

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 512 499**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2004 E 04726602 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1620118**

54 Título: **Fármacos pegilados reversibles**

30 Prioridad:

08.04.2003 US 460816 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2014

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**SHECHTER, YORAM;
FRIDKIN, MATITYAHU y
TSUBERY, HAIM**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 512 499 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

Fármacos pegilados reversibles

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con la pegilación reversible de fármacos y con fármacos pegilados que se convierten lentamente en fármacos en condiciones fisiológicas.

10 **Abreviaturas:** **ANP**, péptido natriurético atrial; **t-Boc**, terc-butiloxicarbonilo; **BSA**, albúmina de suero bovino; **DCC**, N,N'-diciclohexilcarbodiimida; **DCU**, diciclohexilurea; **DMF**, dimetilformamida; **DTNB**, 5,5-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico); **ESMS**, espectros de masas por ionización por electrospray; **Fmoc**, 9-fluorenilmetoxicarbonilo; **Fmoc-OSu**, Fmoc-N-hidroxisuccinimida éster; **FMS**, 2-sulfo-9-fluorenilo-metoxicarbonilo; **GSH**, glutatión reducido; **hGH**, hormona del crecimiento humano; **HOSu**, N-hidroxi-succinimida; **HPLC**, cromatografía en líquido de alto rendimiento; **IFN- α 2**, interferón- α 2 humano; **ifnar2-EC**, parte extracelular del receptor IFN- α 2; **MAL-FMS-NHS**, N-[2-(maleimido-propionilo amino)-7-sulfo-fluoren-9-il-metoxi-carbonilo]succinimida. (**Precursor 8**); **MAL-FMS-OSu**, MAL-FMS-NHS; **NHS**, N-hidroxi-succinimida; **PBS**, solución salina tamponada con fosfato; **PEG**, polietilenglicol; **PEG₅₀₀₀**, 5,000 Da-PEG; **PEG₄₀** o **PEG₄₀₀₀₀**, 40,000 Da-PEG ramificado; **PEG₄₀-SH**, a 40 kDa-PEG ramificado que contiene una porción sulfhidrilo; **PEG₄₀-OSu**, PEG₄₀-N-hidroxisuccinimida éster; **SC**, subcutáneo; **TFA**, ácido trifluoacético; **TNBS**, ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico.

20

Antecedentes de la invención

La mayoría de los fármacos peptídicos y proteicos son de vida corta y frecuentemente tienen una vida media circulatoria corta *in vivo*. Esto es particularmente válido para proteínas no glicosiladas de una masa molecular menor que 50 kDa. El corto tiempo de vida de las proteínas *in vivo* se atribuye a varios factores, que incluyen filtración glomerular en el riñón y proteólisis. Teniendo en cuenta que los fármacos peptídicos y proteicos no se absorben por vía oral, el mantenimiento prolongado de fármacos terapéuticamente activos en la circulación es una característica deseable de importancia clínica evidente. Las proteínas con masas moleculares por encima de ~60 kDa evaden grandemente la filtración glomerular y no son, en su parte principal filtradas en el riñón. Por lo tanto ellas permanecen en la circulación por más tiempo que las proteínas más pequeñas.

30

Una estrategia atractiva para mejorar las propiedades clínicas de pequeños fármacos proteicos ha llegado a ser llamado como PEGilación (o pegilación, como se usa de aquí en adelante). Mediante esta estrategia varias cadenas hidrofílicas de polietilenglicol (PEG) se unen covalentemente a la proteína para incrementar su masa molecular efectiva. Ventajas clínicas importantes se obtienen mediante la pegilación. Por ejemplo, el tiempo de vida *in vivo* se puede prolongar en algunos casos desde minutos a horas, debido a la interferencia estérica que protege los conjugados de la proteólisis *in vivo* y el incremento de la masa molecular, que imposibilita la filtración por el riñón. La pegilación de proteínas también disminuye la inmunogenicidad, presumiblemente mediante la protección de conjugados de ser reconocidos como antígenos extraños por el sistema inmune.

40

A pesar de las profundas ventajas frecuentemente obtenidas por la pegilación de proteínas terapéuticas, esta tecnología tiene de un inconveniente principal. Por un lado, la unión covalente de cadenas de PEG a las proteínas prolonga su tiempo de vida *in vivo*, mediante la protección de los conjugados de la proteólisis y escudándolos del sistema inmune. Por otro lado, la interferencia estérica de las cadenas de PEG frecuentemente conduce a una pérdida drástica o incluso suprime las potencias biológicas y farmacológicas de las proteínas en los conjugados (Fuertges y Abuchowski, 1990; Katre, 1993; Bailon y Berthold, 1998; Nucci y otros, 1991; Delgado y otros, 1992; Fung y otros, 1997; Reddy, 2000; Veronese, 2001). En principio, esta deficiencia puede superarse mediante la introducción de las cadenas de PEG a través de un enlace químico que es sensible a la hidrólisis, o se puede escindir enzimáticamente por las proteasas séricas o esterases. Claramente, una velocidad constante de hidrólisis es crucial. Por tanto, una condición de requisito previo es que la hidrólisis de las cadenas de PEG del conjugado tenga lugar a una velocidad lenta, y de una manera homogénea *in vivo*.

50

Sería altamente deseable diseñar derivados de PEG de proteínas o péptidos o pequeñas moléculas de fármacos de la que el PEG puede ser liberado por hidrólisis. Un conjugado de PEG reversible adecuado tendría que ser hidrolizado lentamente y espontáneamente en condiciones fisiológicas y permitiría la reactivación dependiente del tiempo de proteínas y péptidos pegilados inactivos.

55

Se propusieron varios métodos para pegilación reversible (Greenwald y otros, 1999, 2000; Lee y otros, 2001; Garman y Kalindjian, 1987; Zalipsky y otros, 1999). Ellos adolecen, sin embargo, de los principales inconvenientes potenciales. Por

ejemplo, la dependencia de desprendimiento enzimático como una etapa determinante de la velocidad (Greenwald y otros, 1999, 2000; Lee y otros, 2001) de PEGs de los conjugados por proteasas séricas y/o esterases podría no producir perfiles farmacocinéticos deseables *in situ*. Además, es dependiente de la disponibilidad de las enzimas. El conjugado unido por disulfuro no se escinde en el medio ambiente no reductor de los fluidos corporales (Zalipsky y otros, 1999). Un conjugado pegilado reversible que todavía conserva una porción activa capaz de reaccionar con las funciones SH libres puede resultar en entrecruzamiento complejo no deseado (Garman y Kalindjian, 1987). Sería muy deseable diseñar una versión de pegilación reversible que pudiera superar estas deficiencias.

La publicación internacional PCT núm. WO 98/05361 de los presentes solicitantes describe un nuevo enfoque conceptual para prolongar la vida media de los fármacos por derivatización de un fármaco que tiene al menos un amino libre, carboxilo, hidroxilo y/o grupos mercapto con una porción que es altamente sensible a bases y es removible en condiciones básicas suaves. El profármaco obtenido es inactivo, pero se somete a transformación en el fármaco activo bajo condiciones fisiológicas en el cuerpo. Los ejemplos de dichas porciones son los radicales 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS). De acuerdo con este concepto, los derivados de Fmoc y FMS de fármacos peptídicos tales como la insulina y la hormona del crecimiento humano, así como de los fármacos no peptídicos, tales como propranolol, cefalexina y piperacilina se han descrito en dicho documento WO 98/05361. Más tarde, los derivados FMS de citocinas se han descrito en el documento WO 02/36067, y derivados FMS de encefalina, doxorubicina, anfotericina B, gentamicina y hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) se divulgaron en el documento WO 02/7859.

La patente de Estados Unidos núm. 6,433,135 divulga un derivado pegilado de un análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH o GnRH) en el que la porción de PEG está unida covalentemente a un residuo de serina de dicho análogo de LHRH. En el proceso de preparación de dicho análogo de LHRH-PEG mediante síntesis de péptidos en fase sólida, un residuo de serina pegilado tales como Fmoc-Ser(PEG)-OH o tBoc-Ser(PEG)-OH se introduce en el análogo de LHRH, y el análogo de LHRH-PEG producido se recupera (sin el grupo protector Fmoc o t-Boc).

La solicitud de patente de Japón JP 3148298 describe conjugados de PEG-péptido, por ejemplo, el conjugado PEG-GnRH, obtenido al reaccionar el grupo guanidino de un residuo de arginina con PEG, mientras se protegen los grupos amino presentes en las moléculas.

La cita de cualquier documento en la presente no se debe pretender como una admisión de que tal documento sea técnica anterior pertinente o material considerado para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración acerca del contenido o una fecha de cualquier documento se basa en la información disponible por los solicitantes en el momento de la presentación y no constituye una admisión acerca de la exactitud de dicha declaración.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se ha encontrado ahora, de acuerdo con la presente invención, que por la combinación de la tecnología de pegilación de proteínas con la tecnología de la derivatización con Fmoc o FMS o porciones similares removibles en condiciones básicas suaves, las principales deficiencias de la tecnología de pegilación de proteínas, principalmente la pérdida de potencias biológicas y farmacológicas en los conjugados de PEG *in vivo*, se puede superar.

Es así un objeto de la presente invención diseñar conjugados de PEG-proteína de los que el PEG puede ser liberado por hidrólisis en condiciones fisiológicas en el cuerpo.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar conjugados de PEG-proteína reversibles que están inactivos cuando se administran y permiten la reactivación dependiente del tiempo de la proteína pegilada inactivada en condiciones fisiológicas en el cuerpo.

