a cabo con el uso de un hidroxiPEG reactivo modificado que se selecciona del grupo que consiste en un monoaldehído, un monoéster de un monoácido, una monoamina, un monotiol, un monodisulfuro, un carbonato de monobromofenilo, un carbonato de monoclorofenilo, un carbonato de monofluorofenilo, un carbonato de mononitrofenilo, un monocarbonilimidazol, una monohidrazida, un monocarbazato, una monoyodoacetamida, una monomaleimida, un disulfuro de monoortopiridilo, una monooxima, un monofenilglioxal, una monitiazolidina-2-tiona, un monotioéster, una monotriazina y una monovinilsulfona.
- 25 5. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en un monihidroxiPEG-ácido y un di-hidroxiPEG-ácido, tal como di-hidroxiPEG-lisina.
- 30 6. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho polietilenglicol es un derivado reactivo de dicho dihidroxiPEG lineal.
7. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho polietilenglicol es un derivado reactivo de dicho ácido hidroxiPEG-monocarboxílico.
8. Procedimiento para la producción del conjugado comprendido en la composición de acuerdo con la reivindicación 1, entre un compuesto bioactivo seleccionado del grupo que consiste en un péptido, una proteína y una glucoproteína, y un polietilenglicol activado en sólo un extremo («un polietilenglicol monoactivado») que comprende:
- 35 (a) obtener un polietilenglicol que no contiene ningún grupo terminal que es un grupo alcoxilo unido establemente, en donde dicho polietilenglicol tiene una masa molecular de 10 kDa a 30 kDa;
- (b) opcionalmente, antes de la conversión del polietilenglicol de la etapa (a) en un polietilenglicol monofuncionalmente activado, proteger todo excepto uno de los grupos terminales mediante la adición de uno o varios grupos de bloqueo retirables, en donde el polietilenglicol monofuncionalmente activado utilizado tiene un grupo hidroxilo en su extremo distal, si es lineal, o tiene un grupo hidroxilo en cada extremo distal, si es ramificado;
- 40 (c) producir un derivado monofuncionalmente activado de dicho polietilenglicol al hacer reaccionar dicho polietilenglicol con un compuesto o compuestos modificadores en tales condiciones que dicho polietilenglicol se modifica con un único grupo modificador en un extremo que no contiene dicho grupo o grupos de bloqueo retirables, en donde dicho polietilenglicol monofuncionalmente activado contiene menos del 2% (p/p) del polietilenglicol bifuncionalmente activado.
- 45 (d) si un grupo bloqueador se añade para proteger el grupo o grupos terminales, tal y como se describe en la etapa (b) anterior, retirar dicho grupo bloqueador, en una o varias etapas, sin retirar el grupo activador unido como se describe en la etapa (c) anterior, para producir un polietilenglicol monofuncionalmente activado en donde el extremo distal o los extremos distales son grupos hidroxilo; y
- 50 (e) poner en contacto dicho polietilenglicol monofuncionalmente activado con dicho al menos un componente bioactivo, en condiciones tales que favorecen la unión covalente de dicho polietilenglicol monofuncionalmente activado con dicho componente bioactivo, o

(f) otra posibilidad sería realizar la etapa (e) antes de realizar la etapa (d).

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho grupo modificador se selecciona del grupo que consiste en un aldehído y un grupo carboxilo.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho grupo bloqueador se selecciona del grupo que consiste en un grupo tritilo, un grupo ariloxilo y un grupo *t*-butoxilo.
11. Composición farmacéutica que comprende un conjugado producido o que se puede producir por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8.
12. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho conjugado tiene una antigenicidad reducida o sustancialmente reducida en comparación con un conjugado que comprende el mismo componente bioactivo unido en el mismo sitio o sitios del componente bioactivo con el mismo número de moléculas de polietilenglicol del mismo tamaño y estructura lineal o ramificada que contiene un grupo alcoxilo en el extremo distal, si el polietilenglicol es lineal, o que contiene dos o más grupos alcoxilo en los extremos distales, si el polietilenglicol está ramificado.
13. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 11, en donde el péptido, proteína o glucoproteína se selecciona del grupo que consiste en una enzima, una proteína del suero, una glucoproteína del suero, una proteína de las células de la sangre, una proteína pigmentaria, hemoglobina, una proteína vírica, una hormona peptídica, una hormona proteica, una hormona glucoproteica, una liberina hipotalámica, una citocina, un factor de crecimiento y péptidos y proteínas y glucoproteínas que imitan o funcionan como antagonistas de alguna del grupo anterior.
14. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha proteína sérica se selecciona del grupo que consiste en una albúmina, una inmunoglobulina, un factor de la coagulación de la sangre, y péptidos y proteínas y glucoproteínas que imitan o funcionan como antagonistas de cualquiera de las proteínas anteriores del suero.
15. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el polietilenglicol monofuncionalmente activado que se utiliza en la síntesis de dicho conjugado se selecciona del grupo que consiste en hidroxipeg-monoaldehído y un éster reactivo de un hidroxipegmonoácido.
16. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el polietilenglicol monofuncionalmente activado utilizado en la síntesis se modifica a partir de un dihidroxipeg lineal.
17. Kit que comprende: la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 11.
18. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 11, para ser usada en un procedimiento para prevenir, diagnosticar o tratar un trastorno físico en un animal.
19. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en dicho uso, dicho animal es un mamífero.
20. Composición de acuerdo con la reivindicación 19, en donde en dicho uso, dicho mamífero es un humano.
21. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en dicho uso, dicho trastorno físico se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, artritis, una enfermedad infecciosa, un trastorno genético, un trastorno neurológico, un trastorno metabólico, un trastorno enzimático, una enfermedad cardiovascular e hipertensión.
22. Composición de acuerdo con la reivindicación 21, en donde en dicho uso, dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de mama, un cáncer de útero, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer de testículo, un cáncer de pulmón, una leucemia, un linfoma, un cáncer de colon, un cáncer del tubo digestivo, un cáncer de páncreas, un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de huesos, un cáncer neurológico, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de piel y otros carcinomas, sarcomas, adenomas y mielomas.
23. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en dicho uso, dicha enfermedad infecciosa se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad bacteriana, una enfermedad micótica, una enfermedad vírica y una enfermedad parasitaria.
24. Composición de acuerdo con la reivindicación 19, en donde en dicho uso, dicha enfermedad vírica se selecciona del grupo que incluye VIH/sida y hepatitis.
25. Composición de acuerdo con la reivindicación 21, en donde en dicho uso, dicho trastorno genético se selecciona del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, fibrosis quística, enfermedad de Gaucher, hemofilia y otras hemopatías heredables, enfermedad de Pompe y enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave («IDCG»).
26. Composición de acuerdo con la reivindicación 21, en donde en dicho uso, dicho trastorno neurológico se

