

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 713**

51 Int. Cl.:

C07K 1/13 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2010 PCT/KR2010/007567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO2011053065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2010 E 10827149 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2495258**

54 Título: **Conjugados de derivado de polietilenglicol, catecol y proteína o péptido, y procedimiento de preparación de los mismos**

30 Prioridad:

29.10.2009 KR 20090103662

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

19.06.2017

73 Titular/es:

**KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY (50.0%)
373-1 Guseong-dong, Yuseong-gu
Daejeon 305-701, KR y
INNOTHERAPY INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEE, HAESHIN;
LEE, HYUKJIN;
PARK, TAE GWAN (FALLECIDO);
SONG, IN TAEK y
LEE, MOON SUE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 617 713 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 derivado de polietilenglicol, catecol y proteína o péptido, y procedimiento de preparación de los mismos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un conjugado de derivado de polietilenglicol de catecol y proteína o péptido, en el que la proteína o el péptido está mono-PEGilado en el extremo N-terminal con un derivado de polietilenglicol que tiene catecol, y a un procedimiento de preparación del mismo.

Antecedentes de la técnica

- 10 En el cuerpo humano, se expresan diversos tipos de proteínas o péptidos que participan en el crecimiento y en la diferenciación de las células. Dichas proteínas o dichos péptidos se unen a receptores en la pared de la célula para inducir la expresión de diversas moléculas de señalización, manteniendo así la homeostasis del organismo. Sin embargo, si la cantidad de dichas proteínas o dichos péptidos no se mantiene a niveles adecuados en el organismo, surgirán problemas asociados con la homeostasis debido a la falta o a la sobreexpresión de las moléculas de señalización en el organismo, provocando así diversos problemas. Por ejemplo, si el nivel de una hormona de crecimiento humano o de un factor de crecimiento epidérmico asociado con la cicatrización de las heridas es bajo, el cuerpo no crecerá o la herida no se curará bien.

- 15 R. Canfield (en el año 1962), F. Esch (en el año 1985), S. Cohen (en el año 1962) y D. Metcalf (en el año 1985) descubrieron la lisozima, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), respectivamente, que son factores proteicos que consisten en aminoácidos, y también identificaron la secuencia de aminoácidos de cada uno de los factores proteicos (R. Canfield, *J. Biol. Chem.* 238, 2698., 1963; F. Esch, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82, 6507., 1985; S. Cohen, *J. Biol. Chem.* 237, 1555., 1962; D. Metcalf, *Science* 229, 16, 1985).

- 20 Se sabe que dichos factores proteicos tienen efectos en la curación de las heridas (lisozima/bFGF/EGF) y la leucopoyesis (G-CSF), y por lo tanto, se pueden usar como agentes terapéuticos contra la úlcera del pie, que suele ocurrir en los pacientes diabéticos, o como agentes terapéuticos contra la neutropenia tras la terapia contra el cáncer.

- 25 Sin embargo, se sabe que dichas proteínas tienen una semivida corta en la sangre y el tejido. Así pues, cuando estas proteínas se administran con fines terapéuticos, existe el grave problema de que su potencia y estabilidad *in vivo* sean significativamente bajas.

- 30 Para resolver dichos problemas, en los últimos 10 años, se ha intentado de forma continua conjugar el polímero biocompatible polietilenglicol (PEG) con proteínas o péptidos (G. Pasut y F. M. Veronese *Prog. Polym. Sci.* 32, 933, 2007; F. M. Veronese, *Biomaterials* 22, 405.2001; P. Bailon, *Pharm. Sci. Tech. Today* 1, 352, 1998).

- 35 El polietilenglicol (PEG) es un polímero altamente biocompatible que no provoca una respuesta inmune *in vivo* y es uno de los polímeros sintéticos aprobados por la FDA estadounidense. Este polímero sintético se puede usar para los conjugados de proteína-polietilenglicol que tienen mayores pesos moleculares. Por lo tanto, estos conjugados pueden evitar que la proteína sea eliminada mediante el proceso de filtración en los riñones. Además, estos conjugados presentan el efecto de inhibir la degradación de las proteínas enzimáticas *in vivo* a través del efecto sigiloso del polietilenglicol, aumentando así la semivida y la estabilidad *in vivo* de la proteína. Los ejemplos de proteínas que tienen mayor potencia, obtenidas usando este procedimiento, incluyen la hormona humana del crecimiento, la eritropoyetina, el interferón, la insulina, la interleucina, la calcitonina, etc.

- 40 No obstante, cuando se usa polietilenglicol para aumentar la estabilidad y la semivida *in vivo* de un fármaco de proteína, existe el problema de que el polietilenglicol reacciona con una pluralidad de sitios de unión del fármaco de proteína, produciéndose, de este modo, una mezcla heterogénea de especies multi-PEGiladas. En particular, la mezcla heterogénea de especies multi-PEGiladas causa muchos problemas en la determinación de la semivida y la estabilidad *in vivo* de los fármacos.

- 45 Entretanto, incluso cuando el conjugado mono-PEGilado que contiene una molécula de polietilenglicol unida al mismo se prepara en condiciones estrictamente controladas, se da el problema de que la actividad biológica o *in vivo* del fármaco se ve influenciada de manera significativa por el sitio de unión del mismo. Para resolver este problema, ha habido un intento de conjugar PEG con el extremo N-terminal de las proteínas o de los péptidos, ya que los sitios activos de la mayoría de las proteínas terapéuticas (EPO, G-CSF, hormona de crecimiento, etc.) no se encuentran adyacentes al extremo N-terminal. En concreto, esto se debe a que la PEGilación N-terminal es una técnica capaz de minimizar la reducción de la activación de la proteína, lo que es el defecto más importante de la PEGilación.

- 50 Por lo tanto, para realizar la mono-PEGilación específica de sitio N-terminal como se ha descrito anteriormente, ha habido diversos intentos de conjugar de forma específica del sitio mono-polietilenglicol (mono-PEG) con la amina

primaria del grupo amina N-terminal de proteínas o péptidos.

5 Los polietilenglicoles usados en estos intentos anteriores eran derivados de metoxipolietilenglicol que tenían unidos a un extremo N-hidroxisuccinimida o propionato de N-succinimidilo que reacciona específicamente con la amina primaria (T. H. Kim, "Biomateriales", 23, 2311, 2002; H Lee, *Pharm. Res.*, 19, 845, 2002). Se sabe que los conjugados mono-PEGilados preparados usando derivados de succinimida-polietilenglicol tienen un cambio muy pequeño en la actividad *in vivo*, pero la N-hidroxisuccinimida o el propionato de N-succinimidilo se hidrolizan rápidamente durante la conjugación con proteínas o péptidos, dificultando la preparación de conjugados de proteína o de péptido, lo que reduce el rendimiento de la preparación de los conjugados de proteína o de péptido.

10 En otro intento de usar la mutación de proteínas específica del sitio (mutación simple), se ha intentado la tecnología de la realización de la PEGilación mediante la introducción de más del 95 % de cisteína en el extremo N-terminal de fármacos de proteína (péptido). Sin embargo, esta tecnología tiene el problema de que, debido a que los fármacos de proteínas se modifican químicamente, la bioactividad de los fármacos se reduce debido a la modificación.

15 Además, se intentó la PEGilación específica del extremo N-terminal empleando aldehído-PEG. Es un procedimiento aplicado para la producción de Neulasta® (Amgen Inc.). Sin embargo, las condiciones de reacción de esta tecnología deben limitarse a las condiciones ácidas (pH 4-6, normalmente pH 5,0-5,5), y también se debe usar el agente reductor NaBH₄. Por lo tanto, la aplicación de dicha tecnología es limitada debido a dichas condiciones de reacción limitadas.

20 El documento US 6 506 730 describe una composición farmacéutica para la administración a través de la mucosa nasal de un conjugado de polímero biocompatible-péptido biológicamente activo. El polietilenglicol es un polímero preferido. Se sugiere activar el polímero con fosgeno e hidroxisuccinimida.

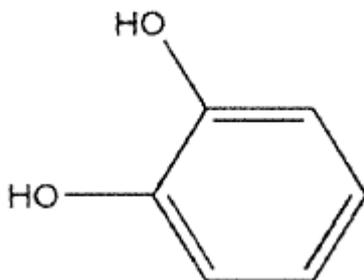
25 Por consiguiente, los presentes inventores han encontrado que, si se prepara un conjugado de una proteína o un péptido con un derivado de PEG que tiene un compuesto que contiene un catecol unido al mismo, un procedimiento de preparación del conjugado será sencillo, el producto resultante tendrá una fuerte resistencia a la hidrólisis, y se puede producir un conjugado que comprenda una proteína o un péptido mono-PEGilado con especificidad de sitio en el grupo primario N-terminal con alto rendimiento, completándose así la presente invención.

Divulgación de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un conjugado de una proteína o un péptido con un derivado de polietilenglicol, en el que la proteína o el péptido está mono-PEGilado en el grupo amina N-terminal con el derivado de polietilenglicol, y un procedimiento de preparación del conjugado.

30 Para lograr el objeto anterior, la presente invención incluye el uso de un derivado de polietilenglicol que tiene un compuesto que contiene un catecol unido al mismo, y proporciona un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol que tiene unido al mismo un compuesto que contiene un catecol de la siguiente fórmula 1, en el que la proteína o el péptido está mono-PEGilado en el grupo amina N-terminal con el catecol del derivado de polietilenglicol:

35 [Fórmula 1]



Por otra parte, se proporciona un procedimiento de preparación de dicho conjugado de polietilenglicol, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 40 (a) disolver la proteína o el péptido en un reactor;
 (b) disolver el derivado de polietilenglicol en otro reactor; y
 (c) añadir a y hacer reaccionar con la solución de la etapa (b) la solución de la etapa (a).

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es un esquema de la reacción de metoxipolietilenglicol con ácido 3,4-dihidroxicinámico.

La FIG. 2 es la secuencia de aminoácidos de un péptido bisagra-3.

La FIG. 3 muestra los resultados de HPLC de fase inversa de una mezcla de mPEG-CT con bisagra-3.

La FIG. 4 muestra los resultados de MALDI-TOF de una mezcla de mPEG-CT con bisagra-3.

La FIG. 5 es un diagrama esquemático que muestra los candidatos de PEGilación presentes en bisagra-3.

La FIG. 6 es un diagrama que muestra los resultados de HPLC de fase inversa para productos de digestión trípica de PEG-bisagra-3. En la FIG. 6, el pico del minuto 13 en la línea roja: fragmento T1; el pico del minuto 12 en la línea roja: el resultado de la dilución insuficiente; y el pico del minuto 23,4 en la línea roja: fragmentos PEGilados.

La FIG. 7 es un diagrama que muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF de fragmentos tríplicos de PEG-bisagra-3. En la FIG. 7, apareció un pico en mPEG (PM: 5.000) o mPEG más T1 (PM: 5.883).

La FIG. 8 es un diagrama que muestra la configuración de la unión entre un grupo catecol y succinato de succinimidilo.

La FIG. 9 muestra los resultados de SDS-PAGE de succinato de succinimidilo-PEG-lisozima (carril 3) y catecol-PEG-lisozima (carril 4). En la FIG. 9, el catecol-PEG-lisozima mono-PEGilado presenta una sola banda.

La FIG. 10 muestra los resultados de SDS-PAGE para succinato de succinimidilo-PEG-bFGF (carril 2) y catecol-PEG-bFGF (carril 3) (FIG. 10A), resultados de MALDI-TOF para los productos de la digestión trípica de bFGF (PM: 2.495; FIG. 10B) y los resultados de MALDI-TOF para los productos de la digestión trípica de catecol-PEG-bFGF (PM: 7.468; FIG. 10C).