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. En la presente se divulga más aún un compuesto de la fórmula:



en donde

Y es una porción de un fármaco que contiene al menos un grupo funcional seleccionado de amino, carboxilo, fosfato, hidroxilo y/o mercapto, y

X es un radical que es altamente sensible a bases y es removible en condiciones básicas suaves, dicho radical que lleva una porción de PEG lineal o ramificado;

n es un entero de al menos uno, y sales farmacéuticamente aceptables de éstos.

El profármaco obtenido es inactivo, pero se somete a transformación en el fármaco activo Y en condiciones fisiológicas en el cuerpo.

En modalidades preferidas de la invención, el radical X es Fmoc o 2-sulfo-Fmoc (en la presente "FMS"), Y es un fármaco peptídico o proteico unido a Y a través de un grupo amino, n es 1 o 2, y la porción de PEG lineal o ramificado tiene un peso molecular de 5,000-40,000 Da.

En otro aspecto, la presente invención proporciona nuevos métodos e intermediarios y precursores para la preparación de los conjugados de la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un profármaco de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la estabilidad de la porción funcional de maleimida en MAL-FMS-NHS en soluciones acuosas que tienen diferentes valores de pH. MAL-FMS-NHS (1 mM) se incubó a temperatura ambiente en H₂O. (pH 6.0), en ácido acético 0.007 M (pH~4.0), en tampón de fosfato 0.1 M (pH 7.4), y en NaHCO₃0.1 M (pH 8.5). En los puntos de tiempo indicados, las alícuotas se dejaron reaccionar con un ligero exceso de GSH (15 min a pH 7.2) y la concentración de GSH sin reaccionar se determinó con 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB).

La Figura 2 muestra el grado de incorporación de MAL-FMS-NHS a pH 7.2 en α -lactoalbúmina (α -LA) como una función de la cantidad de reactivo añadido. Para muestras de α -LA (1.0 ml de 1mg/ml en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.2), MAL-FMS-NHS se añadió a concentraciones que varían desde 1 equivalente hasta 14 equivalentes molares de MAL-FMS-NHS. Para cada tratamiento, la cantidad incorporada en la proteína se determinó por la absorbancia a 280 nm, después de la diálisis, y por cuantificación de la cantidad de porciones de cadena lateral de amino no modificadas con ácido trinitrobenzeno sulfónico. (TNBS).

Las Figuras 3A-3B muestran el curso del tiempo de reactivación de conjugados (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₂-gentamicina y (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-gentamicina, respectivamente. Después de la incubación a pH 8.5, 37°C, se retiraron alícuotas en los puntos de tiempo indicados y se analizaron por su potencia para detener la replicación de *E. coli*. La IC₅₀ se determinó para cada alícuota. La gentamicina nativa inhibe la replicación de *E. coli* con IC₅₀ valor = 0.22±0.02 μ M.

Las Figuras 4A-4B muestran la modificación progresiva de las porciones de aminoácidos de la insulina humana con PEG₅₀₀₀-Fmoc-OSu y la pérdida de potencia biológica como una función de PEG₅₀₀₀-Fmoc incorporado a la insulina, respectivamente. (4A) La insulina (17.24 nmoles en 0.2 ml NaHCO₃0.01 M) reaccionó con concentraciones crecientes de PEG₅₀₀₀-Fmoc-OSu en un exceso molar sobre la proteína como se indica en la figura durante 2 horas a 25°C. El número de grupos amino libres que permanecen sin modificar se cuantificaron con TNBS. (4B) Las alícuotas que contienen 0.4, 0.7, 1.1, 1.5 y 2.2 moles de PEG₅₀₀₀-Fmoc unido covalentemente por mol de insulina, se ensayaron para su potencia lipogénica en adipocitos de rata. Bajo las condiciones del ensayo, la insulina humana estimula la lipogénesis, 4-6 veces por encima de los niveles basales con ED₅₀ valor de 0.2±0.02 ng/ml. Un derivado de insulina que exhibe ED₅₀ de 2.0±0.2 ng/ml en este ensayo se considera que tiene 10% de la potencia lipogénica de la insulina nativa.

La Figura 5 muestra la velocidad de reactivación de conjugados de PEG₅₀₀₀-Fmoc-insulina tras la incubación a pH 8.5, 37°C. Los conjugados de PEG₅₀₀₀-Fmoc-insulina que contienen uno y dos moles de PEG₅₀₀₀-Fmoc/mol de insulina se incubaron a una concentración de 0.172 μ M en NaHCO₃0.1 M -0.5% albúmina de suero bovino y NaN₃1 mM a 37°C. Se analizaron alícuotas en los puntos de tiempo indicados (en varias concentraciones para cada alícuota) para sus potencias lipogénicas en adipocitos de rata.

La Figura 6 muestra un efecto hipoglicemiante prolongado después de una única administración subcutánea (SC) de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina en ratones. Los ratones recibieron SC, tanto insulina nativa (Zn²⁺-libre, 1.72 nmol/ratón en 0.2 ml tampón PBS) como (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina (17.2 nmol/ratón, en 0.2 ml tampón PBS). Los niveles de glucosa en sangre se determinaron en los puntos de tiempo indicados. Cada punto es la media aritmética±SEM de glucosa en sangre de cinco ratones.

La Figura 7 muestra el patrón hipoglicemiante en ratones después de una sola administración intraperitoneal (IP) de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina. Los grupos de ratones recibieron tanto insulina IP (Zn²⁺-libre, 0.345 nmol/ratón, en 0.2 ml tampón PBS) como (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina (3.45 nmoles/ratón, en 0.2 ml tampón PBS). Los niveles de glucosa en sangre se determinaron en los puntos de tiempo indicados. Cada punto en la figura es la media aritmética ± SEM de cinco ratones.

La Figura 8 muestra la velocidad de liberación de la exendina-4 del conjugado PEG₄₀-FMS-exendina-4, tras la incubación a pH 8.5, 37°C. En los puntos de tiempo indicados, se cargaron alícuotas (50 μ l) en HPLC, y se corrieron bajo condiciones que resuelven bien la exendina-4 del conjugado. Los resultados se expresan como porcentaje de área del

pico máximo de exendina-4 liberada, como una función del tiempo. La exendina-4 (50 µg) se asignó al 100% del área del pico.

La Figura 9 muestra la velocidad de hidrólisis de los conjugados de PEG-FMS, tras la incubación a pH 8.5, 37°C. Las soluciones de PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4 (círculos) y PEG₅₀₀₀-FMS-4-nitro-fenil amina (cuadrados) se incubaron en PBS a pH 8.5, 37°C. En los puntos de tiempo indicados, las alícuotas (50 µl) se analizaron mediante el uso de HPLC en una columna RP-4. Los resultados se expresan como porcentaje del área del pico máximo de exendina-4 y 4-nitrofenetilamina liberadas, como una función del tiempo.

Las Figuras 10A-10B muestran los patrones hipoglucemiantes de exendina-4 nativa y PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 a continuación de una única administración subcutánea a ratones CD1. (10A) ratones CD1 se administraron SC con cualquiera exendina-4 nativa (10 µg/ratón) o con PEG₄₀-FMS-exendina-4 (10 µg/ratón de equivalentes de exendina-4). En los puntos de tiempo indicados, se determinaron los niveles de glucosa circulante. Cada grupo experimental consistió en cinco ratones. Los datos se presentan como medias±SE. (10B) Tres grupos de ratones CD1 (n=6 por grupo) experimentaron una administración subcutánea de solución salina, exendina-4 nativa (4 µg/ratón) o PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 (4µg péptido/ratón). Los niveles de glucosa circulante fueron monitoreados a continuación. Los resultados se expresan como el porcentaje de disminución de la concentración de glucosa en plasma en los grupos tratados con exendina-4 o PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 con respecto a la encontrada en el grupo tratado con solución salina medido en el mismo punto de tiempo durante el día.

Las Figuras 11A-11C muestran la liberación de IFNα2 activo tras la incubación de PEG₄₀-FMS-IFNα2 a pH 8.5, 37°C. PEG₄₀-FMS-IFNα2 (0.3 mg proteína/ml) se incubó en tampón de fosfato 0.1 M con NaN₃ 2 mM y 6 mg/ml de BSA (pH 8.5, 37°C). En los puntos de tiempo indicados, se retiraron alícuotas. (11A) Análisis de la descarga de IFNα2 del conjugado por SDS-PAGE; las cantidades de descarga IFNα2 fueron cuantificadas en relación con una referencia de IFNα2 de concentración e intensidad (los incrementos de tiempo y los porcentajes se indican) conocidas; (11B) Las alícuotas retiradas en los puntos de tiempo indicados se analizaron por su capacidad de unión de IFNα2 en BIAcore; (11C) perfil ajustado de BIAcore de descarga IFNα2 nativo de PEG₄₀-FMS-IFNα2.

La Figura 12 muestra los resultados de la administración SC de IFNα2 nativo y PEG₄₀-FMS-IFNα2. Las ratas se inyectaron SC con las concentraciones indicadas de IFNα2 nativo (100 µg/rata) o el conjugado de PEG₄₀-FMS-IFNα2 (12, 60, 120 µg/rata) (0.2 ml/rata, disuelto en PBS). Alícuotas de sangre fueron retiradas en los puntos de tiempo indicados. Las actividades antivirales circulantes en las alícuotas se determinaron en células WISH humanas con diluciones seriadas de 3 veces cada alícuota.