selecciona del grupo que incluye enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple.

27. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en dicho uso, dicha administración es parenteral.
28. Composición de acuerdo con la reivindicación 27, en donde en dicho uso, dicha administración parenteral es intravenosa.
- 5 29. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en dicho uso, dicha administración es oral.
30. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en dicho uso, dicha administración es tópica.
31. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en dicho uso, dicha administración es por inhalación.
32. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en dicho uso dicha administración es rectal.
- 10 33. Utilización de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 u 11 a 16, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno físico según se define en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26.
34. Utilización de acuerdo con la reivindicación 33, definida adicionalmente por las peculiaridades de cualquiera de las reivindicaciones 19, 20, o 27 a 32.

15

Los mPEG de 4,8 kDa y 10 kDa se fijan con una fuerza 100 veces mayor que los PEG sin grupos metoxilo a los anticuerpos anti-mPEG

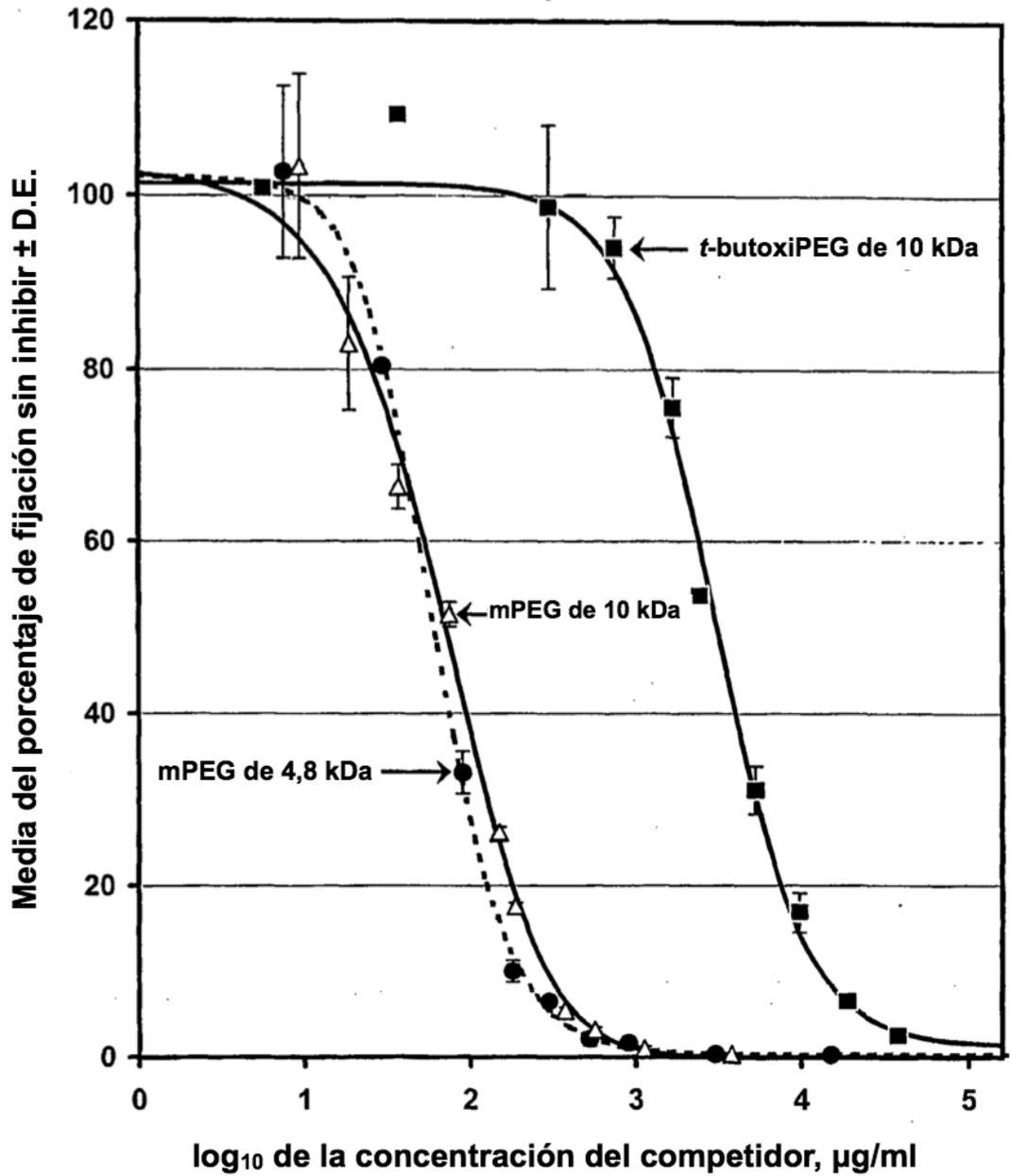


Figura 1

Fijación competitiva a los anticuerpos anti-mPEG realizada por los PEG lineales o los «PEG ramificados» (mPEG-lisinas) con 1 o 2 grupos metoxilo (Representada frente a la molaridad de grupos metoxilo)

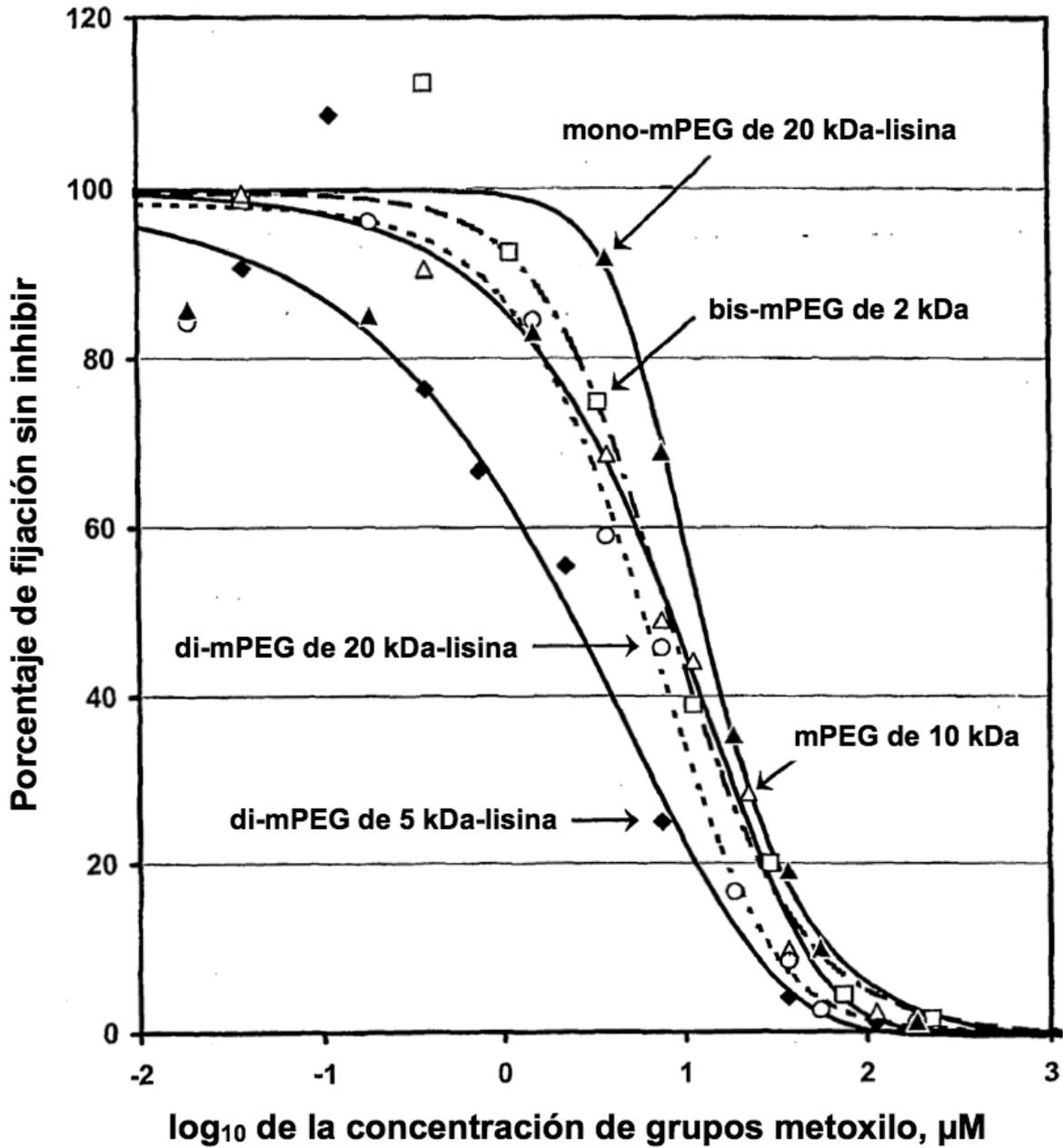


Figura 2a

Fijación competitiva a los anticuerpos anti-mPEG realizada por los PEG lineales o los «PEG ramificados» que contienen 1 o 2 grupos metoxilo

(Representada frente a la concentración en peso de PEG)