La FIG. 11 muestra los resultados de SDS-PAGE de succinato de succinimidilo-PEG-G-CSF (carril 2) y catecol-PEG-G-CSF (carril 3) (Fig. 11A), resultados de MALDI-TOF para productos de la digestión trípica de G-CSF (PM: 1.792; FIG. 11B) y resultados de MALDI-TOF para los productos de la digestión trípica de catecol-PEG-G-CSF (PM: 6.792; FIG. 11C).

La FIG. 12 es un conjunto de fotografías de gel de SDS-PAGE que muestran los resultados de la adición de NaIO_4 en proporciones de 0:1, 0,5:1, 1:1, 1,5:1 y 2:1 con respecto al catecol a pH 6,0 durante la reacción de PEGilación de proteína lisozima.

La FIG. 13 es un diagrama que muestra los valores relativos del rendimiento de la PEGilación cuando se añade NaIO_4 en proporciones de 0:1, 0,5:1, 1:1, 1,5:1 y 2:1 con respecto al catecol a pH 6,0 durante la reacción de PEGilación de la proteína lisozima.

La FIG. 14 muestra los resultados de SDS-PAGE de una mezcla resultante de la reacción de mPEG-CT con EPO (carril 2; dos bandas) y de mPEG-CT-EPO (PEG-EPO; carril 3; una banda) purificada usando un sistema de FPLC.

La FIG. 15 es un diagrama que muestra los resultados de HPLC de fase inversa. En la FIG. 15, los picos de la línea negra indican mPEG-CT-EPO (98 minutos) y una mezcla de EPO (140 minutos), y los picos de la línea roja indican mono-PEG (105 minutos), di-PEG (98 minutos) y multi-PEG (85 minutos).

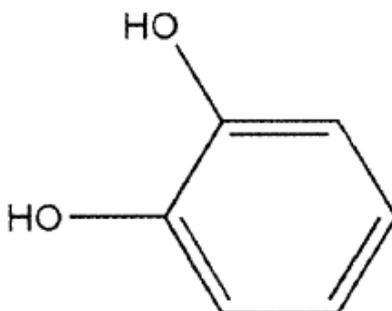
La FIG. 16 es un diagrama que muestra las semividas *in vivo* de mono-PEG-EPO, multi-PEG-EPO y EPO.

La FIG. 17 es un diagrama que muestra los resultados de la medición de la proporción de hematocrito de mono-PEG-EPO y EPO.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención incluye el uso de un derivado de polietilenglicol que tiene unido al mismo un compuesto que contiene un catecol de la siguiente fórmula 1, y proporciona un conjugado de una proteína o un péptido con el derivado de polietilenglicol, en el que la proteína o el péptido está mono-PEGilado con especificidad de sitio en el grupo amina N-terminal con el catecol del derivado de polietilenglicol:

[Fórmula 1]



Los presentes inventores han realizado estudios para resolver los problemas descritos anteriormente que se producen en la técnica anterior y, como resultado de ello, han descubierto un grupo funcional que se une específicamente al grupo amina N-terminal de las proteínas, en el que el grupo funcional que es un grupo 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina grupo (DOPA) se conoce como un aminoácido que está contenido abundantemente en la proteína adhesiva de mejillón. En estudios sobre la dopamina o el catecol, un trabajo de investigación preparado por los presentes inventores demostró que un grupo catecol puede ser adsorbido a diversas superficies y también que

las proteínas se pueden usar para recubrir diversas superficies usando esta adhesión (H. Lee, PNAS, 103, 12999, 2006; H. Lee, *Science*, 318, 426, 2007; H. Lee, *Adv. Mater.* 21,431, 2009).

Por lo tanto, en la presente invención, se usan derivados de polietilenglicol reactivos obtenidos mediante la unión de un compuesto que contiene un catecol con polietilenglicol. Dichos derivados de polietilenglicol se pueden unir selectivamente al grupo amina N-terminal de las proteínas o de los péptidos, formándose así conjugados, y en este caso, las proteínas o los péptidos se pueden mono-PEGilar con especificidad de sitio en el extremo N-terminal con los derivados de polietilenglicol, preparándose de este modo formulaciones de proteína o péptido que tienen mayores semivida y estabilidad *in vivo*, a la vez que se mantiene la actividad fisiológica de las proteínas o de los péptidos. También, usando el grupo catecol, que es muy estable frente a la hidrólisis que se produce cuando se usan derivados de proteínas o péptidos, se puede mantener la eficacia de la reacción durante un largo período de tiempo.

Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende englobar cualquiera de las formas de polietilenglicol (PEG). La definición del mismo también incluye derivados tales como el aldehído de metoxipolietilenglicol como se describe a continuación.

El polietilenglicol que se usa en la presente invención es preferentemente uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en, pero sin limitación, aldehído de metoxipolietilenglicol, succinimidilpropionato de polietilenglicol, succinimidilbutanoato de metoxipolietilenglicol, succinimidilsuccinato de metoxipolietilenglicol, benzotriazolcarbonato de metoxipolietilenglicol, epóxido de metoxipolietilenglicol, carbonilimidazol de metoxipolietilenglicol, *p*-nitrofenilcarbonato de metoxipolietilenglicol, isocianato de metoxipolietilenglicol, amina de metoxipolietilenglicol que contiene amina primaria, hidrazida de metoxipolietilenglicol y metoxicarboxil-polietilenglicol que contiene grupos carboxilo. Debido a que dicho polietilenglicol puede reaccionar con una amina o un grupo carboxilo, se puede unir a un grupo catecol para formar un derivado.

Además, el polietilenglicol que se usa en la presente invención puede tener cualquier forma seleccionada entre forma lineal, ramificada, de cepillo y estrellada.

El compuesto que contiene un catecol que se usa en la presente invención es preferentemente uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en, pero sin limitación, 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina que contiene grupos carboxilo y amina, 3-hidroxi-tiramina que contiene grupos amina, ácido 3,4-dihidroxi-hidrocinnámico que contiene grupos carboxilo, 3,4-dihidroxibenzaldehído que contiene grupos aldehído y norepinefrina. Además, el compuesto que contiene un catecol tiene preferentemente un peso molecular de 1.000 o inferior.

El derivado de polietilenglicol usado en la presente invención tiene preferentemente un peso molecular de 500 a 100.000, y más preferentemente de 2.000 a 40.000. Esto se debe a que es difícil obtener un derivado de polietilenglicol que tenga un peso molecular superior a 100.000, y un derivado de polietilenglicol que tenga un peso molecular inferior a 500 está presente en un estado líquido, y por lo tanto, tiene malas propiedades físicas que conducen a una baja eficiencia de la reacción.

Si el derivado de polietilenglicol está conjugado a una proteína, se puede obtener un conjugado de proteína-derivado de polietilenglicol que tenga un mayor peso molecular, y este conjugado puede evitar que la proteína sea eliminada por el proceso de filtración en los riñones. Además, el conjugado presenta el efecto de inhibir la degradación de la proteína enzimática *in vivo* a través del efecto de sigilo del polietilenglicol, aumentando así la semivida y la estabilidad *in vivo* de la proteína.

En la presente invención, debido a que el conjugado de proteína o péptido-derivado de polietilenglicol se prepara mediante la mono-PEGilación específica de sitio de la proteína o del péptido como se ha descrito anteriormente, se puede prevenir el problema como la producción de un conjugado heterogéneo. Por lo tanto, cuando se mide la duración de la eficacia y de la estabilidad de un fármaco de proteína o péptido de la presente invención, se pueden obtener datos fiables. También, usando la presente invención, se puede preparar fácilmente un fármaco que tiene actividad biológica *in vivo* deseada. Además, debido a que el conjugado de la presente invención se prepara a través de PEGilación específica del extremo N-terminal, se puede aumentar al máximo el efecto farmacológico del fármaco de proteína sin modificar químicamente el fármaco de proteína.

La proteína que se usa en la presente invención puede ser una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en, pero sin limitación, lisozima, hormona de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormona de crecimiento humana (hGH), interferón (IFN), interleucina-2 (IL-2), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), urato oxidasa de mamífero (uricasa), y arginina desiminasa (ADI). En el presente documento, se pueden producir proteínas tales como la lisozima, bFGF, EGF y GCSF usando técnicas recombinantes de genes, ya sea mediante la extracción de estas proteínas de mamíferos o la clonación de estas proteínas en vectores de ADN y luego la expresión de estas proteínas en un huésped procarionta o eucariota. En el presente documento, los ejemplos del huésped procarionta incluyen *Escherichia coli*, los ejemplos del huésped eucariota incluyen *Hanesnula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc., y los mamíferos incluyen ratones, perros y cerdos.

El péptido que se usa en la presente invención puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en, pero sin limitación, bisagra-7, bisagra-3, buforina, histonina, protegrina, indolicidina, histatina, BIP, magainina 2, péptido de tipo glucagón (GLP-1), agonista de GNRH/LHRH, análogos de somatostatina, péptido inmunorregulador glatirámico, calcitonina de salmón, desmopresina, péptidos inhibidores de la coagulación de plaquetas, eptifibatida y el inhibidor de la fusión del VIH enfuvirtida.

El procedimiento de preparación de un derivado de polietilenglicol que tiene unido al mismo un compuesto que contiene un catecol de fórmula 1 puede comprender las etapas de:

- (a) disolver polietilenglicol en un disolvente orgánico polar en un reactor;
- (b) disolver un agente de reticulación y un compuesto que contiene un catecol de fórmula 1 en un disolvente orgánico polar en otro reactor;
- (c) añadir a y hacer reaccionar con la solución de la etapa (b) *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA); y
- (d) añadir a y hacer reaccionar con la solución de la etapa (a) la solución de la etapa (c).

El derivado de polietilenglicol preparado de acuerdo con el procedimiento anterior se caracteriza en que se puede mono-conjugar (mono-PÉGilar) con el grupo amina N-terminal de las proteínas o los péptidos.

De aquí en adelante, se describirá en detalle cada etapa del procedimiento de preparación anterior.

Las etapas (a) y (b) del procedimiento de preparación anterior son etapas de preparación de soluciones de materiales de reacción. En las etapas (a) y (b), se puede usar un disolvente orgánico polar para disolver los materiales de reacción. Los ejemplos preferidos de un disolvente orgánico polar que se pueden usar en la presente invención incluyen alcohol, sulfóxido de dimetilo (DMSO), dimetilformaldehído (DMF), acetona y *N*-metilpirrolidona (NMP). De estos disolventes, el más preferido es la DMF, porque la DMF puede evitar la oxidación de un grupo catecol.

El agente de reticulación que se añade al compuesto que contiene un catecol puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en hexafluorofosfato de benzotriazoliloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP), hidroxibenzotriazol (HOBt), clorhidrato de etil-(*N,N'*-dimetilamino)propilcarbodiimida (EDC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y cianoborohidruro de sodio. Un ejemplo preferido del agente de reticulación que se usa para la unión de un grupo amina con un grupo carboxilo puede ser una combinación de HOBt y BOP, una combinación de EDC y NHS, y una combinación de DCC y NHS. Un ejemplo preferido del agente de reticulación que se usa para la unión de un grupo amina con un grupo aldehído puede ser cianoborohidruro de sodio.

Por ejemplo, el BOP y el HOBt son agentes de reticulación de orden cero. En la realización más preferida, la relación molar de BOP:HOBt:compuesto que contiene un catecol (derivado de polietilenglicol) varía preferentemente de 1:1:1 a 10:10:1. Si la relación molar está fuera de este intervalo, se puede reducir la reactividad entre los materiales de reacción.