La Figura 13 muestra el resultado de la administración intravenosa de PEG₄₀-FMS-IFNα2 a ratas. Las ratas se inyectaron por vía intravenosa con las concentraciones indicadas de IFNα2 nativo (30 µg/rata) o el conjugado de PEG₄₀-FMS-IFNα2 (30 µg/rata) (0.2 ml/rata, disuelto en PBS). Alícuotas de sangre fueron retiradas en los puntos de tiempo indicados. Las actividades antivirales circulantes en las alícuotas se determinaron en células WISH humanas con diluciones seriadas de 3 veces cada alícuota.

Las Figuras 14A-14B muestran el comportamiento experimental contra el simulado de IFNα2: (14A) a continuación de la administración SC, con concentraciones iniciales de 60 nM y 1.5 nM de PEG₄₀-FMS-IFNα2 y IFNα2 nativo, respectivamente; (14B) a continuación de la administración intravenosa a ratas con concentraciones iniciales de 20 nM de PEG₄₀-FMS-IFNα2, 1.5 nM de IFNα2 nativo en el volumen SC y no conjugado en circulación. Los insertos son las curvas experimentales.

La Figura 15 muestra la dosis-respuesta de PYY₃₋₃₆ en la ingesta de alimentos en ratones. Los ratones macho C57BL6J (10 por grupo), fueron privados de alimentos durante 24 h. En el momento de 23 h, los ratones recibieron una inyección SC de solución salina o de las dosis indicadas de PYY₃₋₃₆. En el momento de 24 h los ratones se les permitió consumir un exceso de comida pesada previamente durante 2 h. El agua potable se brindó en todo momento. La cantidad de alimento consumido por 10 ratones durante 2 h se muestra como una función de la dosis de PYY₃₋₃₆.

La Figura 16 muestra la reducción dependiente del tiempo en la ingesta de alimentos en ratones por PYY₃₋₃₆. Los ratones macho C57BL6J (10 por grupo) fueron privados de alimentos como se indica en la Figura 15 y se administró PYY₃₋₃₆ (5 nmol/ratón) en los tiempos indicados antes de comenzar el período de re-alimentación. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos idénticos.

La Figura 17 muestra los efectos de la pegilación irreversible sobre la actividad biológica de PYY₃₋₃₆. PYY₃₋₃₆ nativo se dejó reaccionar con PEG₄₀-OSu. Los grupos de 10 ratones fueron inyectados con solución salina SC, PYY₃₋₃₆, o PEG₄₀-PYY₃₋₃₆ (5 nmol/ratón) en 1 h antes de comenzar el período de re-alimentación. Los resultados son el promedio de dos experimentos idénticos.

La Figura 18 muestra que PEG₄₀-FMS está unido al grupo α-amino de PYY₃₋₃₆. PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ (100 µg) se acetiló por un exceso molar de 500 de anhídrido acético a pH 7.0, se dializó, y se incubó durante 3 días a pH 8.5, 37 ° C para eliminar cuantitativamente la porción de PEG₄₀-FMS. El PYY₃₋₃₆acetilado resultante después se sometió a tres ciclos de análisis de la secuencia de proteínas N-terminal. La secuencia obtenida fue ile-(Nε-acetil)lys-pro. El análisis de secuencia del péptido nativo produjo ile, lys, y pro en ciclos 1, 2, 3, respectivamente (no mostrado).

La **Figura 19** muestra la cinética de liberación de PYY₃₋₃₆ liberado de PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆. El PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ (750 μM en tampón fosfato 0.1 M pH 8.5, NaN₃ 2 mM, se incubó a 37°C. Las alícuotas (100 μl) se retiraron en los tiempos indicados y PYY₃₋₃₆ libre se midió por HPLC. La cantidad acumulada de PYY₃₋₃₆ liberado se muestra como una función del tiempo. La cantidad de PYY₃₋₃₆ en el conjugado inicial se determinó por hidrólisis ácida de una alícuota de 20 μl, seguido por análisis de aminoácidos.

La **Figura 20** muestra la velocidad de hidrólisis de PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ en suero normal de ratón. PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ (0.5 μM) se incubó en suero normal de ratón a 37°C. Las alícuotas se retiraron en los tiempos indicados y la cantidad de 2-PEG₄₀-9-sulfo-fulveno liberado de PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ se determinó por HPLC y tomado para el cálculo de la velocidad de hidrólisis de PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆. El inserto muestra que PYY₃₋₃₆ degrada rápidamente en suero normal de ratón a 37°C. PYY₃₋₃₆ (50 nM) se incubó en suero normal de ratón a 37°C. En los tiempos indicados, alícuotas (0.1 ml) se removieron, desproteinizaron por 3 volúmenes de etanol y la cantidad de PYY₃₋₃₆ se determinó en los sobrenadantes por HPLC.

La **Figura 21** muestra que el PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ provoca saciedad prolongada. El protocolo descrito en la Figura 15 se repitió, excepto que los ratones recibieron SC solución salina o PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ (5 nmol/ratón) en os tiempos indicados antes de comenzar la realimentación. Los resultados son el promedio de tres experimentos idénticos, normalizados de acuerdo con el control de solución salina.

La **Figura 22** muestra el curso temporal de reactivación de PEG₄₀₀₀₀-FMS-hGH tras la incubación a pH 8.5, 37°C. PEG₄₀₀₀₀-FMS-hGH (1 mg/ml) se incubó en tampón fosfato 0.1 M, 0.6% BSA y -2 mM NaN₃ a 37°C. Las alícuotas se retiraron en los puntos de tiempo indicados, y se analizaron para sus potencias para desplazar ¹²⁵I-hGH de la preparación enriquecida de receptor hGH extraída de las membranas plasmáticas de hígado de conejo. La hGH nativa desplaza ¹²⁵I-hGH en este ensayo el medio máximamente a una concentración de 0.3±0.03 nM. Un derivado hGH que exhibe desplazamiento medio máximo en este ensayo a una concentración de 3.0±0.3 nM nM se considera que tiene 10% de potencia de unión del receptor nativo. El inserto muestra la velocidad de liberación de la hGH de PEG₄₀-FMS-hGH tras la incubación a pH 8.5, 37°C. PEG₄₀₀₀₀FMS-hGH (1 mg de proteína) se incubó como se describió anteriormente. En los puntos de tiempo indicados, alícuotas de 0.1 ml se retiraron y sometieron a análisis por HPLC analítica.

La **Figura 23** muestra la velocidad de hidrólisis de los conjugados de PEG-FMS, tras la incubación a pH 8.5, 37°C. La concentración de PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 y PEG₄₀₀₀₀-FMS-hGH se determinó para cada punto de tiempo por HPLC. El gráfico lineal obtenido indica que la velocidad de hidrólisis es de reacción de primer orden. El tiempo de vida media de los conjugados se calculó a partir de $t_{1/2} = \ln 2/k$, cuando k es la pendiente de la gráfica lineal (h^{-1}).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un nuevo enfoque conceptual para la pegilación reversible de fármacos, particularmente péptidos y proteínas de peso molecular bajo o medio, por el cual la porción de PEG y el residuo de fármaco no están unidos directamente entre sí, como en los procedimientos de pegilación estándar, sino más bien ambos residuos están unidos a diferentes posiciones de una estructura de andamio que es altamente sensible a bases y es removible en condiciones fisiológicas.

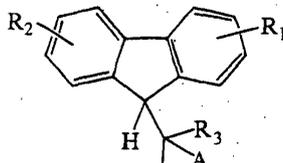
En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:



en donde

Y es una porción de un fármaco que contiene al menos un grupo funcional seleccionado de amino libre, carboxilo, fosfato, hidroxilo y/o mercapto, y

X es un radical de la fórmula:



en donde:

R₁ es un radical que contiene una porción de polietilenglicol (PEG) lineal o ramificado con un peso molecular en el intervalo de 5000 a 40000 Da;

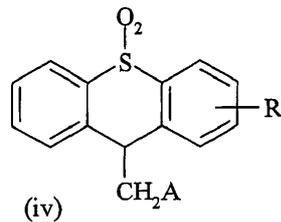
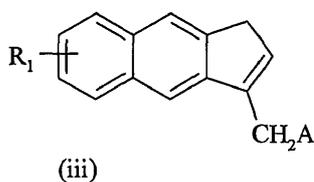
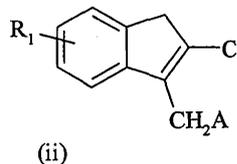
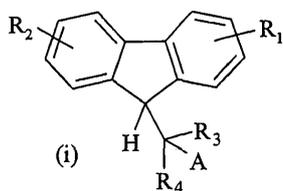
R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C1-C8), alcoxi (C1-C8), alcoxialquilo(C1-C8), arilo(C6-C10), alcarilo(C1-C8), (C6-C10)ar(C1-C8)alquilo, halógeno, nitro, -SO₃H, -SO₂NHR, amino, amonio, carboxilo, PO₃H₂, y OPO₃H₂;
 R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C1-C8) y arilo(C6-C10);
 R₃ y R₄, iguales o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C1-C8) y arilo(C6-C10);
 A es un enlace covalente cuando el radical está unido a un grupo carboxilo, fosfato o mercapto del fármaco Y, o A es -OCO- cuando el radical está unido a un grupo amino o hidroxilo del fármaco Y;
 n es un entero de al menos uno,
 y sales farmacéuticamente aceptables de éste.