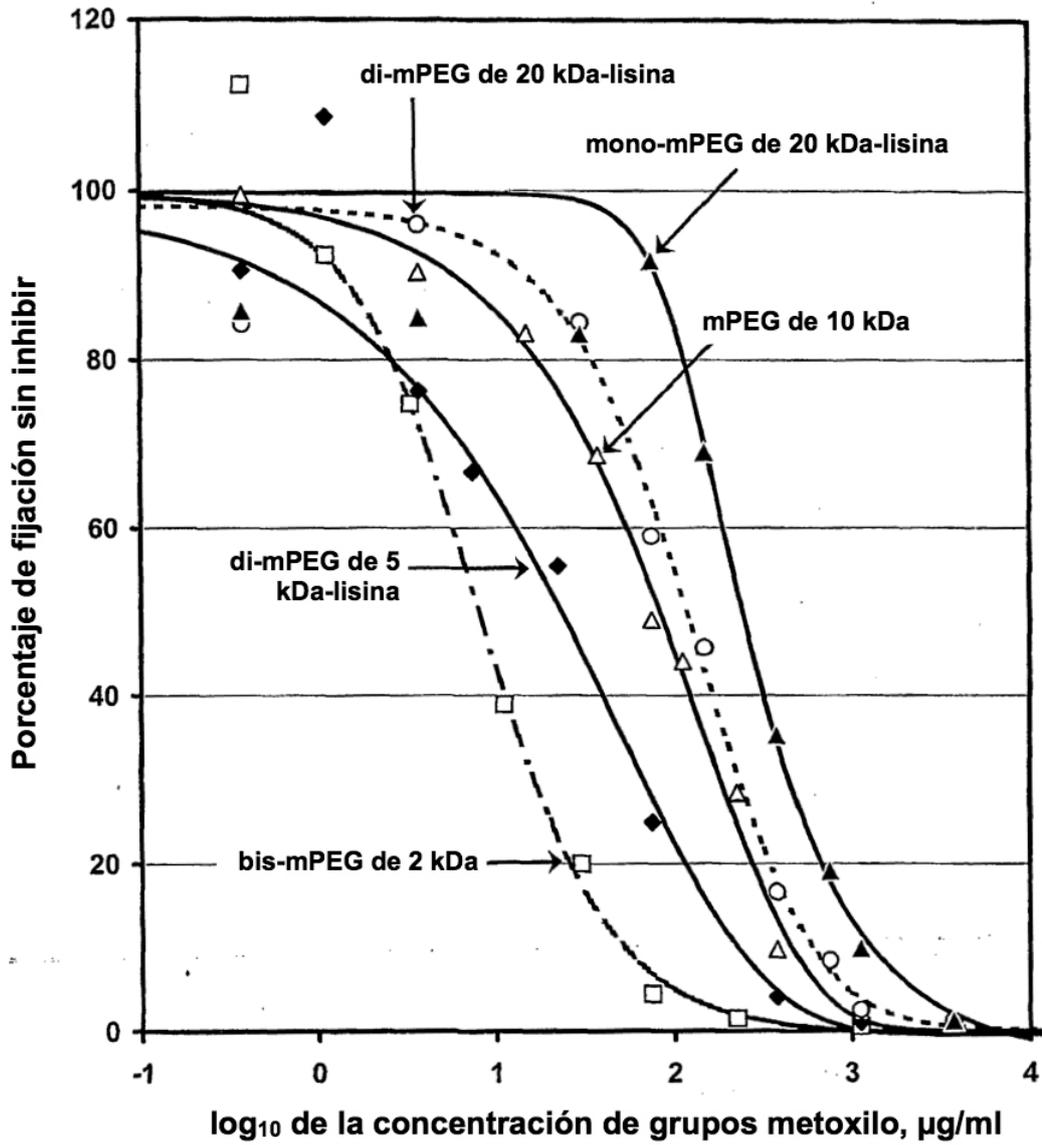


Figura 2b

**Diferencia de afinidad por los anticuerpos anti-mPEG
entre los PEG de 10 kDa que contienen 0, 1 o 2
grupos metoxilo**

