

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 214**

51 Int. Cl.:

A61K 38/27 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2005 E 14191805 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2842576**

54 Título: **Conjugación de péptidos mediante transglutaminasa**

30 Prioridad:

21.01.2004 DK 200400076

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

15.11.2017

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**JOHANSEN, NILS LANGELAND;
ZUNDEL, MAGALI y
DÖRWALD, FLORENCIO ZARAGOZA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 642 214 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

Conjugación de péptidos mediante transglutaminasa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método nuevo para conjugación postraduccional de péptidos donde transglutaminasa se utiliza para incorporar un punto de fijación en el péptido al cual otro grupo puede ser selectivamente unido. Dichos péptidos conjugados han alterado características y pueden así ser usados en aplicaciones terapéuticas o pueden facilitar el análisis o aislamiento y purificación de dichos péptidos.

Antecedentes de la invención

10 Es bien conocido que modificar las propiedades y características de péptidos conjugando grupos al péptido cambia debidamente las propiedades del péptido. Tal conjugación requiere generalmente algún grupo funcional en el péptido para reaccionar con otro grupo funcional en un grupo de conjugación. Típicamente, grupos de amino, tal como el grupo de amino de N-terminal o el grupo de ϵ -amino en lisinas, han sido usados en combinación con un reactivo adecuado acilante. Es frecuentemente deseado o incluso requerido para ser capaz de controlar la reacción de conjugación, es decir para controlar dónde los compuestos de conjugación se fijan y para controlar cuántos grupos de conjugación son fijados. Esto frecuentemente se denomina especificidad.

15 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método mediante el cual péptidos se puedan conjugar con un alto grado de especificidad. En términos generales, el método aprovecha una enzima, por ejemplo transglutaminasa, capaz de incorporar un compuesto que comprende un grupo adecuado funcional en el péptido, dónde dicho grupo funcional es posteriormente usado como un punto donde conjugar.

20 La conjugación de péptidos en general ha sido conocida por mucho tiempo, y US 4.179.337 describió hace más de 20 años péptidos conjugados con polietileno o polipropilenglicoles.

25 Diferentes tipos de químicas han sido descritas como eficaces en la formación de un enlace entre el péptido y la fracción a ser conjugada con el péptido. EP 605 963 divulga la injertación de polímeros acuosos que forman una conexión de oxima con un grupo de aldehído en una proteína. Ninguno de los aminoácidos naturales comprende un aldehído, así un grupo hidróxilo tiene que ser oxidado como un primer paso del proceso de conjugación. WO 96/41813 divulga polímeros que se funcionalizan con una oxima de amino-oxi formando grupo útil en las reacciones de conjugación. WO 98/05363 divulga un compuesto que comprende un péptido y un polímero hidrosoluble, donde los dos son de manera covalente conectados a través de un enlace de oxima al residuo de aminoácido N-terminal.

30 Además, el uso de enzimas para permitir una conjugación más específica de péptidos es conocido. EP 243 929 divulga el uso de enzimas proteolíticas, tal como carboxipeptidasa para incorporar un compuesto con un grupo funcional en el C-terminal de un péptido, dónde dicho grupo funcional puede posteriormente ser usado como un punto donde pegar grupos citotóxicos, otros péptidos o grupos indicadores usados para facilitar análisis del péptido, tal como por ejemplo grupos fluorescentes. Esta técnica, no obstante, limita el punto de fijación al residuo de aminoácido C-terminal, algo que constituye una limitación severa si el residuo C-terminal es esencial para la actividad del péptido.

40 Transglutaminasa ha sido usada previamente para alterar las propiedades de péptidos. En la industria alimentaria y en particular en la industria de diario muchas técnicas están disponibles para por ejemplo vincular péptidos usando transglutaminasas. Otros documentos revelan el uso de transglutaminasa para alterar las propiedades de péptidos fisiológicamente activos. EP 950665, EP 785276 y Sato, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 54, 487-504, 2002 revelan la reacción directa entre péptidos que comprenden al menos una Gln y PEG funcionalizada de amina o ligandos similares en presencia de transglutaminasa, y Wada in *Biotech. Lett.*, 23,1367-1372,2001 divulga la conjugación directa de β -lactoglobulina con ácidos grasos mediante transglutaminasa. WO 02/055532 describe la mejora de moléculas de hormonas de crecimiento mediante la modificación covalente con PEG. Sato et al (2000, *Bioconjug Chem*, 11, 502-509) describe la conjugación mediada por transglutaminasa de compuestos a proteínas. WO 01/58935 describe la provisión de conjugados de Factor VII que comprenden un resto no polipeptídico acoplado a un factor VII modificado.

45 Breinbauer et al (2003, *Chembiochem : A Eur J Chem Biol*, 4, 1439-4227) es un artículo de revisión sobre el uso de la pareja de reacción alquino-azida en la química de bioconjugados.

50 Resumen de la invención

El alcance de la invención se determina mediante las reivindicaciones. La información proporcionada en la presente que no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente a modo de información.

Los presentes inventores han sorprendentemente encontrado que enzimas, tal como por ejemplo transglutaminasa, se pueden utilizar para incorporar en un péptido uno o más grupos funcionales, que no son

accesibles en el péptido para formar un péptido funcionalizado, y que este péptido funcionalizado puede posteriormente ser reaccionado con otro compuesto que comprende una fracción de conjugación y uno o más grupos funcionales capaces de reacción con el grupo o grupos funcionales así incorporados en el péptido.

5 Tal método proporciona un alto grado de especificidad en que transglutaminasa puede sólo catalizar la incorporación de compuestos a residuos de aminoácidos que son sustratos para transglutaminasa, y en que los grupos funcionales se seleccionan de modo que ellos sólo reaccionan entre sí, no con otros grupos funcionales accesibles en el péptido. De esta manera, la fracción de conjugación sólo se une a localizaciones o lugares geométricos controlados, y por selección de los grupos funcionales, el número de grupos conjugados pueden ser controlados.

10 Por consiguiente, en un aspecto, la presente especificación proporciona un método para conjugar péptidos, dicho método incluye las siguientes etapas

15 i) reaccionar en uno o más pasos un péptido con un primer compuesto que comprende uno o más grupos funcionales o grupos latentes funcionales, que son no accesibles en cualquiera de los aminoácidos constituyendo dicho péptido, en presencia de transglutaminasa capaz de catalizar la incorporación de dicho primer compuesto en dicho péptido para formar un péptido funcionalizado, y

ii) opcionalmente activar dicho grupo latente funcional, y

20 iii) reaccionar en uno o más pasos dicho péptido funcionalizado con un segundo compuesto que comprende uno o más grupos funcionales, donde dicho grupo(s) funcional no reacciona con grupos funcionales accesibles en los residuos de aminoácidos constituyendo dicho péptido, y donde dicho grupo(s) funcional en dicho segundo compuesto es capaz de reacción con dicho grupo(s) funcional en dicho primer compuesto de modo que un enlace covalente entre dicho péptido funcionalizado y dicho segundo compuesto es formado.

Es además un objetivo de la presente divulgación proporcionar péptidos conjugados por el método de la presente invención.

25 Es otro objetivo de la presente divulgación proporcionar péptidos que son en cierto modo modificados para hacerlos más adecuados para el método de la presente divulgación.

Es también otro objetivo de la presente divulgación proporcionar reactivos y enzimas adecuados para uso en los métodos de la presente divulgación.

Es también otro objetivo de la presente divulgación proporcionar composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos conjugados por métodos de la presente divulgación.

30 Es también otro objetivo de la presente divulgación proporcionar péptidos conjugados según los métodos de la presente divulgación para uso en la terapia.

Es también otro objetivo de la presente divulgación proporcionar métodos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades que comprenden la administración de péptidos conjugados preparados según los métodos de la presente divulgación.

35 Es también otro objetivo de la presente divulgación proporcionar un uso de péptidos conjugados preparados de acuerdo con los métodos de la presente divulgación en la producción de medicamentos.

Es también otro objetivo de la presente divulgación proporcionar un método para mejorar las propiedades farmacológicas de un péptido por conjugación de dicho péptido según los métodos de la presente divulgación.

Definiciones

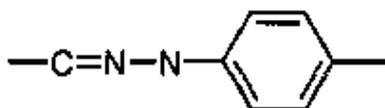
40 En el presente contexto "transaminación" o similar se destina a indicar una reacción donde nitrógeno en la cadena lateral de glutamina se intercambia por nitrógeno de otro compuesto, en particular nitrógeno de otro nitrógeno con nucleófilo.

45 En el presente contexto, el término "no accesible" se destina a indicar que algo está ausente o ausente *de facto* en el sentido de que no se puede alcanzar. Cuando se declara que grupos funcionales no son accesibles en un péptido a ser conjugado se quiere indicar que dicho grupo funcional está ausente en el péptido o, si presente, de alguna forma evitado de tomar parte en reacciones. Por ejemplo, dicho grupo funcional podría ser aplastado en la estructura del péptido de modo que se resguarda de participar en la reacción, o éste podría estar localizado en un área del péptido donde la flexibilidad restringida de la cadena peptídica impide que el grupo funcional participe en reacciones. Es reconocido que el hecho de que un grupo funcional sea accesible o no depende de las condiciones de reacción. Puede ser previsto que en presencia de agentes desnaturizantes o a temperaturas elevadas el péptido pueda desplegarse para exponer grupos funcionales de otra manera no accesibles. Debe entenderse que "no accesible" significa "no accesible en la condición de reacción elegida para la reacción de interés en particular".

En el presente contexto, el término "enlace de oxima" se destina a indicar una fracción de la fórmula-C=N-O-.

En el presente contexto, el término "enlace de hidrazono" se destina a indicar una fracción de la fórmula-C=N-N-.

En el presente contexto, el término "enlace de fenilhidrazono" se destina a indicar una fracción de la fórmula



5 En el presente contexto, el término "enlace de semicarbazono" se destina a indicar una fracción de la fórmula- C=N-N-C(O)-N-.

10 El término "alcano" se destina a indicar un hidrocarburo saturado, lineal, ramificado y/o cíclico. A menos que sea especificado con otro número de átomos de carbono, el término se destina a indicar hidrocarburos con de 1 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como de 1 a 20 (ambos incluidos), tal como de 1 a 10 (ambos incluidos), por ejemplo de 1 a 5 (ambos incluidos); o de 15 a 30 átomos de carbono (ambos incluidos).

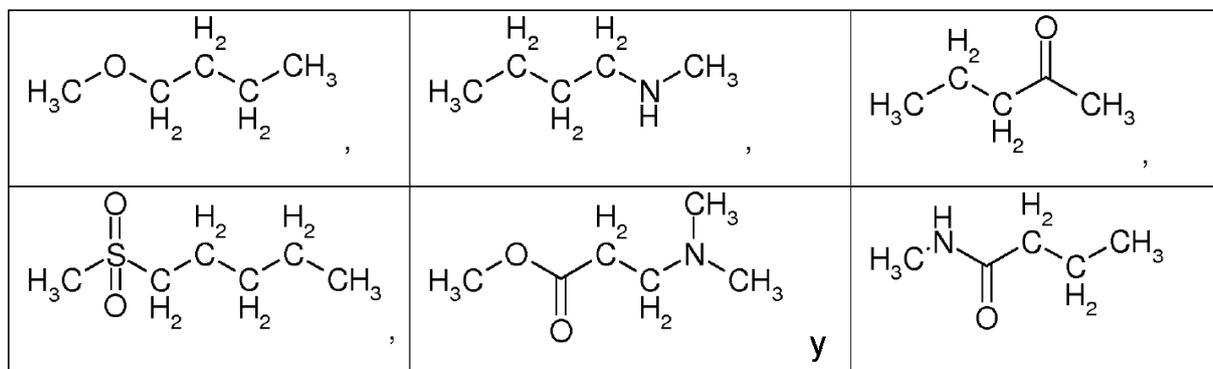
15 El término "alqueno" se destina a indicar un hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico que comprende al menos un enlace doble de carbono-carbono. A menos que sea especificado con otro número de átomos de carbono, el término se destina a indicar hidrocarburos con de 2 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como de 2 a 20 (ambos incluidos), tal como de 2 a 10 (ambos incluidos), por ejemplo de 2 a 5 (ambos incluidos); o de 15 a 30 átomos de carbono (ambos incluidos).

20 El término "alquino" se destina a indicar un hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico que comprende al menos un enlace triple de carbono-carbono, y éste puede opcionalmente comprender uno o más enlaces dobles de carbono- carbono. A menos que sea especificado con otro número de átomos de carbono, el término se destina a indicar hidrocarburos con de 2 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como de 2 a 20 (ambos incluidos), tal como de 2 a 10 (ambos incluidos), por ejemplo de 2 a 5 (ambos incluidos); o de 15 a 30 átomos de carbono (ambos incluidos).

El término "compuesto aromático homocíclico" se destina a indicar hidrocarburos aromáticos, tal como benceno y naftaleno.

25 El término "compuesto heterocíclico" se destina a indicar un compuesto cíclico que comprende 5, 6 ó 7 átomos de anillo donde 1, 2, 3 o 4 son hetero átomos seleccionados de N, O y/o S. Ejemplos de compuestos heterocíclicos aromáticos incluyen tiofeno, furano, pirano pirrol, imidazol, pirazolo, isotiazol, isooxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, al igual que sus equivalentes parcialmente o completamente hidrogenados, tal como piperidina, pirazolidina, irrolidina, pirolínea, imidazolidina, imidazolina, piperazina y morfolina.

30 Los términos, "hetero alcano" "hetero alquino" y "hetero alqueno" se destinan a indicar alcanos, alquenos y alquinos tal como se ha definido anteriormente, en el que uno o más heteroátomo o grupo ha sido insertado en la estructura de dichas fracciones. Ejemplo C1-C6-alquilo. Ejemplos de heteroalcanos incluyen.

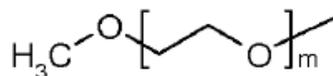


35 El término "radical" o "biradical" se destina a indicar un compuesto donde uno o dos, respectivamente, átomos de hidrógeno han sido quitados. Cuando específicamente declarado, un radical puede también indicar la fracción formada por la eliminación formal de un grupo más grande de átomos, por ejemplo hidróxilo, de un compuesto.

El término "halógeno" se destina a indicar elementos del grupo séptimo principal de la tabla periódica, por ejemplo F, Cl, Br e I.

El término "PEG" se destina a indicar polietilenglicol de un peso molecular entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.000.000 Da, sus análogos incluidos, donde por ejemplo el grupo OH terminal ha sido sustituido por un grupo alcoxi, tal como por ejemplo un grupo de metoxi, un grupo etoxi o un grupo de propoxi. En particular, el PEG donde el grupo terminal-OH ha sido sustituido por metoxi se denomina mPEG.

- 5 El término "mPEG" (o mejor dicho "mPEGil") significa un radical polidisperso o monodisperso de la estructura



10 donde m es un número entero mayor que 1. Así, un mPEG donde m es 90 tiene un peso molecular de 3991 Da, es decir aprox 4kDa. Asimismo, un mPEG con un peso medio molecular de 20 kDa tiene una m media de 454. Debido al proceso para producir mPEG estas moléculas frecuentemente tienen una distribución de pesos moleculares. Esta distribución es descrita por el índice de polidispersidad.

15 El término "índice de polidispersidad" como se utiliza en este caso significa la proporción entre el peso molecular del promedio en peso y el peso molecular del promedio en número, como conocido en la técnica de química polimérica (ver por ejemplo "Polymer Synthesis and Characterization", J.A. Nairn, University of Uta, 2003). El índice de polidispersidad es un número que es mayor de o igual a uno, y se puede estimar de datos de Gel Permeation Chromatographic. Cuando el índice de polidispersidad es 1, el producto es monodisperso y está así compuesto por compuestos con un único peso molecular. Cuando el índice de polidispersidad es mayor de 1 esta es una medida de la polidispersidad de ese polímero, es decir cómo de ancha es la distribución de polímeros con pesos diferentes moleculares.

20 El uso de, por ejemplo, "mPEG20000" en fórmulas, nombres de compuesto o en estructuras moleculares indica un residuo de mPEG donde mPEG es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

25 El índice de polidispersidad típicamente aumenta con el peso molecular de PEG o mPEG. Cuando se hace referencia es a 20 kDa PEG y en particular 20 kDa mPEG se destina a indicar un compuesto (o de hecho una mezcla de compuestos) con un índice de polidispersidad por debajo de 1,06, tal como por debajo de 1,05, tal como debajo de 1,04, tal como por debajo de 1,03, tal como entre 1,02 y 1,03. Cuando la referencia es hecha a 30 kDa PEG y en particular 30kDa mPEG ésta se destina a indicar un compuesto (o de hecho una mezcla de compuestos) con un índice de polidispersidad debajo de 1,06, tal como debajo de 1,05, tal como debajo de 1,04, tal como debajo de 1,03, tal como entre 1,02 y 1,03. Cuando la referencia es hecha a 40 kDa PEG y en particular 40 kDa mPEG ésta se destina a indicar un compuesto (o de hecho una mezcla de compuestos) con un índice de polidispersidad debajo de 1,06, tal como debajo de 1,05, tal como debajo de 1,04, tal como debajo de 1,03, tal como entre 1,02 y 1,03.

35 En el presente contexto, las palabras "proteína" y "péptido" son usadas de forma intercambiable y se destinan a indicar los mismos. El término "péptido" se destina a indicar un compuesto con dos o más residuos de aminoácidos enlazados por un enlace peptídico. Los aminoácidos pueden ser naturales o innaturales. El término es también destinado a incluir dichos compuestos sustituidos con otros péptidos, sacáridos, lípidos u otro mineral orgánico, al igual que compuestos donde uno o más residuos de aminoácidos han sido químicamente modificados. El término es también destinado a incluir péptidos a los que grupos protésicos son fijados. En particular, el péptido ejercita una actividad fisiológica, tal como por ejemplo terapéutica.

40 En el presente contexto, el término "arilo" se destina a indicar un radical de anillo aromático homocíclico o un radical de sistema anular fundido homocíclico donde al menos uno de los anillos son aromáticos. Grupos de arilo típicos incluyen fenilo, bifenililo, naftilo, tetralinil y similares.

45 El término "heteroarilo", como se utiliza en este caso, solo o en combinación, se refiere a un radical de anillo aromático con por ejemplo de 5 a 7 átomos de anillo, o a un radical de sistema de anillo aromático fundido con por ejemplo de 7 a 18 átomos de anillo, donde al menos un anillo es aromático y contiene uno o más heteroátomos como átomos de anillo seleccionados de nitrógeno, oxígeno o heteroátomos de azufre, donde n-óxidos y monóxidos de azufre y dióxidos de azufre son permisibles sustituciones heteroaromáticas. Ejemplos incluyen furanilo, tienilo, tiofenilo, pirrolil, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolil, oxadiazolilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, piridinilo, piridazinil, pirazinilo, pirimidinil, quinoleínilo, isoquinoleínilo, benzofuranilo, benzotiofenil indolil, indazolilo, y similares.

50 El término "conjuguar" como sustantivo se destina a indicar un péptido modificado, es decir un péptido con una fracción conectada a éste para modificar las propiedades de dicho péptido. Como verbo, el término se destina a indicar el proceso de unión de una fracción a un péptido para modificar las propiedades de dicho péptido.