En la presente se describe además un compuesto de la fórmula:



en donde

Y es una porción de un fármaco que contiene al menos un grupo funcional seleccionado de amino libre, carboxilo, fosfato, hidroxilo y/o mercapto, y X es un radical seleccionado del grupo de radicales que consiste en las fórmulas (i) a (iv):



en donde:

R₁ es un radical que contiene una porción de polietilenglicol (PEG);
 R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alcoxi, alcoxialquilo, arilo, alcarilo, aralquilo, halógeno, nitro, -SO₃H, -SO₂NHR, amino, amonio, carboxilo, PO₃H₂, y OPO₃H₂;
 R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo;
 R₃ y R₄, iguales o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo;
 A es un enlace covalente cuando el radical está unido a un grupo carboxilo, fosfato o mercapto del fármaco Y, o A es -OCO- cuando el radical está unido a un grupo amino o hidroxilo del fármaco Y;
 n es un entero de al menos uno,
 y sales farmacéuticamente aceptables de éste.

Los términos "alquilo", "alcoxi", "alcoxialquilo", "arilo", "alcarilo" y "aralquilo" en las definiciones de R₁, R₂, R₃ y R₄ en la presente descripción se usan para denotar radicales alquilo de 1-8 átomos de carbono; de preferencia 1-4, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo, y radicales arilo de 6-10 átomos de carbono, por ejemplo fenilo y naftilo. El término "halógeno" incluye bromo, fluoro, cloro y yodo.

En la invención, es un radical de la fórmula (i), preferentemente un radical de la fórmula (i) en donde R₂, R₃ y R₄ son cada uno hidrógeno y A es -OCO-, particularmente el radical 9-fluorenilmetoxicarbonilo (de aquí en adelante "Fmoc"), o con la

máxima preferencia, un radical de la fórmula (i) en donde R₂ es -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno, R₃ y R₄ son cada uno hidrógeno, y A es -OCO-, particularmente el radical 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (de aquí en adelante "FMS").

5 En otra modalidad de la invención, el grupo funcional es el radical (i), en donde R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno y A es un enlace covalente, es decir el grupo 9-fluorenilmetilo (Fm), que es aplicable para enmascaramiento reversible de grupos mercapto libres, de las funciones carboxílicas de porciones de ácido aspártico y glutámico, y de funciones de carboxilo del C-terminal de las moléculas de citocina. Los 9-ésteres de fluorenilmetilo resultantes (FM-ésteres) generan las funciones carboxílicas principales libres a continuación de una vía de reacción de β-eliminación tras el tratamiento básico suave, y así se pueden emplear de manera similar para enmascaramiento reversible de funciones carboxílicas de fármacos. El grupo Fmoc es de uso potencial adicional similar en la protección reversible de grupos hidroxilo de tirosina, serina y treonina.

10 Los radicales Fmoc halogenados (i) en donde R₂ es halógeno en la posición 2 o 7, preferentemente Cl o Br, el radical 2-cloro-1-indenilmetoxicarbonilo (CLIMOC) (ii), el radical 1-benzo[f]indenilmetoxicarbonilo uretano (BIMOC) (iii), el radical sulfona uretano (iv) y los radicales correspondiente (i) a (iv) en donde A es un enlace covalente, puede ser usado de manera similar a Fmoc y Fm para sustitución de funciones amino, carboxilo, hidroxilo y mercapto de fármacos, proporcionando así una amplia gama de sensibilidad hacia la eliminación de tales grupos en condiciones básicas, por ejemplo, condiciones fisiológicas. De hecho, los radicales anteriores (i) a (iv) pertenecen a una familia general de entidades químicas raras que experimentan hidrólisis a pH neutro o ligeramente alcalino y condiciones suaves, y por lo tanto se pueden usar para la protección reversible temporal de grupos α- y ε-amino, por ejemplo en la síntesis de péptidos, y pueden ser retirados de la función amino mediante una reacción de β-eliminación, en condiciones básicas suaves.

15 De acuerdo con la invención, un radical (i), preferentemente Fmoc o FMS unido covalentemente a porciones amino y/o hidroxilo o Fm unido covalentemente a porciones carboxilo y/o mercapto, experimenta hidrólisis (a través de β-eliminación) de nuevo a las funciones amino, hidroxilo, mercapto o carboxilo libres, en condiciones fisiológicas en el fluido corporal, particularmente a pH 7.4 y 37 °C.

En una modalidad de la invención, R₁ es un radical de la fórmula:



en donde

R₅ se selecciona del grupo que consiste en -NH-, -S-, -CO-, -COO-, -CH₂-, -SO₂-, -SO₃-, -PO₂-, y -PO₃-; y

R₆ es un enlace o un radical mediante el cual la porción de PEG está unido covalentemente a R₅.

35 En una modalidad preferida, R₅ es -NH-, y R₆ se selecciona del grupo que consiste en -CO-, -COO-, -CH₂-, -CH(CH₃)-, CO-NH-, -CS-NH-, -CO-CH₂-NH-CO-, -CO-CH(CH₃)-NH-CO-, -CO-CH₂-NH-CO-NH,

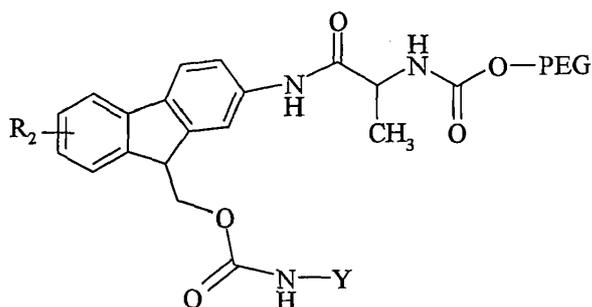


55 Z es O, S o NH; y

R_7 se selecciona del grupo que consiste en alquileo C1-C18 lineal o ramificado, fenileno, un radical oxialquileo que tiene 3-18 átomos de carbono en la cadena principal, un residuo de un péptido que contiene 2-10 residuo de aminoácidos, y un residuo de un sacárido que contiene 1-10 residuos de monosacáridos.

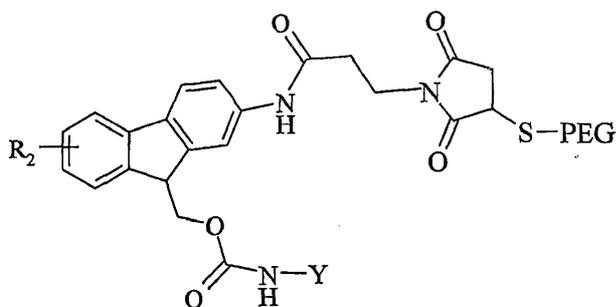
5 En el radical 4-cloro-6-Z-triazin-2-il anterior, el grupo 6-Z- está unido a la porción PEG mientras que la posición 2 está unida a R_5 , que es NH- en este caso. En el radical -CO- R_7 -succinimido anterior, el grupo tio -S- en la posición 3 está unido a la porción PEG mientras que -CO- está unido a R_5 , que es NH- en este caso.

10 En una modalidad preferida, el fármaco pegilado de la invención es un compuesto de la fórmula:



25 en donde R_2 es H o $-SO_3H$ en la posición 2 del anillo de fluoreno, y Y es preferentemente un fármaco peptídico o proteico. Cuando R_2 es H, se obtiene un conjugado Y en la presente designado PEG-Fmoc-fármaco. En una modalidad más preferida, R_2 es $-SO_3H$ en la posición 2 del anillo de fluoreno, y se obtiene un conjugado Y en la presente designado PEG-FMS-fármaco.

30 En una modalidad más preferida, el fármaco pegilado de la invención es un compuesto de la fórmula:



en donde R_2 es H o $-SO_3H$.

50 En una modalidad más preferida, el fármaco pegilado de la invención es un compuesto de la fórmula anterior, en donde R_2 es $-SO_3H$ en la posición 2 del anillo de fluoreno, y la porción PEG es un PEG ramificado de 40 kDa. Estos conjugados están en la presente identificados como $(PEG_{40}\text{-FMS})_n$ -péptido/proteína, en donde n es 1 a 3, preferentemente 1 o 2, con la máxima preferencia 1.

55 Los compuestos anteriores de la invención en donde R_5 es -NH- se pueden preparar a partir de N-(9-fluorenilmetoxi-carbonilo)-succinimida (Fmoc-OSu) o N-(2-sulfo-9-fluorenilmetoxi-carbonilo)-succinimida (FMS-OSu) sustituidos por $-NH_2$ en el anillo de fluoreno (representado en Esquema 7, la página a, primera fila, primera columna), por reacción del grupo amino con el PEG-OH activado (por ejemplo, PEG-O-CO-Cl) o un PEG derivatizado activado tal como PEG-carboxilato

(PEG-COOH, por ejemplo a través de PEG-CO-Cl), PEG-aldehído (PEG-CHO), PEG-isocianato (PEG-N=C=O), PEG-isotiocianato (PEG-N=C=S), 2,4-dicloro-6-S-PEG-1,3,5-triazina, 2,4-dicloro-6-NH-PEG-1,3,5-triazina, o 2,4-dicloro-6-O-PEG-1,3,5-triazina (Esquema 7, página a, columna derecha) con el fin de obtener los derivados en donde $-R_6$ -PEG es como se presenta en el Esquema 7 (página a, columna central).

5

En una modalidad preferida de la invención, el conjugado de la invención es un $(\text{PEG-Fmoc})_n$ -péptido/proteína, y el compuesto de partida para su preparación es el derivado maleimido de Fmoc-OSu, en la presente designado Precursor 7 o MAL-Fmoc-NHS o MAL-Fmoc-OSu, de la fórmula representada en el Esquema 3.