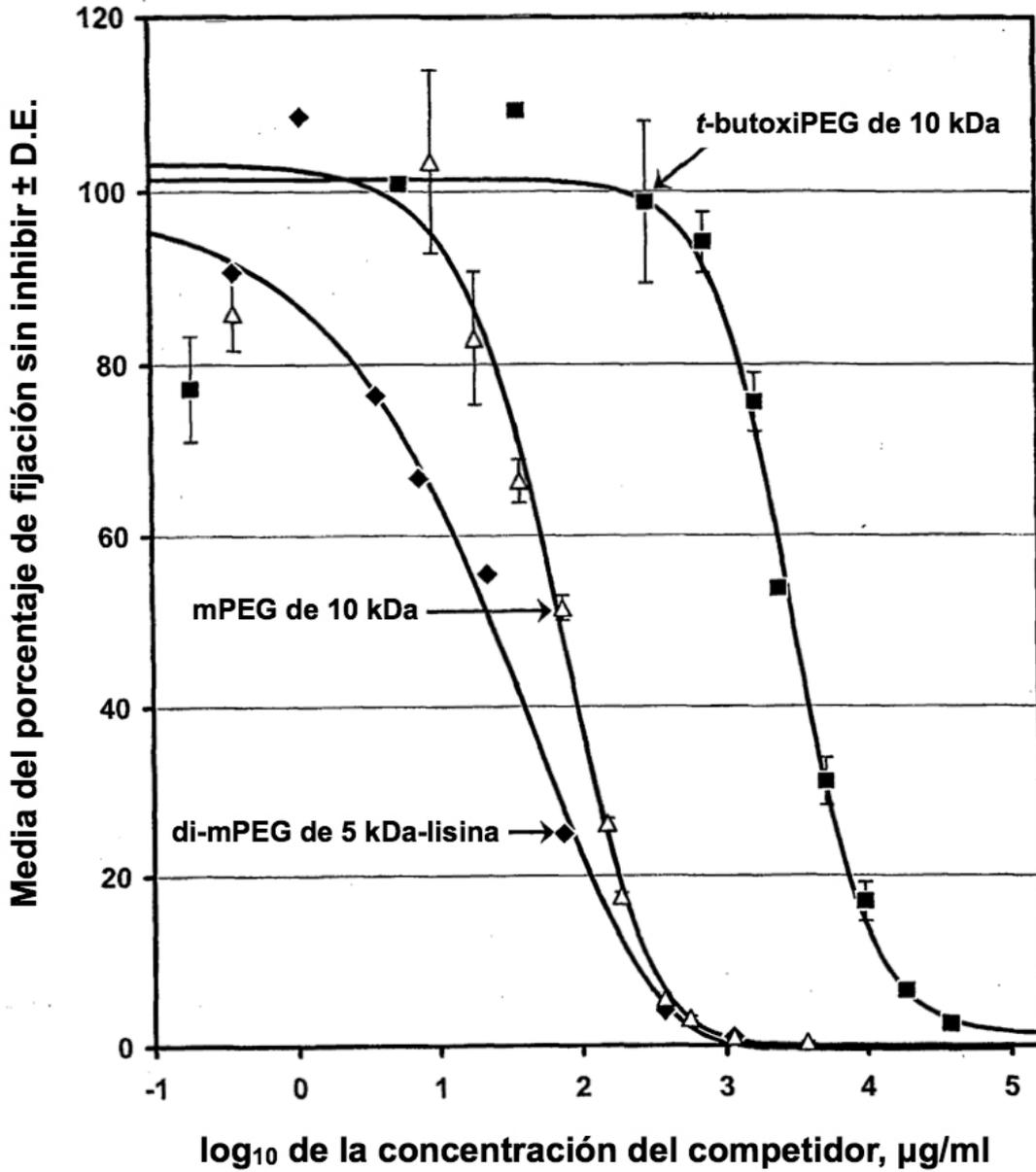


Figura 3

El mPEG se une con una fuerza 100 mayor a los anticuerpos anti-mPEG que los hidroxipEG (PharmaPEG) sin grupos alcóxilo