El término "profármaco" como se utiliza en este caso se destina a indicar un compuesto que no o que necesariamente no tiene una actividad terapéutica pero que sobre administración se transforma en un compuesto

terapéuticamente activo por una reacción en el cuerpo. Típicamente tales reacciones son hidrólisis, por ejemplo por esterases u oxidaciones. Ejemplos de profármacos incluyen amidas biohidrolizables y ésteres biohidrolizables y también encierra a) compuestos en los que la funcionalidad biohidrolizable en tal profármaco se encierra en el compuesto según la presente invención, y b) compuestos que pueden ser oxidados o reducidos biológicamente a un dado grupo funcional para producir sustancias de fármaco según la presente invención. Ejemplos de estos grupos funcionales incluyen 1,4-dihidropiridina, n-alquicarbonilo-1,4-dihidropiridina, 1,4-ciclohexadieno, terc-butilo, y similares.

Como se utiliza en este caso, el término "éster biohidrolizable" es un éster de una sustancia de fármaco (en caso, un compuesto según la invención) que bien a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia progenitora pero confiere a esta sustancia propiedades ventajosas in vivo tales como duración de acción, aparición de acción, y similares, o b) es biológicamente inactivo pero es fácilmente convertido in vivo por el sujeto al principio biológicamente activo. La ventaja es, por ejemplo, solubilidad aumentada o que el éster biohidrolizable sea absorbido por vía oral del intestino y se transforme en un compuesto según la presente invención en plasma. Muchos ejemplos de tal se conocen en la técnica e incluyen por vía de ejemplo ésteres de alquilo inferiores (p. ej., C1-C4), ésteres de aciloxialquilo inferiores, ésteres de alcoxiaciloxialquilo inferiores, ésteres de alcoxiaciloxi, ésteres de alquilo de acilamino de alquilo y ésteres de colina.

Como se utiliza en este caso, el término "amida biohidrolizable" es una amida de una sustancia de fármaco (en caso, un compuesto según la presente invención) que bien a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia progenitora pero confiere en esta sustancia propiedades ventajosas in vivo tales como duración de acción, aparición de acción, y similares, o b) es biológicamente inactivo pero es fácilmente convertido in vivo por el sujeto al principio biológicamente activo. La ventaja es, por ejemplo solubilidad aumentada o que la amida biohidrolizable sea absorbida por vía oral del intestino y se transforme en un compuesto según la presente invención en plasma. Muchos ejemplos de tal se conocen en la técnica e incluyen por ejemplo amidas de alquilo inferiores, amidas de α -amino ácidos, amidas de alcoxiacil y amidas de alquilaminoalquilcarbonilo.

En el presente contexto, el término "sal aceptable farmacéuticamente" se destina a indicar sales que no son nocivas para el paciente. Tales sales incluyen sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables, sales metálicas aceptables farmacéuticamente, amonio y sales amónicas alquiladas. Sales de adición ácidas incluyen sales de ácidos inorgánicos al igual que ácidos orgánicos. Ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen, bromhídrico yodhídrico, fosfórico, ácidos sulfúricos nítricos y similares. Ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maléico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamóico, bismetileno, salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico p-aminobenzoico glutámico, benzenosulfónico, ácidos de p-toluensulfónico y similares. Más ejemplos de sales con adición de ácidos inorgánicos u orgánicos incluyen las sales farmacéuticamente aceptables catalogadas en J. Pharm. Sci. 1977, 66,2, . Ejemplos de sales metálicas incluyen litio, sodio, potasio, sales magnésicas y similares. Ejemplos de amonio y sales amónicas alquiladas incluyen amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, sales de tetrametilamonio y similares.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto como se utiliza en este caso significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o parcialmente detener las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto es definida como "cantidad terapéuticamente eficaz". Cantidades eficaces para cada fin dependerán de la gravedad de la enfermedad o herida al igual que del peso y estado general del sujeto. Será entendido que determinar una dosificación apropiada puede ser conseguido usando experimentación rutinaria, por construcción de una matriz de valores y puntos diferentes de análisis en la matriz, lo que está dentro de las habilidades comunes de un médico adiestrado o veterinario.

El término "tratamiento" y "tratar" como se utiliza en este caso significa la gestión y cuidado de un paciente con motivo de combatir una condición, tal como una enfermedad o un trastorno. El término se destina a incluir el espectro completo de tratamientos para una condición dada donde el paciente está sufriendo, tal como administración del compuesto activo para aliviar los síntomas o complicaciones, para retardar la progresión de la enfermedad, trastorno o condición, para aliviar o paliar los síntomas y complicaciones, y/o para curar o eliminar la enfermedad, trastorno o condición al igual que para prevenir la condición, donde prevención debe ser entendida como la gestión y cuidado de un paciente con motivo de combatir la enfermedad, condición o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones. El paciente a ser tratado es preferiblemente un mamífero, en particular un ser humano, pero pueden también incluirse animales, tales como perros, gatos, vacas, oveja y cerdos.

Descripción de la invención

Transglutaminasa (E.C.2.3.2.13) es también conocida como proteína-glutamina-\$-glutamyltransferasa y cataliza la reacción general



En un aspecto, Q-C(O)-NH₂ (aceptor de amina) representa una glutamina con péptido y Q'-NH₂ (donante de amina) luego representa un primer compuesto, como se ha indicado anteriormente, o Q-C(O)-NH₂ representa un primer compuesto como se ha indicado anteriormente y Q'-NH₂ luego representa una lisina con péptido. En un aspecto particular, no obstante, Q-C(O)-NH₂ representa una glutamina con péptido y Q'-NH₂ representa un primer compuesto como se ha indicado anteriormente.

Un donante de amina *in vivo* común es la lisina unida al péptido y la reacción anterior luego provee reticulación de péptidos. El factor de coagulación Factor XIII es una transglutaminasa que hace coagulación de sangre sobre heridas. Transglutaminasas diferentes difieren entre sí, por ejemplo en que residuos de aminoácidos alrededor del Gln se requieren para la proteína para ser un sustrato, es decir transglutaminasas diferentes tendrán péptidos diferentes con Gln como sustratos dependiendo de qué residuos de aminoácidos son vecinos del residuo de Gln. Este aspecto puede ser aprovechado si un péptido a ser modificado contiene más de un residuo de Gln. Si se desea selectivamente conjugar el péptido sólo en algunos de los residuos de Gln presentes, esta selectividad puede ser obtenida seleccionando una transglutaminasa que sólo acepta el residuo(s) de Gln pertinente como sustrato. Alternativamente, uno o más residuos de aminoácidos cerca un Gln puede ser alterado, por ejemplo mediante ingeniería genética para modificar la actividad de una transglutaminasa dada a dicho residuo de Gln.

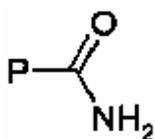
Es reconocido que un compuesto sea o no un sustrato para una enzima dada en principio depende de las condiciones de reacción, por ejemplo el bastidor de tiempo. Dado tiempo suficiente, muchos compuestos que no son normalmente considerados como sustratos son, de hecho, sustratos. Cuando se declara sobre esto que para una transglutaminasa dada algunos residuos de Gln pueden ser sustratos mientras otros no son se destina a indicar que "otros no son" al punto dónde la selectividad deseada puede todavía ser conseguida. Si uno o más residuos de Gln, que se desea que queden no conjugados, es, de hecho, un sustrato para transglutaminasa, no obstante, sólo si en el contacto con transglutaminasa para un periodo temporal extendido, selectividad puede ser conseguida eliminando o inactivando la transglutaminasa después de un tiempo adecuado.

Ejemplos de transglutaminasas útiles incluyen transglutaminasas microbianas, tal como por ejemplo de *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* y *Streptomyces griseocarneum* (todos descritos en US 5,156,956), y *Streptomyces lavendulae* (descritos en US 5,252,469) y *Streptomyces ladakanum* (JP2003199569).

Debe señalarse que elementos del género anterior de *Streptoverticilio* son ahora incluidos en el género *Streptomyces* [Kaempfen, J.Gen.Microbiol., 137, 1831-1892,1991]. Otras transglutaminasas útiles microbianas han sido aisladas de *Bacillus subtilis* (descritas en US 5,731,183) y de varios mixomicetos. Otros ejemplos de transglutaminasas útiles microbianas son aquellas descritas en WO 96/06931 (p. ej. transglutaminasa de *Lidicus* de bacilo) y WO 96/22366. Transglutaminasas útiles no microbianas incluyen transglutaminasa de hígado de conejillo de Indias, y transglutaminasas de varias fuentes marinas como el pescado plano *Pagrus major* (descritas en EP-0555649), y la ostra japonesa *gigas* de *Crassostrea* (descrita en US 5,736,356).

En un aspecto, Q'-NH₂, es decir, el primer compuesto como se ha indicado anteriormente, es un nitrógeno con nucleófilo, donde un nucleófilo se entiende como un compuesto básico rico de electrón que tiende a atacar el núcleo de carbono. Un nitrógeno con nucleófilo puede por ejemplo ser una amina o un derivado de oxi amina.

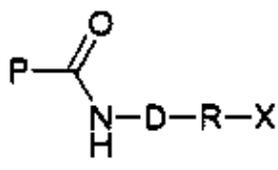
En un aspecto, la especificación describe un método de péptidos de conjugación, donde un residuo de Gln con péptido representado por la fórmula



se reacciona en uno o más pasos con un nitrógeno con nucleófilo (primer compuesto) representado por la fórmula

H₂N-D-R-X

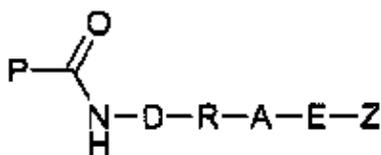
en presencia de una transglutaminasa para formar un péptido transaminado de la fórmula



opcionalmente dicho grupo latente funcional en X es luego activado, dicho péptido transaminado siendo además reaccionado con un segundo compuesto de la fórmula

Y-E-Z

- 5 para formar un péptido conjugado de la fórmula



donde D representa un enlace u oxígeno;

R representa un enlazador o un enlace;

- 10 X representa un radical que comprende uno o más grupos funcionales o grupos latentes funcionales no accesibles en los residuos de aminoácido que constituyen el péptido P-C(O)-NH₂;

Y representa un radical que comprende uno o más grupos funcionales que grupos reaccionan con grupos funcionales presentes en X, y que grupos funcionales no reaccionan con grupos funcionales accesible en el péptido P-C(O)-NH₂;

E representa un enlazador o un enlace;

- 15 A representa la fracción formada por la reacción entre el par de grupos funcionales comprendido en X y Y; y
Z es la fracción a ser conjugada al péptido.

Después de la conjugación, el péptido conjugado se puede aislar y purificar por técnicas bien conocidas en la técnica. El péptido conjugado puede también ser convertido en una sal aceptable farmacéuticamente o profármaco, si pertinente.

- 20 En particular, dicho método puede también comprender un paso donde el resultante péptido conjugado se formula como una composición farmacéutica.

- 25 La fracción A formada en la reacción entre los grupos funcionales de X e Y puede en principio ser de cualquier tipo dependiendo de qué propiedades del péptido conjugado final son deseadas. En alguna situación puede ser deseable tener un enlace lábil que se puede dividir en alguna fase posterior, por ejemplo por alguna acción enzimática o por fotólisis. En otras situaciones, puede ser deseable tener un enlace estable, de modo que un péptido estable conjugado se obtiene. Se hace una mención particular del tipo de fracciones formadas por reacciones entre derivados de amina y grupos de carbonilo, tal como oxima, hidrazono, fenilhidrazona y fracciones de semicarbazona.

- 30 En un aspecto los grupos funcionales de X e Y se seleccionan de entre grupos de carbonilo, tal como ceto y grupos de aldehído, y derivados de amino, tal como

derivados de hidracina-NH-NH₂,

derivados de carboxilato de hidracina-O-C(O)-NH-NH₂,

derivados de semicarbazida-NH-C(O)-NH-NH₂,

derivados de tiosemicarbazida-NH-C(S)-NH-NH₂,

- 35 derivados de dihidracida de ácido carbónico-NHC(O)-NH-NH-C(O)-NH-NH₂,

derivados de carbazida-NH-NH-C(O)-NH-NH₂,

derivados de tiocarbazida-NH-NH-C(S)-NH-NH₂,

derivados de hidracina de arilo-NH-C(O)-C₆H₄-NH-NH₂, y

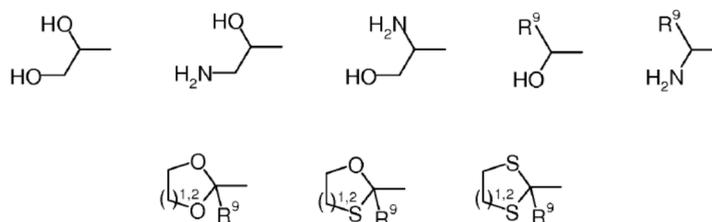
derivados de hidrácida-C(O)-NH-NH₂; o

derivados de oxilamina, tal como-O-NH₂,-C(O)-O-NH₂,-NH-C(O)-O-NH₂ y -NH-C(S)-O-NH₂.

- 5 Debe entenderse, que si el grupo funcional comprendido en X es un grupo carbonilo, luego el grupo funcional comprendido en Y es un derivado de amina, y viceversa. Debido a la presencia de grupos-NH₂ en más péptidos, se cree que es obtenida una mejor selectividad si X comprende una funcionalidad de ceto o de aldehído.

- 10 Otro ejemplo de un par adecuado de grupos funcionales presente en X e Y se deriva de azida (-N₃) y alquinas que reaccionan para formar una fracción de triazol. Todavía otro ejemplo de un par adecuado es alquina y nitril-óxido que reaccionan para formar una fracción de isooxazolidina.

Debe entenderse que el grupo funcional comprendido en X puede estar latente en el sentido de que tiene a ser activado antes de la reacción con Y-E-Z. Por ejemplo, X puede comprender una fracción que sobre reacción con un reactivo adecuado se transforma a un aldehído o una cetona. Ejemplos de tales fracciones incluyen



- 15 donde R⁹ representa H, C₁₋₆ alquilo, arilo o heteroarilo. Ejemplos Particulares incluyen metilo, etilo y propilo. Dichasfracciones se pueden transformar para un aldehído o cetona por oxidación con un agente adecuado, tal como por ejemplo peryodato, o por hidrólisis con un ácido acuoso, opcionalmente en presencia de un catalizador, tal como cobre, plata o sales de mercurio.

- 20 En particular, el compuesto de la fórmula (primer compuesto),

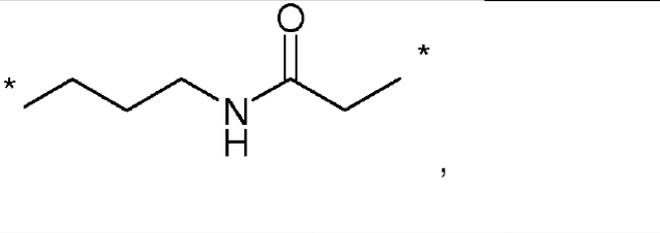
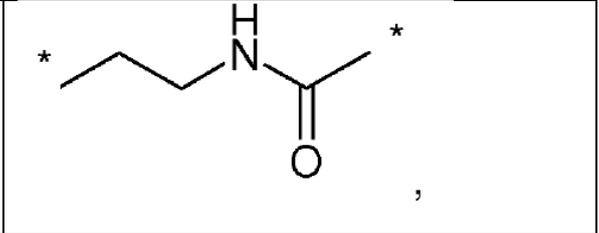
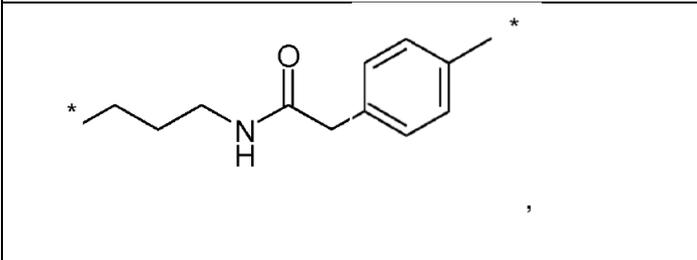
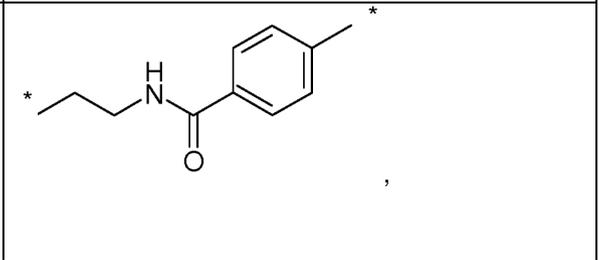
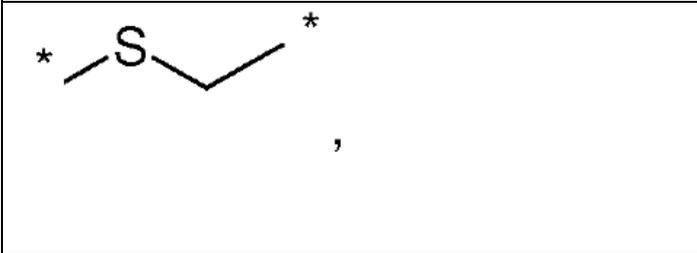
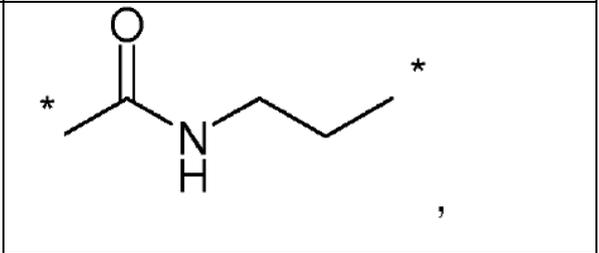
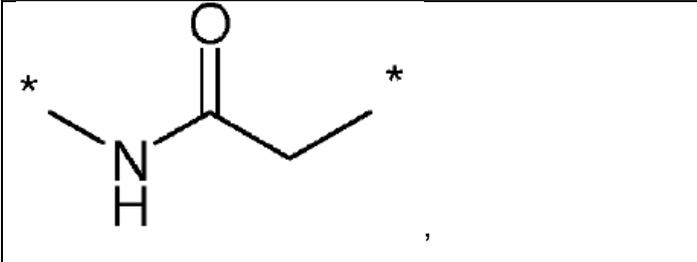
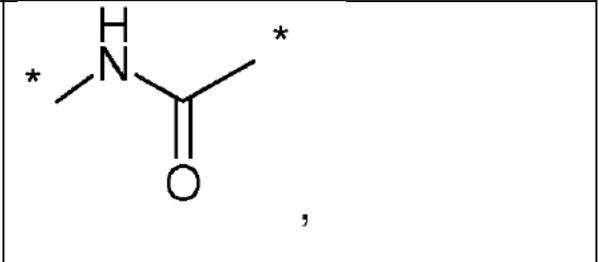
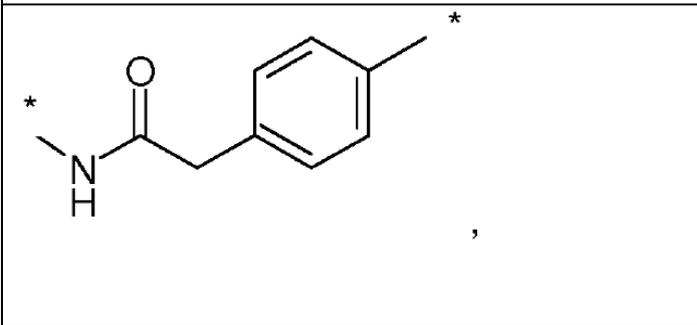
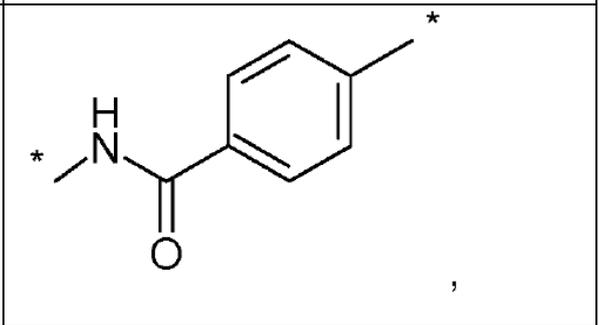
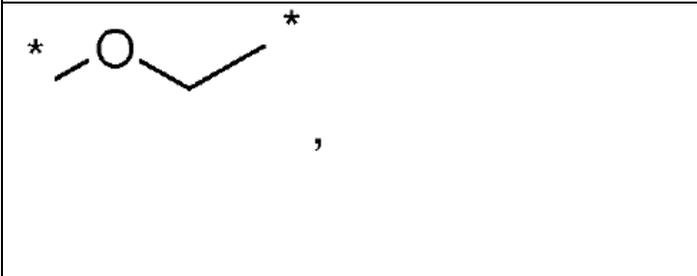
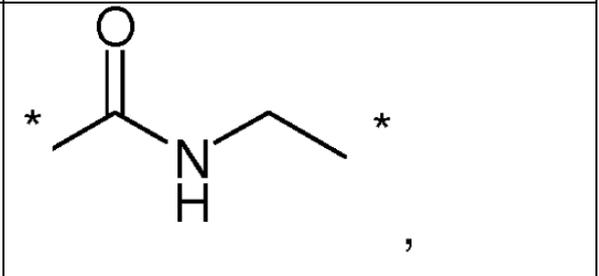
H₂N-D-R-X