10

En una modalidad más preferida de la invención, el conjugado de la invención es un $(\text{PEG-FMS})_n$ -péptido/proteína, y el compuesto de partida para su preparación es el derivado maleimido de FMS-OSu, en la presente designado Precursor 8 o MAL-FMS-NHS o MAL-FMS-OSu, de la fórmula representada en el Esquema 3.

15

Dos posibles vías para la pegilación de péptidos/proteínas objetivo y la preparación de conjugados $(\text{PEG-Fmoc})_n$ -péptido/proteína o $(\text{PEG-FMS})_n$ -péptido/proteína se proporcionan por la invención, como se representa en el Esquema 6. Ambas vías son procedimientos de dos etapas.

20

De acuerdo con una vía, MAL-FMS-NHS o MAL-Fmoc-NHS se une primero al componente amina de péptido/proteína objetivo, obteniendo así un conjugado MAL-FMS-péptido/proteína o MAL-Fmoc-péptido/proteína, y después sustituir PEG-SH por la porción de maleimida, lo que produce el conjugado $(\text{PEG-FMS})_n$ -péptido/proteína o $(\text{PEG-Fmoc})_n$ -péptido/proteína, respectivamente.

25

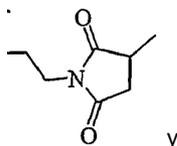
En la segunda vía, MAL-FMS-NHS o MAL-Fmoc-NHS se hace reaccionar primero con PEG-SH, formando así un conjugado PEG-FMS-NHS o PEG-Fmoc-NHS, y después haciéndolo reaccionar con el componente amina del péptido o la proteína objetivo resultante en el deseado conjugado $(\text{PEG-FMS})_n$ -péptido/proteína o $(\text{PEG-Fmoc})_n$ -péptido/proteína, respectivamente. Esta vía es adecuada para péptidos y proteínas que contienen sulfhidrilo o disulfuro.

30

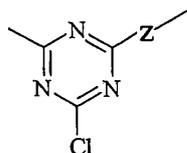
Los compuestos en donde R_5 es -NH- y R_6 es -CO-NH- o -CS-NH- se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituido por -N=C=O o -N=C=S en el anillo de fluoreno (representado en el Esquema 7, página C, primera fila y la última fila, primera columna), respectivamente, por reacción con PEG-NH₂. No es necesaria la activación debido a que estas especies de Fmoc/FMS ya están activadas.

35

En una modalidad adicional de la invención, R_5 es -S-; y R_6 se selecciona del grupo que consiste en



40



45

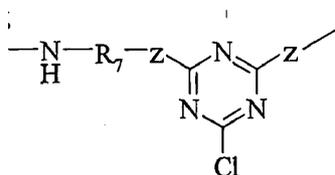
en donde Z es O, S o NH.

50

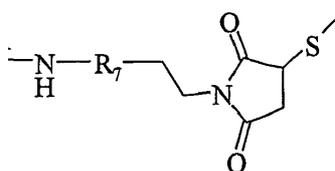
Los compuestos anteriores de la invención en donde R_5 es -S- se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituido por -SH en el anillo de fluoreno (representado en el Esquema 7, página b, segunda fila, primera columna), por reacción con PEG-maleimida de la fórmula mostrada en el Esquema 7, página b, segunda fila, columna derecha), obteniendo así un compuesto pegilado de la invención en donde la porción de PEG está unida al anillo de fluoreno a través de un residuo como se representa en el Esquema 7, página b, segunda fila, columna central, o por reacción con 2,4-dicloro-6-S-PEG-1,3,5-triazina, 2,4-dicloro-6-NH-PEG-1,3,5-triazina, o 2,4-dicloro-6-O-PEG-1,3,5-triazina.

55

En otra modalidad, en el fármaco pegilado de la invención, R_5 es -CO-; R_6 se selecciona del grupo que consiste en -O-; -NH-; -NH- R_7 -COO-; -NH- R_7 -NH-; -NH- R_7 -CO-NH-;



y



25 Z es O, S o NH; y

R_7 se selecciona del grupo que consiste en alquileo C1-C18 lineal o ramificado, fenileno, un radical oxialquileo que tiene 3-18 átomos de carbono en la cadena principal, un residuo de un péptido que contiene 2-10 residuos de aminoácidos, y un residuo de un sacárido contiene 1-10 residuos de monosacáridos.

30 Los compuestos anteriores de la invención en donde R_5 es -CO- se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -COOH en el anillo de fluoreno (representado en el Esquema 7, página b, tercera fila, primera columna). Cuando R_6 es -O- o -NH-, la reacción se produce con PEG (PEG-OH) o PEG-amina (PEG-NH₂), respectivamente, obteniendo así un compuesto pegilado en donde la porción PEG está unida al anillo de fluoreno a través de un residuo -CO-O- o -CO-NH-, respectivamente, como se muestra en el Esquema 7, página b, columna central (3^{ra} y 4^{ta} filas).

35 Los compuestos de la invención en donde R_5 es -CO- y R_6 es NH- R_7 -COO- se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituido por -COOH en el anillo de fluoreno, por reacción con H₂N- R_7 -CO-O-*t*Bu mediante el uso de un reactivo de acoplamiento (por ejemplo DCC/HOBt, o PyBOP(benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato)/trietilamina), por eliminación del grupo protector *t*Bu bajo condiciones ácidas (por ejemplo, ácido trifluoroacético o HCl en dioxano), la activación del grupo carboxilo libre por trifósgeno y la reacción de -NH- R_7 -COCl formado con PEG-OH para obtener el derivado -CO-NH- R_7 -CO-O-PEG.

40 Los compuestos de la invención en donde R_5 es -CO- y R_6 es NH- R_7 -NH se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -COOH en el anillo de fluoreno, por reacción con H₂N- R_7 -NH-*t*Bu mediante el uso de un reactivo de acoplamiento y eliminar el grupo protector *t*Bu como se describe anteriormente, reaccionar el grupo amino libre con PEG-OSu para obtener el derivado -CO-NH- R_7 -NH-PEG.

45 Los compuestos de la invención en donde R_5 es -CO- y R_6 es NH- R_7 -CO-NH- se puede preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -COOH en el anillo de fluoreno, por reacción con H₂N- R_7 -CO-NH-*t*Bu mediante el uso de un reactivo de acoplamiento y por eliminación del grupo protector *t*Bu como se describe anteriormente, activación del grupo carboxilo libre con DCC/NHS y reacción de la -NH- R_7 -CO-N-hidroxisuccinimida éster formado con PEG-NH₂ para obtener el derivado -CO-NH- R_7 -CO-NH-PEG.

50 Los compuestos de la invención en donde R_5 es -CO- y R_6 es -NH- R_7 -NH-Z-(4-cloro-6-Z-PEG-1,3,5-triazin-2-il se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -COOH en el anillo de fluoreno, por reacción con H₂N- R_7 -NH-*t*Boc o H₂N- R_7 -O-*t*Bu o H₂N- R_7 -S-tritil mediante el uso de un reactivo de acoplamiento y por eliminación de los grupos protectores *t*Boc, *t*Bu o tritil como se describe anteriormente, reaccionar el grupo NH₂, OH o SH libres con 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina, y después reaccionar -NH- R_7 -NH[O o S]-(4-cloro-6-NH[O o S]-1,3,5-triazin-2-il así formado con PEG-NH₂,

PEG-OH o PEG-SH para obtener el correspondiente derivado -CO-NH-R₇-NH[O o S]-(4-cloro-6-NH[O o S]-PEG-1,3,5-triazina .

5 Los compuestos de la invención en donde R₅ es -CO- y R₆ es NH-R₇-etilen-succinimido se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -COOH en el anillo de fluoreno, por reacción con H₂N-R₇-etilen-maleimida mediante el uso de un reactivo de acoplamiento (por ejemplo DCC/HOBt, PyBoP/trietilamina) seguido por reacción de la porción de maleimida con PEG-SH a pH 6-8 para obtener el derivado -CO-NH-R₇-etilen-succinimido-S-PEG .

10 Los fármacos -Fmoc/FMS-pegilados de la invención son después preparados a partir de estos intermediarios por el procedimiento de una sola etapa descritos en el Ejemplo 5 más adelante.

Aún en una modalidad adicional de la invención, R₅ es -CH₂-; y R₆ es -(CH₂)_n-S- o -(CH₂)_n-NH-, en donde n es 0 a 18, preferentemente 1.

15 Los compuestos anteriores de la invención en donde R₅ es -CH₂- y R₆ es -CH₂-S- o - R₆ es -CH₂-NH- se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -COH en el anillo de fluoreno (representado en el Esquema 7, página c, 4^{ta} fila, primera columna), por reacción con PEG-SH o PEG-NH₂seguido por reacción con NaHBH₃, respectivamente.

20 Los compuestos anteriores de la invención en donde R₅ es -CH₂- y R₆ es - (CH₂)_n-S- o R₆ es -(CH₂)_n-NH- se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -(CH₂)_n-Hal en el anillo de fluoreno, en donde Hal es F, Cl, Br o I (representado en el Esquema 7, página d, 3^{ra} fila, primera columna), por reacción con PEG-NH₂ o PEG- SH, obteniendo así un compuesto pegilado de la invención en donde la porción PEG está unida al anillo de fluoreno a través de un residuo como se representa en el Esquema 7, página d, columna central, 3^{ra} y 4^{ta} filas, respectivamente.

25 Los fármacos -Fmoc/FMS-pegilados de la invención son después preparados a partir de los intermediarios anteriores por el procedimiento de una etapa descrito en el Ejemplo 5 más adelante.

