CONJUGADO QUE COMPRENDE ERITROPOYETINA Y UNA ESTRUCTURA POLIMÉRICA RAMIFICADA

Campo de la técnica

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología, con las ciencias biológicas y la industria farmacéutica, y en particular con la modificación de moléculas para mejorar su farmacocinética, aumentando su tiempo de vida media en sangre y su actividad biológica.

Estado de la técnica anterior

El empleo de biomoléculas para uso terapéutico en humanos se ha incrementado en los últimos años, debido fundamentalmente a: (1) descubrimiento de nuevas moléculas de proteínas y péptidos, (2) mejor entendimiento de los mecanismos de acción *in vivo,* (3) mejoramiento en los sistemas de expresión de las proteínas y en la síntesis de los péptidos y (4) mejoramiento en las formulaciones o en las tecnologías de modificación de moléculas, que permiten mejorar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas.

El desarrollo tecnológico en el campo de la liberación modificada de fármacos ha permitido la introducción de un gran número de sistemas que alteran la liberación de los fármacos inyectables, con la intención de mejorar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los agentes terapéuticos. Se pueden producir nuevos sistemas de liberación de fármacos a través de un cambio en la formulación (por ejemplo, productos de liberación continua o liposomas), o a través de una adición a la molécula del fármaco, por ejemplo la peguilación, que no es más que la unión covalente de éste a una o más moléculas de polietilenglicol (PEG).

Las nuevas formas de liberación conllevan a un aumento del tiempo de vida media, una disminución en los efectos adversos, un incremento en la eficacia del medicamento, y una mayor calidad de vida del paciente. Los sistemas de liberación continua liberan los fármacos de manera controlada y predeterminada, y son apropiados especialmente para aquellos fármacos donde es importante evitar grandes fluctuaciones en las concentraciones en el plasma.

La liberación sistémica de moléculas empleando microesferas biodegradables ha sido ampliamente estudiada debido a la protección a proteínas sensibles a la degradación y a la liberación prolongada o modificada (Sinha, V. R. and Trehan, A. (2003). Biodegradable microspheres as protein delivery, *J. Controlled Release*, 90(3): 261-280).

La peguilación provee un método para la modificación de proteínas terapéuticas, con el propósito de minimizar muchas de las limitaciones farmacológicas de las biomoléculas. Por ejemplo, el tiempo de vida media en sangre aumenta por varias causas, entre ellas: el residuo polimérico puede impedir el ataque de proteasas; y el reconocimiento del fármaco por el sistema inmune y el volumen hidrodinámico significativamente superior del conjugado, respecto a la proteína nativa, hacen que disminuya sensiblemente la filtración por el riñón. A pesar de que en muchos casos la actividad biológica *in vitro* de una proteína se ve afectada por la peguilación, el aumento sustancial del tiempo de vida en sangre hace que su acción terapéutica sea más efectiva (Harris J. M. y Chess R. B. (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:214-221).

Otro de los beneficios de la peguilación lo constituye el aumento de la estabilidad física, debido a que esta bloquea estéricamente vías de degradación inducidas por interacciones hidrofóbicas y genera obstáculos estéricos no específicos que disminuyen las interacciones intermoleculares involucradas en la inestabilidad térmica de las proteínas. El aumento de la estabilidad física permite obtener formulaciones más estables (Harris J. M. y Chess R. B. (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:214-221).

Gracias al surgimiento de la segunda generación de los PEG activados se pudo contar con grupos que permitían una peguilación más selectiva (por ejemplo: el grupo aldehído que se une preferentemente por el extremo N-terminal de las proteínas) y estructuras ramificadas (Roberts M. J., Bentley M.D., Harris J.M. (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Reviews* 54:459–476). Entre los PEG ramificados desarrollados están los monofuncionales de dos ramas (Patente Nro. US 5,932,462), los tetrafuncionales de cuatro ramas, y los octafuncionales de ocho ramas. Para la conjugación de proteínas terapéuticas, los PEG activados más útiles son los monofuncionales, porque evitan el entrecruzamiento entre la proteína y el polímero de PEG. Los PEG ramificados también tienen un efecto tipo sombrilla, que permite una mejor protección de la superficie de la proteína.

El PEG monofuncional de dos ramas ha permitido la obtención de un conjugado con interferón alfa 2a que ha demostrado mejores resultados en la clínica que la proteína nativa (Rajender Reddy K., Modi M.W., Pedder S. (2002). Use of

peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C. *Adv. Drug Deliv. Reviews* 54:571-586).

Existen reportes de un gran número de proteínas en las que se han aplicado las diferentes tecnologías de liberación modificada, entre las que se encuentra la eritropoyetina (EPO) humana recombinante (EPO hr). La EPO es una glicoproteína de 165 aminoácidos. Su peso molecular estimado utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (*del inglés Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, abreviado SDS-PAGE) oscila entre 27 y 39 kDa (Mikaye, T. et al. (1977). Purification of Human Erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558- 5564), en dependencia de su grado de glicosilación.

En las investigaciones se ha comprobado que al retirar el estímulo hipóxico, el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la EPO disminuye rápidamente en la sangre, pudiendo ser indetectable a las 3 horas, lo que indica que su tiempo de vida media es corto (Lacombe, C. *et al.* (1988). Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* 81:620–623; Koury, S.T. *et al.* (1989). Quantitation of erythropoietin producing cells in kidneys of mice by *in situ* hybridation: Correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA and serum erythropoietin concentration. *Blood* 74: 645-651). Se estimó que el tiempo de vida media en plasma sanguíneo de la EPO oscila entre 4 y 13 horas, este tiempo es muy bajo si se compara con el de otras moléculas de uso terapéutico. Esto hace que un paciente que requiera del empleo de la hormona de forma regular deba inyectarse con frecuencia, para mantener los niveles de eritrocitos cercanos a los normales (Spivak, J.L. 1992. The mechanism of action of erythropoietin: Erythroid cell response. En: J.W. Fisher (Ed.) Biochemical Pharmacology of Blood and Blood-Forming Organs. Springer-Verlag Berlin. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 101: 49-114; Jelkmann, W. (1986). Renal Erythropoietin: Properties and Production. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 104: 139-205).