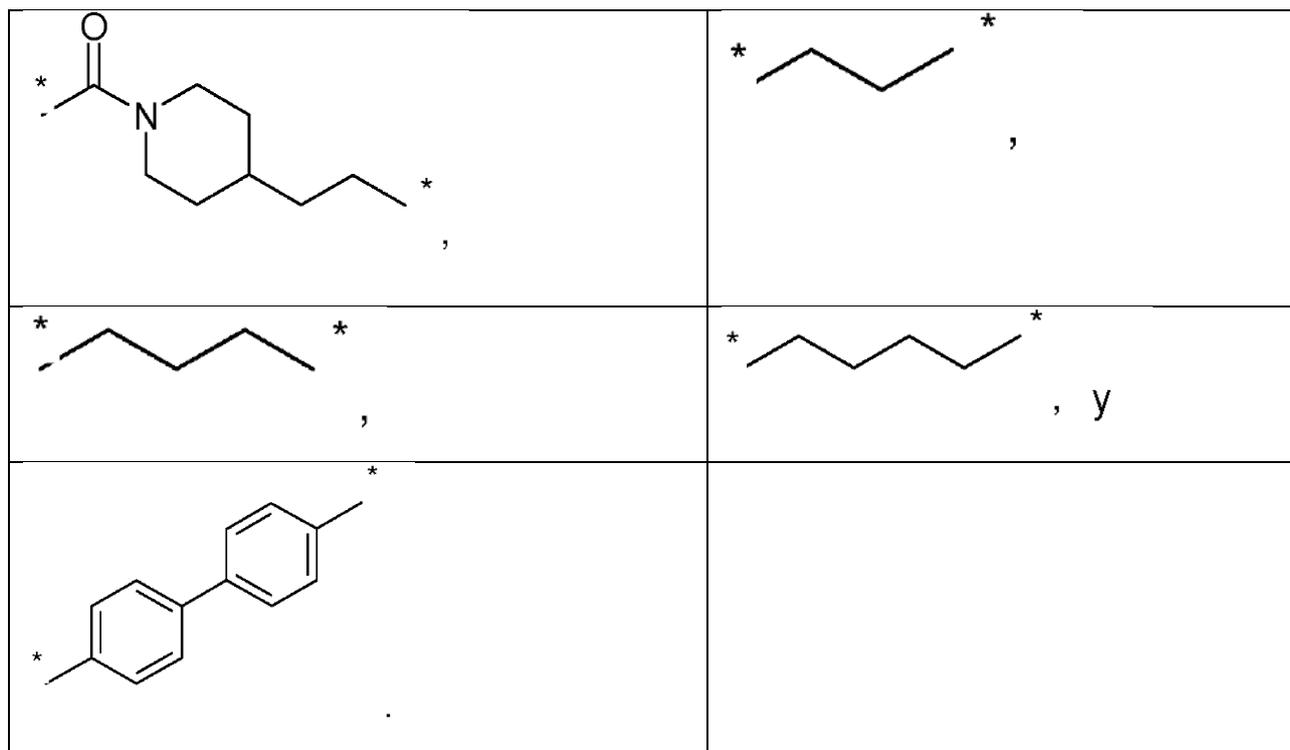
- 25 se puede seleccionar de entre 4-(aminometil)fenil etanona, 4-(2-aminoetil)fenil etanona, N-(4-acetilfenil) 2-aminoacetamida, 1-[4-(2-aminoetoxi)fenil]etanona, 1-[3-(2-aminoetoxi)fenil]etanona, 1,4-bis(aminoxi)butano, 3-oxapentano-1,5-dioxiamina, 1,8-diaminoxi-3,6-dioxaoctano, 1,3-bis(aminoxi)propano-2-ol, 1,11-bis(aminoxi)-3,6,9-trioxaundecano, 1,3-diamino-2-propanol, 1,2-bis(aminoxi)etano y 1,3-bis(aminoxi)propano.

- 30 Tanto el compuesto para transaminar (primer compuesto) y el compuesto para ser reaccionado con el péptido transaminado (segundo compuesto) comprenden un enlazador, R y E, respectivamente. Estos enlaces, que son independientes uno del otro, pueden estar ausentes o seleccionados de entre diradicales de alcano, alqueno o alquina y diradicales de hetero alcano, hetero alqueno y hetero alquina, donde uno o más biradicales opcionalmente sustituidos homocíclicos aromáticos o biradicales de un compuesto heterocíclico, por ejemplo fenileno o biradical de piperidina se pueden insertar en los biradicales mencionados. Debe entenderse que dichos enlaces pueden también comprender sustituciones por grupos seleccionados de entre hidróxilo, halógeno, nitro, ciano, carboxilo, arilo, alquilo y heteroarilo.

- 35 Ambos E y R representan vínculos o enlaces, y en el presente contexto el término "enlazador" se destina a indicar un funcionamiento de fracción como unos medios para separar Y de Z y X de NH₂-D-, respectivamente. Una función de los enlaces E y R puede ser para proporcionar flexibilidad adecuada en la conexión entre el péptido y la fracción conjugada Z. Ejemplos típicos de E y R incluyen, alquileno C₁₋₁₀ lineal, ramificado y/o cíclico, alquenileno C₂₋₁₀, alquinileno C₂₋₁₀, heteroalquileno C₂₋₁₀, heteroalquenileno C₂₋₁₀, heteroalquileno C₂₋₁₀, donde puede ser insertado uno o más biradicales de compuesto aromático homocíclico o biradical de compuesto heterocíclico.

Ejemplos Particulares de E y R incluyen

 <chem>CCCC(=O)N</chem>	 <chem>CCCC(=O)N</chem>
 <chem>CCCC(=O)Nc1ccc(C)cc1</chem>	 <chem>CCCC(=O)Nc1ccc(C)cc1</chem>
 <chem>CCSCC</chem>	 <chem>CCCC(=O)N</chem>
 <chem>CC(=O)NC</chem>	 <chem>CC(=O)NC</chem>
 <chem>CC(=O)Nc1ccc(C)cc1</chem>	 <chem>CC(=O)Nc1ccc(C)cc1</chem>
 <chem>CCOCC</chem>	 <chem>CCCC(=O)N</chem>



donde * denota puntos de unión

Una necesidad para modificar péptidos puede surgir para cualquier número de cuestiones, y esto es también reflejado en los tipos de compuestos que se pueden conjugar para péptidos según los métodos de la presente divulgación. Puede ser deseable conjugar péptidos para alterar las propiedades físico químicas del péptido, tal como por ejemplo para aumentar (o reducir) solubilidad para modificar la biodisponibilidad de péptidos terapéuticos. En otro aspecto, puede ser deseable modificar el índice del aclaramiento en el cuerpo conjugando compuestos al péptido que se enlaza a proteínas plasmáticas, tal como por ejemplo albúmina, o que aumenta el tamaño del péptido para prevenir o retrasar la secreción a través de los riñones. La conjugación puede también alterar y en particular reducir la susceptibilidad de un péptido para hidrólisis, tal como por ejemplo proteólisis de in vivo. En otro aspecto, puede ser deseable conjugar una etiqueta para facilitar análisis del péptido.

Ejemplos de tal marcador incluyen isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes y sustratos enzimáticos. En otro aspecto más, un compuesto se conjuga a un péptido para facilitar aislamiento del péptido. Por ejemplo, un compuesto con una afinidad específica a un material de columna particular se puede conjugar al péptido. Puede también ser deseable modificar la inmunogenidad de un péptido, por ejemplo al conjugar un péptido para esconder, enmascarar o eclipsar uno o más epítopos inmunogénicos en el péptido.

En un aspecto, la especificación proporciona un método de propiedades farmacológicas de mejora de péptidos. La mejora es con respecto al péptido correspondiente no-conjugado. Ejemplos de tales propiedades farmacológicas incluyen vida media de in vivo funcional, inmunogenicidad, filtración renal, protección de proteasa y unión de albúmina.

El término "vida media de in vivo funcional" se usa en su significado normal, es decir, el tiempo en el que 50% de la actividad biológica del péptido o péptido conjugado está todavía presente en el órgano del cuerpo/objetivo, o el tiempo en el que la actividad del péptido o péptido conjugado es 50% de su valor inicial. Como una alternativa para determinar la vida media de in vivo funcional, "vida media de plasma de in vivo" puede ser determinada, es decir, el tiempo en el que 50% del péptido o péptido conjugado circula en el plasma o flujo sanguíneo antes de ser esclarecido. Determinar la vida media de plasma es frecuentemente más simple que determinar la vida media funcional y la magnitud de vida media de plasma es normalmente una buena indicación de la magnitud de vida media de in vivo funcional. Términos alternativos para vida media de plasma incluyen vida media de suero, vida media circulante, vida media circulatoria, aclaramiento de suero, aclaramiento de plasma y vida media del aclaramiento.

El término "aumentado" como se usa en conexión con la vida media de in vivo funcional o vida media de plasma se utiliza para indicar que la vida media pertinente del péptido conjugado ha estadísticamente de forma significativa aumentado en relación a aquel del no-conjugado (progenitor) péptido, como determinado bajo condiciones comparables. Por ejemplo la vida media pertinente se puede aumentar por al menos aproximadamente 25%, tal como por al menos aproximadamente 50%, por ejemplo, por al menos

aproximadamente 100%, 150%, 200%, 250%, o 500%. En un aspecto, los compuestos de la presente divulgación muestran un aumento en la vida media de al menos aproximadamente 5 h, preferiblemente al menos aproximadamente 24 h, más preferiblemente al menos aproximadamente 72 h, y de la forma más preferible al menos aproximadamente 7 días, relativamente a la vida media del péptido progenitor.

5 Medición de vida media de plasma *in vivo* puede llevarse a cabo de varias formas como se describe en la bibliografía. Un aumento en la vida media de plasma de *in vivo* se puede cuantificar como una reducción en el aclaramiento (CL) o como un aumento en el periodo de permanencia media (MRT). Péptidos conjugados de la presente divulgación para que el CL disminuya a menos del 70%, tal como menos del 50%, tal que menos del 20%, tal que menos del 10% del CL del péptido progenitor como determinado en un ensayo adecuado, es
10 dicho que tiene una vida media de plasma de *in vivo* aumentado. Péptidos conjugados de la presente divulgación para que MRT se aumente a más del 130%, tal como más del 150%, tal como más del 200%, tal como más del 500% del MRT del péptido progenitor en un ensayo adecuado es dicho que tiene una vida de mitad de plasma de *in vivo* aumentado. Aclaramiento y periodo de permanencia media se puede evaluar en estudios farmacocinéticos estándar usando los animales de experimentación adecuados. Está dentro de las
15 capacidades de un experto en la técnica elegir un animal de prueba adecuada para una proteína dada.

Pruebas en el humano, por supuesto, representan la prueba definitiva. Típicamente, y como un ejemplo, los ratones, ratas, perros, simios o cerdos son inyectados con el compuesto de interés. La cantidad inyectada depende del animal de prueba. Posteriormente, muestras de sangre se toman durante un periodo de uno a cinco días, como sea apropiado, para la evaluación de CL y MRT. Las muestras de sangre son convenientemente
20 analizadas por técnicas de ELISA.

El término "Inmunogenicidad" de un compuesto se refiere a la capacidad del compuesto, cuando administrado a un humano, para suscitar una respuesta inmunitaria deletérea, ya sea, humoral, celular, o ambas. En cualquier sub- población humana, pueden existir individuos que muestran sensibilidad para proteínas particulares administradas. En un aspecto, el péptido conjugado de la presente divulgación muestra una reducción en la
25 inmunogenicidad de un individuo sensible de al menos aproximadamente 10%, preferiblemente al menos aproximadamente 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente 40% y más preferiblemente al menos aproximadamente 50%, relativamente a la inmunogenicidad para este individuo del péptido progenitor.

El término "protección de proteasa" o "proteasa protegida" como se utiliza en este caso se destina a indicar que el péptido conjugado de la presente divulgación es más resistente a la peptidasa de plasma o proteasas que el péptido progenitor. Proteasa y enzimas de peptidasa presentes en plasma se conocen por estar
30 implicadas en la degradación de proteínas circulantes.

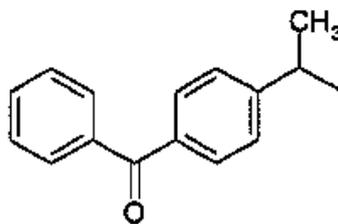
Resistencia de una proteína a la degradación por, por ejemplo, dipeptidil aminopeptidasa IV (DPPIV) se determina por el siguiente ensayo de degradación: partes alícuotas de la proteína (5 nmol) se incuban a 37 °C con 1 %L de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180
35 minutos en 100 %L de 0,1 M tampón de trietilamina-HCl, pH 7, 4. Reacciones enzimáticas se terminan por la adición de 5 %L de 10% ácido trifluoroacético, y los productos de degradación de proteína se separan y cuantifican mediante análisis de HPLC. Un método para realizar este análisis es: las mezclas se aplican sobre un vidac C18 poro ancho (30 nm poros, 5% m partículas) 250 x 4, 6 mm columna y eluido a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes lineales graduales de acetonitrilo en 0,1% ácido trifluoroacético (0% acetonitrilo durante 3 min, 0-24% acetonitrilo durante 17 min, 24-48% acetonitrilo durante 1 min) según Siegel et al., Regul. Pept. 1999, 79:93-102 y Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 1993,214:829-35. Proteínas y su productos de degradación se pueden monitorear por su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican por integración de su áreas de valor máximo relacionadas con aquellas de estándares. El índice de hidrólisis de una proteína por dipeptidil aminopeptidasa IV se estima en tiempos de
40 incubación que suponen menos que 10% del péptido siendo hidrolizado. En un aspecto, el índice de hidrólisis del péptido conjugado es menos que 70%, tal como menos que 40%, tal como menos que 10% del péptido progenitor.

El componente de proteína más abundante en la sangre circulante de especies mamíferas es albúmina de suero, que está normalmente presente a una concentración de aproximadamente 3 a 4,5 gramos por 100
50 mililitros de sangre. Albúmina de suero es una proteína de sangre de aproximadamente 70.000 daltons que tiene diferentes funciones importantes en el sistema circulatorio. Funciona como un transportador de una variedad de moléculas orgánicas encontradas en la sangre, como el transportador principal de varios metabolitos tal como ácidos grasos y bilirrubina a través de la sangre, y, debido a su abundancia, como un regulador osmótico de la sangre circulante. Albúmina de suero tiene una vida media superior a una semana, y un método para aumentar la vida media de plasma de proteínas ha sido conjugado a la proteína un grupo que enlaza a albúmina de suero.

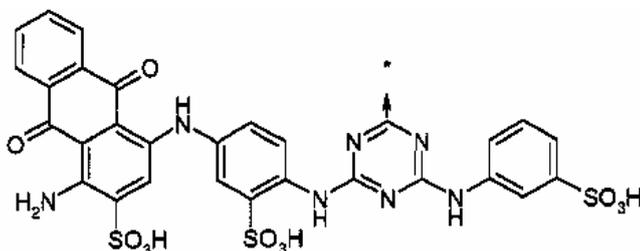
Propiedad de unión de albúmina se puede determinar como se describe en J.Med.Chem, 43, 2000, 1986-1992.

Ejemplos Particulares de Z incluyen radicales que comprenden una o más etiquetas, tal como marcadores fluorescentes, tal como radical de fluoresceína, radical de rodamina, radical de Texas Red ® y radical de proteína ficobili; sustratos enzimáticos, tal como radical de acetato de p-nitrofenol; e isótopos radiactivos, tal

- como Cu-64; Ga-67; Ga-68; Zr-89; Ru-97; Tc-99; Rh-105; Pd-109; In-111; I-123; I-125; I-131; Re-186; Re-188; Au-198; Pb-203; At-211; Pb-212 y Bi-212; fracciones orgánicas, tal como PEG o radicales de mPEG y derivados de amino de la misma (incluida PEG ramificada y lineal y radicales de mPEG); C1-22 alquilo lineal, ramificado y/o cíclico, alqueno C2-22, alquino C2-22, heteroalqueno C1-22, heteroalqueno C2-22, heteroalquino C2-22, donde uno o más biradicales de compuesto aromático homocíclico o biradicales de compuesto heterocíclico pueden ser insertados, y donde dichos radicales C1-C22 o C2-C22 pueden ser opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de hidróxilo, halógeno, carboxilo, heteroarilo y arilo, donde dicho arilo o heteroarilo puede opcionalmente ser además sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de hidróxilo, halógeno, y carboxilo; radicales de esteroide; radicales lípidos; radicales polisacáridos, por ejemplo dextranos; radicales de poliamida, por ejemplo radicales de ácido poliamínico; radicales de PVP; radicales de PVA; poli(1-3-dioxalano); poli(1,3,6-trioxano); polímero de etileno/anhídrido maléico; materiales de tinte de Cibacron, tal como azul Cibacron 3GA; cadenas de poliamida de longitud específica, como se describe en WO 00/12587 y almidón de hidroxialquilo, tal como, por ejemplo, almidón de hidroxietilo, tal como descrito en WO 03/074087 y WO 02/80979.
- Se hace una mención particular de alquilo C10-20, tal como C15 y C17, y en particular lineal C15 y C17, y derivados de benzofenona de la fórmula



Se hace una mención particular de Z comprendiendo un radical de cibacronilo como se ha esquematizado más abajo

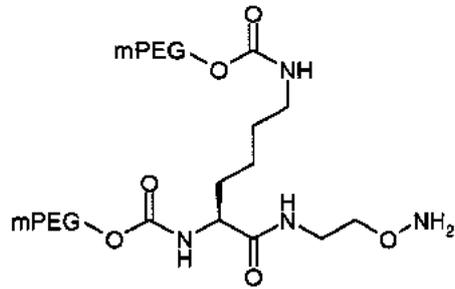


- PEG o mPEG conjugado a un péptido según la presente divulgación puede ser de cualquier peso molecular. En particular el peso molecular puede estar entre 500 y 1000.000 Da, tal como entre 500 y 500.000 Da, tal como entre 500 y 100.000 Da, tal como entre 500 y 60.000 Da, tal como entre 1000 y 40.000 Da, tal como entre 5000 y 40.000 Da. En particular, PEG con pesos moleculares de entre 10.000 Da y 40.000 Da, tal como entre 20.000 Da y 40.000 Da, tal como entre 20.000 y 30.000 Da o entre 30.000 y 40.000 Da puede ser utilizado. Se hace una mención particular de PEG o mPEG con un peso molecular de 10.000, 20.000, 30.000 o 40.000 Da.