La etapa (c) del procedimiento de preparación anterior es una etapa de adición de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) a la solución que contiene catecol de la etapa (b) y de dejar que la mezcla reaccione. En la etapa (c), preferentemente, la DIPEA se añade como una base orgánica a la solución que contiene catecol, y después se deja reaccionar durante aproximadamente 10 a 20 minutos.

La etapa (d) del procedimiento de preparación anterior es una etapa de adición de la solución de la etapa (c) a la solución de la etapa (a) y de dejar que la mezcla reaccione. La reacción de la etapa (d) se lleva a cabo preferentemente a temperatura ambiente durante aproximadamente 10-14 horas. En un ejemplo, se demostró que el metoxipolietilenglicol y el compuesto que contiene un catecol se unieron entre sí en la etapa (d), formando de este modo un derivado de polietilenglicol.

Además, el procedimiento de preparación anterior puede comprender además la etapa (e) de dializar la solución de la etapa (d). La etapa (e) del procedimiento de preparación anterior es una etapa de diálisis de la solución de la etapa (d) para eliminar el material sin reaccionar, una vez finalizada la reacción. La diálisis se lleva a cabo preferentemente durante 10-14 horas usando una membrana de diálisis que tiene un peso molecular de corte de 2.000 a 10.000.

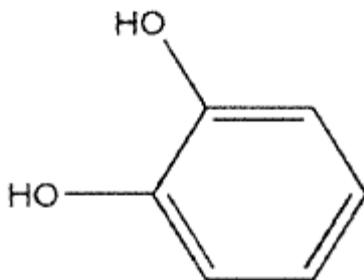
En el presente documento, como solución de diálisis, preferentemente, se usa agua destilada que tiene un pH de 1-6. Si el pH de la solución de diálisis está fuera de este intervalo, se puede producir indeseablemente la oxidación del catecol.

Además, el procedimiento de preparación anterior puede comprender además la etapa (f) de liofilización de la solución dializada de la etapa (e). La etapa (f) del procedimiento de preparación anterior es una etapa de liofilización de la solución dializada para obtener un derivado de polietilenglicol en forma de un polvo blanco. La etapa (f) se puede llevar a cabo mediante un procedimiento de liofilización conocido por el experto habitual. A través de la etapa (f), se sublima el disolvente, obteniéndose de este modo un derivado de polietilenglicol como un polvo blanco. Además, también se puede llevar a cabo el secado adicional para eliminar completamente el disolvente.

La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol que tiene unido al mismo un compuesto que contiene un catecol de la siguiente fórmula 1, en el que la proteína o el péptido está mono-PEGilado en el grupo amina N-terminal con el catecol del derivado de polietilenglicol:

5

[Fórmula 1]



comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) disolver el polímero o el péptido en un reactor;
 (b) disolver el derivado de polietilenglicol en otro reactor; y
 (c) añadir a y hacer reaccionar con la solución de la etapa (b) la solución de la etapa (a).

10

De aquí en adelante, se describirá en detalle cada uno de los procedimientos de preparación del conjugado de proteína o péptido-derivado de polietilenglicol de acuerdo con la presente invención.

15

La etapa (a) del procedimiento de preparación del conjugado de acuerdo con la presente invención es una etapa de disolución de la proteína o del péptido, que tiene un grupo amina N-terminal, en el reactor. Preferentemente, la proteína o el péptido se pueden disolver en un tampón en el reactor. El tampón que se usa en la etapa (a) puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en solución salina tamponada con fosfato, tampón de imidazol, tampón de trimetilamina, tampón trietanolamina, tampón de dietilbarbiturato de sodio, tampón de bicina y tampón de aminometilpropanodiol. Además, el pH de la solución tampón es preferentemente de 5,5 a 10. Si el pH del tampón es inferior a 5,5, se reducirá la reactividad de la proteína o del péptido, y si el pH es superior a 10, se reducirá la estabilidad del fármaco de proteína o de péptido.

20

La etapa (b) del procedimiento de preparación del conjugado de acuerdo con la presente invención es una etapa de disolución del derivado de polietilenglicol, proporcionada de acuerdo con la presente invención, en otro reactor. Preferentemente, el derivado de propilenglicol se puede disolver en el mismo tampón que se usa en la etapa (a).

25

La etapa (c) del procedimiento de preparación del conjugado de acuerdo con la presente invención es una etapa de adición de la solución de la etapa (a) a la solución de la etapa (b) y de someter la mezcla de solución a una reacción de PEGilación. La reacción de PEGilación se lleva a cabo preferentemente a 4-35 °C durante 2 a 100 horas.

30

En la etapa (c), también se puede usar un agente de oxidación para aumentar la actividad del derivado de polietilenglicol. El agente de oxidación que se usa en la presente invención puede ser uno o más seleccionado del grupo que consiste en NaIO_4 , MnCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , KMnO_4 , H_2O_2 , $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y Na_3VO_4 . El agente de oxidación se puede añadir durante la disolución del derivado de polietilenglicol. El agente de oxidación se usa preferentemente en una relación molar de 1:1 a 1:10 con respecto al derivado de polietilenglicol. En la realización más preferida, el NaIO_4 se puede añadir en una relación molar de 1,5:1 con respecto al grupo catecol. Si el tiempo de reacción de PEGilación es inferior a 2 horas, la eficacia de conjugación del polietilenglicol se reducirá, y si el tiempo de reacción es superior a 100 horas, se reducirá la estabilidad de la proteína o del péptido. Además, si la temperatura de reacción es inferior a 4 °C, la velocidad de reacción será demasiado baja, y si la temperatura de reacción es superior a 35 °C, la proteína o el péptido se modificarán.

35

40

En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento de preparación del conjugado de acuerdo con la presente invención puede comprender además, tras la etapa (c), la etapa (d) de dializar la solución de la etapa (c) y luego separar el conjugado de la solución dializada. La etapa (d) del procedimiento de preparación del conjugado de acuerdo con la presente invención es una etapa de bien dializar la solución para eliminar el material sin reaccionar o de separar el conjugado a través de cromatografía en fase líquida (HPLC o FPLC), una vez finalizada la reacción de PEGilación. La etapa (d) se puede llevar a cabo usando un procedimiento de diálisis convencional o el procedimiento de cromatografía en fase líquida conocido para los expertos habituales en la materia.

45

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Será evidente para el experto habitual en la materia que estos ejemplos tienen fines meramente ilustrativos, y no se han de interpretar como limitantes del alcance de la presente invención.

5 **Ejemplo 1: Síntesis de derivado de polietilenglicol (PEG) que tiene catecol**

Para sintetizar un derivado de polietilenglicol (PEG) que tiene un compuesto que contiene un catecol unido al mismo, se usó metoxipolietilenglicol como PEG, y se usó ácido 3,4-dihidroxicinámico como el compuesto que contiene un catecol.

10 En 15 ml del disolvente orgánico polar DMF (dimetilformamida) en un reactor, se dejaron reaccionar 1.000 mg de metoxipolietilenglicol (m-PEG; PM: 5.000) que tenía un grupo amina terminal con ácido 3,4-dihidroxicinámico (HCA), hidroxibenzotriazol (HOBt), hexafluorofosfato de benzotriazolioxitrisfosfonio (BOP) y *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) durante 720 minutos mientras se agitaba. En el presente documento, las cantidades de los compuestos usadas fueron 38 mg, 110 mg y 44 μ l. Entretanto, la DMF usada como disolvente fue ventajosa para la reacción, debido a que pudo evitar la oxidación del grupo catecol del HCA.

15 Como se muestra en la FIG. 1, se dializó el producto de reacción durante 24 horas para eliminar el material sin reaccionar restante una vez finalizada la reacción. A continuación, se liofilizó el material resultante, obteniéndose así ácido 3,4-dihidroxicinámico-PEG en forma de polvo blanco. Se confirmó que el material obtenido era un derivado de PEG (denominado de aquí en adelante mPEG-CT) que tenía catecol.

20 **Ejemplo 2: Preparación de conjugado de PEG-bisagra-3 con mPEG-CT y examen de la configuración del conjugado preparado**

(1) Preparación de conjugado de PEG-bisagra-3 usando mPEG-CT

Para conjugar un derivado de polietilenglicol con un péptido, se preparó mPEG-CT de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 (FIG. 1). Es decir, se dejaron reaccionar mPEG-amina (PM: 5.000) y HCA con HOBt, BOP y DIPEA en una solución de DMF, obteniéndose así mPEG-CT.

25 A continuación, se dejó reaccionar el mPEG-CT con el péptido bisagra-3 (véase la FIG. 2) a 4 °C en condiciones ligeramente ácidas (pH 6,5). Como resultado de ello, se preparó satisfactoriamente un conjugado de PEG-bisagra-3.

(2) HPLC de fase inversa y MALDI-TOF para la confirmación de la mono-PEGilación

30 Para confirmar si el conjugado de PEG-bisagra-3 preparado en el Ejemplo 2-(1) tenía una configuración en la que el péptido bisagra-3 está mono-PEGilado con PEG, se realizaron una HPLC de fase inversa (cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa) y MALDI-TOF (desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo).

El sistema HPLC usado fue Agilent serie 1200, y la columna fue supelco Discovery® BIO Wide Pore C18 5 cm x 4,6 mm, 3 μ m. La fase móvil consistía en agua (TFA al 0,1 %):acetonitrilo (TFA al 0,1 %) = 95:5, agua (TFA al 0,1 %):acetonitrilo (TFA al 0,1 %) = 5:95 (hasta 30 minutos), y agua al 95 % (hasta 35 minutos).

35 Como resultado de ello, como se muestra en la FIG. 3, los resultados de la HPLC de fase inversa mostraron que solo se detectaron dos picos. Los dos picos indican bisagra-3 sin modificar (16,2 minutos) y bisagra-3 mono-PEGilada (17 minutos), solo se produjo mono-PEGilación sin multi-PEGilación.

40 Para el análisis de MALDI-TOF, se mezcló una solución de acetonitrilo (ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA)) con agua (ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA)) en una proporción de 1:1, y se adsorbió la proteína sobre la fase estacionaria usando un ZipTip, y luego se lavó con agua para eliminar las sales del tampón. A continuación, se purificó solamente PEG-bisagra-3 puro usando una mezcla 1:1 o acetonitrilo y agua, y se colocó en una placa de MALDI-TOF. A continuación, se sometió la muestra a análisis de MALDI-TOF usando un sistema de Voyager DE-STR (Applied Biosystems, Inc.).

45 Como resultado de ello, como se muestra en la FIG. 4, los resultados del análisis MALDI-TOF también mostraron que solo se detectaron PEG (PM: 5.000) y mono-PEG-bisagra-3 (PM: 7.238). Por lo tanto, se confirmó que, en el conjugado de péptido-polietilenglicol preparado usando el derivado de polietilenglicol con catecol, el péptido se mono-PEGiló con polietilenglicol.

(3) Examen de los sitios de mono-PEGilación a través de la degradación trípica

50 Para examinar si el conjugado de PEG-bisagra-3 preparado en el Ejemplo 2-(1) tenía una configuración en la que el PEG estaba conjugado con especificidad de sitio con el extremo N-terminal del péptido bisagra-3, se sometió el conjugado a digestión trípica, seguida de los análisis de HPLC de fase inversa y de MALDI-TOF.