Con el objetivo de aumentar el tiempo de vida medio de la EPO hr se han realizado mutaciones a la molécula para aumentar los sitios de *N*-glicosilación (Burke, Paul (2003). Device for the sustained release of aggregation-stabilized, biologically active agent. Solicitud de Patente en Estados Unidos Nro. 20030133979), se ha encapsulado en microesferas (Morlock M, *et al.* (1998). Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG-PEO-LPLG triblock copolymers: protein stabilization and *in-vitro* release properties. *J Control Release* 4; 56 (1-3):

105-115) y en liposomas (Moriya H, *et al.* (1997). Pharmacokinetic and pharmacological profiles of free and liposomal recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administrations in rats. *Pharm Res.* 14 (11): 1621- 1628), y se ha reportado la obtención de un dímero de EPO hr con vistas a aumentar la actividad biológica de la misma (Bruno D., *et al.* (2001). Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, Vol. 97, No. 12, 3776-3782).

Una de las modificaciones que más resultados ha tenido en la clínica lo constituye la conjugación química de la EPO hr con polímeros (Jolling K. *et al. (*2005). Mixed-effects Modelling of the Interspecies Pharmacokinetic Scaling of Pegylated Human Erythropoietin. *Eur J Pharm Sci*; 24: 465-475). En el desarrollo de esta EPO hr peguilada se ha encontrado como dificultad el bajo rendimiento del proceso de conjugación, debido a la formación de especies monopeguiladas y bipeguiladas, constituyendo esta última un contaminante del proceso.

Por todo lo expresado anteriormente, sigue siendo de interés la obtención de nuevos conjugados de EPO con polímeros, que ofrezcan ventajas terapéuticas con respecto a la molécula sin modificar.

Explicación de la invención

La presente invención resuelve el problema antes planteado, al proveer un conjugado que comprende eritropoyetina (EPO) y una estructura polimérica ramificada asimétrica que comprende dos ramas de monometoxipolietilenglicol (mPEG) donde la masa molecular de una de estas ramas de mPEG está entre 10 kDa y 14 kDa, y la masa molecular de la otra rama de mPEG está entre 17 kDa y 23 kDa.

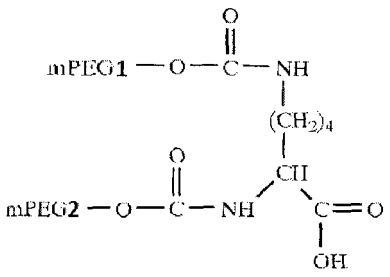
De esta manera, la invención proporciona un conjugado que comprende una estructura de PEG monofuncional ramificada que presenta una talla molecular similar a la utilizada por Papadimitriou (Patente Nro. US 7,202,208), pero que emplea una estructura de PEG de dos cadenas de distintas masas moleculares. Esta alternativa, inesperadamente, ofrece nuevas ventajas al fármaco. En el conjugado de la invención, la masa molecular total de la estructura polimérica de PEG de dos ramas está entre 27 y 37 kDa. En una realización de la invención, la masa molecular de mPEG1 es de 12 kDa y la de mPEG2 es 20 kDa.

El empleo de cadenas ramificadas asimétricas de PEG, en vez de lineales, que poseen la masa molecular indicada permitió disminuir la formación de los contaminantes bipeguilados, e inesperadamente aumentó de forma significativa el tiempo de vida media de la molécula, así como su estabilidad físico-química.

Otro resultado no esperado fue que se mantuvo intacta la actividad biológica de la molécula peguilada con este PEG monofuncional ramificado asimétrico. La pérdida de la actividad biológica de las biomoléculas con la peguilación ha sido ampliamente reportada en la literatura (Harris J. M. y Chess R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:214-221).

El PEG monofuncional de dos ramas asimétricas se obtiene por la unión de dos cadenas lineales de PEG de diferente talla molecular a un núcleo. Un proceso semejante ha sido utilizado por otros autores con buenos resultados (Patente Nro. US 5,932,462). Para poder unir las dos cadenas lineales de PEG a un núcleo, se necesita que éstas tengan un grupo activo. Este grupo puede ser seleccionado entre varios grupos conocidos en el estado del arte. Por ejemplo, este grupo activo puede ser: succinimidil succinato, succinimidil carbonato, *p*-nitrofenilcarbonato, succinimidil propanoato, succinimidil butanoato, entre otros. Un PEG lineal preferido en esta invención es el activado con succinimidil carbonato. Esto se debe a dos razones fundamentales: a) los buenos rendimientos de la reacción entre éste y los grupos aminos y b) la facilidad del proceso de obtención de este PEG funcionalizado. El proceso de obtención de este PEG funcionalizado es conocido por aquellos que trabajan en esta rama de la técnica (Miron T., Wilchek M. (1993). A Simplified Method for the Preparation of Succinimidyl Carbonate Polyethylene Glycol for Coupling to Proteins. *Bioconjugate Chem.* 4:568-569). Una vez que se tiene el PEG lineal activado, a continuación éste se hace reaccionar con la molécula elegida como núcleo.

En una realización preferida de esta invención el núcleo es L-lisina, por ser una molécula biocompatible, con dos grupos amino libres y un grupo carboxílico que puede ser utilizado para ser posteriormente activado. Por tanto, en una materialización de la invención, la EPO está conjugada a una estructura polimérica ramificada asimétrica que se representa como:



En una realización particular, en dicha estructura polimérica que forma parte del conjugado, la masa molecular de mPEG1 es 12 kDa y la masa molecular de mPEG2 es 20 kDa, o la masa molecular de mPEG1 es 20 kDa y la masa molecular de mPEG2 es 12 kDa.