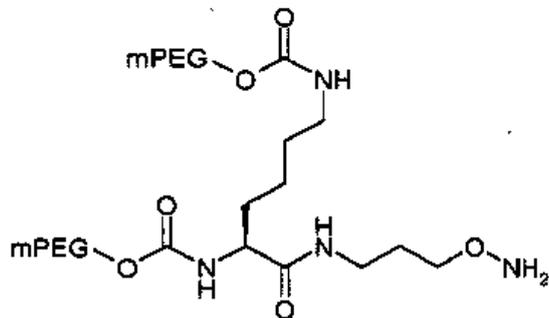
Z se puede ramificar de modo que Z comprende más de una de las etiquetas anteriormente mencionadas o radicales. Por ejemplo, mPEG40K es típicamente conseguido como un mPEG ramificado con dos brazos cada uno con un mPEG20k.

- En un aspecto, Z comprende una o más fracciones que se conocen por enlazar a proteínas plasmáticas, tal como por ejemplo albúmina. La capacidad de un compuesto para enlazar a albúmina se puede determinar como se describe en J. Med. Chem, 43, 2000, 1986-1992. En el presente contexto, un compuesto se define como unión a albúmina si Ru/Da está sobre 0,05, tal como sobre de 0,10, tal como sobre de 0,12 o incluso sobre de 0,15.
- En otro aspecto de la divulgación la fracción de unión de albúmina es un péptido, tal como un péptido que comprende menos que 40 residuos de aminoácidos. Varios pequeños péptidos que son fracciones de unión de albúmina, son descritos en el J. Biol. Chem. 277, 38 (2002)35035-35043.

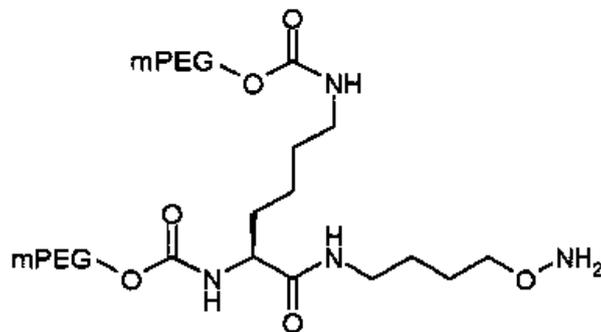
Ejemplos Particulares de compuestos de la fórmula Y-E-Z incluye



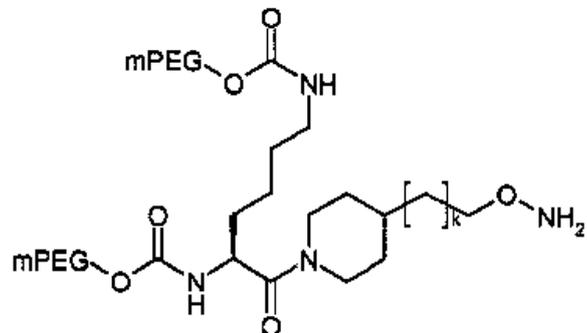
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



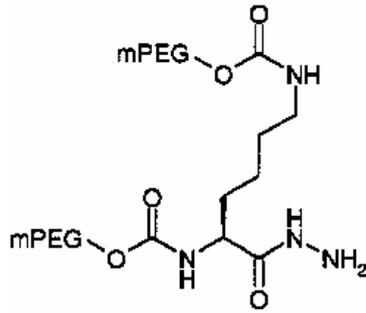
5 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



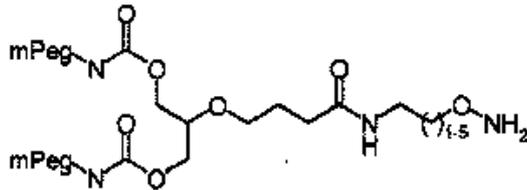
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



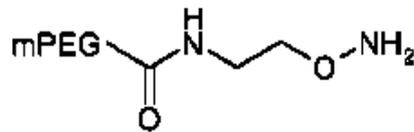
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

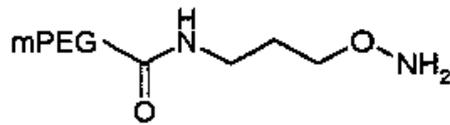


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa o 30 kDa,

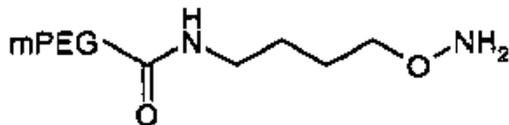


5

donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

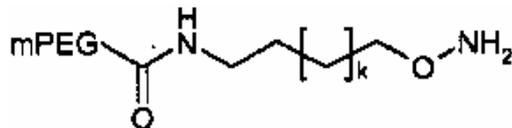


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

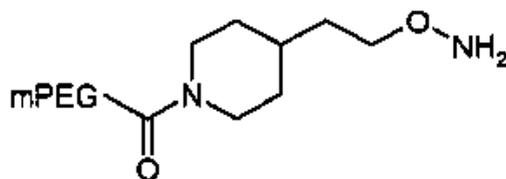


10

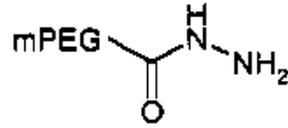
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



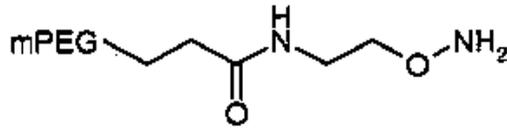
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



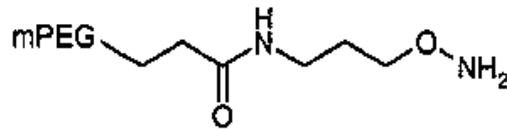
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



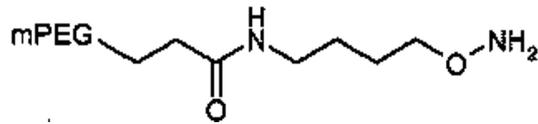
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



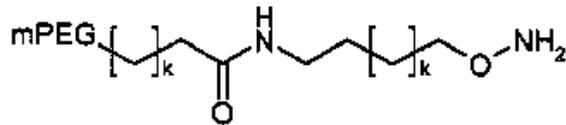
5 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

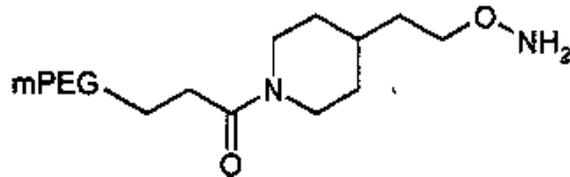


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

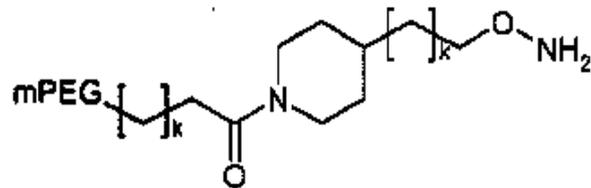


10

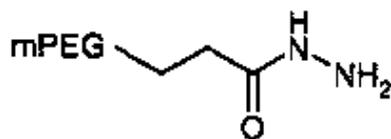
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



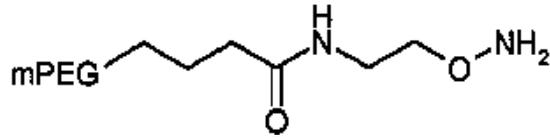
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



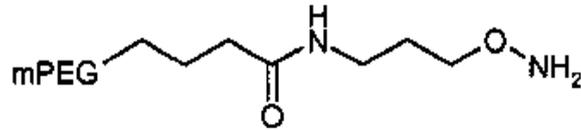
15 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



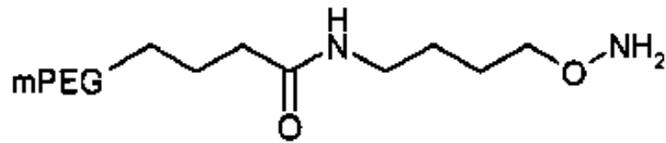
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



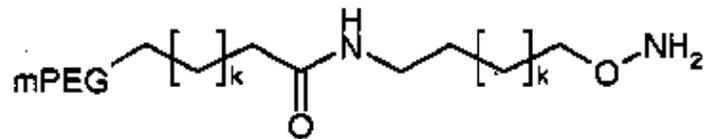
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



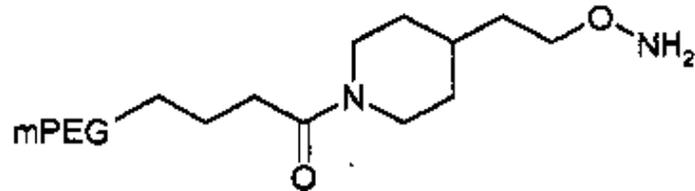
5 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

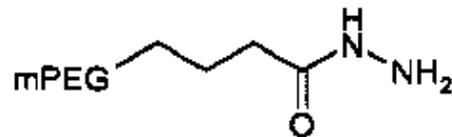


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

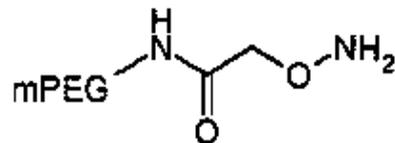


10

donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

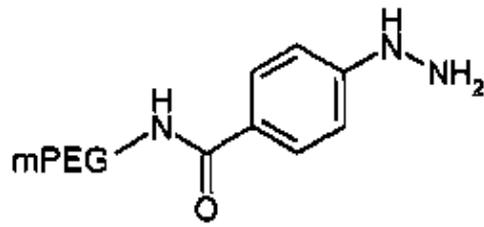


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

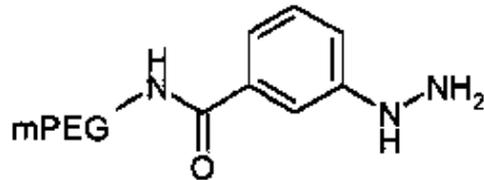


15

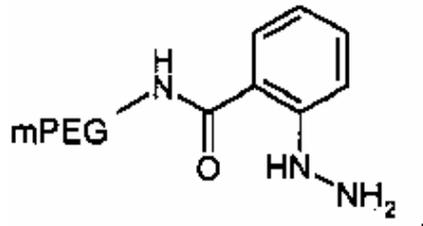
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

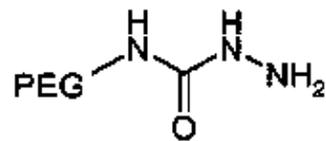


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

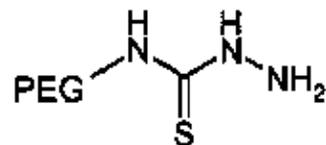


5

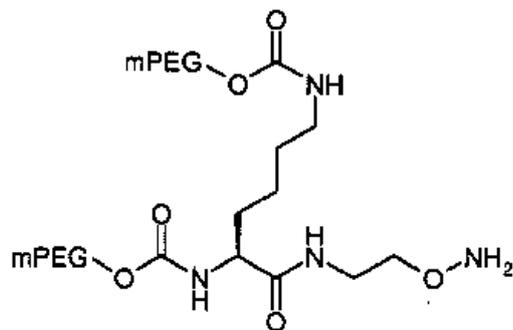
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



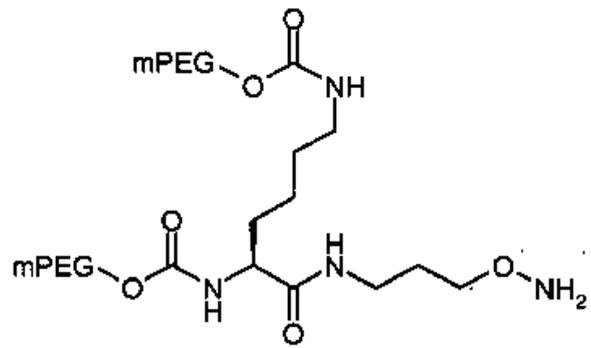
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



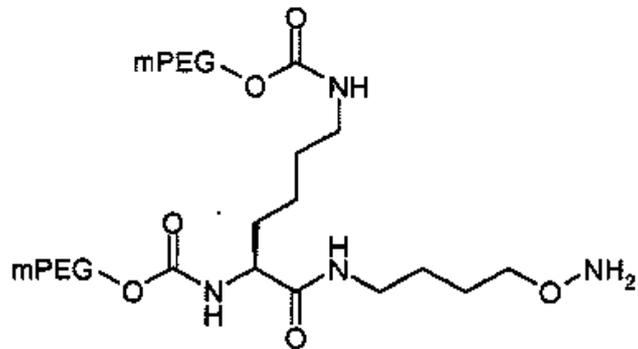
10 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



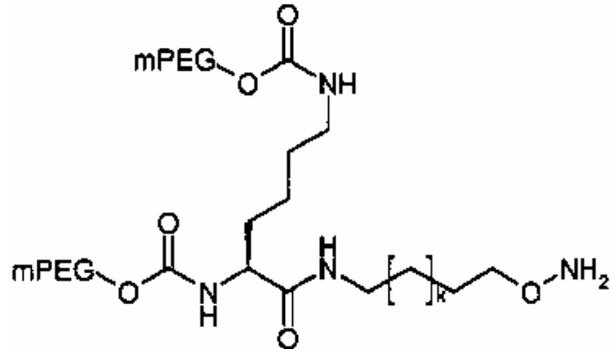
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

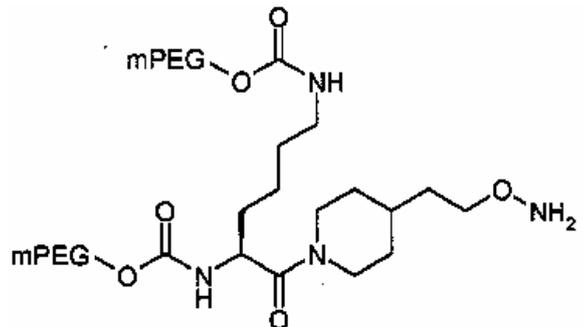


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

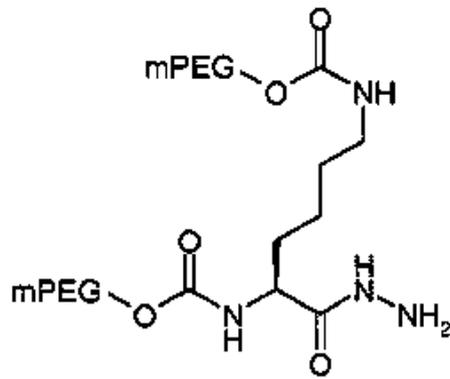


5

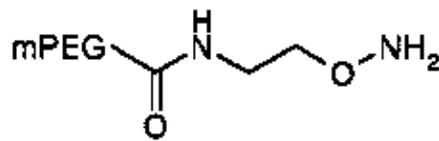
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



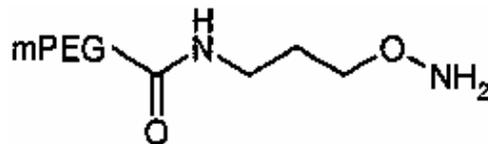
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

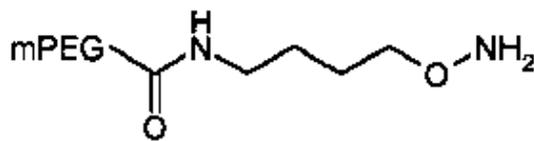


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

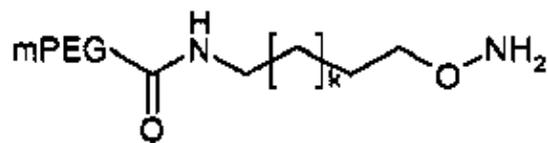


5

donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

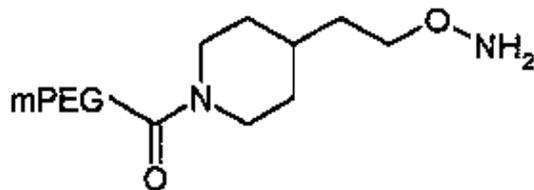


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

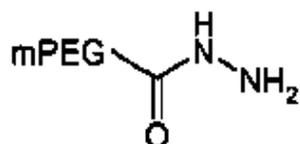


10

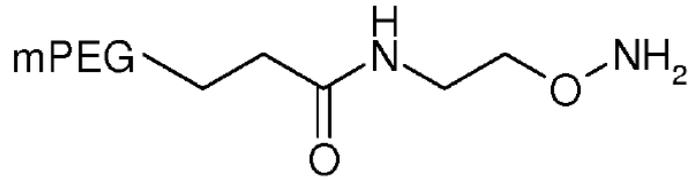
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



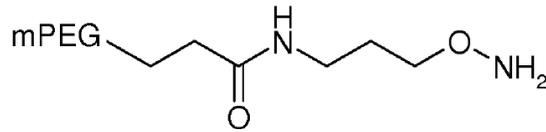
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



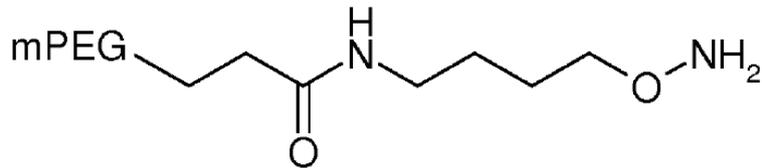
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



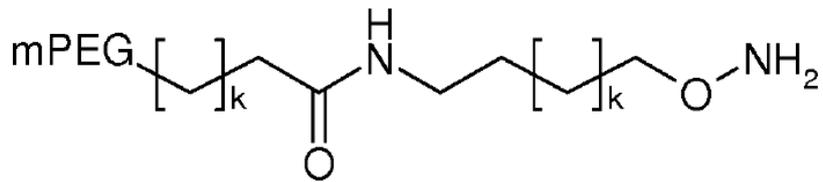
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



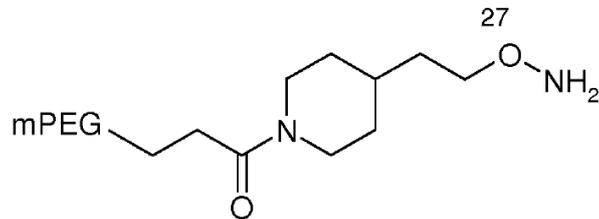
5 donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