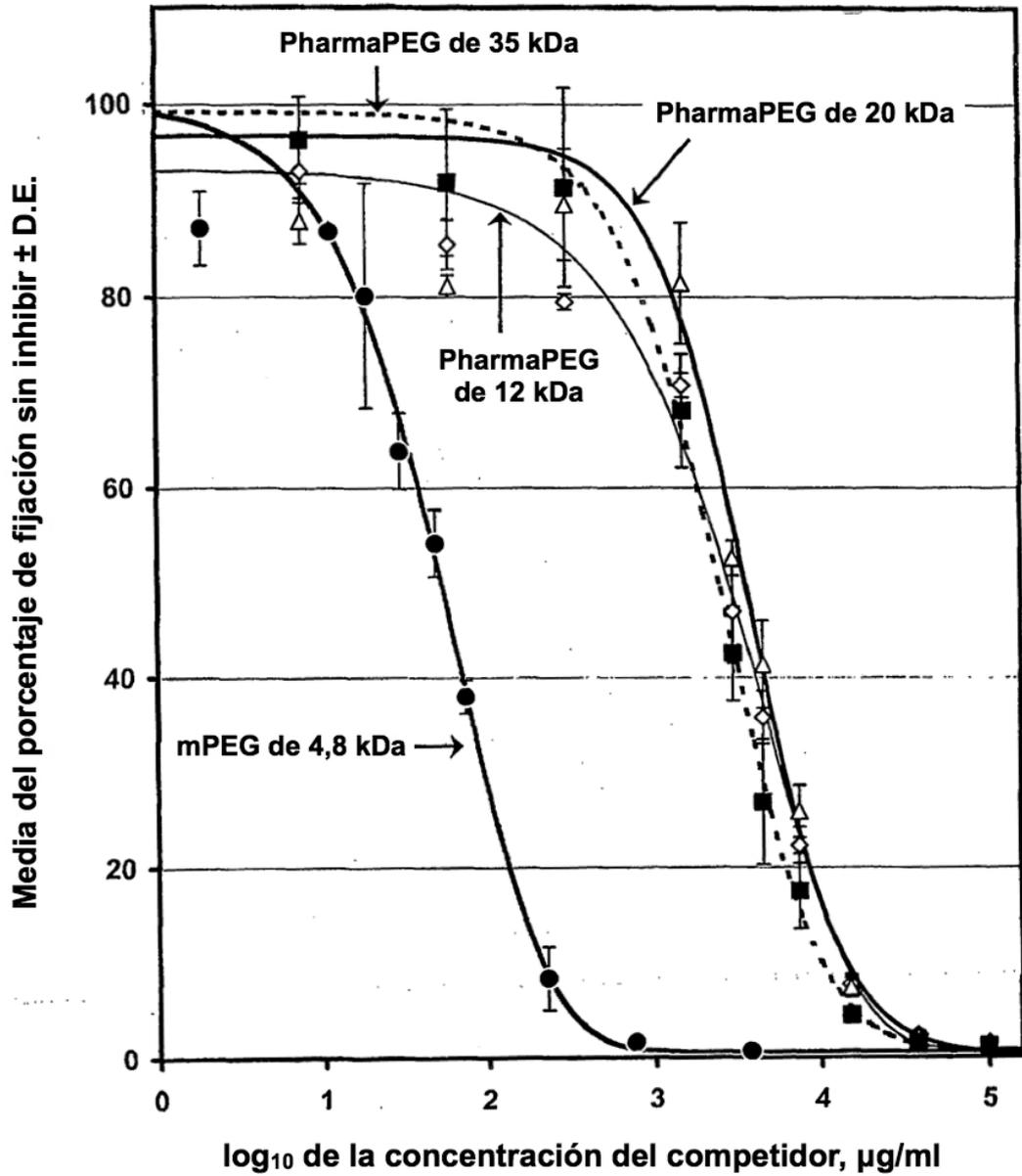
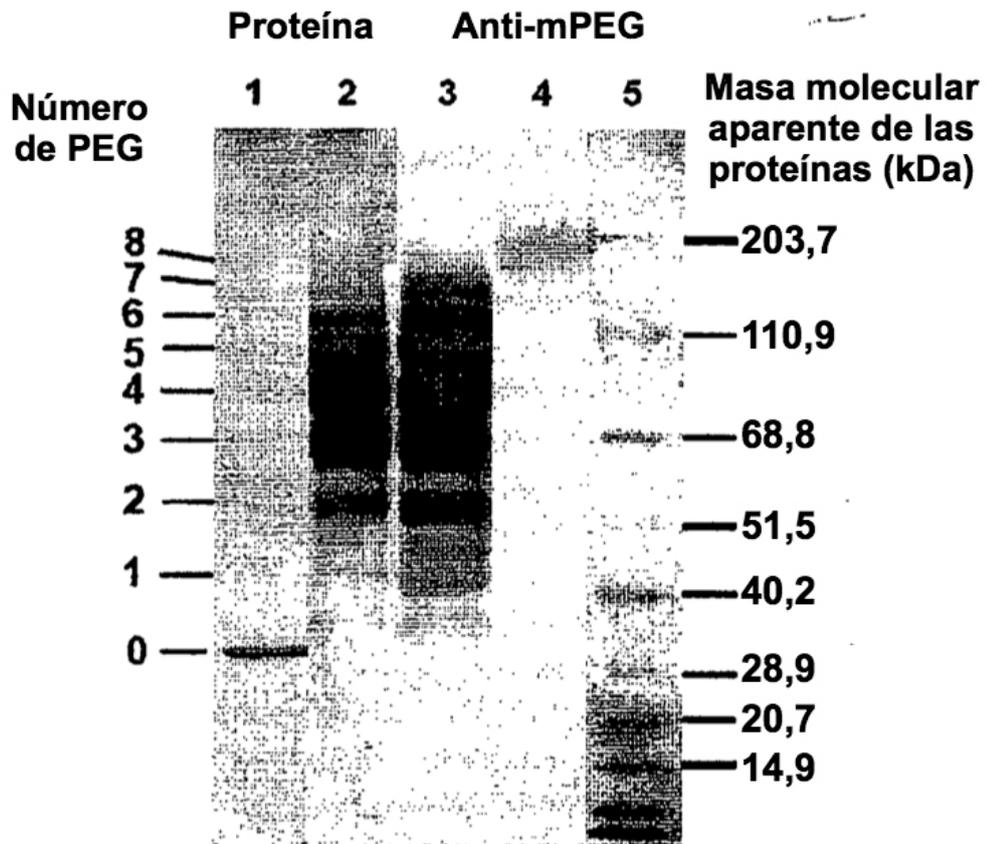


Figura 4

Detección de los conjugados mPEG-proteína en una «transferencia Western» con anticuerpos anti-mPEG



Carril 1: Anhidrasa carbónica II («CA II»)