El derivado de dos ramas asimétricas puede ser purificado empleando métodos cromatográficos, y posteriormente se activa con diferentes grupos reactivos para la conjugación con las biomoléculas. Cualquiera de los grupos funcionales utilizados para la activación de otras estructuras de PEG puede ser utilizado para el PEG ramificado asimétrico descrito en esta invención. Como ejemplo de estos grupos funcionales tenemos: ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, succinimidil carbonato, aldehídos de distintos tipos, maleimidos, entre otros. Otro tipo de grupos funcionales que permiten la unión de esta estructura a proteínas son los grupos quelantes, como el nitrilotriacetato, que por mediación de un metal de transición puede conjugarse a las histidinas presentes en el esqueleto peptídico. La elección del grupo reactivo a utilizar depende del residuo de la proteína al que se quiere unir el PEG.

En los ejemplos de la solicitud de patente presentada por Huang (EP 1479711 A1) se muestran estructuras ramificadas de PEG con masas moleculares diferentes en cada una de las ramas, pero el tamaño molecular de las ramas es menor que el de la presente invención. En la solicitud de patente Nro. EP 1479711 A1 los inventores plantean que la actividad biológica del conjugado disminuye con respecto a la actividad biológica del fármaco sin modificar. Sin embargo, en la presente invención, inesperadamente, la actividad biológica del conjugado de EPO con el PEG monofuncional de dos ramas asimétricas, de masa molecular total entre 27 y 37 kDa, fue similar a la de la EPO sin modificar. Por otro lado, en la presente invención se demostró que el tiempo de vida media de una estructura de PEG con dos ramas que poseen masas moleculares inferiores, según la solicitud de patente presentada por Huang, es menor que el tiempo de vida media del conjugado de

EPO con un PEG de dos ramas de 12 kDa y 20 kDa, respectivamente, de esta invención.

Este resultado obtenido en la invención fue inesperado. Con el conjugado que comprende una estructura polimérica asimétrica ($PEG_{2,32K}$) se logra una distribución espacial de la molécula que no limita la actividad biológica, mejora la reacción de conjugación disminuyendo la formación de los productos polipeguilados, y mejoran significativamente los parámetros farmacocinéticos. Esto permite la disminución de la dosis del tratamiento en las personas que lo necesitan.

Las materias primas fundamentales para obtener la estructura de PEG de dos ramas asimétricas en la presente invención son el mPEG de 12 kDa (PEG 12K) y el mPEG de 20 kDa (PEG 20K). El peso molecular de estos mPEG posee un rango establecido por los fabricantes, ya que el PEG es un polímero polidisperso. Por ejemplo, según especificación de uno de los fabricantes la polidispersión debe ser menor de 1,1%. En ese caso, el rango de pesos moleculares reportado por el fabricante para el PEG 12K sería de 12,0 ± 1,2 kDa; y el del PEG 20K sería de 20,0 ± 2,0 kDa.

Para determinar si esta diferencia en los pesos moleculares entre cada lote de material de partida de PEG influye en los resultados de la farmacocinética, se realizó un experimento con lotes de PEG que tuvieran un peso molecular correspondiente a los valores extremos de las especificaciones (Ejemplo 11). Se tomó un PEG 12K con 11 kDa de peso molecular y un PEG 20K con 18 kDa de peso molecular, para formar un conjugado de EPO con una estructura de PEG de dos ramas de 29 kDa de peso molecular total ($PEG_{2,29K}$-EPO). También se tomó un PEG 12K con 13 kDa de peso molecular y un PEG 20K con 22 kDa de peso molecular, para formar un conjugado de EPO con una estructura de PEG de dos ramas de 35 kDa de peso molecular total ($PEG_{2,35K}$-EPO). Los resultados mostraron que los parámetros farmacocinéticos son similares cuando se usan diferentes lotes de partida de PEG 12K y PEG 20K. Por lo tanto, los conjugados formados por las estructuras de $PEG_{2,29K}$-EPO y $PEG_{2,35K}$-EPO se consideran esencialmente iguales a los formados por la estructura del peso teórico indicado por el fabricante, que es el conjugado de EPO y un PEG de dos ramas, una de 12 kDa y otra de 20 kDa ($PEG_{2,32K}$-EPO).

La conjugación de la proteína con el PEG activado se realiza en un tampón apropiado. Las características del tampón dependen, entre otros factores, del grupo

funcional del polímero y del objetivo de la conjugación. Por ejemplo, si se desea conjugar por los grupos amino libres, con un PEG funcionalizado como éster de *N*-hidroxisuccinimida, los sitios de conjugación se pueden predecir, hasta cierto grado, según el pH de la reacción de conjugación. Un pH entre 8,0 y 9,0 favorece la conjugación por el grupo ε-amino de las lisinas.

Una vez obtenido el conjugado, este se caracteriza empleando varias técnicas. Las propiedades químicas, físicas y biológicas de los conjugados se analizan para lograr una caracterización lo más completa posible del conjugado purificado. Por ejemplo, la concentración del conjugado puede ser usualmente determinada por espectroscopía ultravioleta (absorbancia a 280 nm), pues el residuo de PEG no afecta prácticamente el coeficiente de extinción molar de la proteína. La pureza del producto purificado se determina preferiblemente por SDS-PAGE, pues los métodos cromatográficos, como la cromatografía de filtración en gel, discriminan pobremente las señales correspondientes al conjugado de interés y a los contaminantes. Otras propiedades físico-químicas pueden ser estudiadas por los procedimientos usuales conocidos por los versados en esta rama de la técnica.