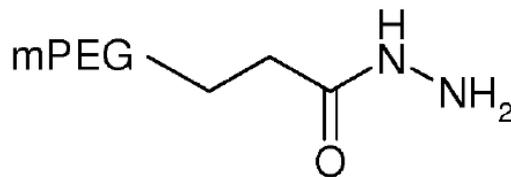


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

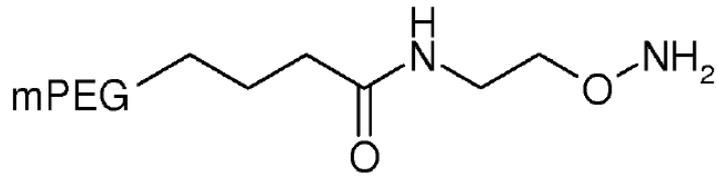


10

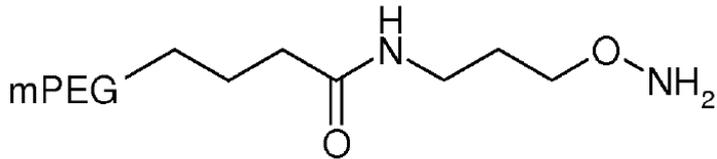
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa, donde



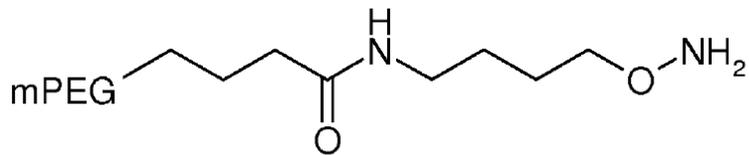
mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa, donde



mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

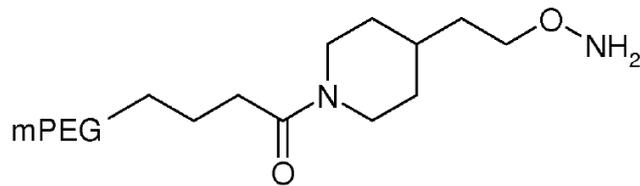


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

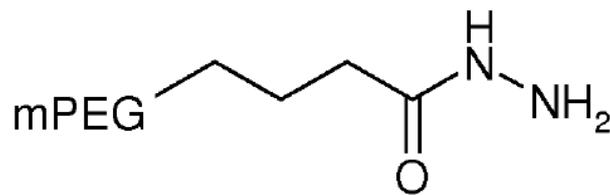


5

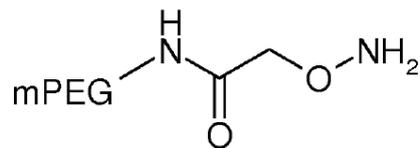
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

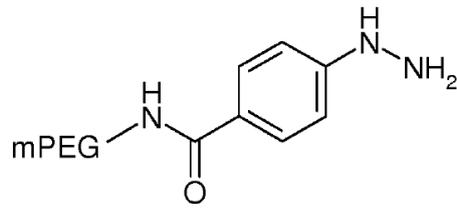


10 donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

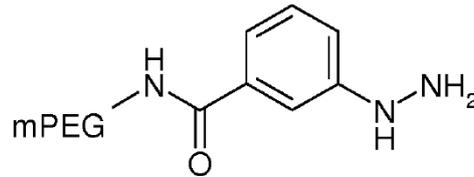


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

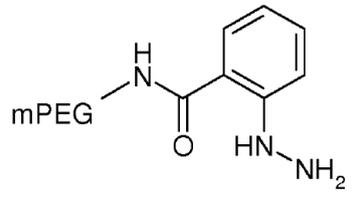
ES 2 642 214 T3



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

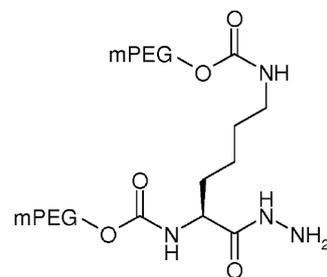


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

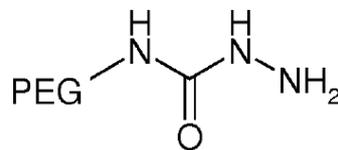


5

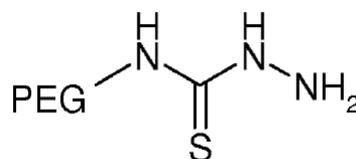
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



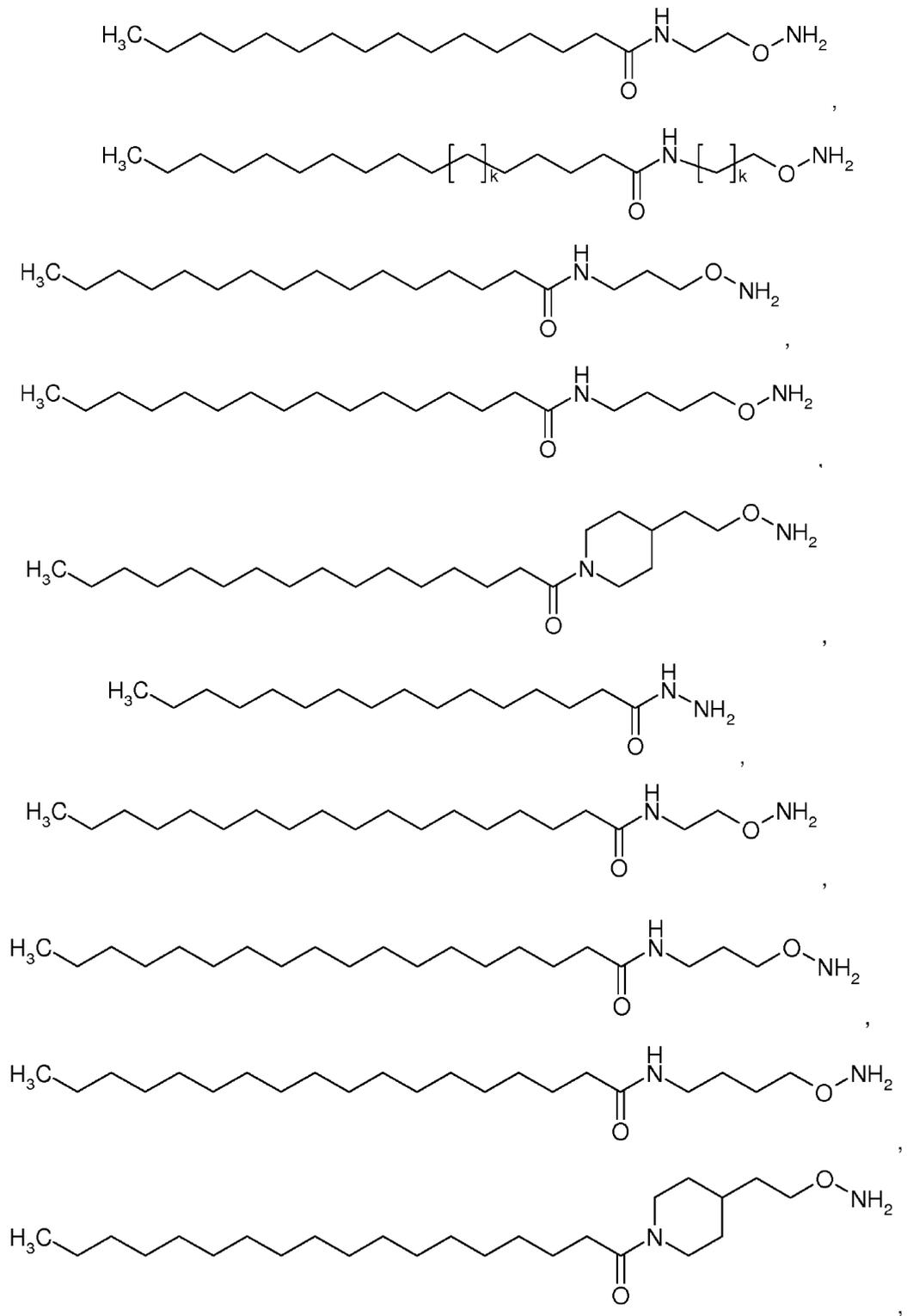
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa

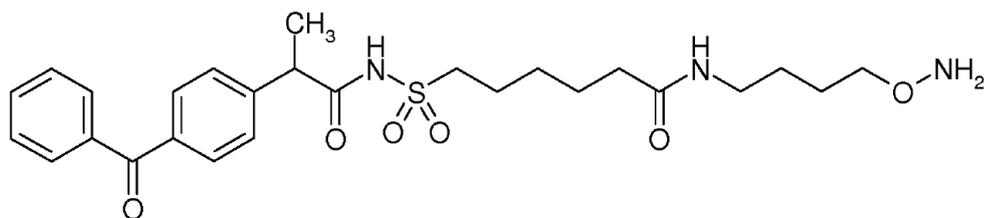
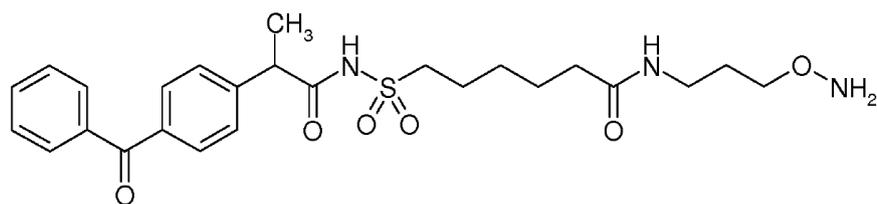
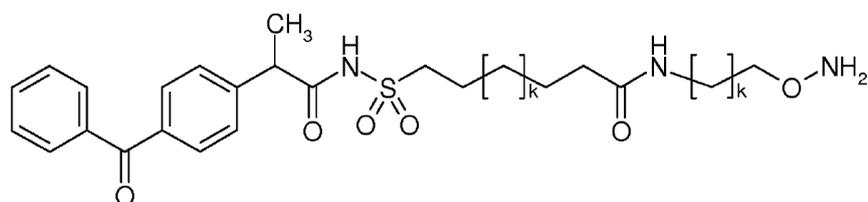
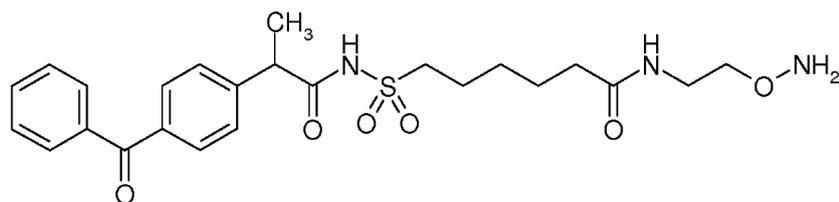
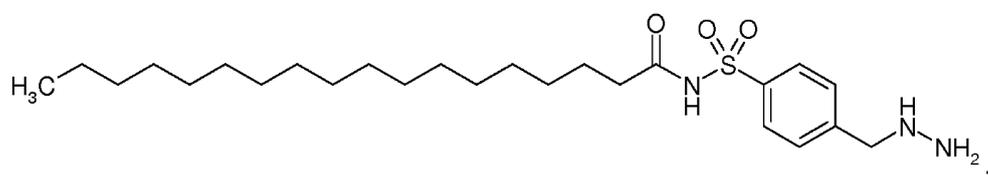
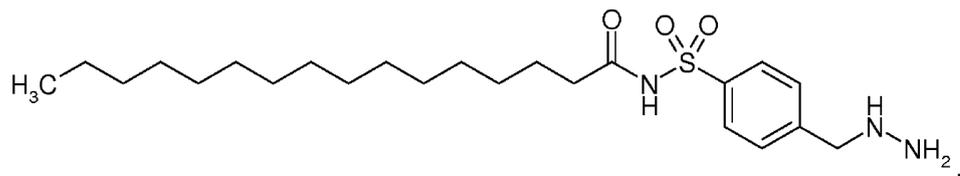
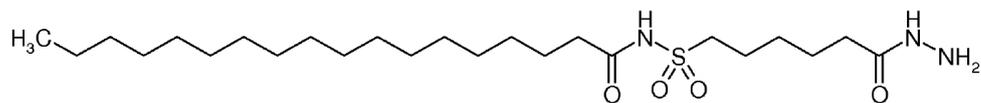
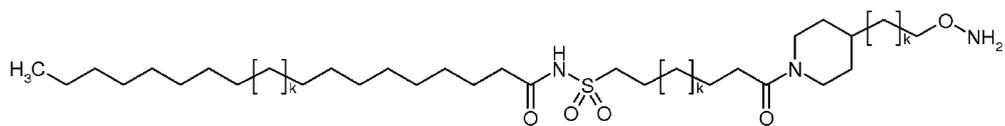


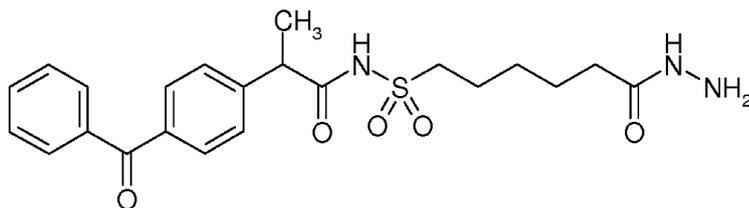
10 donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa







donde cada K en las fórmulas anteriores independientemente representa un número entero de 0 a 5, es decir 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

5 Como se explica en la parte "Antecedentes de la invención", la conjugación directa de por ejemplo PEG
 10 funcionalizada de amina o ácidos grasos para Gln con péptidos es conocida. Es, no obstante, claro a partir de
 los ejemplos descritos en, por ejemplo EP 950665, EP 785276, Sato, Adv. Drug Delivery Rev., 54, 459-476,
 2002 y Wada, Biotech. Lett., 23,1367-1372, 2001 que requiere un significativo exceso (hasta 100-1000 pliegue)
 del compuesto a ser conjugado al péptido para que la reacción proceda. Tal exceso constituye una limitación a
 la utilidad de la reacción en técnica o gran escala. Por ejemplo, mPEG con un pequeño índice de poli
 15 dispersidad es muy caro, y un requisito para un exceso grande es en practica prohibitivo. Por otra parte, para
 la conjugación de fracciones grandes, tal como por ejemplo PEG 10 kDa o PEG 20k Da, exceso del reactivo
 en el orden de 100-1000 pliegue no es realizable debido al peso molecular de tales compuestos. Es también
 bien conocido que la presencia de cantidades grandes de PEG es posible que precipite péptidos, es decir el
 péptido a ser conjugado y la transglutaminasa. En cambio aquí, el presente método en dos etapas ofrece la
 ventaja de que el reactivo que en el paso enzimático se requiere en gran exceso es una pequeña molécula que
 puede fácilmente ser manejada incluso en gran exceso. Con una selección apropiada del enlace que va a ser
 formado en el segundo paso no se requiere ningún gran exceso, como por ejemplo, formación de oxima
 tiene lugar a casi cantidades equimolares de amina y funciones de ceto.

20 Otra ventaja es la posibilidad de hacer péptidos "listos para conjugar". Un péptido se puede reaccionar con un
 nucleófilo adecuado (H₂ N-D-R-X) en presencia de una transglutaminasa para generar un péptido
 funcionalizado. Dicho péptido funcionalizado puede luego ser almacenado como sea necesario para ser
 reaccionado más tarde con uno o más segundos compuestos (Y-E-Z) para generar varios péptidos diferentes
 conjugados. Esto permite un péptido funcionalizado para ser usado para generar una multitud de péptidos
 25 conjugados. De esta manera, optimizaciones numerosas para identificar condiciones de reacción apropiadas
 pueden ser evitadas.

Un péptido tiene que ser un sustrato para transglutaminasa según los métodos de la presente divulgación. Es
 así un requisito que el péptido contenga un Gln o un residuo de Lys, y en particular un residuo de Gln. Si un
 péptido dado no es un sustrato de transglutaminasa es posible insertar uno o más residuos de Gln o Lys, y en
 particular Residuos de Gln en la secuencia peptídica para hacer del péptido un sustrato para
 30 transglutaminasa. En principio, tal Gln o residuo de Lys se puede insertar en cualquier posición en la secuencia,
 no obstante, es preferiblemente insertado en una posición dónde el fisiológico, tal como la actividad terapéutica
 del péptido no es afectada a un grado dónde el péptido no sea útil ya, por ejemplo en una intervención
 terapéutica. Inserciones de residuos de aminoácidos en péptidos se pueden causar por técnicas estándar
 conocidas por personas expertas en la técnica, tal como modificación postraduccional química o técnicas
 35 transgénicas.

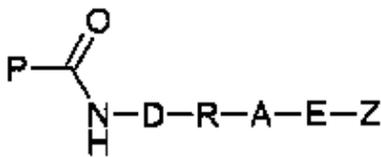
Cualquier péptido que sea sustrato para transglutaminasa se puede conjugar por los métodos de la presente
 divulgación, tal como por ejemplo enzimas, hormonas peptídicas, factores de crecimiento, anticuerpos, citocinas,
 receptores, linfoquinas y antígenos de vacuna, y se hace una mención particular de péptidos terapéuticos, tal
 como insulina, péptido 1 similar a glucagón (GLP-1), péptido 2 similar a glucagón (GLP-2), hormona de
 40 crecimiento, citocinas, péptidos factores de trébol (TFF), modificadores receptores de melanocortina peptídica y
 compuestos Factor VII.

Otras clases de péptidos o proteínas que son aplicables en los métodos de la presente divulgación incluyen
 enzimas. Muchas enzimas se usan para varios fines industriales, y se hace una mención particular de hidrolasas
 (proteasas, lipasas, celulasas, esterasas), oxidorreductasas (lacasas, peroxidasas, catalasas, dismutasas de
 45 superóxido, lipoxigenasas), transferasas e isomerasas.

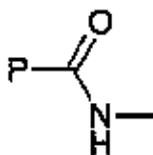
Péptidos a ser modificados según los métodos de la presente divulgación pueden bien ser aislados de fuentes
 naturales (p. ej. plantas, animales o microorganismos, tal como levadura, bacterias, hongos o vira) o ellos
 puede ser sintetizados. Péptidos de fuentes naturales también incluyen péptidos de fuentes transgénicas, por
 ejemplo fuentes que han sido genéticamente modificadas para expresar o para aumentar la expresión de un
 50 péptido, donde dicho péptido puede ser "natural" en el sentido que éste existe en la naturaleza o "innatural"
 en el sentido que éste sólo existe debido a intervención humana. Fuentes naturales de forma aislada de
 péptidos puede también ser sometidos a una modificación sintética antes de la conjugación de la presente
 divulgación.

En un aspecto, la especificación se refiere a péptidos conjugados obtenibles, tales como obtenidos según los métodos de la presente divulgación. Si el péptido conjugado obtenible, tal como por ejemplo obtenido por los métodos de la presente divulgación es un péptido terapéutico, la especificación también proporciona el uso de tales compuestos en la terapia, y composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos.

- 5 En un aspecto, la especificación proporciona péptidos conjugados de la fórmula



donde P, R, A, D, E y Z son tal como se ha definido anteriormente, y donde el grupo



- 10 representa un radical peptídico obtenido eliminando un hidrógeno de-NH₂ en la cadena lateral de un residuo de Gln, y sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y profármacos de las mismas.

Como se ha mencionado anteriormente, un péptido puede contener más de un residuo de Gln dónde el péptido puede ser conjugado. En este caso, la fórmula anterior está destinada también a indicar un péptido que ha sido conjugado en más de un sitio.

- 15 En tanto en cuanto el péptido no conjugado (P-C(O)-NH₂) es un péptido terapéutico, la especificación también se refiere al uso en la terapia de los péptidos conjugados, y en particular a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos péptidos conjugados.