30 En aún otra modalidad, R₅ es -SO₂- y R₆ es -O-, -NH- o -CH₂-CH₂-S. Los compuestos en donde R₆ es -O- o -NH- se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -SO₂Cl en el anillo de fluoreno (representado en el Esquema 7, página C, primera columna, 3^{ra} fila), por reacción con PEG-OH o PEG-NH₂, respectivamente. Los fármacos -Fmoc/FMS-pegilados de la invención son después preparados a partir de estos intermediarios por el procedimiento de una etapa descrito en el Ejemplo 5 más adelante.

35 Los compuestos en donde R₆ es -CH₂-CH₂-S, se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -SO₂CH=CH₂ en el anillo de fluoreno (representado en el Esquema 7, página C, primera columna, 2^{da} fila), por reacción con PEG-SH. Los fármacos -Fmoc/FMS-pegilados de la invención son después preparados a partir de estos intermediarios por el procedimiento de dos etapas descrito en los Ejemplos 16 o 17 más adelante.

40 En aún otra modalidad R₅ es -PO₂- y R₆ es -O- o NH-. Estos compuestos se pueden preparar a partir de Fmoc-OSu o FMS-OSu sustituidos por -PO₂Cl en el anillo de fluoreno (representado en el Esquema 7, página d, primera columna, primera fila), por reacción con PEG-OH o PEG-NH₂, respectivamente. Los fármacos -Fmoc/FMS-pegilados de la invención son después preparados a partir de estos intermediarios por el procedimiento de una etapa descrito en el Ejemplo 5 más adelante.

45 De conformidad con la presente invención, Y es una porción de un fármaco que contiene al menos un grupo funcional seleccionado de amino libre, carboxilo, hidroxilo, fosfato y/o mercapto. En una modalidad más preferida de la invención, el fármaco contiene al menos un grupo amino libre y es un fármaco peptídico o proteico o un fármaco no peptídico.

50 En una modalidad de la invención, el fármaco es un fármaco no peptídico que contiene al menos un grupo amino y la invención se refiere a conjugados PEG-Fmoc y PEG-FMS de éstos. Los fármacos no peptídicos que son susceptibles a la tecnología de la invención incluyen aminoglucósidos antibióticos tales como gentamicina y anfotericina B, y fármacos antineoplásicos tales como el ácido aminolevulínico, daunorrubicina y doxorrubicina.

55 En una modalidad más preferida de la invención, el fármaco que contiene al menos un grupo amino es un fármaco peptídico o proteico, con la máxima preferencia un péptido o proteína de peso molecular bajo o medio, que puede ser usado como un medicamento para uso humano o veterinario.

Así, la invención proporciona además conjugados de fármacos pegilados PEG-FMS-Y y PEG-Fmoc-Y en la presente identificados por las fórmulas:

(PEG-FMS)_n-Y o (PEG-Fmoc)_n-Y

5 en donde Y es una porción de un fármaco peptídico o proteico, n es un entero de al menos uno, preferentemente 1 o 2, y Y está unido al radical FMS o Fmoc a través de al menos un grupo amino. En la modalidad más preferida el conjugado es (PEG-FMS)_n-Y y la porción PEG es PEG₄₀₀₀₀.

10 Los ejemplos de péptidos y proteínas Y que pueden pegilarse de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, insulina, un interferón, tal como IFN- α 2, un agonista de PYY tal como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tales como la exendina-3 y exendina-4 y análogos y agonistas de exendina, péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina, TNF- α , calcitonina, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o un análogo de ésta tal como leuprolide y D-Lys⁶-GnRH, hirudina, el glucagón, y un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF- α .

15 En una modalidad preferida de la invención, el fármaco peptídico es la insulina y la invención proporciona conjugados PEG-Fmoc-insulina y PEG-FMS-insulina y composiciones farmacéuticas que los comprenden para el uso en el tratamiento de la diabetes mellitus y la hiperglicemia. Los ejemplos de esos conjugados son los conjugados (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina, (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₂-insulina y PEG₄₀₀₀₀-FMS-insulina.

20 En otra modalidad preferida de la invención, el fármaco es una exendina o un agonista de la exendina.

En una modalidad más preferida, el fármaco es exendina-4 de la secuencia representada por la sec. con núm. de ident.: 1

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH₂

25 En otra modalidad preferida, el fármaco es exendina-3 de la secuencia representada por la sec. con núm. de ident.: 2

HSDGTFITSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH₂

30 En una modalidad preferida adicional, el fármaco es un agonista de la exendina definida en la presente como un compuesto que imita la actividad de la exendina-3 o exendina-4 que se une al receptor(es) en el que la exendina-3 o exendina-4 ejerce sus acciones que son beneficiosas como insulínico y en el tratamiento de la diabetes mellitus o imitando los efectos de la exendina en el aumento de flujo de orina, aumento de la excreción urinaria de sodio y/o disminución de la concentración de potasio en la orina, por la unión al receptor(es) donde las exendinas causan estos efectos. Preferentemente, el agonista de la exendina se selecciona del grupo de insulínicos exendina-4 fragmentos y análogos que constan de agonistas de la exendina representados por sec. con núm. de ident.:3 a sec. con núm. de ident.: 10:

40 exendina-4 (1-31) HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGP [sec. con núm. de ident.:3];
 Y³¹exendina-4(1-31) HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGY [sec. con núm. de ident.:4];
 exendina-4 (1-30) HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGG [sec. con núm. de ident.:5];
 exendina-4 (1-30) amida HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGG-NH₂ [sec. con núm. de ident.:6];
 exendina-4 (1-28) amida HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKN-NH₂ [sec. con núm. de ident.:7]; L¹⁴,
 F²⁵exendina-4 amida HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKNGG PSSGAPPPS-NH₂ [sec. con núm. de ident.:8];
 45 L¹⁴,F²⁵ exendina-4 (1-28) amida HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN-NH₂ [sec. con núm. de ident.:9]; y
 L¹⁴,A²²,F²⁵ exendina-4 (1-28) amida HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLAIE FLKN-NH₂ [sec. con núm. de ident.:10].

50 De acuerdo con esta modalidad, la invención proporciona los conjugados PEG-Fmoc-exendina/agonista de exendina y PEG-FMS-exendina/agonista de exendina y composiciones farmacéuticas que los comprenden para usar en la prevención de la hiperglicemia y para usar en el tratamiento de la diabetes mellitus seleccionado del grupo que consiste en diabetes mellitus no dependiente de insulina, diabetes mellitus dependiente de insulina, y la diabetes mellitus gestacional. En una modalidad más preferida, el conjugado de exendina pegilado de la invención es PEG₄₀-FMS-exendina-4.

55 En una modalidad preferida adicional de la invención, el fármaco peptídico es un interferón, preferentemente IFN- α , y la invención proporciona conjugados PEG-Fmoc-IFN- α y PEG-FMS-IFN- α y composiciones farmacéuticas que los comprenden para usar en el tratamiento de enfermedades tratables por el IFN- α , particularmente enfermedades virales, más particularmente la hepatitis B o C, tanto como terapia única o junto con un agente antiviral tal como ribavirina, o para usar en el tratamiento de cáncer, por ejemplo, carcinoma de células transicionales, el tipo más común de cáncer de vejiga, cáncer de ovario, melanoma cáncer de páncreas, linfoma no-Hodgkin, leucemia de células pilosas, y el sarcoma de Kaposi

relacionado con el SIDA, tanto como terapia única o junto con un agente citotóxico tal como carboplatino y/o ciclofosfamida. En una modalidad más preferida, el conjugado es (PEG₄₀-FMS)₂-IFN α 2 o, con la máxima preferencia, PEG₄₀-FMS-IFN α 2.

5 En aún otra modalidad preferida de la invención, el fármaco peptídico es un agonista de PYY, definido en la presente como una molécula que tiene actividad biológica como PYY- o PYY[3-36], tal como la reducción de la ingesta de alimentos en los mamíferos, y actúa por un mecanismo similar al de PYY y PYY[3-36], por ejemplo, mediante la unión al receptor Y2. El agonista de PYY es preferentemente un agonista específico para el receptor Y2 y es preferentemente un péptido que contiene, en un mínimo, la secuencia de aminoácidos 25-36 de PYY, con la máxima preferencia la secuencia 3-36 de PYY.

10 En una modalidad de la invención, el agonista de PYY es el péptido PYY 36-mer de la secuencia representada por sec. con núm. de ident.: 11:

YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂

15 En una modalidad más preferida, de la invención, el agonista de PYY es el péptido PYY[3-36] de la secuencia representada por la sec. con núm. de ident.: 12:

IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂

20 De acuerdo con esta forma de modalidad, la invención proporciona conjugados de agonistas PEG-Fmoc-PYY y agonistas PEG-FMS-PYY y composiciones farmacéuticas que los comprenden particularmente para usar en la reducción de la ingesta de alimentos, para inducir la pérdida de peso y para usar en el tratamiento de enfermedades o trastornos que pueden ser aliviados mediante la reducción de la ingesta de alimentos, tales como obesidad, hipertensión, dislipidemia, riesgo cardiovascular, resistencia a la insulina, y la diabetes mellitus (particularmente diabetes tipo II). En una modalidad preferida, el agonista de PYY pegilado de la invención es PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆.

25 En otra modalidad preferida, el fármaco peptídico es la hormona de crecimiento humana (hGH) y la invención proporciona conjugados PEG-Fmoc-hGH y PEG-FMS-hGH y composiciones farmacéuticas que los comprenden para el tratamiento de afecciones y trastornos tratables por hGH, particularmente para usar en el tratamiento de niños patológicamente de baja estatura y como agente anti envejecimiento. En modalidades preferidas, los conjugados de hGH pegilados de la invención son (PEG₄₀-FMS)₂-hGH y PEG-FMS-hGH.