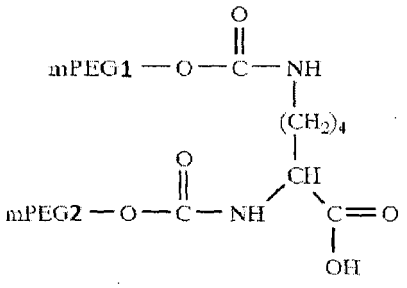
En el contexto de esta invención el término eritropoyetina (EPO) se refiere a cualquiera de las variantes de la molécula de EPO que mantenga su actividad biológica; por ejemplo moléculas truncadas. La EPO puede ser obtenida mediante tecnología del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante, empleando los sistemas de expresión y purificación conocidos por los versados en esta rama de la técnica. Por tanto, en una materialización de la presente invención, el conjugado comprende EPO hr. El conjugado objeto de la invención también comprende cualquiera de las variantes de EPO obtenidas mediante los métodos descritos anteriormente, después de ser modificada a través de cualquier procedimiento del estado de la técnica, tal como la sustitución de aminoácidos.

Es también objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los conjugados PEG-EPO que se revelan en la misma y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la obtención de EPO peguilada que se caracteriza porque dicha proteína se conjuga a una estructura polimérica ramificada asimétrica que comprende dos ramas de mPEG donde la masa molecular de una de las ramas de mPEG está entre 10 kDa y 14 kDa, y la

masa molecular de la otra rama de mPEG está entre 17 kDa y 23 kDa. A través del método de la invención, se produce un incremento de la vida media de la EPO en la sangre de un mamífero al que se administra dicha proteína, si se compara con la vida media de la EPO sin conjugar con PEG. Por tanto, la invención provee un método para la mejora de los parámetros farmacocinéticos de dicha proteína, con el fin de reducir las dosis que se administran a un sujeto que lo necesita. En el contexto de la invención, se entiende por mejora de los parámetros farmacocinéticos de la EPO el aumento del tiempo de vida media y/o el tiempo medio de residencia de dicha proteína. De este modo, la invención revela un método de modificación química de la molécula de EPO, con el fin de incrementar el tiempo de vida media de dicha molécula, que se caracteriza porque dicha proteína se conjuga a una estructura polimérica ramificada asimétrica que comprende dos ramas de mPEG, donde la masa molecular de una de estas ramas de mPEG está entre 10 kDa y 14 kDa, y la masa molecular de la otra rama de mPEG está entre 17 kDa y 23 kDa.

En una realización de la invención, la masa molecular de una de las ramas de mPEG en la estructura polimérica ramificada asimétrica es 12 kDa y la masa molecular de la otra rama de mPEG es 20 kDa. En una materialización de la invención, la estructura polimérica ramificada asimétrica que se conjuga a la EPO, en el método de la invención, se representa como:



En una realización preferida del método de la invención, en la estructura polimérica ramificada asimétrica que se conjuga a la EPO, la masa molecular de mPEG1 es 12 kDa y la masa molecular de mPEG2 es 20 kDa, o la masa molecular de mPEG1 es 20 kDa y la masa molecular de mPEG2 es 12 kDa. En una realización más preferida, en el método de la invención, la EPO es EPO hr.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Resultados de SDS-PAGE con doble tinción (Azul brillante de Coomassie y yodo) del producto de la reacción de conjugación de la EPO con el $PEG_{2,32K}$. La muestra 1 corresponde al control positivo de EPO y la muestra 2 al producto de la reacción de conjugación de la EPO con el $PEG_{2,32K}$.

Figura 2. Resultados de SDS-PAGE con doble tinción (Azul brillante de Coomassie y yodo) del producto de la reacción de conjugación de la EPO con el $PEG_{2,40K}$. La muestra 1 corresponde al control positivo de EPO y la muestra 2 al producto de la reacción de conjugación de la EPO con el $PEG_{2,40K}$.

Figura 3. Cromatogramas obtenidos empleando cromatografía de filtración en gel para evaluar diferentes conjugados de PEG-EPO.

Figura 4. Actividad biológica *in vivo* de la EPO nativa y la EPO monopeguilada determinada por el método de ratones normocitémicos.

Figura 5. Resultados obtenidos del ensayo de degradación con tripsina de los conjugados $PEG_{2,32K}$ –EPO, $PEG_{2,40K}$ –EPO y la EPO sin modificar. Se representa la cinética de degradación seguida por SDS-PAGE.

Figura 6. Actividad biológica de distintos conjugados de PEG-EPO y de EPO sin modificar, determinada por el método de ratones normocitémicos.

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Obtención del PEG activado como éster de N-hidroxisuccinimida

Reacción de activación de $mPEG_{20K}$-OH

Se secaron azeotrópicamente 50 g de mPEG de 20 kDa de peso molecular sin activar ($mPEG_{20K}$-OH) en 450 mL de tolueno, durante 3 horas. Pasado este tiempo, se extrajeron 200 mL de solvente, y se dejó enfriar la solución hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 60 mL de diclorometano (DCM) seco como cosolvente. Se pesaron 4,9 g de disuccinidimil carbonato y se disolvieron en 40 mL de dimetilformamida. Se agregó la solución anterior al frasco que contiene el $mPEG_{20K}$-OH. Se pesaron 2,5 g de dimetilaminopiridina y se disolvieron en 20 mL de DCM. Se agregó la solución anterior al frasco que contiene el $mPEG_{20K}$-OH y se comenzó a agitar. Se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción se filtró, para eliminar los productos sólidos, empleando una membrana de fibra de vidrio. El filtrado se precipitó con 1,5 L de éter dietílico seco, y

se filtró al vacío. El precipitado se colectó al vacío, se secó a alto vacío durante 4 h y se almacenó a -20 °C. Se logró recuperar como succinidimil carbonato de PEG (PEG_{20K}-SC) un 96% de la masa inicial de $mPEG_{20K}$-OH, con un grado de activación de 96,0 ± 0,8%.

Reacción de activación de $mPEG_{12K}$-OH

Se siguió el mismo procedimiento empleado para la reacción de activación del $mPEG_{20K}$-OH, pero en este caso se utilizó como materia prima inicial el mPEG de 12 kDa de peso molecular sin activar ($mPEG_{12K}$- OH).