El péptido, denominado "bisagra-3", tiene 20 aminoácidos (véase la FIG. 2). El péptido tiene 7 aminas primarias expuestas (potenciales sitios de PEGilación), es decir, 6 grupos épsilon-amino de la lisina (K) y un grupo alfa-amino en el extremo N-terminal. Todas las aminas eran candidatas como sitios de PEGilación (véase la FIG. 5). Por consiguiente, se examinó si el péptido solo estaba PEGilado en el grupo alfa-amino N-terminal entre estos sitios.

5 Dado que la secuencia de bisagra-3 solo contiene un aminoácido triptófano (véase la FIG. 2), se podía examinar si el péptido bisagra-3 estaba PEGilado solo en el extremo N-terminal a través de la forma de los productos de la digestión triptica del péptido.

Dado que el péptido bisagra-3 no tiene cisteína, se añadió una solución de una pequeña cantidad de cloruro de calcio (CaCl₂) en urea 4 M al péptido bisagra-3, e inmediatamente después se añadió tripsina a la solución en una cantidad de 1/20 del péptido. Entonces, se sometió el péptido a digestión triptica a 37 °C durante 12 horas, seguida del análisis de HPLC de fase inversa.

Como resultado de ello, se obtuvo un gráfico como el mostrado en la FIG. 6. Como puede verse en el mismo, a 280 nm de UV, solo se detectó un resto de triptófano. Esto es porque el péptido bisagra-3 digerido muestra un único pico en el fragmento T1 (13 min). Si el catecol reaccionara con las aminas épsilon (K12, K13, K16, K17 y K20), el pico del fragmento único no cambiaría. Sin embargo, como se puede ver a partir de los resultados de la FIG. 6, el pico del único fragmento seguramente disminuyó (línea roja). Es decir, debido al grupo catecol, la intensidad del pico solo aumentó cuando existía el fragmento T1. La presencia del pico anterior (13 min; línea roja) fue porque no se realizó suficiente dilución (PMCO: diluido a 1:6000).

Tras el análisis de HPLC de fase inversa, solo quedarían las aminas K9 y N-terminales entre los candidatos de PEGilación. Si mPEG-CT reaccionara con K9, el peso molecular de los fragmentos PEGilados y digeridos, es decir, el mPEG-CT más T1+2, sería de 6254,49, porque la tripsina no podría reconocer la lisina PEGilada (K9). Por lo tanto, se realizó el análisis de MALDI-TOF para examinar el sitio en el que el mPEG-CT estaba PEGilado. El análisis de MALDI-TOF se realizó de la misma manera que se describe en el Ejemplo 2-(2).

Los resultados del análisis de MALDI-TOF se muestran en la FIG. 7. Como puede verse en la misma, solo existían dos picos: 5.000 y 5.883. Dichos resultados indican sin duda que el pico de 5.000 es mPEG-TC y el pico de 5.883 es mPEG-CT más el fragmento T1 (PM: 899) de bisagra-3. No se observó el peso molecular de mPEG-CT más el fragmento T1+2 (6.254,49), y por lo tanto, el pico de 5.883 es la prueba fiable de PEGilación N-terminal. Por consiguiente, se confirmó que el conjugado de PEG-bisagra-3 preparado usando mPEG-CT en el Ejemplo 2-(1) tenía una configuración en la que el péptido bisagra-3 estaba mono-PEGilado en el extremo N-terminal.

30 **Ejemplo 3: Comparación con el conjugado de PEG-lisozima usando mPEG-SS y mPEG-CT**

(1) Preparación de PEG-lisozima usando mPEG-SS

No solo se pueden PEGilar péptidos, sino también proteínas en el extremo N-terminal. En la técnica anterior, el procedimiento más útil para la PEGilación de aminas fue el uso de succinato de succinimidilo capaz de formar un enlace covalente con un grupo amina primaria expuesto en la superficie. Sin embargo, dicho procedimiento tenía el problema de que no era específico del sitio. Esto se debe a que el succinato de succinimidilo reacciona con los grupos amina primaria aleatorios, a diferencia de un grupo catecol (FIG. 8). Por lo tanto, para comparar un grupo catecol con el succinato de succinimidilo, se preparó un conjugado de PEG-lisozima usando mPEG-SS y lisozima como ejemplo de proteína.

En concreto, a un pH de 8,5, que es una condición que se conoce en general, se dejaron reaccionar 20 mg de mPEG-SS con 5 mg de lisozima a 4 °C durante 12 horas, preparando de esta manera un conjugado de PEG-lisozima.

Como resultado de ello, se confirmó que se había preparado el conjugado de PEG-lisozima.

(2) Preparación del conjugado de PEG-lisozima usando mPEG-CT

Para preparar un conjugado de PEG-lisozima usando el mPEG-CT del Ejemplo 1, de acuerdo con el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 2-(1), se mezclaron 5 mg de mPEG-CT (5 k) con 5 mg de lisozima a pH de 8,5, y se dejó reaccionar la mezcla a 4 °C durante 12 horas.

Como resultado de ello, se confirmó que se había preparado un conjugado de PEG-lisozima.

(3) Examen de mono- o multi-PEGilación usando el análisis de gel de SDS-PAGE

Se sometieron los conjugados de PEG-lisozima de los Ejemplos 3-(1) y 3-(2) a análisis en gel de SDS-PAGE para examinar si los conjugados estaban mono-PEGilados o multi-PEGilados.

Con este fin, se preparó un gel de SDS-PAGE que tenía una fracción de acrilamida del 15 %, y se aplicó una tensión al mismo para separar la lisozima y el conjugado de PEG-lisozima de acuerdo con el tamaño.

Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 9. En la FIG. 9, el carril 1 es el resultado de la carga de lisozima como un control, el carril 2 es el resultado de la carga del conjugado de PEG-lisozima del Ejemplo 3-(1), y el carril 3 es el resultado de la carga del conjugado de PEG-lisozima del Ejemplo 3-(2). Como resultado de ello, se hizo reaccionar el conjugado del carril 2 preparado usando metoxi-polietilenglicol-succinato de succinimidilo (mPEG-SS) con tres grupos amina (aparecieron 3 bandas) (K33, K97 y K116). Sin embargo, como puede verse en el carril 3, el conjugado de PEG-lisozima preparado usando mPEG-CT mostró una sola banda, lo que sugiere que el conjugado solo reaccionó con un grupo amina. Por lo tanto, se confirmó que el derivado de PEG con catecol estaba mono-conjugado con la proteína, a diferencia del derivado de PEG con succinato de succinimidilo.

Ejemplo 4: Preparación de conjugado de PEG-bFGF con mPEG-CT y examen de la configuración del conjugado preparado

(1) Preparación del conjugado de PEG-bFGF usando mPEG-CT o mPEG-SS

El bFGF (PM: 17,1 kDa) es un factor de crecimiento de fibroblastos básico, que es un tipo de FGF. En órganos adultos, participa en la curación de las heridas y en la regeneración de los tejidos. De acuerdo con el mismo procedimiento usado en el Ejemplo 2-(1), se preparó un conjugado de PEG-bFGF usando mPEG-CT. Como resultado de ello, se confirmó que se había preparado el conjugado de PEG-bFGF.

Entretanto, de acuerdo con el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 3-(1), se preparó un conjugado de PEG-bFGF usando mPEG-SS.

(2) Examen de mono-PEGilación mediante el análisis de gel SDS-PAGE

Se sometió el PEG-bFGF a análisis de SDS-PAGE y análisis de MALDI-TOF de acuerdo con el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 2-(2) para examinar si el PEG-bFGF era un conjugado mono-PEGilado. Sin embargo, el análisis se realizó a un pH diferente del valor de pH usado en el Ejemplo 2-(2). Esto se debe a que la amina N-terminal tiene un valor de pKa diferente. Se analizó si bFGF estaba PEGilado a pH 6,5.

Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 10A.

En la FIG. 10A, la proteína cargada en el carril 2 es el resultado de realizar la PEGilación usando mPEG-CT a un pH de 6,5, y en el carril 3, se pudieron observar dos bandas, es decir, la banda del bFGF anterior y la banda del conjugado de PEG-bFGF mono-PEGilado. La proteína cargada en el carril 3 es un conjugado de PEG-bFGF mono-PEGilado obtenido mediante la separación y la purificación de la proteína del carril 2 mediante FPLC. Por consiguiente, se confirmó que, cuando un conjugado de proteína-polietilenglicol se prepara usando un derivado de polietilenglicol con catecol, la proteína se monoPEGila con el polietilenglicol.

(3) Examen de los sitios de PEGilación por digestión trípica

Se examinaron los sitios de PEGilación de PEG-bFGF mediante digestión trípica de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2-(3).

Como resultado de ello, como se muestra en la FIG. 10C, se observó el pico del fragmento T1 a 7.468. Debido a que el peso molecular del fragmento T1 de bFGF no modificado es de 2.495 (FIG. 10B), el pico a 7.468 es sin duda la suma de mPEG-CT (PM: 5.000) y del fragmento T1 de bFGF (PM: 2.495) y, por lo tanto, el pico a 7.468 es la prueba fiable de PEGilación N-terminal. Por consiguiente, se confirmó que el PEG-bFGF preparado usando mPEG-CT es una configuración en la que la proteína bFGF estaba mono-PEGilada en el extremo N-terminal con PEG.

Ejemplo 5: Preparación del conjugado de PEG-G-CSF usando mPEG-CT y examen de la configuración del conjugado preparado

(1) Preparación del conjugado de PEG-G-CSF usando de mPEG-CT o mPEG-SS

El G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos; PM: 18,8 kDa) es la proteína más importante del sistema sanguíneo humano, y sirve para estimular la liberación de la médula ósea en el flujo sanguíneo. Se preparó un conjugado de PEG-G-CSF de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2-(1). Como resultado de ello, se confirmó que se había preparado el conjugado de PEG-G-CSF.

Entretanto, se preparó un conjugado de PEG-G-CSF usando mPEG-SS de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 3-(1).

(2) Examen de PEGilación mediante el análisis en gel de DS-PAGE

Se examinó si la proteína G-CSF estaba mono-PEGilada mediante el análisis de PEG-bFGF y el análisis en gel de SDS-PAGE de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2-(2).

Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 11.

Como se puede observar en la FIG. 11A, en el conjugado mono-PEGilado preparado usando mPEG-CT, solo se pudieron observar las bandas de G-CSF y G-CSF mono-PEGilado (carril 2), y cuando se realizó la purificación del conjugado mediante FPLC, solo se pudo separar el G-CSF mono-PEGilado (carril 3). Por consiguiente, se confirmó que la proteína G-CSF estaba mono-PEGilada.

5 (3) Examen de mono-PEGilación en extremo N-terminal por digestión trípica

Se examinaron los sitios de PEGilación mediante la digestión trípica de G-CSF y PEG-G-CSF de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 4-(3).

10 Como resultado de ello, como se muestra en la FIG. 11B, los resultados de MALDI-TOF de los productos de la digestión trípica de G-CSF indicaron que el peso molecular del fragmento T1 era de 1.792. Entretanto, como se muestra en la FIG. 11C, los resultados de la MALDI-TOF para los productos de la digestión trípica del PEG con catecol-G-CSF indicaron que el peso molecular del fragmento T1 era de 6.792. Por lo tanto, se cree que el resultado anterior es la suma del fragmento T1 y PEG (PM: 5.000), lo que sugiere que el derivado de PEG con catecol estaba mono-conjugado con la proteína, a diferencia del derivado de PEG con succinato de succinimidilo.

15 A través de los Ejemplos 1 a 5 anteriores, se sintetizó satisfactoriamente el derivado de polietilenglicol (PEG-CT) que tenía el compuesto que contenía un catecol unido al mismo, y se confirmó que, cuando el derivado de PEG-CT se conjugaba con la proteína o con el péptido, se puede conjugar con especificidad de sitio con el extremo N-terminal de la proteína o del péptido.