30 En una modalidad preferida adicional de la invención, el fármaco peptídico es el péptido natriurético atrial (ANP) o un análogo de éste, particularmente el ANP cíclico de 28 aminoácidos de la secuencia representada por la sec. con núm. de ident.:13, como sigue:

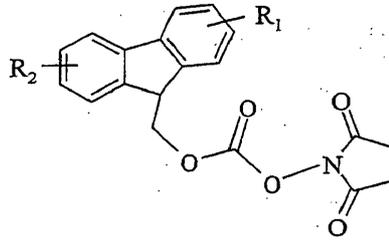
Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-[Cys7-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys23]-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr

40 De acuerdo con esta modalidad, la invención proporciona conjugados PEG-Fmoc-ANP y PEG-FMS-ANP y composiciones farmacéuticas que los comprenden para usar en el tratamiento de afecciones y trastornos tratables por la invención proporciona conjugados PEG-Fmoc-ANP y PEG-FMS-ANP y composiciones farmacéuticas que los comprenden para usar en el tratamiento de afecciones y trastornos tratables por péptidos natriuréticos y las variantes de éstos, particularmente para usar en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, insuficiencia renal aguda y síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS). En una modalidad preferida de la invención, el ANP pegilado es el conjugado PEG₄₀-FMS-ANP.

45 También incluidas en el alcance de la invención están las sales farmacéuticamente aceptables de los conjugados pegilados de la invención. Como se usa en la presente, el término "sales" se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino del fármaco, por ejemplo péptido o proteína, molécula. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y sales con bases orgánicas tales como las formadas por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina, o lisina, piperidina, y procaína. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico.

50 La presente invención se refiere además a métodos para la preparación de los conjugados pegilados de la invención y a varios precursores nuevos usados en estos métodos.

Así, la presente invención se relaciona además con un precursor de la fórmula:



15 en donde:

R₁ es un radical de la fórmula -R₅-R₆-B;

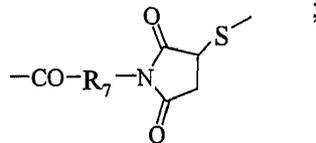
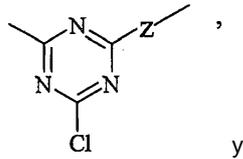
R₂ es H o -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno;

B es maleimido, -S-CO-CH₃ o una porción PEG;

R₅ se selecciona del grupo que consiste en NH-, -S-, -CO-, -COO-, -CH₂-, -SO₂-, -SO₃-, -PO₂-, y -PO₃-; y

R₆ es un enlace o un radical por el cual el maleimido, -S-CO-CH₃ o la porción PEG se une a R₅.

25 En una modalidad preferida, R₅ es NH-; R₆ se selecciona del grupo que consiste en -CO-, -COO-, -CH₂-, -CH(CH₃)-, CO-NH-, -CS-NH-, -CO-CH₂-NH-CO-, -CO-CH(CH₃)-NH-CO-, -CO-CH₂-NH-CO-NH-, -CO-R₈-;

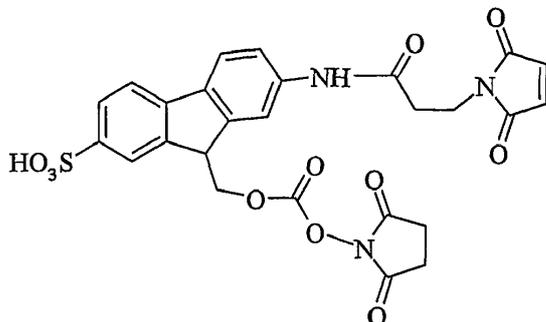


Z es O, S o NH;

R₇ se selecciona del grupo que consiste en alquileo C1-C18 lineal o ramificado, fenileno, un radical oxialquileo que tiene 3-18 átomos de carbono en la cadena principal, un residuo de un péptido que contiene 2-10 residuos de aminoácidos, y un residuo de un sacárido que contiene 1-10 residuos de monosacáridos; y

R₈ es un alquileo C1-C8 lineal o ramificado, preferentemente etileno, cuando B es maleimido o -S-CO-CH₃.

50 En una modalidad preferida, la invención se refiere los **Precursores 1-7** nuevos, cuyas fórmulas se representan en los Esquemas 1 y 3. En la modalidad sumamente preferida, la invención se refiere al compuesto que se identifica en la presente descripción como **Precursor 8** o MAL-FMS-NHS de la fórmula:



Precursor 8 es el compuesto N-[2-(maleimido-propionilo amino)-7-sulfo-fluoren-9-il-metoxycarbonilo]succinimida [o 9-hidroximetilo-2-(amino-3-maleimidopropionato)-7-sulfo-fluoreno-N-hidroxisuccinimida] y se identifica además en la presente descripción como MAL-FMS-OSu.

MAL-FMS-NHS es un reactivo hetero-bifuncional, soluble en agua, que consiste en un éster sulfonado fluoreniloxycarbonil N-hidroxisuccinimida que reacciona con grupos de péptidos y aminoácidos de la proteína. Un grupo maleimida se unió a la cadena principal de fluorenilo para permitir el acoplamiento a sulfhidrilo que contiene PEG, con la máxima preferencia PEG₄₀₀₀₀-SH.

Así, proporcionados adicionalmente por la invención están los conjugados precursores de fármacos que se identifican en la presente descripción por la fórmula:



en donde Y es una porción de un fármaco, con mayor preferencia un fármaco peptídico o proteico, n es un entero de al menos uno, preferentemente 1 o 2, y Y se une al radical FMS o Fmoc a través de un grupo amino.

La presente invención también proporciona un método para la preparación de un conjugado (PEG-Fmoc)_n-Y, en donde Y es una porción de un fármaco, con mayor preferencia un fármaco peptídico o proteico, n es un entero de al menos uno, preferentemente 1 o 2, y Y se une al radical Fmoc a través de un grupo amino, que comprende:

- (i) reaccionar un fármaco Y, por ejemplo, un fármaco peptídico o proteico, con al menos un equivalente de Precursor 7, obteniendo así un conjugado (MAL-Fmoc)_n-Y; y
- (ii) reaccionar el conjugado (MAL-Fmoc)_n-Y con PEG-SH.

En una modalidad más preferida, la invención se refiere a un método para la preparación de un conjugado (PEG-FMS)_n-Y, en donde Y es una porción de un fármaco, con mayor preferencia un fármaco peptídico o proteico, n es un entero de al menos uno, preferentemente 1 o 2, y Y se une al radical FMS a través de un grupo amino, que comprende:

- (i) reaccionar un fármaco Y, por ejemplo un fármaco peptídico o proteico, con al menos un equivalente de MAL-FMS-NHS, obteniendo así un conjugado (MAL-FMS)_n-Y; y
- (ii) reaccionar el conjugado (MAL-FMS)_n-Y con PEG-SH, obteniendo así el conjugado (PEG-FMS)_n-Y.

En otra modalidad más preferida, la invención se refiere a un método para la preparación de un conjugado (PEG-FMS)_n-Y, que comprende:

- (i) reaccionar MAL-FMS-NHS con PEG-SH, obteniendo así un conjugado PEG-FMS-NHS; y
- (ii) reaccionar el fármaco Y, por ejemplo un fármaco peptídico o proteico, con al menos un equivalente de conjugado de PEG-FMS-NHS, obteniendo así el conjugado (PEG-FMS)_n-Y.

El reactivo PEG-SH es preferentemente PEG₄₀-SH, en donde la porción PEG es una porción de PEG ramificada de peso molecular 40,000 Da.

Como se mencionó en la sección de antecedentes en la presente descripción, la técnica de pegilación se ha usado

ampliamente para la modificación de moléculas, particularmente, fármacos peptídicos y proteicos, en un intento de mejorar algunas de sus características, tales como la mejora de la estabilidad y la solubilidad, inmunogenicidad reducida, la reducción de la proteólisis, toxicidad reducida, reducción de la depuración por los riñones, la mejora de la biodisponibilidad, y vida circulante extendida por lo tanto se requiere una dosificación menos frecuente. Sin embargo, uno de los principales problemas de la pegilación es que la unión covalente entre la porción de PEG y el fármaco frecuentemente causa la pérdida de la actividad biológica o una disminución drástica de la potencia farmacológica del fármaco. Por esta razón, la pegilación se usa más para las proteínas de alto peso molecular, que son menos propensas a ser inactivadas por la reacción con PEG, pero es menos frecuente para péptidos y proteínas de bajo peso molecular.

Teóricamente, la disminución de la bioactividad de péptidos y proteínas por pegilación se puede superar mediante la unión de las cadenas de PEG a través de un enlace químico sensible a hidrólisis alcalina suave y/o ácida, o enzimáticamente escindible por las proteasas séricas o de esterases. Obviamente, una velocidad inconsistente de hidrólisis haría tal un enfoque poco práctico. Por tanto, una condición de requisito previo es que la hidrólisis de las cadenas de PEG del conjugado tenga lugar a una velocidad lenta y de manera homogénea bajo las condiciones de pH y temperatura estrictamente homeostáticos del sistema circulatorio de los mamíferos.