Reacción de L-lisina con PEG_{20K}-SC y PEG_{12K}-SC

Se pesaron 9,1 g de L-lisina y se disolvieron en 30 mL de solución de ácido bórico 0,1 M; pH 8,0. Se añadieron 20 g de PEG_{20K}-SC y 15 mL de la solución de L-lisina en ácido bórico. La solución se mantuvo en agitación durante 12 horas.

Posteriormente, se diluyó la mezcla de reacción con 300 mL de agua destilada, y se ajustó a 3,5 el pH de la mezcla con una solución de ácido clorhídrico. La mezcla se pasó a un embudo separador, donde se añadieron 100 mL de DCM. Se agitó manualmente y se extrajo la fase inferior (fase orgánica). Se realizaron un total de 5 extracciones. Se añadieron 20 g de sulfato de sodio al frasco que contiene la fase orgánica, y se agitó manualmente hasta total claridad de la fase. Se filtró al vacío, empleando una membrana de fibra de vidrio. El filtrado se concentró en el rotoevaporador al máximo posible. Se le añadieron 500 mL de éter dietílico y se agitó manualmente, para precipitar el producto. Se filtró al vacío y el producto (L-lisina monopeguilada 20K) se secó durante 1 h al vacío en el rotoevaporador.

En la segunda etapa de la reacción se añadieron 9 g de PEG_{12K}-SC a 15 g de L-lisina monopeguilada 20K. Los reaccionantes se disolvieron en 215 mL de DCM y se añadió 0,14 mL de trietilamina. La mezcla de reacción se filtró al vacío, empleando una membrana de fibra de vidrio. El filtrado se concentró al máximo en el rotoevaporador. Se le adicionaron 300 mL de éter dietílico y se agitó manualmente durante 2 minutos, para precipitar el producto. Se filtró al vacío y el producto obtenido (PEG de dos ramas asimétricas, una de 12 kDa y otra de 20 kDa ($PEG_{2,32K}$-COOH)) se secó durante 1 h al vacío, en el rotoevaporador. El rendimiento total del proceso fue superior al 70%.

Purificación de $PEG_{2,32K}$-COOH

La purificación del $PEG_{2,32K}$-COOH se llevó a cabo en una columna de DEAE-Sepharosa con 80 cm de altura, y se empleó un flujo volumétrico de 40 mL/min. El

gel se higienizó previamente con 4,5 L de solución de hidróxido de sodio 0,2 M. Se equilibró la columna con solución de ácido bórico 50 mM, pH 9,0. Posteriormente, la columna se lavó con 5 L de agua destilada. Se aplicó la muestra de $PEG_{2,32K}$-COOH disuelta en agua, hasta alcanzar una conductividad de 40 µS/cm más que la conductividad del agua. Luego de aplicar la muestra, se lavó la columna con 3 L de agua purificada. La elución de la muestra se realizó con 5 L de una solución de cloruro de sodio 10 mM. Se colectaron fracciones de 500 mL. Posteriormente, se regeneró la columna con 3 L de una solución de cloruro de sodio 1M. El recobrado total del proceso fue superior al 90%, con una pureza mayor al 95%.

Obtención del PEG ramificado activado como éster de N-hidroxisuccinimida ($PEG_{2,32K}$-NHS)

Se disolvió 1 g del $PEG_{2,32K}$-COOH en DCM. Se añadieron 0,01 g de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y 0,02 g de diciclohexilcarbodiimida. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 12 h. Posteriormente, se diluyó con 5 mL de DCM y se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio. El filtrado se concentró en el rotoevaporador y se le añadió 400 mL de éter dietílico para precipitar el producto. La mezcla se filtró al vacío y se colectó el producto sólido ($PEG_{2,32K}$-NHS), el cual fue secado durante 1 h al vacío en el rotoevaporador. Se alcanzaron grados de activación superiores a 95% y una recuperación de la masa inicial de polímero superior a 90%.

Ejemplo 2. Obtención de la EPO conjugada con $PEG_{2,32K}$-NHS

Reacción de conjugación

Seis gramos de $PEG_{2,32K}$-NHS fueron añadidos a una solución que contenía 1 g de EPO hr a una concentración inicial de 5 mg/mL en solución de borato 50 mM, pH 8,0. La reacción se mantuvo durante 2 horas a 4°C, con agitación lenta. La reacción se detuvo diluyendo hasta una concentración final de proteínas de 0,9 mg/mL con ácido bórico 50 mM, pH 8,0. El rendimiento de la reacción fue determinado por densitometría del gel obtenido por SDS-PAGE, como se muestra en la Figura 1. El recobrado total fue superior al 40%, con menos del 3% de productos polipeguilados.

Purificación de la EPO monopeguilada

Para separar los productos de la reacción de conjugación de la EPO hr con PEG, o sea la EPO monopeguilada de la EPO libre y de la EPO bipeguilada, se diseñó un esquema de purificación por cromatografía de intercambio aniónico. El proceso de

separación se llevó a cabo empleando una columna empacada con Q-Sepharosa, de 12 cm de altura. El gel se higienizó previamente con 22 mL de solución de hidróxido de sodio 0,2 M. Se pasaron 33 mL de agua purificada, y seguidamente 33 mL de la solución de equilibrio de ácido bórico 50 mM, pH 8,0. Se aplicó la muestra procedente de la reacción de conjugación, diluida en la solución de equilibrio hasta una concentración de 0,9 mg/mL. La elución de la muestra que contiene el conjugado de EPO con $PEG_{2,32K}$-NHS ($PEG_{2,32K}$-EPO) se realizó secuencialmente, empleando el mismo tampón de equilibrio con concentraciones crecientes de cloruro de sodio entre 0,175 M y 0,5 M. El flujo volumétrico fue de 1,2 mL/min y la carga de 0,58 mg de proteína/mL de gel. El recobrado del proceso fue del 40% de la EPO monopeguilada y el grado de pureza del 97%.

Ejemplo 3. Obtención del PEG ramificado activado como éster de *N*-hidroxisuccinimida ($PEG_{2,40K}$-NHS)

Para la obtención del $PEG_{2,40K}$-NHS se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, pero se usó en la segunda etapa de la reacción con lisina el PEG_{20K}-SC. Se logró un rendimiento total de más de 50%, con una activación superior a 90%.