- 20 Mucha enfermedades son tratadas usando más de un medicamento en el tratamiento, bien concomitantemente administrado o consecutivamente administrado. Está por lo tanto dentro del campo de la presente divulgación para usar los conjugados peptídicos de la presente divulgación en métodos terapéuticos para el tratamiento de una de la enfermedades anteriormente mencionadas en combinación con uno o más de los otros compuestos terapéuticamente activos normalmente usados en el tratamiento de dicha enfermedad. Por analogía, está también dentro del campo de la presente divulgación para usar los conjugados peptídicos de la presente divulgación en combinación con otros compuestos terapéuticamente activos normalmente usados en el tratamiento de una de las enfermedades anteriormente mencionadas en la producción de un medicamento para dicha enfermedad.

Como se ha mencionado anteriormente, péptidos terapéuticos conjugados según los métodos de la presente divulgación se pueden utilizar en la terapia y esto es también un aspecto de la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente especificación proporciona el uso de péptidos conjugados de la presente divulgación en diagnósticos.

- 30 Composiciones farmacéuticas

- Otro fin es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un péptido conjugado. La composición puede comprender además un sistema de tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) de quelante, estabilizadores y tensioactivos. En un aspecto de la divulgación la composición farmacéutica es una composición acuosa, es decir composición que comprende agua. Tal composición es típicamente una solución o una suspensión. En otro aspecto de la divulgación la composición farmacéutica es una solución acuosa. El término "composición acuosa" se define como una composición que comprende al menos 50 % p/p de agua. Asimismo, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % en peso de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50 % en peso de agua.

- 40 En otro aspecto la composición farmacéutica es una composición liofilizada, a lo cual el médico o el paciente adicionan solventes y/o diluyentes antes de uso.

En otro aspecto la composición farmacéutica es una composición seca (p. ej. de pulverización o liofilizada seco) preparada para uso sin alguna disolución previa.

En otro aspecto la especificación se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo una solución acuosa de un péptido conjugado, y un tampón, donde dicho péptido conjugado está presente en una concentración de 0,1-100 mg/ml o por encima, y donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 2, 0 a aproximadamente 10, 0.

- 5 En otro aspecto de la divulgación el pH de la composición se selecciona de la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, y 10,0.
- 10 En otro aspecto de la divulgación el tampón es seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicil-glicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas derivadas. Cada uno de estos tampones específicos constituyen un aspecto alternativo de la divulgación.
- 15 En otro aspecto de la divulgación la composición comprende además un conservante aceptable farmacéuticamente. En otro aspecto de la divulgación el conservante es seleccionado del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato metílico, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, hidroxibenzoato de P de butilo, 2-feniletanol, alcohol benzílico, clorobutanol, y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato etilo, bencetonio, cloruro clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1, 2-diol) o mezclas derivadas. En otro aspecto de la divulgación el conservante es presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el conservante es presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el conservante es presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el conservante es presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido al experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.
- 20
- 25

- En otro aspecto de la divulgación la aplicación la composición comprende además un agente isotónico. En otro aspecto de la divulgación el agente isotónico es seleccionado del grupo que consiste de una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. l-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanediol (propilenglicol), 1,3-propanediol, 1,3-butanediol) polietilenglicol (p. ej. PEG400), o mezclas derivadas. Cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluso por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo y carboximetilcelulosa-Na puede ser utilizada. En un aspecto el aditivo de azúcar es sacarosa.
- 30
- 35

- Alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 con al menos un grupo-OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En un aspecto el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Se pueden utilizar los azúcares o polialcoholes mencionados arriba individualmente o en la combinación. No hay límite fijo de la cantidad usada, puesto que azúcar o alcohol de azúcar es soluble en la preparación líquida y no tiene un efecto adverso en los efectos estabilizantes obtenidos usando los métodos de la divulgación. En un aspecto, la concentración de azúcar o de azúcar alcohólica está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el agente isotónico de aplicación está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el agente isotónico está presente en una concentración de 8mg/ml a 24 mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes específicos isotónicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.
- 40
- 45

- 50 En otro aspecto de la divulgación la composición comprende además un agente quelante. En otro aspecto de la divulgación el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico, y ácido aspártico, y sus mezclas derivadas. En otro aspecto de la divulgación el agente quelante es presente en una concentración de 0,1mg/ml a 5mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el agente quelante es presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2mg/ml. En otro aspecto de la divulgación el agente quelante es presente en una concentración de 2mg/ml a 5mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.
- 55

En otro aspecto de la divulgación la composición comprende además un estabilizador. El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

5 Más particularmente, composiciones de la divulgación son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen una proteína que posiblemente muestren formación agregada durante almacenamiento en composiciones farmacéuticas líquidas. Por "formación agregada" se entiende una interacción física entre las moléculas de proteína que da como resultado formación de oligómeros, que puedan permanecer solubles o ser grandes visibles agregados que se precipiten de la solución. Por "durante almacenamiento" se pretende que una composición líquida farmacéutica o composición una vez preparada, no sea inmediatamente administrada a un sujeto. Más bien, tras la preparación, se empaqueta para almacenamiento, bien en una forma líquida, en un estado congelado o en una forma seca para más tarde reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para administración a un sujeto. Por "forma seca" se pretende que la composición líquida farmacéutica o composición se seque bien por secado de congelación (es decir, liofilización; ver, por ejemplo, Williams and Polli (1984) J Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por pulverización (ver Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; and Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20), or air drying (Carpenter and Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; and Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). Formación agregada por una proteína durante almacenamiento de una composición líquida farmacéutica puede contrariamente afectar la actividad biológica de esta proteína, dando como resultado pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, formación agregada puede causar otros problemas tal como bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica con proteínas es administrada usando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender además una cantidad de una base de aminoácido suficiente para reducir formación agregada por la proteína durante almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, dónde cualquier aminoácido dado esté presente bien en su forma de base libre o en su forma de sal. Dónde una combinación de aminoácidos se usan, todos los aminoácidos puede estar presentes en sus formas de base libre, todos puede estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras otros están presentes en sus formas de sal. En un aspecto, aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones de la divulgación son aquellos llevando una cadena lateral cargada tal como arginina, lisina, ácido aspártico, y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L o D isómero, o mezclas derivadas) de un aminoácido particular (metionina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas derivadas) o combinaciones de estos estereoisómeros o glicina o una base orgánica tal como pero no limitado a imidazol, puede estar presente en las composiciones farmacéuticas de la divulgación mientras el aminoácido particular o base orgánica está presente bien en su forma de base libre o su forma de sal. En un aspecto el L-estereoisómero de un aminoácido se usa. En un aspecto el L-estereoisómero se usa.

Composiciones de la divulgación puede también ser formuladas con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido de origen natural que aporta el efecto deseado de disminución de formación agregada por la proteína durante almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la divulgación. Análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y arginina L de n-monoetil, análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácido se incorporan en las composiciones bien en su forma de base libre o su forma de sal. En otro aspecto de la divulgación los aminoácidos o análogos de aminoácido se usan en una concentración que es suficiente para prevenir o retrasar la agregación de la proteína.

En otro aspecto de la divulgación la metionina (u otros aminoácidos sulfúricos o aminoácidos análogos) se puede adicionar para inhibir oxidación de residuos de metionina para sulfóxido de metionina cuando la proteína que actúa como el agente terapéutico es una proteína que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima de especies de metionina oxidada en el tiempo.

50 La inhibición de oxidación de metionina produce retención superior de la proteína en su forma apropiada molecular.

Cualquier estereoisómero de metionina (isómero L o D) o cualquier combinación de las mismas se puede usar. La cantidad a ser adicionada debería ser una cantidad suficiente para inhibir oxidación de los residuos de metionina de manera que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% sulfóxido de metionina. Generalmente, esto se puede obtener por metionina de adición tal que la proporción de metionina adicionada a gamas de residuos de metionina de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.

En otro aspecto de la divulgación la composición comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos bajos moleculares. En otro aspecto de la divulgación el estabilizador se selecciona de glicol de polietileno (p. ej. PEG 3350), alcohol de polivinílico (PVA),

polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxixelulosa o derivados de los mismos (p. ej. HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias con azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol y diferentes sales (p. ej. sodio cloruro). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye un aspecto alternativo de la divulgación.

- 5 Las composiciones farmacéuticas puede también comprender agentes adicionales estabilizantes, que además mejoran estabilidad de una proteína terapéuticamente activa en esta. Agentes estabilizantes de interés particular a la actual divulgación incluyen, pero de forma no limitativa, metionina y EDTA, que protegen la proteína contra la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege la proteína contra la agregación asociada con congelación- descongelación o corte mecánico.
- 10 En otro aspecto de la divulgación la composición comprende además un tensioactivo. En otro aspecto de la divulgación el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, polímeros de bloque de polioxietileno de polioxipropileno (por ejemplo, poloxámeros tal como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno, polioxietileno y derivados de polietileno tal como derivados
- 15 alcoxilados y alquilados (tweens, por ejemplo Tween-20; Tween-40; Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, serina de fosfatidilo, colina de fosfatidilo, etanolamina de fosfatidilo, inositol de fosfatidilo, glicerol de difosfatidil y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-ésteres de
- 20 3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (alquilo eter)-derivados de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo lauroil y derivados de miristoil de Lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, que es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y el positivamente cargado DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroalcolípidos (por
- 25 ejemplo, galactopiranososa), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, ácido fusídico de derivados (p. ej. taurodihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de las mismas C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados de N^α- acilado de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N^α-acilado de dipéptidos que comprenden cualquier combinación
- 30 de lisina, arginina o histidina y un ácido neutral o ácido de amino, derivado de N^α-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutral y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, CAS n° de registro [577-11-7]), docusato de calcio, CAS n° de registro[128-49-4], docusato de potasio, CAS n° de registro [7491-09-0]), SDS (sulfato de dodecilo de sodio o sulfato de lauril de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados de lo mismo, ácidos biliares y sales derivadas y glicina o conjugados de taurina,
- 35 ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, deoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, n-Hexadecil-N, n-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, aniónico (alquil-aril-sulfonatos) tensioactivos monovalentes, tensioactivos zwitteriónicos (p. ej. N-alquil-N, N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (p. ej. bromuro de cetil- trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Dodecil β-D-
- 40 glucopiranosida) poloxaminas (por ejemplo, Tetronic's), que son copolímeros en bloque tetrafuncionales derivados de adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno para etilenodiamina, o el tensioactivo puede ser seleccionado del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas derivadas. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituyen un aspecto alternativo de la divulgación.

45 El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edición, 2000.

Es posible que otros ingredientes puedan estar presentes en la composición farmacéutica de la presente divulgación. Tales ingredientes adicionales puede incluir agentes de humidificación, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un ión híbrido (p. ej., un aminoácido tal

50 como betaina, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar contrariamente a la estabilidad total de la composición farmacéutica de la presente divulgación.

Composiciones farmacéuticas con un péptido conjugado se pueden administrar a un paciente en la necesidad de tal tratamiento en diferentes sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, piel y sitios mucosos, en sitios de

55 absorción de baipás, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

Administración de composiciones farmacéuticas según la divulgación puede ser a través de diferentes vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de las mismas, epidérmica,

dermal, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, para ejemplos a través de la conjuntiva, uretal, y parenteral a pacientes en la necesidad de tal tratamiento.

5 Composiciones de la divulgación actual se puede administrar en diferentes formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, bálsamos, pastas, emplastos, pomadas, comprimidos, comprimidos revestidos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, gelatina dura encapsula y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, esprays, polvo, aerosoles, inhalantes, gotas de ojo, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pessarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, solución de inyección, soluciones de transformación in situ, por ejemplo gelificación in situ, ajuste in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, solución de infusión e implantes.

10 Composiciones de la divulgación puede ser además compuestas en, o fijados a, por ejemplo a través de interacciones electroestáticas y covalentes hidrofóbicas, un portador de fármaco, sistema de administración de medicamentos y sistema de administración de medicamentos avanzado para además mejorar la estabilidad del conjugado, aumentar biodisponibilidad, aumentar solubilidad, reducir efectos adversos, conseguir cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, y aumentar adaptabilidad del paciente o cualquier combinación de las mismas. Ejemplos de soportes, sistemas de entrega de fármaco y sistemas de entrega de fármaco avanzados incluyen, pero de forma no limitativa, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, alcohol poli(vinílico), acrilado y polímeros de metacrilato, ácido poliglicólico y poliláctico y copolímeros en bloque de los mismos, glicoles de polietileno, proteínas portadoras, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas termogelificantes, por ejemplo sistemas co-poliméricos de bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de las mismas, fase L2 y dispersiones de las mismas, bien conocidos por los expertos en la técnica de comportamiento de fase en los sistemas de agua lipídica, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, auto-emulsionantes, auto-microemulsionable, ciclodextrinas y derivados de las mismas y dendrímeros.

25 Composiciones de la divulgación actual son útiles en la composición de sólidos, semi-sólidos, polvo y soluciones para administración pulmonar de un péptido conjugado usando por ejemplo un inhalador de dosis dosificada, inhalador de polvo seco y un nebulizador, todos siendo dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

30 Composiciones de la divulgación actual son en concreto útiles en la composición de sistemas de entrega de fármaco controlados, sostenidos, postergados, retardados y de liberación lenta. Más específicamente, pero no limitado a, composiciones son útiles en la composición de liberación parenteral controlada y sistemas de liberación sostenida (ambos sistemas conduciendo a una reducción múltiple en el número de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Incluso más preferiblemente, son sistemas de liberación controlada y liberación administrados subcutáneos. Sin limitar el ámbito de la divulgación, ejemplos de sistema de liberación útil controlada y composiciones son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

40 Métodos para producir sistemas de liberación controlada útil para composiciones de la divulgación actual incluyen, pero de forma no limitativa, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsión, dispersión, homogenización de alta presión, encapsulación, secado por atomización, microencapsulación, coacervación, separación de fase, evaporación de solvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluido supercrítico. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Composition and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).

45 Administración parenteral puede ser realizada por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del péptido conjugado en forma de una pulverización pulmonar o nasal. Como una opción más, las composiciones farmacéuticas con el péptido conjugado pueden también ser adaptado para administración transdérmica, por ejemplo por inyección sin aguja o de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ejemplo, bucal.

50 El término "composición estabilizada" se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada.

55 El término "estabilidad física" de la composición de proteína como se utiliza en este caso se refiere a la tendencia de la proteína para formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de exposición de la proteína a tensiones termomecánicas y/o interacción con interfaces y superficies que estén desestabilizando, tales como superficies e interfaces hidrofóbicas. Estabilidad física de las composiciones de proteína acuosa es evaluada mediante inspección visual y/o mediciones de turbidez tras exponer la composición llena en contenedores adecuados (p. ej. cartuchos o viales) a estrés mecánico/físico (p. ej. agitación) a temperaturas diferentes durante varios períodos de tiempo. Inspección visual de las composiciones

se realiza con una punto de luz preciso con fondo oscuro. La turbidez de la composición se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez, por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una composición que muestra ninguna turbidez corresponde a una puntuación visual 0, y una composición que muestra turbidez visual en la luz diurna corresponde a una puntuación visual 3). Una composición es clasificada físico inestable respecto a la agregación de proteína, cuando muestra turbidez visual en la luz diurna. Alternativamente, la turbidez de la composición se puede evaluar por mediciones de turbidez simple bien conocidas por el experto en la materia. Estabilidad física de las composiciones de proteína acuosa puede también ser evaluadas usando un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferiblemente una pequeña molécula que preferentemente se enlaza a un conformador no nativo de la proteína. Un ejemplo de una pequeña sonda molecular espectroscópica de estructura de proteína es tioflavina T. Tioflavina T es un tinte fluorescente que ha sido muy usado para la detección de fibrillas de amiloide. En presencia de fibrillas y quizás otras configuraciones de proteína también, tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión mejorada a aproximadamente 482 nm cuando está vinculada a una forma de proteína de fibrilla. La tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda.

Otras pequeñas moléculas se pueden usar como sondas de los cambios en la estructura de proteínas de estados nativos a no nativos. Por ejemplo las sondas "parche hidrofóbico" que enlazan preferentemente a parches hidrofóbicos expuestos de una proteína. Los parches hidrofóbicos están generalmente enterrados en la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero se exponen cuando una proteína empieza a desplegarse o desnaturalizarse. Ejemplos de estas pequeñas sondas moleculares espectroscópicas son colorantes aromáticos hidrofóbicos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de aminoácido de metal, tales como complejos de metal de cobalto de aminoácidos hidrofóbicos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, y valina, o similares.

El término "estabilidad química" de la composición de proteína como se utiliza en este caso se refiere a cambios covalentes químicos en la estructura de la proteína conduciendo a formación de productos de degradación química con menos potencia biológica potencial y/o potenciales propiedades inmunogénicas aumentadas en comparación con la estructura de proteína nativa. Varios productos de degradación química pueden ser formados dependiendo del tipo y naturaleza de la proteína nativa y el entorno al que la proteína se expone. Eliminación de degradación química puede más probablemente no ser completamente evitada y el aumento de las cantidades de productos de degradación química se ve frecuentemente durante almacenamiento y uso de la composición de proteína como bien es conocido por el experto en la materia. La mayoría de las proteínas son propensas a desamidación, un proceso en el que el grupo de amida de cadena lateral en el glutaminil o residuos de asparaginil se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras vías de degradación implican formación de productos de transformación de alto peso molecular dónde dos o más moléculas de proteína son de manera covalente enlazadas entre sí a través de transamidación y/o interacciones de disulfuro conduciendo a la formación de dímero de manera covalente enlazado, oligómero y productos de degradación polimérica (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). Oxidación (de por ejemplo residuos de metionina) se pueden mencionar como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la composición de proteína se puede evaluar por medición de la cantidad de los productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a condiciones diferentes medioambientales (la formación de productos de degradación puede frecuentemente ser acelerada por, por ejemplo, temperatura en aumento). La cantidad de cada producto de degradación individual es frecuentemente determinado por separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño y/o la carga de la molécula usando varias técnicas de cromatografía (p. ej. SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

Por lo tanto, como perfilado por encima, una "composición estabilizada" se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas. En general, una composición debe ser estable durante su uso y almacenamiento (de acuerdo con condiciones de almacenamiento y uso recomendadas) hasta que la fecha de caducidad sea alcanzada.

EJEMPLOS

El péptido a ser conjugado, disuelto en un solvente adecuado, tal como por ejemplo agua, se mezcla con el primer compuesto (como mencionado anteriormente) en 5 a 1000 exceso de pliegue y la transglutaminasa se añade. Transglutaminasas adecuadas son por ejemplo aquellas aisladas de *Streptomyces mobaraenese*, *Streptomyces lyticus* o hígado de conejillo de Indias. La cantidad de transglutaminasa a ser adicionada depende de la velocidad de reacción deseada. Cuanta más enzima se añada, más rápido irá la reacción. La temperatura puede ser ambiente o ligeramente elevada hasta aproximadamente 40°C. Cuando la reacción ha alcanzado un punto deseado, es decir un punto dónde una fracción deseada del péptido a ser conjugado ha sido funcionalizada, el segundo compuesto (como mencionado anteriormente) se añade para proveer el péptido conjugado. El péptido conjugado puede posteriormente ser purificado, por ejemplo por técnicas de columna. Uno o más pasos de purificación adicional puede también ser incluido anteriormente en la secuencia de reacción, por ejemplo para eliminar exceso del primer compuesto o para eliminar la enzima. En el segundo paso, la temperatura se puede elevar para aumentar la velocidad de reacción dado que este paso no depende de la

actividad enzimática. Condiciones de reacción típicas se pueden encontrar en Biochem., 35,13072-13080,1996, Bioconjugate Chem., 11, 502-509, 2000, y Bioconjugate Chem., 12, 701-710,1991.