Ejemplo 6: Aumento de la eficiencia de la PEGilación usando peryodato de sodio

20 Para aumentar la eficiencia de la PEGilación, se usó el agente de oxidación peryodato de sodio. En condiciones de bajo pH, la proporción de aminas alfa (aminas N-terminales) presentes en forma de cationes de NH_3^+ es más alta que la de las aminas épsilon (aminas de restos de lisina). Así pues, solo la amina N-terminal puede reaccionar con una quinona oxidada por el peryodato. Por consiguiente, se realizó la PEGilación en condiciones de proporciones variables de peryodato de sodio.

25 Se disolvieron 5 mg de lisozima y 5 mg de mPEG-CT en un tampón (pH 6,0) y se dejaron reaccionar a 4 °C durante 720 minutos. En este momento, se añadió peryodato de sodio en proporciones de 0:1, 0,5:1, y 1:1 y 2:1 con respecto al mPEG-CT.

Se realizó un experimento en un grupo de control de la misma manera que en el Ejemplo 3-(2).

30 Los resultados experimentales se muestran comparativamente en las FIG. 12 y 13, que muestran las eficiencias de PEGilación a diferentes proporciones de peryodato a un pH de 6,0 o inferior. La última columna del gel de SDS-PAGE y el valor del rendimiento de la PEGilación a un pH de 8,5 en el gráfico son los resultados para el grupo de control que no sufrió reacción química. Los resultados experimentales indicaron que el mayor rendimiento fue del 57,94 % a una proporción de peryodato:catecol de 1,5:1.

Ejemplo 7: Examen del tiempo de duración *in vivo* del conjugado de PEG-EPO

(1) Preparación y confirmación de conjugado de PEG-EPO usando mPEG-CT o mPEG-SS

35 La eritropoyetina (PM: 30 kDa) es una hormona que se produce en los riñones y estimula la producción de eritrocitos en la médula. La función más importante es la de estimular la diferenciación y el desarrollo de los eritrocitos. En el presente ejemplo, se usó mPEG-CT (PM: 30 kDa), porque la PEGilación que une un PEG de al menos 20 kDa podría ser eficaz en un medio *in vivo*.

40 Se preparó un conjugado de PEG-EPO de acuerdo con los mismos procedimientos que se han descrito en los Ejemplos 2-(1) y 3-(1), excepto que se añadió peryodato de sodio a una proporción de 1,5:1 durante la reacción de mPEG-CT con EPO y que se usó un pH de 7,5. Debido a que las proteínas tienen diferentes valores de pKa, se usó un pH que era algo más alto que en el caso de la lisozima. Una vez finalizada la reacción, se purificó la EPO conjugada con PEG usando un sistema de FPLC (Shephacril TM HiPrep 26/60 S-200-HR 320 ml).

45 Los resultados del análisis se muestran en las FIG. 14 y 15. Como puede verse a partir de los resultados del análisis en gel de SDS-PAGE, después del procedimiento de FPLC, la mezcla de EPO (una línea negra en la FIG. 15; 140 minutos) y el mPEG-CT-EPO (PEG-EPO, una segunda línea en la FIG. 14 o una línea negra en la FIG. 15; 98 minutos) se purificaron por completo (tercera línea en la FIG. 14). El rendimiento de PEGilación fue del 77 %. De los resultados del análisis de MALDI-TOF, se podía observar una EPO mono-PEGilada (datos no mostrados).

50 Se usó mPEG-SS (PM: 20 kDa) como un control de multi-PEGilación de proteínas. Se detectó una EPO mono-PEGilada a los 105 minutos, y se detectó una EPO di-PEGilada a los 95 minutos y se purificó mediante FPLC (una línea roja en la FIG. 15). Se detectó un pico a los 85 minutos, lo que indica una proteína conjugada y una proteína multi-PEGilada. El rendimiento de la PEGilación fue mucho menor en mPEG-SS que en mPEG-CT, pero se indicó con una altura ajustada en la FIG. 15 para facilitar la comparación.

(2) Examen del tiempo de duración *in vivo*

En un estudio farmacocinético *in vivo*, se usó una EPO multi-PEGilada, es decir, un PEG-EPO multi-PEGilado preparado usando el mPEG-SS del Ejemplo 7-(1), como control positivo. Los ratones recibieron por inyección intravenosa 100 µg/kg (peso corporal del ratón) de EPO, y luego se midió el tiempo de circulación *in vivo* de la EPO.

5 Para cada muestra de proteína, se usaron cinco ratones, y se inyectaron aproximadamente 2,5 µg de cada proteína a cada ratón. Esta cantidad de proteína corresponde a $6,4 \times 10^4$ mIU de EPO, suponiendo un factor de conversión de $2,56 \times 10^4$ mIU. Se cuantificaron las proteínas plasmáticas mediante ELISA, y se ajustaron las cantidades cuantificadas de acuerdo con las afinidades de diferentes anticuerpos ELISA frente a las muestras de proteína, es decir, PEG-EPO, multi-PEG-EPO y EPO.

10 Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 16. Como se puede ver en la FIG. 16, se midieron las semividas de todas las muestras de proteína, siendo de aproximadamente 4-96 horas. En la etapa inicial (0,25-4 horas), se mostraron tendencias similares, pero se creyó que los resultados fueron algo inexactos para la medición exacta de las semividas. Durante la etapa intermedia (4-48 horas), se distribuyó la EPO y resultó tener una semivida de 6 horas. Durante las 72 horas posteriores a la inyección, no se detectó la EPO en el plasma. La EPO multi-PEGilada resultó tener una semivida más larga (30 horas). Sin embargo, durante la última etapa (48-96 horas), la EPO multi-PEGilada resultó tener una semivida más corta (15 horas). Por otro lado, la EPO mono-PEGilada resultó tener la semivida más larga (30 horas), y se observó durante el tiempo más largo (96 horas). Estos resultados sugieren que la EPO multi-PEGilada y la EPO mono-PEGilada presentaron la excelente EPO habitual, debido a la larga semivida y que la EPO mono-PEGilada resultó tener una larga semivida en comparación con la EPO multi-PEGilada. Por lo tanto, se podría predecir que la EPO mono-PEGilada tuvo un largo tiempo de duración *in vivo*, de modo que se pudieran aumentar al máximo la eficacia y la estabilidad *in vivo* del fármaco de proteína.

(3) Medición de la actividad biológica

Para medir la actividad biológica, se midió la proporción de hematocrito en sangre en cada muestra.

25 Se añadió EDTA a la sangre extraída de los ratones para evitar que la sangre se coagulara y, a continuación, se midió la proporción de hematocrito en sangre usando VetScan HM5 (Abaxis).

30 Como resultado de ello, como se muestra en la FIG. 17, durante 0 a 3 días después de la inyección, EPO y PEG-EPO tuvieron actividades similares, y dichas actividades similares también se mostraron incluso 7-10 días después de la inyección. Sin embargo, la EPO perdió la mayor parte de su actividad *in vivo* hacia el día 14, mientras que PEG-EPO todavía mantenía su efecto. A partir de estos resultados, se puede predecir que el fármaco de proteína de la presente invención, que no fue modificado químicamente, tiene una excelente eficacia *in vivo*.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la materia que dicha descripción es solo para una realización preferida, y no limita el ámbito de la presente invención. Así pues, el ámbito sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas.

35 Aplicabilidad industrial

40 Cuando se usa en la presente invención, el derivado de PEG con catecol se puede mono-conjugar con especificidad de sitio con el grupo amina N-terminal de una proteína o de un péptido, de modo que se pueda obtener un conjugado de polietilenglicol-proteína o péptido homogéneo con un alto rendimiento. A diferencia de los conjugados de la técnica anterior, el conjugado obtenido de acuerdo con la presente invención permite minimizar la reducción de la actividad de la proteína sin modificar químicamente la proteína, y por lo tanto, el conjugado tiene un excelente efecto farmacológico. Además, debido a que el conjugado es homogéneo, el procedimiento de preparación del conjugado se puede simplificar. Por otra parte, el conjugado tiene una eficacia biológica uniforme *in vivo* y muestra una fuerte resistencia a la hidrólisis y, por lo tanto, un largo tiempo de duración *in vivo*. Por consiguiente, el conjugado tiene el efecto de aumentar la eficacia y la estabilidad *in vivo* del fármaco de proteína.

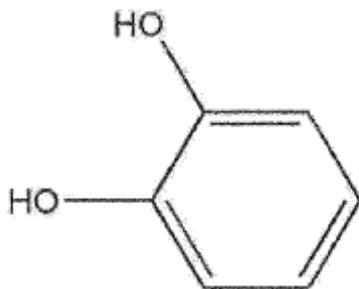
45

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol que tiene unido al mismo un compuesto que contiene un catecol de la siguiente fórmula 1, en el que la proteína o el péptido está mono-PEGilado en el grupo amina N-terminal con el catecol del derivado de polietilenglicol:

5

[Fórmula 1]



2. El conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polietilenglicol es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en aldehído de metoxipolietilenglicol, succinimidilpropionato de polietilenglicol, succinimidilbutanoato de metoxipolietilenglicol, succinimidilsuccinato de metoxipolietilenglicol, benzotriazolcarbonato de metoxipolietilenglicol, epóxido de metoxipolietilenglicol, carbonilimidazol de metoxipolietilenglicol, *p*-nitrofenilcarbonato de metoxipolietilenglicol, isocianato de metoxipolietilenglicol, amina de metoxipolietilenglicol que contiene amina primaria, hidrazida de metoxipolietilenglicol y metoxicarboxil-polietilenglicol que contiene grupos carboxilo.

10

3. El conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polietilenglicol es de una forma cualquiera seleccionada del grupo que consiste en forma lineal, forma ramificada, forma de cepillo y forma estrellada.

15

4. El conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el compuesto que contiene un catecol es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina que contiene grupos carboxilo y amina, 3-hidroxi-tiramina que contiene grupos amina, ácido 3,4-dihidroxihipocinámico que contiene grupos carboxilo, 3,4-dihidroxibenzaldehído que contiene grupos aldehído y norepinefrina.

20

5. El conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el peso molecular del compuesto que contiene un catecol es de 1000 Da o inferior.

25

6. El conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el peso molecular del polietilenglicol es de 500 a 100 000 Da.

7. El conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en lisozima, hormona de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormona de crecimiento humana (hGH), interferón (IFN), interleucina-2 (IL-2), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), urato oxidasa de mamífero (uricasa) y arginina desiminasa (ADI).

30

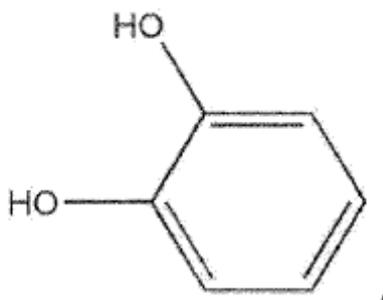
8. El conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en bisagra-7, bisagra-3, buforina, histonina, protegrina, indolicidina, histatina, BIP, magainina 2, péptido de tipo glucagón (GLP-1), agonista de GNRH/LHRH, análogos de somatostatina, péptido inmunorregulador glatirámico, calcitonina de salmón, desmopresina, péptidos inhibidores de la coagulación de plaquetas, eptifibatida e inhibidor de la fusión del VIH enfuvirtida.