Ejemplo 4. Obtención de la EPO conjugada con $PEG_{2,40K}$-NHS

Reacción de conjugación

Seis gramos de $PEG_{2,40K}$-NHS fueron añadidos a una solución que contenía 1 g de EPO hr a una concentración inicial de 5 mg/mL en solución tampón borato 50 mM, pH 8,0. La reacción se mantuvo durante 2 horas a 4°C con agitación lenta. La reacción se detuvo diluyendo hasta una concentración final de proteínas de 0,9 mg/mL con ácido bórico 50 mM, pH 8,0. El rendimiento de la reacción fue determinado por densitometría del gel obtenido mediante SDS-PAGE, como se muestra en la Figura 2. El recobrado total fue superior a 40%, con menos de 1% de productos polipeguilados.

Purificación de la EPO monopeguilada

Para separar los productos de la reacción de conjugación de la EPO con PEG, o sea la EPO monopeguilada de la EPO libre y de la EPO bipeguilada, se diseñó un esquema de purificación por cromatografía de intercambio aniónico. El proceso de separación se llevó a cabo empleando una columna empacada con Q-Sepharosa, de 12 cm de altura. El gel se higienizó previamente con 22 mL de solución de hidróxido de sodio 0,2 M. Se pasaron 33 mL de agua destilada, y seguidamente

33 mL de la solución de equilibrio de ácido bórico 50 mM, pH 8,0. Se aplicó la muestra procedente de la reacción de conjugación diluida en la solución de equilibrio, hasta una concentración de 0,9 mg/mL. La elución de la muestra que contiene el conjugado de EPO con $PEG_{2,40K}$-NHS ($PEG_{2,40K}$-EPO) se realizó secuencialmente empleando el mismo tampón de equilibrio con concentraciones crecientes de cloruro de sodio entre 0,175 M y 0,5 M. El flujo volumétrico fue de 1,2 mL/min, y la carga de 0,58 mg de proteína/mL de gel. El recobrado del proceso fue de 40% y se obtuvo un grado de pureza de 97%.

Ejemplo 5. Caracterización físico-química de las EPO peguiladas

Determinación de la concentración del conjugado

Se determinó por medición de absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro. El cálculo de la concentración de proteínas se realizó empleando un coeficiente de extinción molar para la EPO de 0,743.

Caracterización mediante la cromatografía de filtración en gel

Las separaciones cromatográficas se realizaron utilizando una bomba de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y un detector de luz ultravioleta con un filtro de 226 nm. La masa de aplicación fue de 100 µg de proteína. Las cromatografías fueron realizadas con una matriz Superdex-200. Se analizaron dos variantes de EPO peguilada ($PEG_{2,32K}$ –EPO y $PEG_{2,40K}$ -EPO) y la EPO sin modificar.

En la Figura 3 se observa la correspondencia que existe entre la masa molecular estimada para cada variante y los tiempos de retención resultantes. Con el menor tiempo de retención eluyó el conjugado de $PEG_{2,40K}$-EPO, pues tiene el mayor tamaño molecular, seguidamente eluyó el conjugado de $PEG_{2,32K}$ -EPO y finalmente eluyó la EPO sin modificar.

Ejemplo 6. Caracterización biológica del conjugado de $PEG_{2,32K}$-EPO

La determinación de la potencia de la EPO peguilada se realizó por el método de ratones normocitémicos. Los ratones de la línea B6D2F1 (16-18 g) hembras, vírgenes, fueron inoculados por vía subcutánea con 0,2 mL de las diferentes diluciones ((300, 450 y 600 UI/mL, que equivalen a 3; 4,5 y 6 µg/ratón) de las muestras de $PEG_{2,40K}$ -EPO, $PEG_{2,32K}$ -EPO, el material de referencia (como control positivo) y el control negativo (solo diluente), a razón de tres animales por grupo. Se emplearon adicionalmente dos animales, a los que se les inoculó con una solución de tampón borato 50 mM, pH 8,0; con el objetivo de evaluar su toxicidad. Después

de 72 horas de inoculados, se le extrajo una muestra de sangre a cada animal, por vía retroorbital, y fueron depositadas en viales que contenían 4 µL de heparina sódica (5000 UI). Se tomaron 40 µL de la sangre periférica, y se mezclaron con 120 µL de una solución compuesta por 0,3 mM de azul de metileno; 1,29 mM de citrato de sodio; 5 mL de suero fisiológico; y 10 mL de agua destilada, y se incubaron por una hora en baño de María, a 37 °C. Luego se realizó una hemólisis selectiva, durante 6 minutos, mediante tratamiento con una solución lisante compuesta por 0,08 mM de EDTA tetrasódico; 0,15 mM de cloruro de amonio; y 9,98 mM de bicarbonato de sodio. La lisis de los eritrocitos es detenida por sobredilución con suero fisiológico, y los reticulocitos son contados visualmente en una cámara de Neubauer. El procesamiento de los datos y el cálculo de la potencia se efectúo utilizando un diseño al azar de líneas paralelas de un patrón y un desconocido, para la detección de la validez de la linealidad y el paralelismo, a un nivel de significación α = 0,05. Los valores obtenidos deben cumplir con lo establecido por la Farmacopea Europea, que establece que el valor de la relación de la potencia calculada sobre la supuesta, expresada en porciento, no debe ser menor de un 80% ni mayor de un 125%, y que los límites fiduciales de la potencia calculada se deben encontrar en un rango comprendido entre 64% y 156%.

En la Figura 4 se observa el gráfico de los datos obtenidos directamente del experimento del conteo de reticulocitos, donde se han aplicado cantidades crecientes de EPO medidas en UI de potencia. Se le aplicó un test estadístico de Tukey-Kramer para la comparación de medias, con el objetivo de analizar los valores de las actividades *in vivo*. El análisis estadístico de los datos demostró que no existen diferencias significativas entre los valores, para $P<0,05$. Las diferencias de las actividades biológicas entre la EPO peguilada y la EPO sin modificar empleada como control positivo, se encuentra en el rango de la variación del ensayo (± 50%).