Abreviaturas

5 TGase: transglutaminasa microbiana de mobaraenae de estreptoverticilio según US 5156956 o de *Streptomyces lydicus* según WO 9606931-A1.

Métodos analíticos:

Espectrometría de masas Maldi-Tof.

10 Pesos moleculares fueron determinados usando el instrumento Autoflex Maldi-Tof (Bruker). Muestras fueron preparadas según el método de sándwich. Matriz 1 fue una solución de 10 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico en 1 ml acetona. Matriz 2 fue una solución de 10 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico en 1 ml 50% acetonitrilo en agua. Muestras fueron preparadas en el aparato para consecutivamente aplicar 1 μ l matriz 1, secado de aire, aplicación 1 μ l 3% ácido trifluoracético, aplicación 1 μ l muestra, aplicación 1 μ l matriz 2, secado de aire, lavado por descarga de la placa de objetivo con agua y finalmente secado de aire. Los espectros fueron adquiridos usando una potencia de láser de 20% y el método estándar para el intervalo 3-20 kDa que fue suministrado con el instrumento.

RP-HPLC.

20 Análisis RP-HPLC fue realizado en un módulo de separación Waters 2690 equipado con un detector de red de diodos Waters 996. Una vidac 218TP54 4, 6mm x 250mm 5 μ m C-18 columna de sílice (The Separations Group, Hesperia) fue usada y la detección fue por UV a 214 nm, 254 nm, 280 nm y 301 nm. La columna fue equilibrada con 0,1% ácido trifluoracético / H₂O y eluida por un gradiente de 0 a 90% acetonitrilo contra 0,1% ácido trifluoracético /H₂O sobre 50 min a 42°C, con un flujo de 0, 5ml/min.

LC-MS

25 Análisis LC-MS fue realizado en un espectrómetro de masa PE-Sciex API 100 equipado con dos Microbombas Perkin Elmer Series 200, un automuestreador Perkin Elmer Series 200, un detector de UV Applied Biosystems 785A y un detector de dispersión de la luz vaporizable Sedex 75. Una columna de sílice de 3, 0 mm x 50 mm 5 μ C-18 de Waters Xterra fue eluida a 1, 5 ml/min a temperatura ambiente. Fue equilibrado con 5 % acetonitrilo / 0,1% ácido trifluoracético / H₂O y eluido durante 1,0 min con 5% acetonitrilo / 0,1% ácido trifluoracético / H₂O y luego con un gradiente lineal a 90% acetonitrilo / 0,1% ácido trifluoracético / H₂O sobre 7 min. La detección fue por detección UV a 214nm y dispersión vaporizable ligera. Una fracción del eluido de columna fue introducida en la interfaz de spray de iones de un espectrómetro de masas PE-Sciex API 100. El intervalo de masa 300-2000 amu fue escaneado cada 2 segundos durante el proceso.

Secuenciación de Edman:

35 Secuencias de aminoácidos fueron determinadas por degradaciones de Edman automatizadas usando un secuenciador de proteína de modelo de Applied Biosystem Model 494 esencialmente como se describe por el fabricante. En general 50 pmol de péptido fue usado para un análisis. Un residuo de aminoácido derivatizado de ácido graso o PEGilado muestra un ciclo de Edman en blanco.

Cuantificación de proteína

40 Concentraciones de proteína fueron estimadas por absorbencia de medición a 280 nm usando uno espectrofotómetro de UV. Un coeficiente de extinción molar de 16170 M⁻¹ cm⁻¹ fue usado. Cantidades fueron calculadas de volúmenes y concentraciones.

Mapeo de péptido enzimático para determinación de sitio(s) de derivatización.

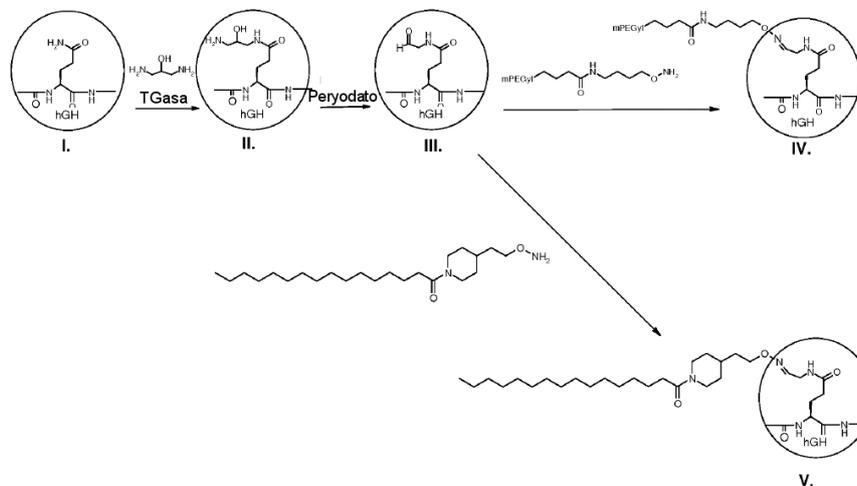
45 Mapeo péptido fue realizado usando digestión Asp-N de la proteína alquilada y reducida. Primero la proteína fue tratada con DTT (Ditiotreitol) e iodoacetamida según procedimientos estándar. El producto alquilado fue purificado usando HPLC. Posteriormente el producto purificado alquilado fue digerido durante toda la noche con endoproteasa Asp-N (Boehringer) a una proporción de enzima:substrato de 1:100. El digerido fue HPLC separado usando una columna C-18 y un sistema de tampón de ácido trifluoracético /acetonitrilo estándar. El mapa peptídico resultante fue comparado con el de hGH no derivatizado y fracciones con tiempos de retención diferente fueron recogidas y además analizadas usando el espectrómetro de masas Maldi-tof.

Página SDS

50 Electroforesis de gel de SDS poliacrilamida fue realizado usando NuPAGE 4%-12 % geles Bis-Tris (Invitrogen NP0321 BOX). Los geles fueron bañados de plata (Invitrogen LC6100) o bañados de Coomassie (Invitrogen

LC6065) y donde fue pertinente también bañados por PEG con yoduro de bario como se describe por M. M. Kurfurst en Anal.Biochem. 200(2):244-248,1992.

Esquema ilustrativo para la conjugación de hGH con mPEG o con una fracción lipofílica



- 5 I. hGH, hormona de crecimiento humana
- II. N^ε141-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH
- III. N^ε141-(2-oxo-etil) hGH
- IV. N^ε141-[2-(4-(4-(mpegil)butanoil)-amino-butiloxiimino)-etil] hGH
- V. N^ε141-[2-(1-(hexadecanoil)piperidina-4-il)etiloxiimino)-etil] hGH

10 Ejemplo 1. Trans-aminación de hGH (I.) para dar N^ε141-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.)

hGH (I.) (200 mg) fue disuelta en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8, 0,14 ml).

Esta solución fue mezclada con una solución de 1,3-Diamino-propan-2-ol (378 mg) disuelta en el tampón de fosfato (50 mM, 1 ml, pH 8,0, pH ajustado a 8,0 con ácido clorhídrico diluido después de disolución de 1,3-Diamino-propan-2-ol).

- 15 Finalmente una solución de TGasa (18 mg-40 U) disuelta en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8,0, 1ml) fue añadida y el volumen fue ajustado a 10 ml por adición de tampón de fosfato (50 mM, pH 8) dando una concentración de 1,3-Diamino-propan-2-ol a 0,2 M. La mezcla combinada fue incubada durante 4 horas a 37 °O.

- 20 La temperatura fue bajada a temperatura ambiente y N-etil-maleimida se añadió a una concentración final de 1mM.

Después de 1 hora la mezcla fue diluida con 10 volúmenes de tampón tris (50 mM, pH 8,5)

Ejemplo 2. Cromatografía de intercambio de iones de N^ε141-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.)

- 25 La solución que resulta del ejemplo 1. fue aplicada a una columna de MonoQ 10/100 GL (Amersham Biosciences cat. No. 17-5167-01) preequilibrado con tampón A (50 mM tris, pH 8,5). Este fue luego eluido a un flujo de 2 ml/min con un gradiente de 3% a 6% de tampón B (50 mM tris, 2 M NaCl, pH 8,5) en el tampón A más de 40 min. Fracciones fueron recogidas basadas en absorción de UV a 280 nm y análisis Maldi-Tof fue realizado en fracciones seleccionadas. Las fracciones correspondientes al valor máximo dado por el previsto pm según la espectrometría de masa de Maldi-Tof fueron agrupadas.

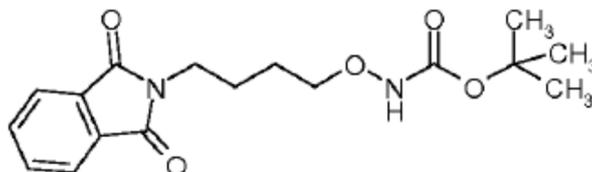
Ejemplo 3 Caracterización de N^ε141-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.)

- 30 Mapeo peptídico de la agrupación recogido en el ejemplo 2 mostró que el AA 130-146 de fragmento Asp-N mostró un aumento de masa de 73 amu correspondiente a la adición del alcohol de amino en la cadena lateral de un residuo de glutamina. Este fue el único péptido que tuvo tiempo de retención cambiado en el Mapa de HPLC cuando se comparó con el del hGH nativo. Este fragmento contiene dos residuos de glutamina. El

péptido fue sometido a secuenciación de Edman y se encontró Gln-137 en el rendimiento previsto, mientras que Gln-141 mostró un ciclo de Edman en blanco. Fue concluido, que la derivatización había tenido lugar selectivamente en Gln-141.

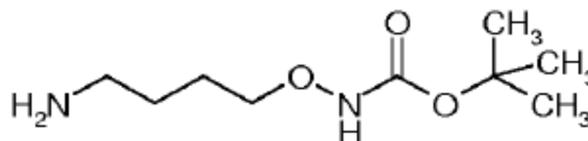
5 Ejemplo 4. Síntesis de N-(4-Aminooxi-butil)-4-mpegil-butiramida donde mpegil es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

Paso 1: 2-(4-(tert-Butoxicarbonilamino)butil)isoindol-1,3-diona



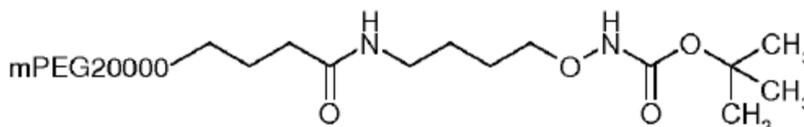
10 Para una mezcla de N-(4-bromobutil)ftalimida comercialmente disponible (2,82 g, 10 mmol) y N-Boc-hidroxilamina (2,08 g, 15,6 mmol) fue adicionado acetonitrilo (2 ml) y sucesivamente 1, 8-diazabicyclo[5, 4, 0]undec-7-eno (2,25 ml, 15 mmol). La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente durante 30 min y luego a 50°C durante 2 días. Fue diluida con una mezcla de agua (30 ml) y 1 ácido N clorhídrico (20 ml). Fue extraído con acetato de etilo (2 x 100 ml). La fase orgánica fue lavada con solución salina (50 ml) y fue secada sobre sulfato magnésico. El producto crudo fue purificado por cromatografía en el sílice (60 g), usando un gradiente de acetato de heptano/etilo 1:0 a 0:1 como eluyente para dar 2,08 g de 2-(4-(tert-butoxicarbonilamino)butil)isoindol-1,3-diona.

Paso 2: éster de tert-butilo de ácido N-(4-aminobutoxi)carbámico



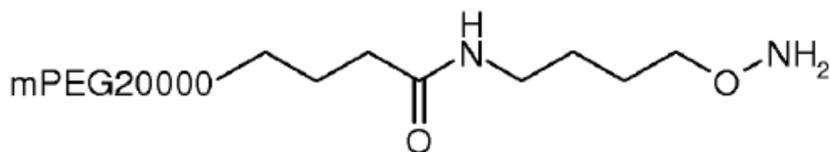
20 Hidrato de hidracina (1,0 ml, 20 mmol) fue añadido a una solución de 2-(4-(tert-butoxicarbonilamino)butil)isoindol-1,3-diona (2,08 g, 6,22 mmol) en el etanol (8,0 ml). La mezcla reactiva fue agitada a 80°C durante 65 h. El solvente fue quitado al vacío. El residuo fue disuelto en el tolueno (10 ml) y el solvente fue quitado al vacío. El residuo fue suspendido en 1 ácido clorhídrico N (10 ml). La precipitación fue quitada por filtración y fue lavada con agua (2 ml). El filtrado y los líquidos de lavado fueron combinados y hechos básico con carbonato potásico. La solución fue extraída con diclorometano (4 x 20 ml). El estrato orgánico fue secado sobre sulfato magnésico. El solvente fue quitado al vacío para dar 0,39 g de éster de terc-butilo ácido de N-(4-aminobutoxi)carbámico. Carbonato potásico (3 g) se añadió a la fase acuosa, que fue extraído con diclorometano (3 x 20 ml). Estas capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato magnésico. El solvente fue quitado al vacío para dar otros 0,39 g de éster de terc-butilo de ácido carbámico de N-(4-aminobutoxi).

Paso 3: éster de tert-butilo de ácido N-(4-(4-(mPEG2000il)butanolamino)butoxi)carbámico



30 El Ester de n-hidroxisuccinimida comercialmente disponible de ácido de mPEG2000ilbutanoico (Nektar "mPEG-SBA", # 2M450P01, 3 g, 0,15 mmol) fue disuelto en el diclorometano (25 ml). Éster de terc-butilo de ácido de N-(4-aminobutoxi)carbámico (0,12 g, 0,59 mmol) fue añadido. La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente. Éter dietílico fue añadido hasta que una precipitación se obtuvo. La precipitación fue aislada por filtración. El material fue Acido trifluoroacético (20 ml) se añadió a una solución de éster de terc-butilo de ácido carbámico de N-(4-(4-(mPEG2000il)butanolamino)butoxi)carbámico.

35



5 Acido trifluoroacético (20 ml) se añadió a una solución de éster de terc-butilo de ácido carbámico de N-(4-(4-(mPEG20000il)butanoli)amino)butoxi) (2,39 g, 0,12 mmol) en el diclorometano (20 ml). La mezcla reactiva fue agitada durante 30 min. Se añadió éter dietílico (100 ml). La precipitación formada fue aislada por filtración. Fue lavado con éter dietílico (2 x 100 ml) y secado al vacío para dar 1,96 g de N-(4-Aminoxibutil)-4-(mPEG20000il)butanoliamida.

Ejemplo 5. Oxidación de N^{ε141}-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.) para dar N^{ε141}-(2-oxoetil) hGH (III.)

10 El tampón de las fracciones agrupadas del ejemplo 2 con 48,7 mg de (II.) fue cambiado cuatro veces a un tampón de 15 mM trietanolamina pH 8,5 (ajustada con 1 N de ácido clorhídrico) usando un dispositivo de ultrafiltración Amicon Ultra-15 (Millipore). Finalmente la solución fue concentrada a 2 ml. A ésta fue añadido 2 ml de una solución de metionina de 100 mM en un tampón de trietanolamina de 15 mM a pH 8,5. Finalmente 0,4 ml de peryodato de sodio 25mM fue añadido el agua, y la mezcla fue incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Luego éste fue enfriado en el hielo y se añadió 1,6 ml de N,N-dimetilformamida helada.

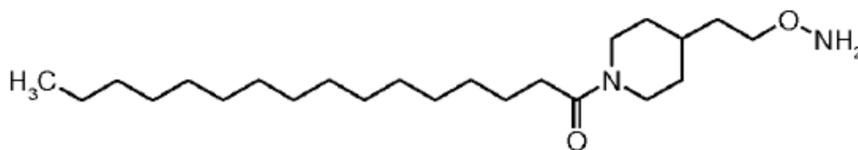
15 Ejemplo 6. Oximación de N^{ε141}-(2-oxo-etil) hGH (III.) con N-(4-Aminooxi-butil)-4-mpegil-butiramida para dar N^{ε141}-[2-(4-(4-(mpegil)butanoil)-amino-butiloxiimino)-etil] hGH (IV.) donde mpegil es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa

380 mg N-(4-Aminooxi-butil)-4-mpegil-butiramida fue disuelto en 4 ml de agua y pH ajustado a 6,0 con 1 N de ácido clorhídrico. La mezcla que resulta del ejemplo 5 fue luego adicionada lentamente mezclando suavemente y la reacción pasó a temperatura ambiente durante 72 h.

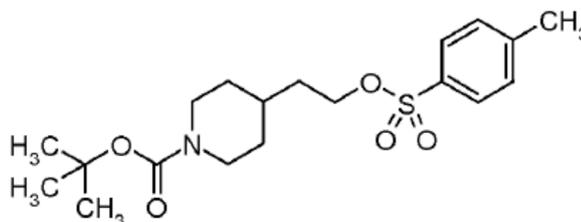
20 Ejemplo 7. Cromatografía de intercambio de iones de N^{ε141}-[2-(4-(4-(mpegil)butanoil)-amino-butiloxiimino)-etil] hGH (IV.) donde mpegil es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa

25 La solución que resultan del ejemplo 6 fue aplicada a una columna de MonoQ 10/100 GL (Amersham Biosciences cat. No. 17-5167-01) preequilibrada con tampón A (50 mM tris, pH 8, 5). Este fue luego eluido en un flujo de 0, 5 ml/min con un gradiente de 0% a 7% de tampón B (50 mM tris, 2 M NaCl, pH 8,5) en el tampón A sobre 1120 min. Fracciones fueron recogidas basadas en absorción de UV a 280 nm y análisis MALDI-tof fueron realizados en fracciones seleccionadas. Las fracciones correspondientes al valor máximo dando el pm esperado según la espectrometría de masa Maldi-Tof fueron agrupadas. Los análisis Maldi-Tof dieron un valor máximo ancho centrado alrededor de 43130 Da de acuerdo con la naturaleza polidispersa de mPEG. La página SDS mostró una única banda con un peso molecular aparente de 60 kDa. La banda bañada tanto con plata como con yoduro de bario, confirmando que era una proteína derivatizada de PEG. Estos resultados analíticos confirmaron que el compuesto de producto aislado fue un derivado mono pegilado de hGH.

Ejemplo 8. Síntesis de 1-[4-(2-(Aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona



Paso 1: éster de tert-butil de ácido 4-[2-(Toluena-4-sulfonilo)etil]piperidina-1-carboxílico



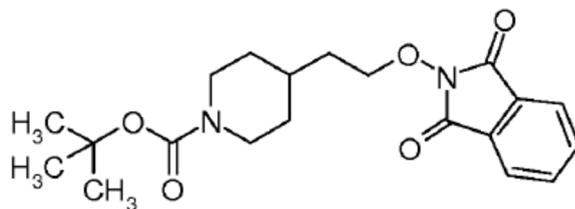
35 Cloruro de tosilo (4,16 g, 21,8 mmol) se añadió a una solución de éster de terc-butilo de éster de 4-(2-hidroxietil) piperidina-1-carboxílico disponible comercialmente (p. ej Aldrich 54, 724-7, 5,0 g, 21,8 mmol) y trietilamina (4,25 ml, 30,5 mmol) en el diclorometano (100 ml). La mezcla reactiva fue agitada a temperatura

ambiente durante 16 h. Éste fue diluido con acetato de etilo (300 ml) y lavado con un 10% de solución acuosa de sulfato de hidrógeno de sodio (200 ml). La fase acuosa fue extraída con acetato de etilo (150 ml). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (250 ml) y secada sobre sulfato magnésico. El solvente fue quitado al vacío. El producto bruto fue purificado por cromatografía de llamarada en el sílice (80 g), usando primero acetato/heptano de etilo: 1:2 luego 1:1 como eluyente, para dar 6,04 g de éster de terc-butilo de ácido 4-[2-(tolueno-4- sulfoniloxi)etil]piperidina-1-carboxílico.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,05 (m, 2 H); 1,45 (s, 9 H); 1,55 (m, 5 H); 2,50 (s, 3 H); 2,65 (t, 2 H); 4,05 (m, 4 H); 7,35 (d, 2 H); 7,80 (d, 2 H).