35

9. Un procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol que tiene unido al mismo un compuesto que contiene un catecol de la siguiente fórmula 1, en el que la proteína o el péptido está mono-PEGilado en el grupo amina N-terminal con el catecol del derivado de polietilenglicol:

40

[Fórmula 1]



comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 5 (a) disolver la proteína o el péptido en un reactor;
 (b) disolver el derivado de polietilenglicol en otro reactor; y
 (c) añadir a, y hacer reaccionar con, la solución de la etapa (b) la solución de la etapa (a).
10. El procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el polietilenglicol es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en aldehído de metoxipolietilenglicol, succinimidilpropionato de polietilenglicol, succinimidilbutanoato de metoxipolietilenglicol, succinimidilsuccinato de metoxipolietilenglicol, benzotriazolcarbonato de metoxipolietilenglicol, epóxido de metoxipolietilenglicol, carbonilimidazol de metoxipolietilenglicol, *p*-nitrofenilcarbonato de metoxipolietilenglicol, isocianato de metoxipolietilenglicol, amina de metoxipolietilenglicol que contiene amina primaria, hidrazida de metoxipolietilenglicol y metoxicarboxil-polietilenglicol que contiene grupos carboxilo.
- 15 11. El procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el compuesto que contiene un catecol es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina que contiene grupos carboxilo y amina, 3-hidroxi-tiramina que contiene grupos amina, ácido 3,4-dihidroxi-hidrocinámico que contiene grupos carboxilo, 3,4-dihidroxi-benzaldehído que contiene grupos aldehído y norepinefrina.
- 20 12. El procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el procedimiento comprende además la etapa (d) de dializar la solución de la etapa (c) y luego separar el conjugado de la solución dializada.
- 25 13. El procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la etapa (d) es separar el conjugado a través de cromatografía en fase líquida.
14. El procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la etapa (b) es disolver el derivado de polietilenglicol con un agente de oxidación a una proporción molar de 1:1 a 1:10 con respecto al derivado de polietilenglicol en el reactor.
- 30 15. El procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el agente de oxidación es uno cualquiera o más seleccionados del grupo que consiste en NaIO_4 , MnCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , KMnO_4 , H_2O_2 , $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y Na_3VO_4 .
- 35 16. El procedimiento de preparación de un conjugado de una proteína o de un péptido con un derivado de polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la etapa (b) se lleva a cabo de 4 a 25 °C durante 2 a 100 horas.