Es importante destacar que las dosis que se emplearon para realizar el ensayo fueron de 300, 450 y 600 UI de potencia. Estas son las dosis establecidas para detectar la actividad biológica de la EPO nativa, mientras que el ensayo realizado empleando el producto de la compañía Amgen, Mircera™, que es una EPO conjugada a una estructura polimérica lineal de 30 kDa de masa molecular ($PEG_{1,30K}$ –EPO), requiere una dosis mínima de 6000 UI de potencia). Sin embargo, en el

ensayo realizado en esta invención, con una dosis 20 veces menor, se detecta actividad biológica *in vivo* de la EPO peguilada.

Ejemplo 7. Resistencia a la degradación por proteasas

Para verificar la resistencia a degradación por proteasas de las diferentes moléculas de PEG–EPO, se realizó un experimento *in vitro,* en el cual las EPO peguiladas y la proteína nativa (como control) se digirieron con tripsina. Las dos variantes peguiladas de EPO mostraron una mayor resistencia a la degradación por proteasas que la EPO nativa. En la Figura 5 se muestran los resultados de la cinética de degradación de la EPO, empleada como control, y de las dos variantes peguiladas $PEG_{2,32K}$ -EPO y $PEG_{2,40K}$ -EPO. Se puede observar que las dos variantes de EPO peguiladas presentan una mayor resistencia a la degradación por proteasas que la EPO nativa.

Ejemplo 8. Farmacocinética del conjugado $PEG_{2,32K}$-EPO

El estudio farmacocinético se realizó comparando la EPO sin modificar, el conjugado $PEG_{2,32K}$-EPO, el conjugado $PEG_{2,40K}$-EPO y el conjugado $PEG_{1,30K}$-EPO. Se emplearon conejos de la cepa Nueva Zelandia, de 2 Kg de masa. Los resultados de tiempo de vida media (t ½), área bajo la curva (del inglés *area under the curve*, abreviado AUC) y tiempo medio de residencia (del inglés *mean residence time*, abreviado MRT) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Farmacocinética comparada de la EPO, el conjugado $PEG_{2,32K}$-EPO, el conjugado $PEG_{2,40K}$-EPO y el conjugado $PEG_{1,30K}$-EPO.

Parámetro farmacocinético	$PEG_{2,32K}$-EPO	$PEG_{2,40K}$-EPO	$PEG_{1,30K}$-EPO	EPO sin modificar
t ½ (h)	165,93 +/- 74,41	131,24 +/- 6,70	68,33 +/- 5,42	4,86 +/- 1,27
AUC (UI/mL·h)	83,59 +/- 44,63	23,32 +/- 14,92	242,44 +/-95,53	15,89 +/- 2,31
MRT (h)	238,94 +/- 12,05	199,62 +/- 4,22	95,87 +/-15,89	6,62 +/- 1,95

Se puede apreciar que todas las EPO peguiladas resultaron tener un tiempo de vida medio superior al de la EPO sin modificar. El tiempo de vida media del conjugado $PEG_{2,32K}$-EPO fue muy superior (2,4 veces) al obtenido con el $PEG_{1,30K}$-EPO. Este resultado es inesperado, teniendo en cuenta que ambos conjugados presentan tamaños moleculares muy similares. También esta molécula ramificada asimétrica

presentó un tiempo de vida medio superior al conjugado $PEG_{2,40K}$-EPO, que también es ramificado, y con un peso molecular superior, lo cual tampoco era de esperar.

Ejemplo 9. Comparación de los resultados farmacocinéticos de distintos conjugados de EPO

Este estudio farmacocinético se realizó comparando el conjugado $PEG_{2,32K}$-EPO, que tiene una rama de 12 kDa y otra de 20 kDa de masa molecular; EPO conjugada a una estructura de PEG asimétrico con una rama de 5 kDa y otra de 7 kDa de masa molecular ($PEG_{2,12K}$-EPO) ; el conjugado de EPO con una estructura simétrica de dos ramas de 7 kDa cada una ($PEG_{2,14K}$-EPO); y el conjugado de EPO a un PEG lineal de 12 kDa de masa molecular ($PEG_{1,12K}$-EPO). Para realizar este estudio, el conjugado $PEG_{2,12K}$-EPO se obtuvo de forma similar al conjugado $PEG_{2,32K}$-EPO, pero utilizando mPEG de menor masa molecular. El conjugado $PEG_{2,14K}$-EPO se obtuvo de forma similar al conjugado $PEG_{2,40K}$-EPO, pero utilizando mPEG de menor masa molecular. El conjugado de $PEG_{1,12K}$-EPO se obtuvo activando el mPEG de 12 kDa de masa molecular como se describió al inicio del Ejemplo 1, y después se realizó la conjugación con la EPO hr, como se describe en el Ejemplo 2. Para la comparación, se emplearon conejos de la cepa Nueva Zelandia, de 2 Kg de masa. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El conjugado de la presente invención ($PEG_{2,32K}$-EPO) mostró tener un tiempo de vida media mayor que los restantes conjugados analizados.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de distintos conjugados de EPO.