10 Paso 2:

Éster de tert-butil de ácido 4-[2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)etil]piperidina-1-carboxílico

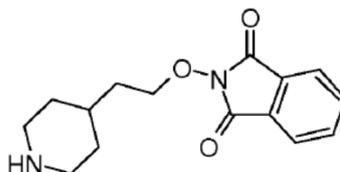


A 0°C , una suspensión de 60% de hidruro de sodio en el aceite mineral (0,69 g, 17,2 mmol) fue adicionado a una solución de N-hidroxifitalimida (2,80 g, 17,2 mmol) en N, N-dimetilformamida (20 ml). La mezcla reactiva fue agitada durante 45 min a 0°C . Una solución de éster de terc-butilo de ácido de 4-[2-(tolueno-4-sulfoniloxi)etil]piperidina-1-carboxílico (5,99 g, 15,6 mmol) en N, N-dimetilformamida (15 ml) y yoduro de tetrabutilamonio (0,17 g, 0,47 mmol) fueron adicionados sucesivamente. La mezcla reactiva fue calentada a 60°C durante 2 días y enfriada a temperatura ambiente. Agua (5 ml) fue añadida cuidadosamente. La mezcla reactiva fue diluida con acetato de etilo (250 ml) y lavada con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (200 ml). La fase acuosa fue extraída con acetato de etilo (200 ml). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (150 ml) y secada sobre sulfato magnésico. El solvente fue quitado al vacío. El producto bruto fue purificado por cromatografía de llamarada en el sílice (80 g), usando acetato/heptano de etilo 1:1 como eluyente para dar 4,36 g de éster de terc-butilo de ácido 4-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)etil]piperidina-1-carboxílico.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,15 (m, 2 H); 1,50 (s, 9 H); 1,75 (m, 5 H); 2,75 (m, 2 H); 4,10 (m, 2 H); 4,30 (t, 2 H); 7,80 (m, 4 H).

Paso 3:

2-(2-(Piperidina-4-il)etoxi)isoindol-1,3-diona

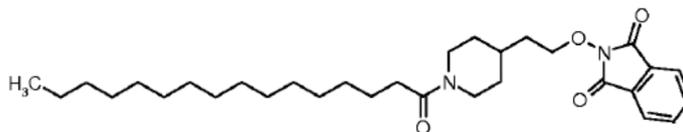


Ácido trifluoroacético (20 ml) se añadió a una solución de éster de terc-butilo de ácido 4-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)etil]piperidina-1-carboxílico (4,26 g, 11,4 mmol) en diclorometano (20 ml). La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente durante 50 min. El solvente fue quitado al vacío. El residuo fue disuelto en el diclorometano (50 ml) y el solvente fue quitado al vacío. Éste procedimiento fue repetido dos veces para dar 6,46 g de la sal de trifluoroacetato cruda de 2-(2-(piperidina-4-il)etoxi)isoindol-1,3-diona. MS: $m/z = 275$ $[\text{M}+1]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1,30 (m, 2 H); 1,65 (m, 2 H); 1,90 (m, 3 H); 2,90 (q, 2 H); 3,30 (d, 2 H); 4,20 (t, 2 H); 7,90 (s, 4 H); 8,30 (br, 1 H); 8,65 (br, 1 H).

Paso 4:

2-[2-(1-(Hexadecanoil)piperidina-4-il)etoxi]isoindol-1,3-diona



A 0°C, hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,04 g, 5,44 mmol) fue adicionado a una solución de ácido palmico (1,40 g, 5,44 mmol) y 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1, 2, 3-benzotriazol (0,89 g, 5,44 mmol) en N,N-dimetilformamida (20 ml) y diclorometano (20 ml). La mezcla reactiva fue agitada a 0°C durante 20 min. Una solución de la sal de trifluoroacetato de 2-(2-(piperidina-4-il)etoxi)isoindol-1,3-diona (2,11 g, 5,44 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml) y etildisopropilamina (6,19 ml, 38,1 mmol) fueron adicionados sucesivamente. La mezcla reactiva fue agitada durante 16 h, mientras iba calentándose hasta temperatura ambiente. Fue diluido con acetato de etilo (150 ml) y fue lavado con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (150 ml). La fase acuosa fue extraída con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con una mezcla de agua (50 ml) y una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (50 ml) y secada sobre sulfato magnésico. El producto bruto fue purificado por cromatografía de llamarada en el sílice (40 g), usando acetato/heptano de etilo 1:1 como eluyente para dar 1, 52 g de 2-[2-(1-(hexadecanoyl)piperidina-4-il)etoxi]isoindol-1, 3-diona. MS: m/z = 513 [M+1]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 0,90 (t, 3 H); 1,10 (m, 2 H); 1,25 (m, 26 H); 1,45 (m, 2 H); 1,65 (m, 1 H); 1,80 (m, 2 H); 2,30 (t, 2H); 2,95 (t, 1 H); 3,85 (m, 3 H); 4,20 (t, 2 H); 4,40 (d, 1 H); 7.90 (s, 4 H).

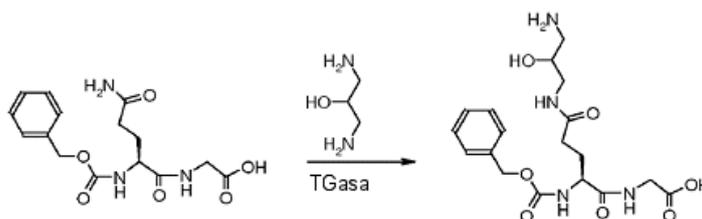
Paso 5:

Hidrato de hidracina (0,14 ml, 2,96 mmol) fue añadido a una solución de 2-[2-(1-(hexadecanoyl)piperidina-4-il)etoxi]isoindol-1,3-diona (1,52 g, 2,96 mmol) en etanol (30 ml). La mezcla reactiva fue calentada a reflujo durante 75 min y enfriada a temperatura ambiente. La precipitación formada fue quitada por filtración. El solvente del filtrado fue quitado al vacío. El producto bruto fue purificado por cromatografía de llamarada en el sílice (30 g), usando una mezcla de amoníaco acuoso de diclorometano/metanol/25% (100:10:1) como eluyente, para dar 800 mg de 1-[4-(2-(aminooxi)etil) piperidina-1-il]hexadecan-1-ona.

MS: m/z = 383 [M+1]⁺

H-NMR (CDCl₃): δ 0,80 (t, 3 H); 1,25 (m, 2 H); 1,60 (m, 26 H); 1,70 (m, 4 H); 1,65 (m, 3 H); 2,70 (t, 2 H); 2,60 (t, 1 H); 3,05 (t, 1 H); 3,80 (m, 3 H); 4,60 (d, 1 H).

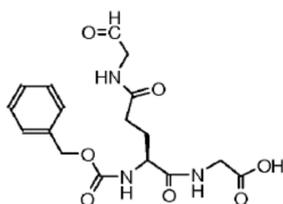
Ejemplo 9. Transaminación de Z-Gln-Gly para dar ácido [4-(3-amino-2-hidroxi-propilcarbamoil)-2-benziloxycarbonilamino-butirilamino]-acético



30 mg de Z-Gln-Gly (Bachem C1635) fue disuelto en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8,0, 2 ml).

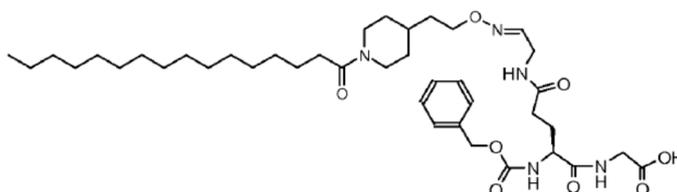
Para esto fue añadida una solución de 1,3-Diamino-propan-2-ol (9 mg) en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8,0, pH ajustado a 8,0 después de la disolución de 1,3-Diamino-propan-2-ol, 0,9 ml). Finalmente una solución de TGasa (0,9 mg ~ 2 U) disuelta en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8,0, 0,1 ml) fue añadida y la mezcla combinada fue incubada durante 4 horas a 37 °O. La temperatura fue bajada a temperatura ambiente y N-etil-maleimida se añadió en una concentración final de 1 mM. Una hora más tarde la mezcla fue diluida con 10 volúmenes de agua. El producto fue aislado de esta solución por HPLC semipreparativa de una sola vez en una columna de 25 mm x 250 mm con 7µm C-18 sílice. La columna fue eluida con un gradiente de 10 a 30% de acetonitrilo en 0,1% de ácido de trifluoroacético / H₂O a 10 ml/min a una temperatura de 40°C durante 50min. El péptido con fracciones correspondientes al valor máximo mayor fueron recogidas, diluidas en 30 ml con aproximadamente 3 volúmenes de H₂O y liofilizadas. El producto final obtenido fue caracterizado por el hecho de que RP-HPLC dónde éste tenía un tiempo de retención de 12, 75 min y por LC-MS dónde un tiempo de retención de 1,9 min tuvo un valor máximo de masa correspondiente a M + H⁺ de 411,5 amu que fue de acuerdo con la estructura prevista.

Ejemplo 10. Oxidación de ácido de [4-(3-Amino-2-hidroxi-propilcarbamoil)-2-benziloxicarbonilamino-butirilamino]-acético para dar ácido de [2-Benziloxicarbonilamino-4-(2-oxo-etilcarbamoil)-butirilamino]-acético



5 0,8 mg de ácido de [4-(3-Amino-2-hidroxi-propilcarbamoil)-2-benziloxicarbonilamino-butirilamino]-acético fue disuelto en un tampón de trietanolamina de 4 ml 15 mM pH 8,5 (ajustado con 1 N de ácido clorhídrico). A ello fue añadido 1 ml de una solución de metionina 173 mM en el agua. Finalmente 0,5 ml de un peryodato de sodio 24 mM en agua fue añadido, y la mezcla fue incubada durante 10 min a 0 °C.

10 Ejemplo 11. Oximación de ácido de [2-Benziloxicarbonilamino-4-(2-oxo-etilcarbamoil)-butirilamino]-acético para dar ácido de (2-Benziloxicarbonilamino-4-{2-[2-(1-hexadecanoil-piperidina-4-il)-etoxiimino]-etilcarbamoil}-butirilamino)-acético.



15 2 mg 1-[4-(2-(Aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona fue disuelto en 3 ml de N, N-dimetilformamida y la solución fue enfriada en el hielo. Para 0,53 ml de esta solución fue añadida 1,38 ml de la mezcla reactiva del Ejemplo 10 y se dejó reaccionar la mezcla a 0 °C durante toda la noche. RP-HPLC confirmó la formación de un producto nuevo. Fue aislado por RP-HPLC en la escala analítica y sometido a espectrometría de masas de Maldi-TOF que dio un valor máximo correspondiente a M + H+ a: 744, 7 amu de acuerdo con la estructura prevista.

Ejemplo 12. Oxidación de N^ε141-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.) para dar N^ε141-(2-oxo-etil) hGH (III.)

20 5 mg N^ε141-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.) fue disuelto en 0,5 ml de tampón de trietanolamina 15 mM pH 8,5 (ajustado con 1 ácido clorhídrico N). Para esto fue añadido 0,13 ml de una solución de metionina 173 mM en el agua. Finalmente 0,06 ml de un peryodato de sodio 24 mM en el agua fue añadido, y la mezcla fue incubada durante 10 min a 0 °C

Ejemplo 13. Oximación de N^ε141-(2-oxo-etil) hGH (III.) con 1-[4-(2-(Aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona para dar N^ε141-[2-(1-(hexadecanoil)piperidina-4-il)etiloxiimino)-etil] hGH (V.).

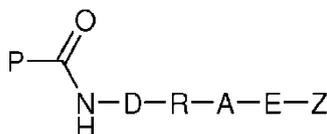
25 2 mg 1-[4-(2-(Aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona fue disuelto en 3 ml N, N-dimetilformamida y la solución fue enfriada en el hielo. 0,14 ml de la mezcla reactiva del Ejemplo 12 fue añadida y la mezcla se dejó reaccionar a 0 °C durante toda la noche.

Ejemplo 14. Caracterización de N^ε141-[2-(1-(hexadecanoil)piperidina-4-il)etiloxiimino)-etil] hGH (V.)

30 Una alícuota de la mezcla reactiva cruda del Ejemplo 13 fraccionada por RP-HPLC en la escala analítica y espectrometría de masas de Maldi-TOF fue realizadas en las fracciones. La fracción que da el peso molecular previsto de la estructura de producto fue sometida a mapeo peptídico. El mapa mostró que el AA 130-146 del fragmento Asp-N ofrecía un aumento de masa de 407 amu correspondiente a la adición del 2-(1-(hexadecanoil) piperidina-4-il)etiloxiimino)-etil en la cadena lateral de un residuo de glutamina. Este fue el único péptido, que tenía tiempo de retención cambiado en el Mapa de HPLC cuando se comparó con el de hGH nativo. Este fragmento
35 contiene dos residuos de glutamina. El péptido fue sometido a secuenciación de Edman y Gln-137 fue encontrado en el rendimiento previsto, mientras que Gln-141 mostró un ciclo de Edman en blanco. Se concluyó que esta derivatización había tenido lugar selectivamente en Gln-141.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula



5 donde P-C(O)-NH- representa el radical peptídico obtenido al eliminar un hidrógeno de -NH₂ en la cadena lateral de Gln;

D representa un enlace u oxígeno;

R representa un enlazador o un enlace;

E representa un enlazador o un enlace;

A representa un resto de triazol; y

10 Z es una fracción conjugada al péptido;

y sales farmacéuticamente aceptables y solvatos del mismo,

15 donde Z comprende una o más etiquetas, tales como marcadores fluorescentes, tales como radical de fluoresceína, radical de rodamina, radical de Texas Red ® y radical de proteína ficobili; sustratos enzimáticos, tales como radical de acetato de *p*-nitrofenol; e isótopos radiactivos, tales como Cu-64, Ga67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Pb-203, At-211, Pb-212 y Bi-212; fracciones orgánicas, tales como uno o más radicales de PEG o mPEG y derivados de amino de los mismos (incluidos radicales de PEG y mPEG lineales y ramificados); alquilo C₁₋₂₂ lineal, ramificado y/o cíclico, alqueno C₂₋₂₂, alquinilo C₂₋₂₂, heteroalquilo C₁₋₂₂, heteroalqueno C₂₋₂₂, heteroalquinilo C₂₋₂₂, donde uno o más birradicales de compuesto aromático homocíclico o birradicales de compuesto heterocíclico pueden ser insertados, y donde dichos radicales C₁₋₂₂ o C₂₋₂₂ pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno, carboxilo, heteroarilo y arilo, donde dicho arilo o heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido además con uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno y carboxilo; radicales de esteroides; radicales de lípidos; radicales de polisacáridos; dextranos; radicales de poliamida; radicales de ácido poliamínico; radicales de PVP; radicales de PVA; poli(1-3-dioxalano); poli(1,3,6-trioxano); 25 polímero de etileno/ anhídrido maléico; materiales de tinte de Cibacron; o azul Cibacron 3GA.

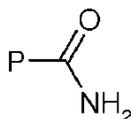
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde Z comprende uno o más radicales PEG o mPEG con un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y 40 kDa.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde Z comprende uno o más grupos alquilo C₁₋₂₂ lineal, ramificado y/o cíclico, alqueno C₂₋₂₂, alquinilo C₂₋₂₂, heteroalquilo C₁₋₂₂, heteroalqueno C₂₋₂₂, heteroalquinilo C₂₋₂₂, donde uno o más birradicales de compuesto aromático homocíclico o birradicales de compuesto heterocíclico pueden ser insertados, y donde dichos radicales C₁₋₂₂ o C₂₋₂₂ pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno, carboxilo, heteroarilo y arilo, donde dicho arilo o heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido además con uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno y carboxilo.

35 4. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde P representa un péptido seleccionado de insulina, péptido 1 similar a glucagón (GLP-1), péptido 2 similar a glucagón (GLP-2), una citocina, TFF, un modificador de receptores de melanocortina y un anticuerpo.

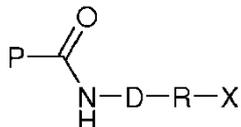
5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el compuesto es un péptido conjugado susceptible de ser obtenido mediante un método que comprende las etapas de

40 i) reaccionar el péptido que contiene un residuo de Gln representado por la fórmula

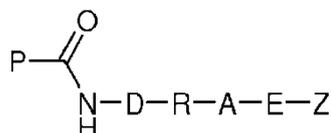


en uno o más pasos con un nucleófilo que contiene nitrógeno (primer compuesto) representado por la fórmula H₂N-D-R-X

que comprende uno o más grupos funcionales o grupos funcionales latentes, que no son accesibles en cualquiera de los residuos de aminoácidos que constituyen dicho péptido, en presencia de una transglutaminasa capaz de catalizar la incorporación de dicho primer compuesto en dicho péptido para formar un péptido transaminado de la fórmula



- 5
- ii) opcionalmente se activa el grupo funcional latente comprendido en X;
- iii) reaccionar en uno o más pasos dicho péptido transaminado con un segundo compuesto de la fórmula Y-E-Z
- 10 que comprende uno o más grupos funcionales, donde dicho(s) grupo(s) funcional(es) no reacciona(n) con grupos funcionales accesibles en los residuos de aminoácidos que constituyen dicho péptido, y donde dicho(s) grupo(s) funcional(es) en dicho segundo compuesto es/son capaz/capaces de reaccionar con dicho(s) grupo(s) funcional(es) en dicho primer compuesto de modo que un enlace covalente entre dicho péptido transaminado y dicho segundo compuesto es formado dando como resultado un péptido conjugado de la fórmula



- 15 donde D representa un enlace u oxígeno;
- R representa un enlazador o un enlace;
- X representa un radical que comprende un grupo funcional o un grupo funcional latente seleccionado de una azida o un alquino, no accesible en los residuos de aminoácido que constituyen el péptido P-C(O)-NH₂;
- 20 Y representa un radical que comprende uno o más grupos funcionales seleccionados de una azida o un alquino, donde estos grupos reaccionan con grupos funcionales presentes en X, y donde estos grupos funcionales no reaccionan con grupos funcionales accesibles en el péptido P-C(O)-NH₂;
- E representa un enlazador o un enlace;
- A representa una fracción de triazol formada por la reacción entre los grupos funcionales comprendidos en X e Y; y
- 25 Z es la fracción que debe ser conjugada al péptido.
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, donde el grupo funcional o grupo funcional latente comprendido en X es una azida.
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, donde el grupo funcional presente en Y es un alquino.
8. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la transglutaminasa se aísla de *Streptomyces mobaraenese*, *Streptomyces lydicus* o hígado de conejillo de Indias.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la terapia.