FIG. 1

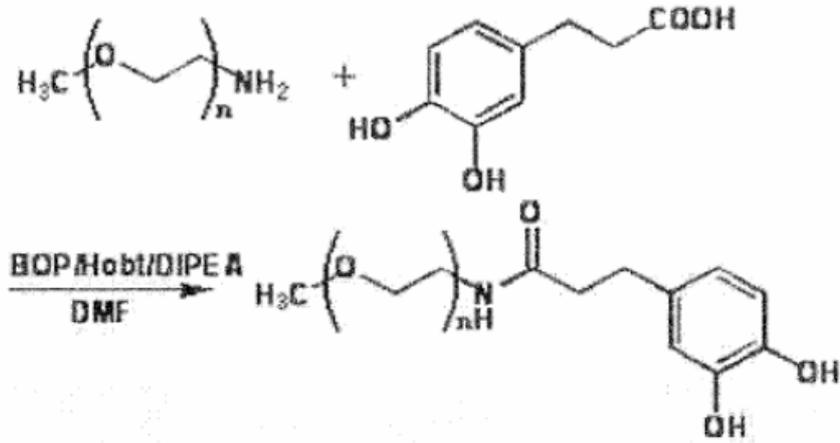


FIG. 2

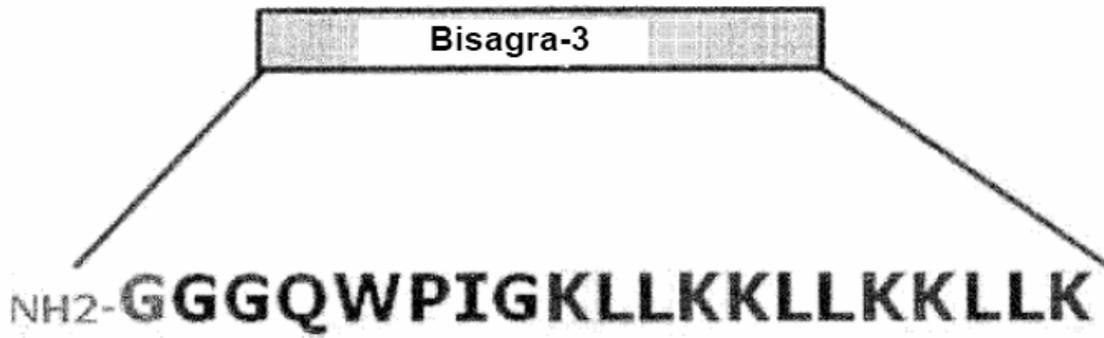


FIG.3

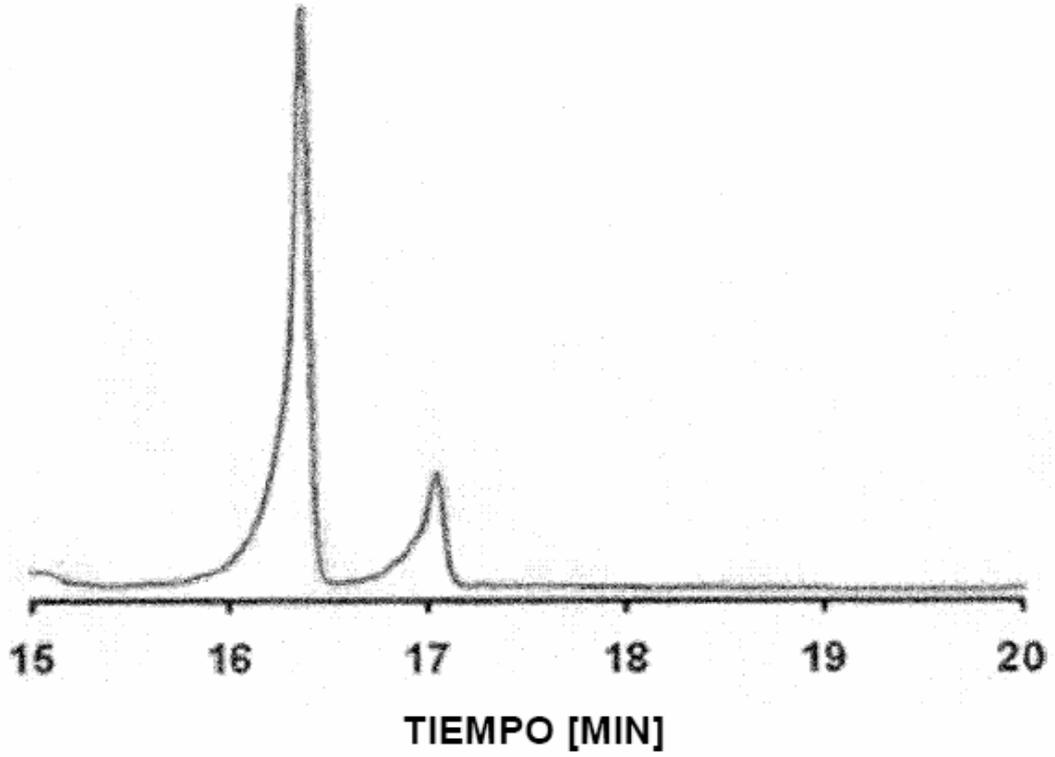


FIG.4

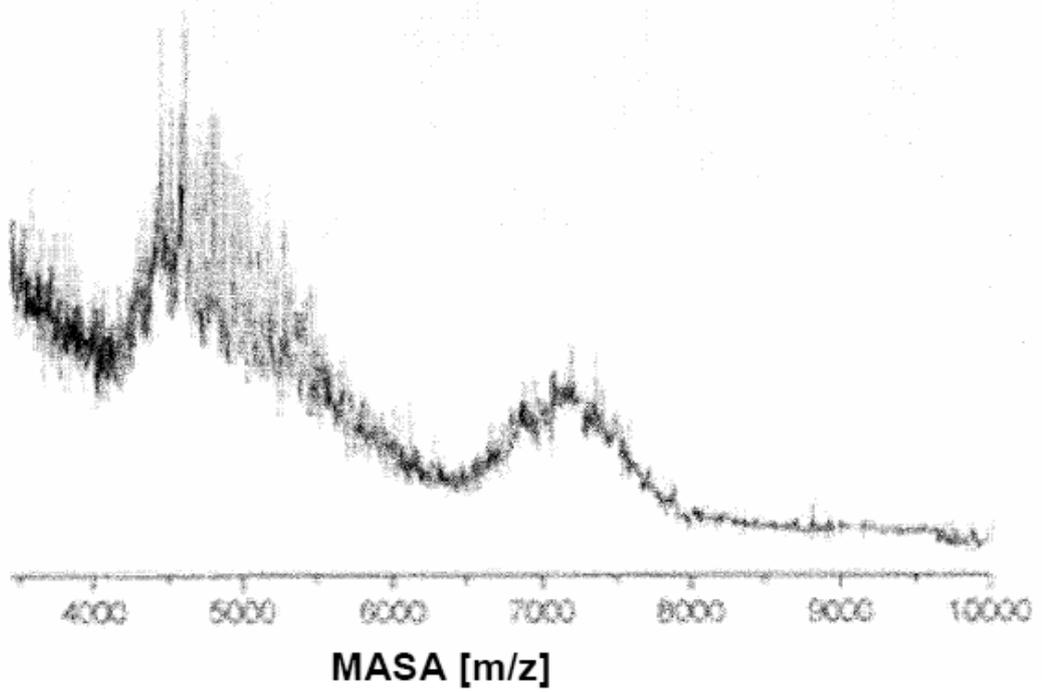


FIG.5

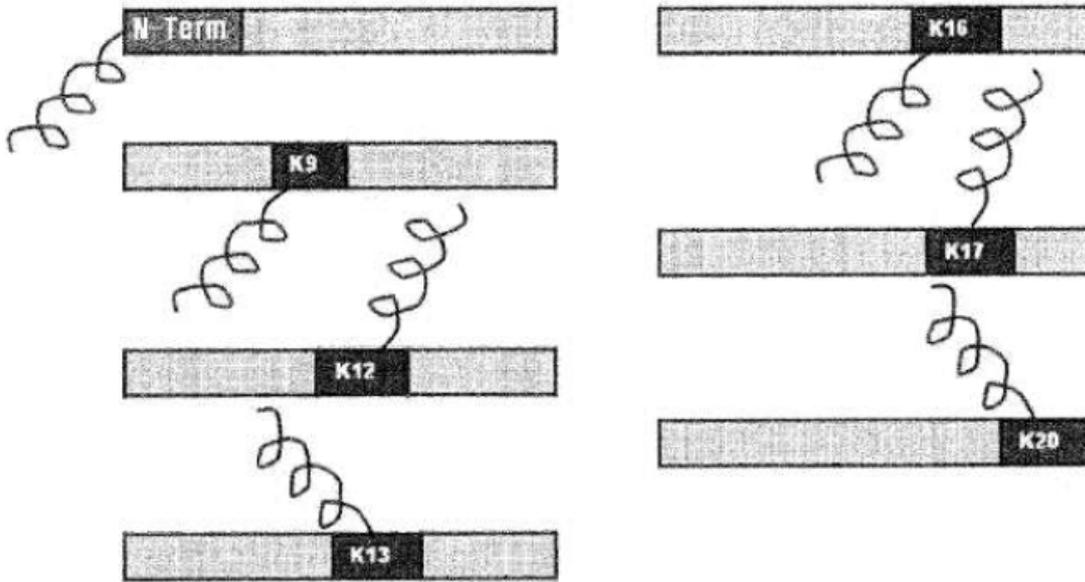


FIG.6

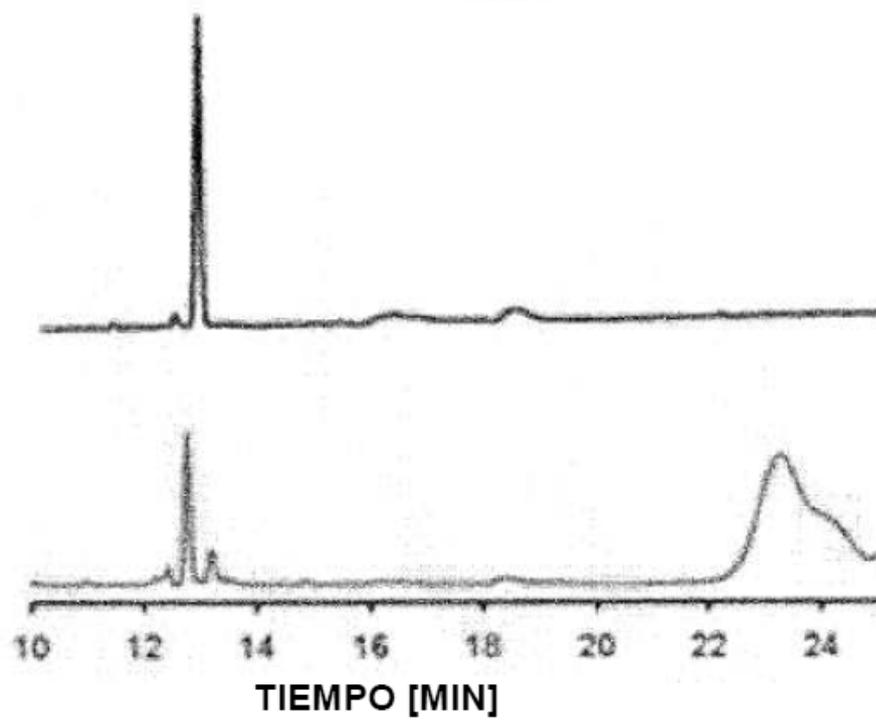


FIG.7

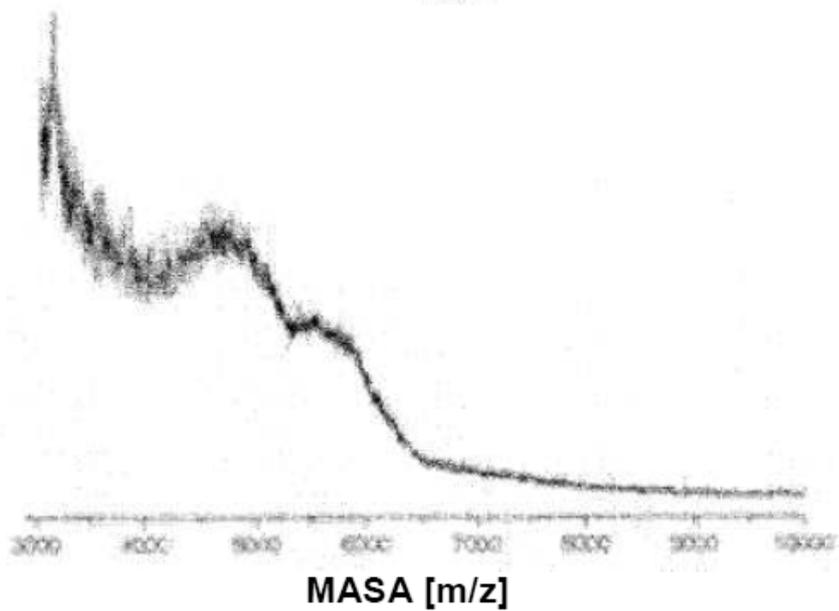


FIG. 8

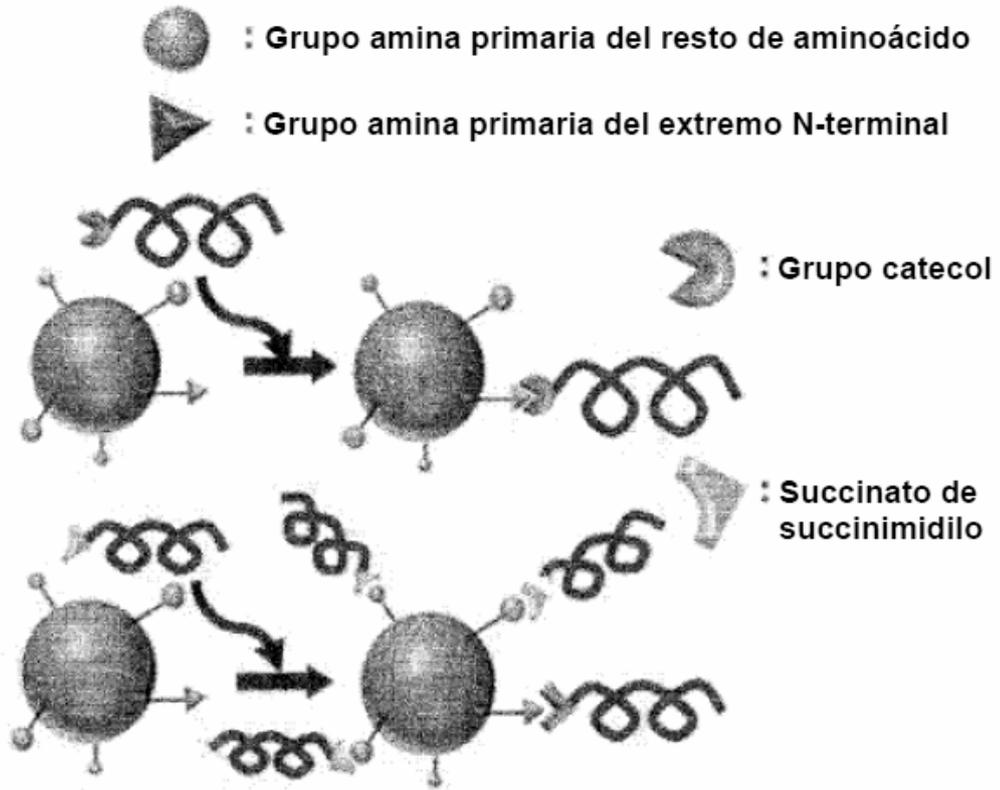


FIG. 9

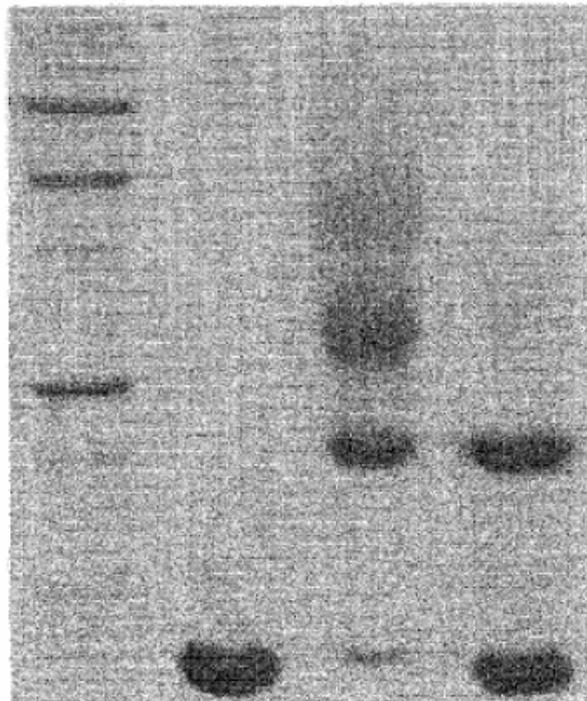


FIG. 10



A

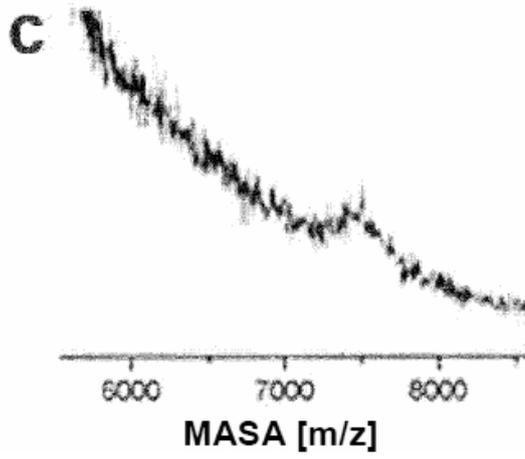
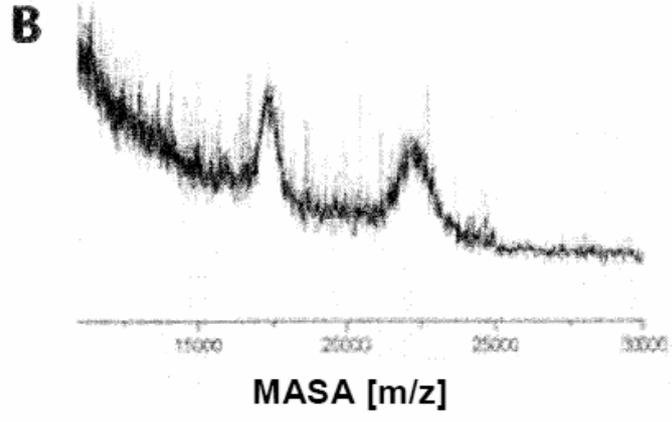