Carril 2: Conjugados de mPEG de 5 kDa con CA II

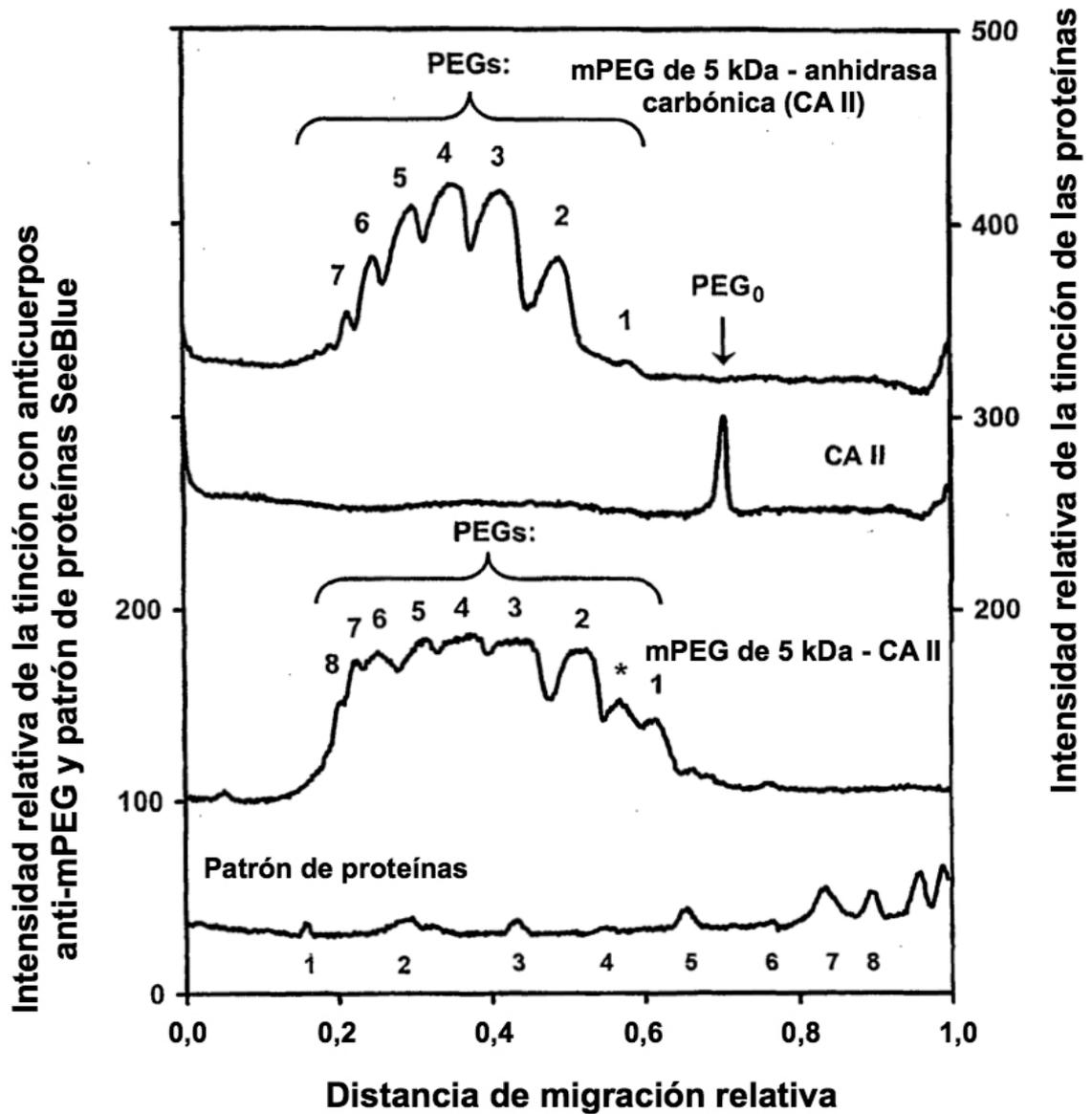
Carril 3: Conjugados de mPEG de 5 kDa con CA II

Carril 4: Anhidrasa carbónica II

Carril 5: Patrón de proteínas SeeBlue Plus 2™

Figura 5a

Intensidad relativa de las bandas teñidas en un gel de electroforesis y en una «transferencia Western» con anticuerpos anti-mPEG



*Fragmento PEGilado de CA II

Figura 5b

Anticuerpos anti-PEG y antiuricasa en el suero de los conejos inmunizados con mPEG-uricasa o PharmaPEG-uricasa