Parámetro	$PEG_{2,32K}$-EPO (asimétrico, 12 y 20 kDa)	$PEG_{2,12K}$-EPO (asimétrico, 5 y 7 kDa)	$PEG_{1,12K}$-EPO	$PEG_{2,14K}$-EPO
t ½ (h)	165,93 +/- 74,41	89,72 +/- 7,87	38,33 +/- 10,97	81,63 +/- 10,31
AUC (UI/mL·h)	83,59 +/- 44,63	31,89 +/- 10,57	110,32 +/- 87,04	28,12 +/- 7,71
MRT (h)	238,94 +/- 12,05	87,14 +/- 17,54	46,41 +/-17,82	80,01 +/- 14,93

Ejemplo 10. Comparación de la actividad biológica de distintos conjugados de EPO

La actividad biológica de los conjugados se midió de forma similar a lo descrito en el Ejemplo 6. Se compararon los resultados obtenidos para los conjugados: (1) $PEG_{2,32K}$-EPO; (2) $PEG_{2,12K}$-EPO; (3) $PEG_{2,14K}$-EPO; y (4) $PEG_{1,12K}$-EPO. Como

control se utilizó la EPO hr sin modificar. En la Figura 6 se puede observar que el conjugado de la presente invención ($PEG_{2,32K}$-EPO) mantiene la actividad biológica de la proteína sin modificar, a diferencia del resto de los conjugados analizados, en los cuales disminuye la actividad biológica al ocurrir la peguilación.

Ejemplo 11. Estudio farmacocinético empleando los límites extremos de masa molecular de los mPEG que conforman las dos ramas asimétricas del conjugado $PEG_{2,32K}$- EPO

Como el PEG es polidisperso, y el material de partida que se utiliza para conformar la estructura de PEG asimétrico $PEG_{2,32K}$ puede tener una variación del valor teórico de 12 kDa y 20 kDa de peso molecular, se realizó un estudio farmacocinético de los conjugados de EPO con estructuras asimétricas de PEG con masas moleculares de 29 kDa ($PEG_{2,29K}$-EPO) y 35 kDa ($PEG_{2,35K}$-EPO). Estos son los límites de masa molecular total del PEG que forma parte del conjugado de EPO de la presente invención. Los conjugados $PEG_{2,29K}$-EPO y $PEG_{2,35K}$-EPO se obtuvieron de igual forma que el conjugado $PEG_{2,32K}$-EPO. Se emplearon conejos de la cepa Nueva Zelandia, de 2 Kg de masa. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Como se puede apreciar, no existen diferencias en cuanto a los parámetros farmacocinéticos en las variantes de conjugado estudiadas.

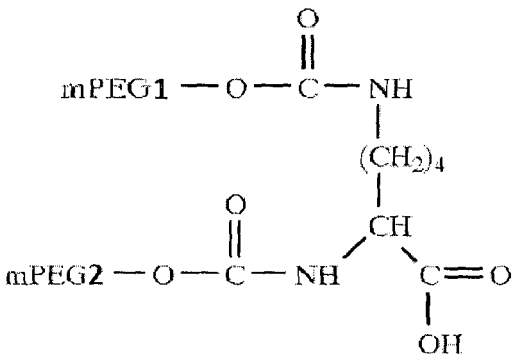
Tabla 3. Resultados de los parámetros farmacocinéticos de conjugados con PEG de diferentes pesos moleculares.

Parámetro	$PEG_{2,32K}$-EPO	$PEG_{2,29K}$-EPO	$PEG_{2,35K}$-EPO
t ½ (h)	165,93 +/- 74,41	159,24 +/- 19,84	174,01 +/- 25,66
AUC (UI/mL·h)	83,59 +/- 44,63	79,76 +/- 21,67	85,55 +/- 34,75
MRT (h)	238,94 +/- 12,05	243,42 +/- 18,54	235,34 +/-12,43

REIVINDICACIONES

CONJUGADO QUE COMPRENDE ERITROPOYETINA Y UNA ESTRUCTURA POLIMÉRICA RAMIFICADA

1. Un conjugado que comprende eritropoyetina (EPO) y una estructura polimérica ramificada asimétrica que comprende dos ramas de monometoxipolietilenglicol (mPEG) donde la masa molecular de una de las ramas de mPEG está entre 10 kDa y 14 kDa, y la masa molecular de la otra rama de mPEG está entre 17 kDa y 23 kDa.
2. El conjugado de la reivindicación 1 donde la masa molecular de una de las ramas de mPEG es 12 kDa y la masa molecular de la otra rama de mPEG es 20 kDa.
3. El conjugado de la reivindicación 1 donde la estructura polimérica ramificada asimétrica se representa como:

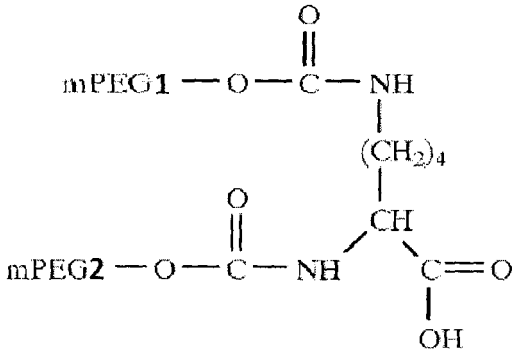


4. El conjugado de la reivindicación 3 donde la masa molecular de mPEG1 es 12 kDa y la masa molecular de mPEG2 es 20 kDa, o la masa molecular de mPEG1 es 20 kDa y la masa molecular de mPEG2 es 12 kDa.
5. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde la EPO es EPO humana recombinante (EPO hr).
6. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. Un método para la obtención de eritropoyetina (EPO) peguilada que se caracteriza porque dicha proteína se conjuga a una estructura polimérica ramificada asimétrica que comprende dos ramas de monometoxipolietilenglicol (mPEG) donde la masa molecular de una de las

ramas de mPEG está entre 10 kDa y 14 kDa, y la masa molecular de la otra rama de mPEG está entre 17 kDa y 23 kDa.

8. El método de la reivindicación 7 donde la masa molecular de una de las ramas de mPEG es 12 kDa y la masa molecular de la otra rama de mPEG es 20 kDa.

9. El método de la reivindicación 7 donde la estructura polimérica ramificada asimétrica se representa como:



10. El método de la reivindicación 9 donde la masa molecular de mPEG1 es 12 kDa y la masa molecular de mPEG2 es 20 kDa, o la masa molecular de mPEG1 es 20 kDa y la masa molecular de mPEG2 es 12 kDa.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-10 donde la EPO es EPO humana recombinante (EPO hr).