FIG. 11

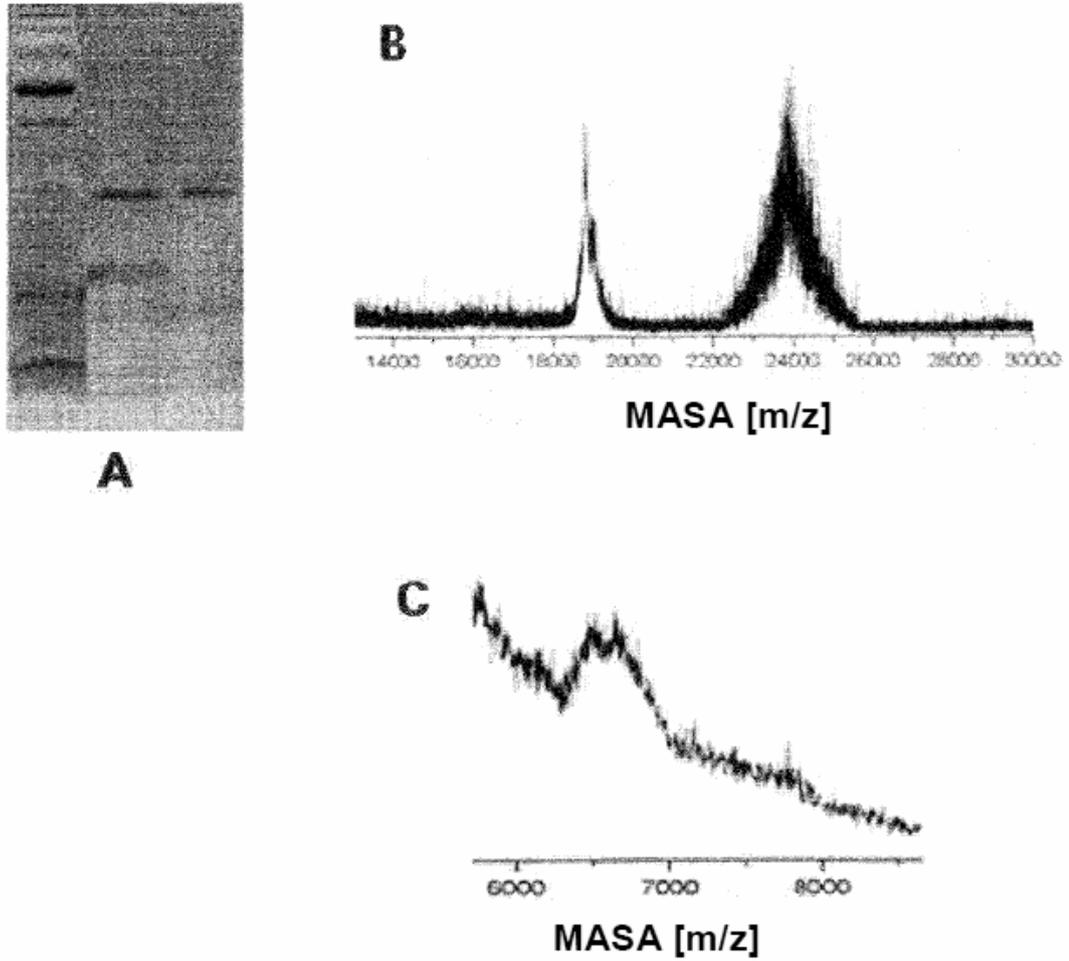


FIG. 12

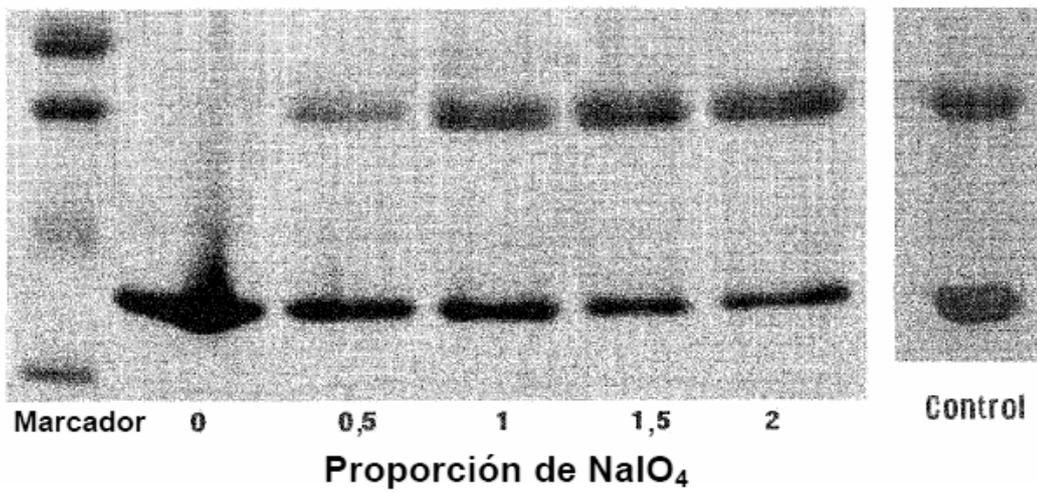


FIG. 13

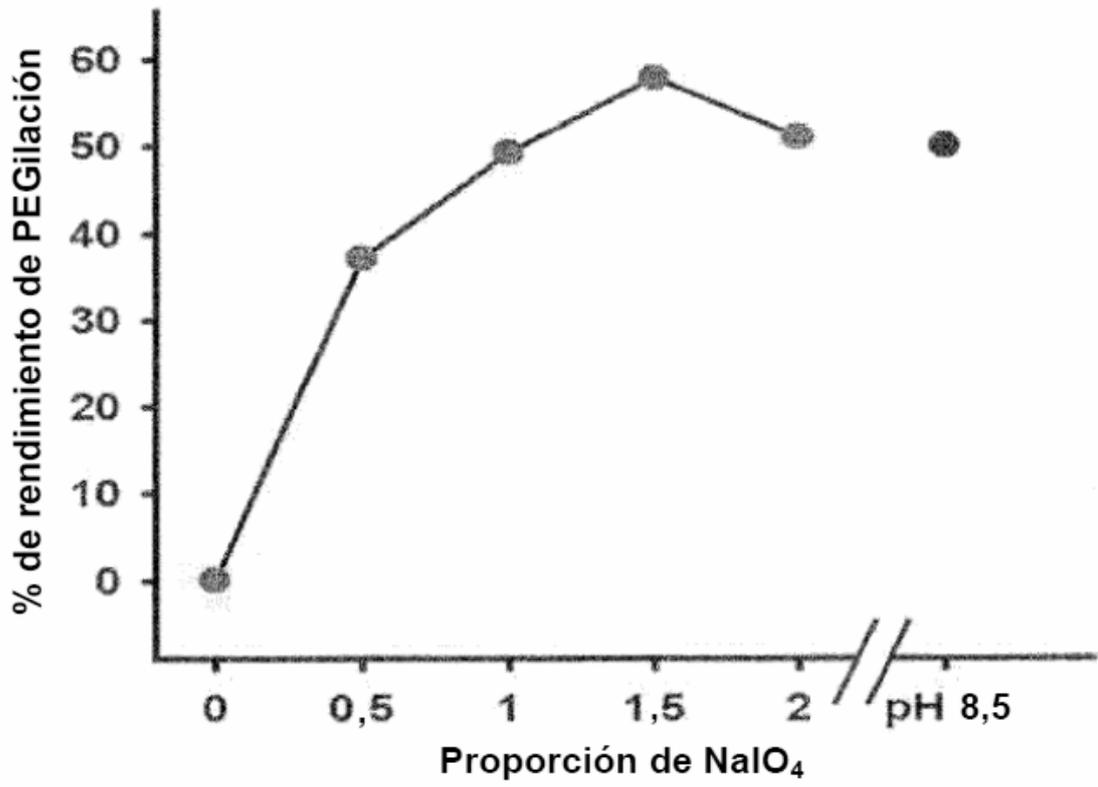


FIG. 14



FIG. 15

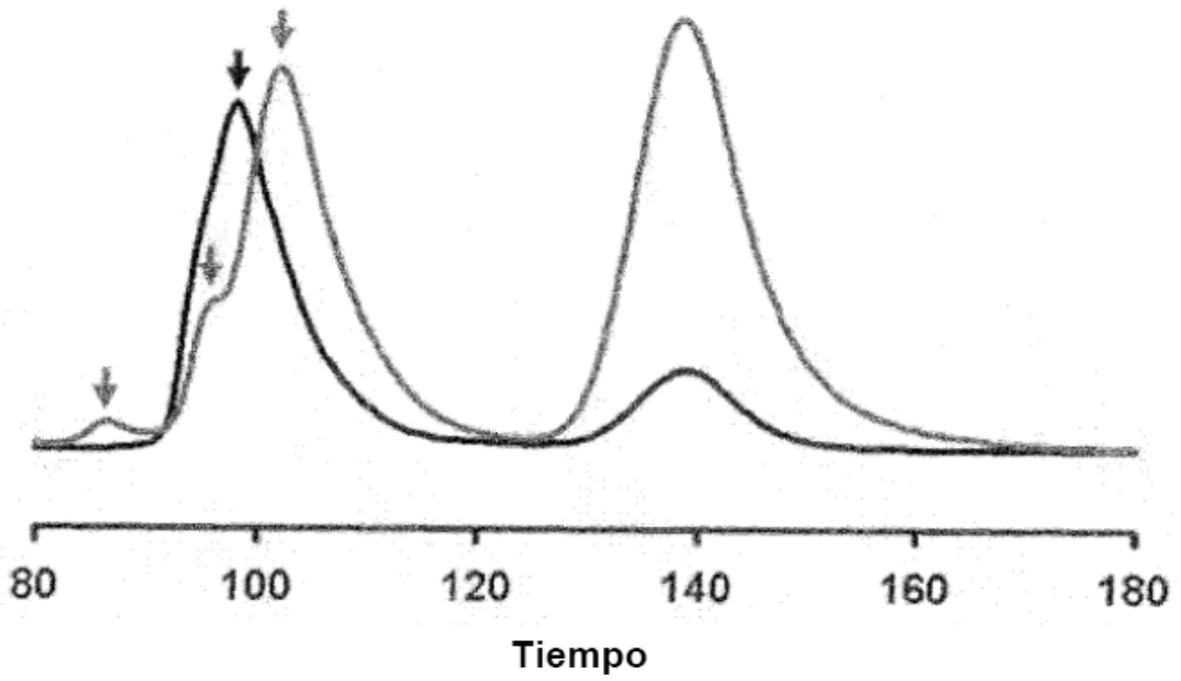


FIG. 16

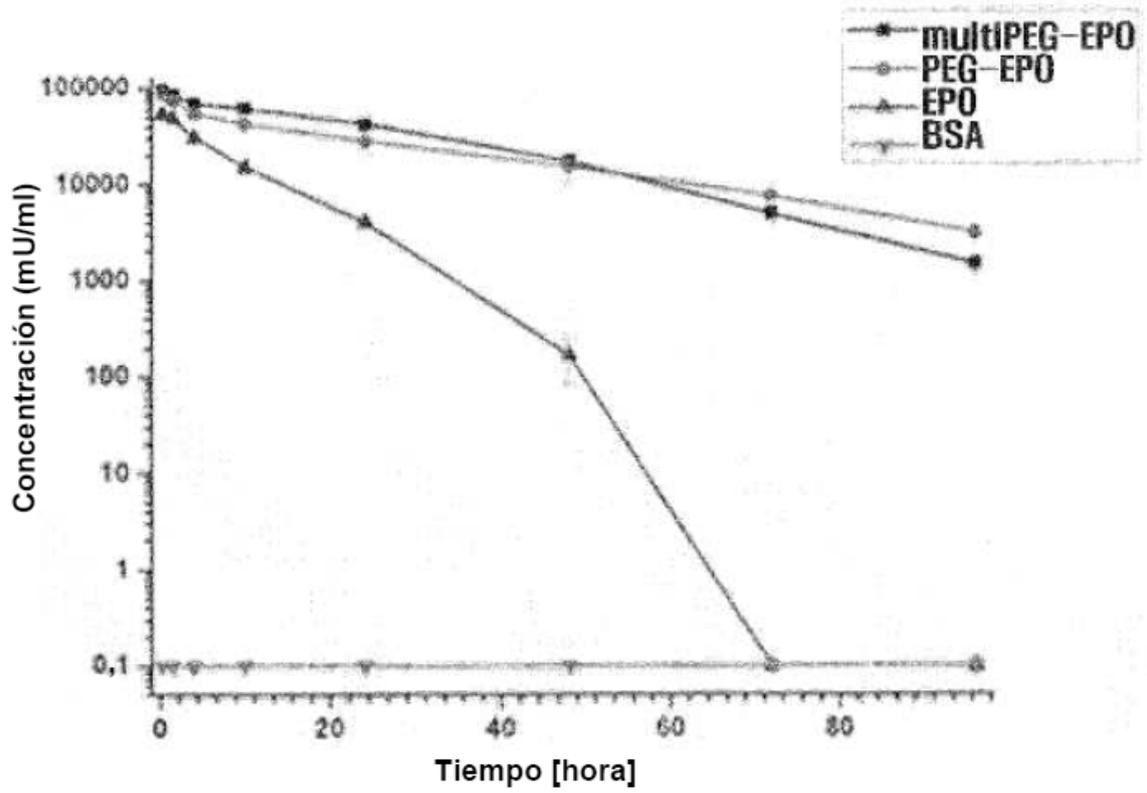


FIG. 17