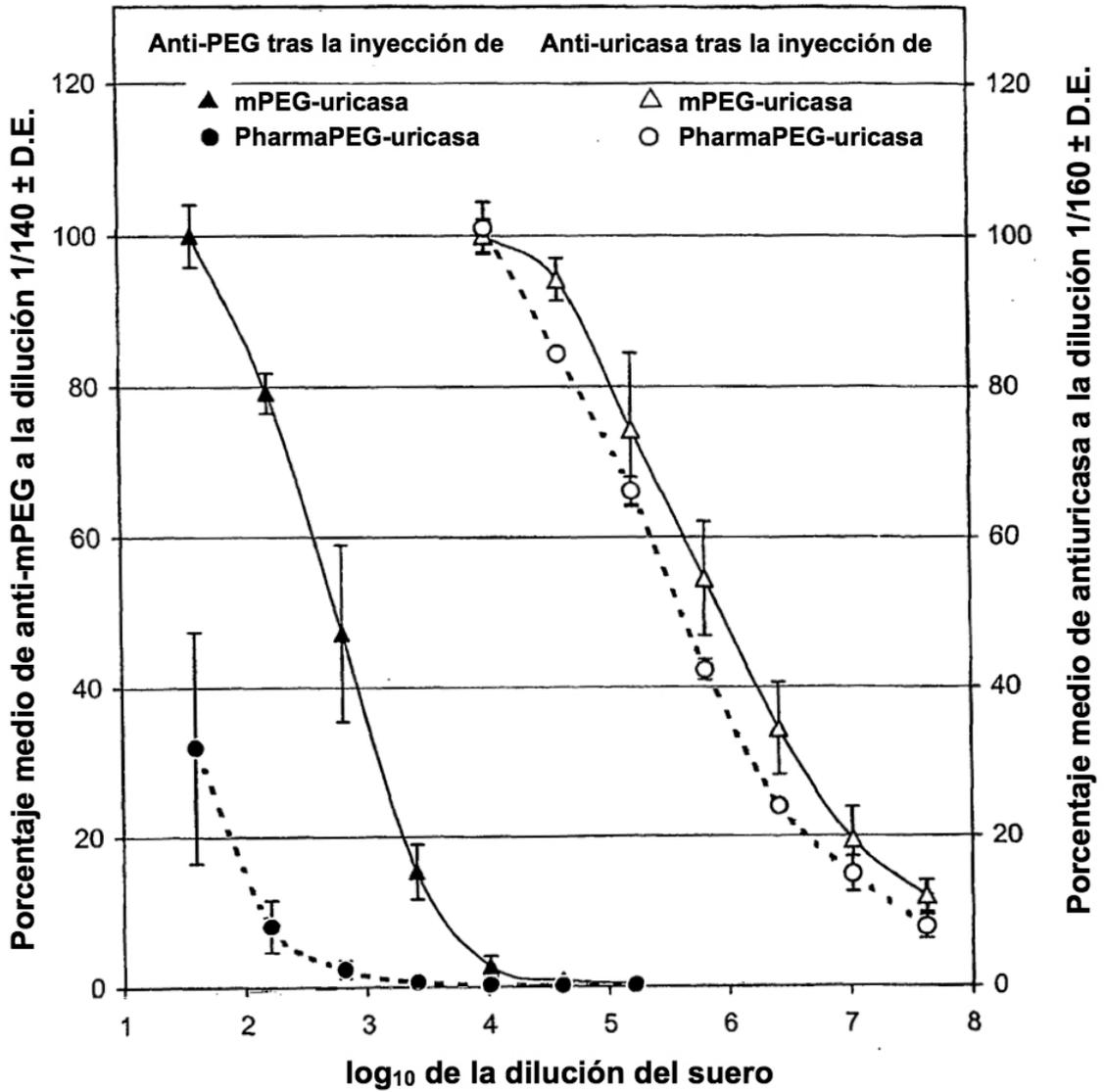


Figura 6a

Anticuerpos anti-PEG y antiuricasa en el suero de los conejos inmunizados con mPEG-uricasa o PharmaPEG-uricasa

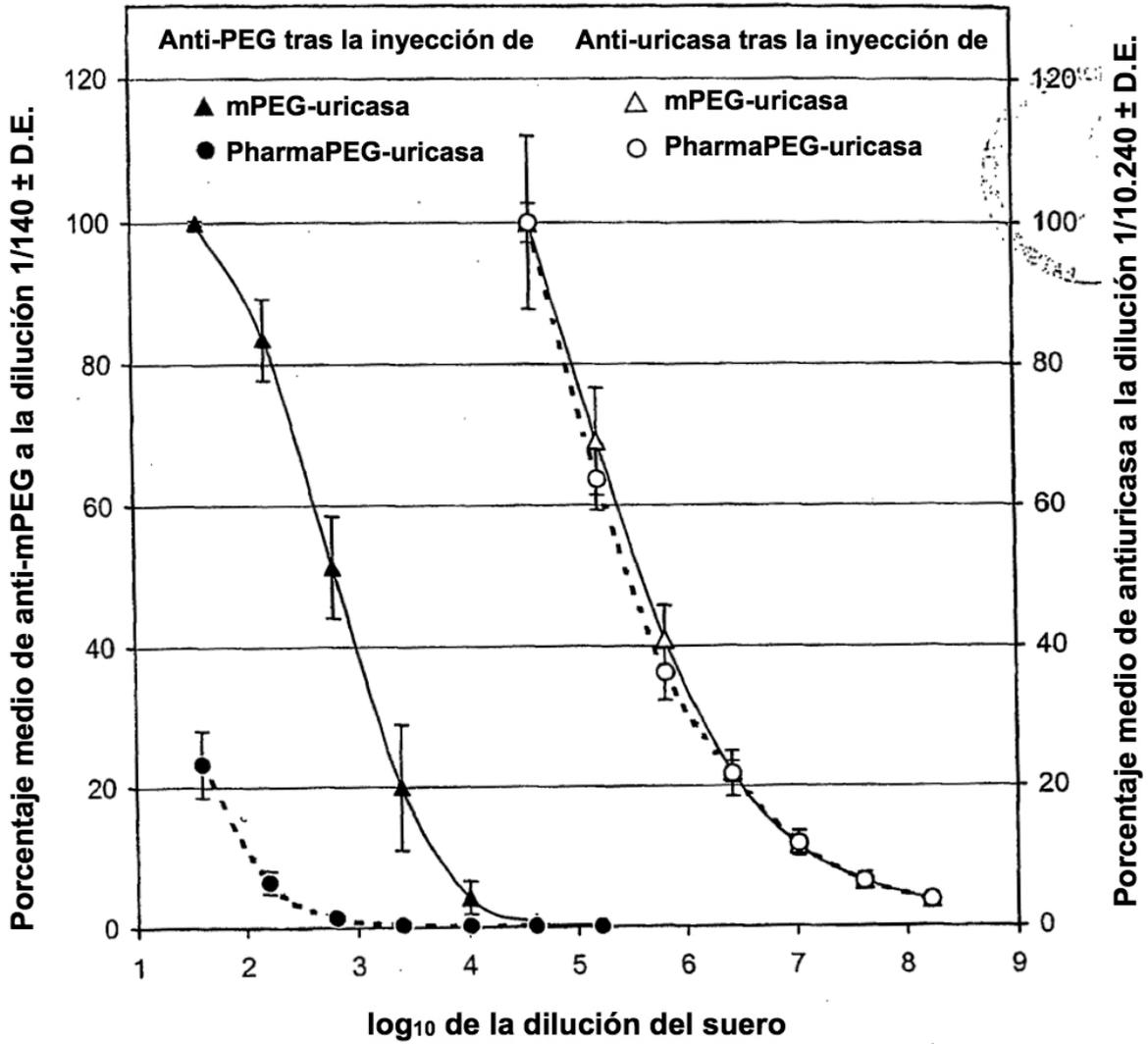


Figura 6b