Anteriormente, hemos preparado 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo-N-hidroxisuccinimida (FMS-OSu) (Gershonov y otros, 1999, 2000; Shechter y otros, 2001, 2001a) como un modificador reversible de proteína. Las porciones proteicas unidas a FMS experimentan hidrólisis lenta y espontánea en condiciones fisiológicas que generan la molécula principal sin modificar. La hidrólisis de los conjugados de FMS-proteína a 37°C C en suero humano normal, en tampones acuosos de pH 8.5, o en el sistema circulatorio *in vivo*, tiene lugar con un $t_{1/2}$ de 5-7 hrs. Mediante el uso de la porción FMS como andamio para la tecnología de la pegilación reversible sugerida permite que se pronostiquen las velocidades de hidrólisis de diversos conjugados. El $t_{1/2}$ para la hidrólisis de moléculas pequeñas modificadas y polipéptidos conjugados con PEG y proteínas cae dentro de un intervalo relativamente estrecho de 8-14h. La velocidad de hidrólisis constante para los conjugados de PEG-FMS-proteína es debido a la reacción de β -eliminación, que se produce en la posición 9 de la porción de fluorenilo, siendo dependiente únicamente del pH del medio circundante. Así, en contraste a lo que ocurre en los enfoques basados en la escisión enzimática del enlace hidrolítico, las velocidades de hidrólisis PEG-FMS similares se esperan de todos los conjugados, independientemente de la identidad de la porción proteína/péptido conjugada. Mediante el uso del presente enfoque se puede controlar aún más la velocidad de hidrólisis por la sustitución de la porción de fluorenilo con aceptor de electrones o grupos inductores de electrones que aumenten o disminuyan, respectivamente, la velocidad de hidrólisis. El número de cadenas de PEG-FMS unidas al fármaco también debe afectar a la velocidad a la que se libera el fármaco nativo.

La porción de fluorenilo sulfonado no es tóxico, como se muestra anteriormente (Shechter y otros, 2001). El PEG de alto peso molecular se sabe que es seguro en términos de toxicidad e inmunogenicidad y es ampliamente usado en las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéuticos (Working y otros, 1997; Roberts y otros, 2002).

Así, la presente invención proporciona un procedimiento denominado en la presente descripción "pegilación reversible". En este nuevo enfoque conceptual, que fue implementado de acuerdo con la invención con polipéptidos y proteínas de bajo peso molecular, la porción de PEG no está unida directamente al fármaco, como en el procedimiento de pegilación estándar, sino más bien la porción de PEG está unida directamente o a través de un enlazador a una porción de fórmula (i) en la presente descripción, y el fármaco se une a otra posición de la porción (i). Dicha porción (i), preferentemente la porción Fmoc o FMS (i), es altamente sensible a las bases y es removible en condiciones básicas suaves. Así, de esta manera, se obtiene un profármaco que es inactivo, pero experimenta transformación en el fármaco activo en las condiciones fisiológicas del cuerpo. El profármaco tiene una vida de circulación extendida, pero la porción de PEG se elimina junto con la porción de Fmoc o FMS y el fármaco recupera su potencia farmacológica completa.

Este nuevo enfoque permite características farmacológicas deseables asociadas con la pegilación que se confieren a los fármacos peptídicos y proteicos de bajo peso molecular que de otro modo habrían sido total o parcialmente inactivados por esta técnica. Un conjugado farmacológicamente "silencioso" que está 'atrapado' en el sistema circulatorio libera el péptido o proteína principal unido covalentemente, con un perfil farmacocinético deseable. Se espera este nuevo enfoque para extender el tiempo de vida, la biodisponibilidad y la eficacia de los fármacos peptídicos existentes, y extender lo mismo en fármacos peptídicos conocidos y candidatos de fármacos peptídicos que aún se pueden descubrir.

Esta nueva tecnología ha sido probada exitosamente de acuerdo con la invención en varios fármacos peptídicos y proteicos. Además de prolongar los tiempos de vida *in vivo*, el conjugado PEG-proteína inactivo pero reactivable tiene la profunda ventaja de mantener un bajo nivel de circulación del fármaco proteico activo en cualquier punto de tiempo después de la administración. De esta manera, se evita un riesgo bien conocido de la presencia de un "brote" tóxico o la desensibilización del fármaco en la circulación.

Como se mencionó anteriormente, en teoría uno puede diseñar cadenas de PEG que se pueden liberar a partir de conjugados de PEG-proteína por proteasas séricas o esterases. Sin embargo, la velocidad rápida o impredecible de liberación no es útil. Una condición de requisito previo con esta nueva tecnología es que las cadenas de PEG se deben hidrolizar espontáneamente a partir de los conjugados a una velocidad lenta, continua y predecible. La liberación de cadenas de PEG debe ocurrir durante un período prolongado, manteniendo así los conjugados proyectados en el sistema circulatorio, antes de la eliminación de las cadenas de PEG por hidrólisis. La presente invención satisface estos requisitos. Por ejemplo, tras la incubación en suero humano normal a 37°C, las cadenas de PEG se hidrolizan de las proteínas, con un tiempo medio de 8.0±2 hrs. Las velocidades de liberación se fijan exclusivamente por la naturaleza de la porción Fmoc (Fmoc/FMS), por el pH y la reactividad del suero sanguíneo, y los mamíferos mantienen la homeostasis estricta con respecto a estos dos últimos parámetros.

De acuerdo con la presente invención, un experimento piloto incluyó la síntesis de una insulina pegilada. Tras la incubación del derivado (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina a pH 8.5, o en suero humano normal a 37°C, la actividad lipogénica fue restaurada con una vida media de 30±2 hrs. La regeneración de la potencia lipogénica de insulina doble modificada, (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₂-insulina, siguió un período de latencia adicional de 10±1 hrs.

Una sola administración subcutánea de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina en ratones, bajaron los niveles circulantes de glucosa, y la vida media de retorno a los valores normoglicémicos excedió las 6.7 veces que para la insulina nativa. Después de la administración intraperitoneal de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina, el retorno a la normoglicemia fue 3.4 veces más lenta que después de la administración de la hormona nativa. En suma, se ha establecido un prototipo de un PEG reversible. Este se somete a hidrólisis espontánea lenta después de la conjugación, regenerando el fármaco principal no modificado, en condiciones fisiológicas. Así, el inconveniente principal de inactivar fármacos por pegilación, se resuelve mediante la tecnología de la presente invención. Las porciones PEG-FMS hidrolizan a velocidades más rápidas en comparación con las porciones PEG-Fmoc ($t_{1/2}$ =5-7 hrs, ref.). Los compuestos que contienen porciones FMS -PEG son más adecuados cuando se introducen 2-5 cadenas de PEG en un fármaco peptídico o proteico, para obtener las características farmacológicas deseables de los conjugados.

En otro ejemplo de la presente invención, se muestra en la presente que cuando exendina-4 nativa se administró por vía subcutánea en una dosis de 4 µg /ratón, el nivel de glucosa en sangre (BGL) se redujo en 26-28% (desde 140 mg/dl hasta 104-101 mg/dl), con el mayor porcentaje de cambio en BGL que ocurre 0.5-1 h después de la administración. Las concentraciones de glucosa después volvieron a sus niveles iniciales con un $t_{1/2}$ de 3.7±0.3 h. Después de la administración subcutánea de PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4, la disminución del BGL se llevó a cabo a una velocidad más moderada. La glucosa circulante alcanzó su concentración más baja de 8-12 horas después de la administración (92 mg/dl, 33%). Las concentraciones de glucosa circulantes bajas estables se mantienen después durante 12 horas adicionales. El retorno a los niveles iniciales de glucosa se llevó a cabo con un $t_{1/2}$ de 30±2 h, que es 7.5 veces más largo que el obtenido por la misma dosis de la exendina-4 nativa.

En un ejemplo adicional de la presente invención, se muestra en la presente que mediante el uso de un ensayo de unión BIAcore, la velocidad de regeneración *in vitro* del interferón nativo se estimó que tiene una vida media de 65 horas. Después de la administración subcutánea a ratas y monitorear la potencia antiviral circulante, los niveles de IFNα2 activos alcanzaron un máximo en 50 horas, es detectado con aún niveles sustanciales 200 horas después de la administración. Este valor contrasta con una vida media de aproximadamente de 1 hr medida para el interferón sin modificar. La concentración de IFNα2 activo escala linealmente con la cantidad inyectada Comparando la administración subcutánea con la intravenosa de PEG₄₀-FMS-IFNα2, se encontró que la larga vida circulatoria de IFNα2 se vio afectada tanto por la lenta velocidad de absorción de la proteína pegilada del volumen subcutáneo como por la lenta velocidad de descarga a partir del PEG en circulación. Una simulación numérica de los resultados fue de buen consenso con los resultados observados *in vivo*. El perfil farmacocinético de este conjugado IFNα2 pegilado nuevo combina un mantenimiento prolongado *in vivo* con la regeneración de IFNα2 nativo activo, garantizando un acceso rápido a los tejidos periféricos y así una ventaja global sobre las formulaciones actualmente usadas.

El péptido YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆) ha demostrado recientemente que induce la saciedad en ratones y humanos. Se describe en la presente que la saciedad inducida por la administración subcutánea de PYY₃₋₃₆ a ratones en ayunas tuvo una vida media de ~3 h. La pegilación de PYY₃₋₃₆ a través de un enlace no hidrolizable produjo un conjugado inactivo excepto el conjugado de la invención PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆YY₃₋₃₆ gradualmente liberado no modificado en condiciones fisiológicas. La administración subcutánea de PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ a ratones resultó en la saciedad prolongada, con una vida media de ~24 h. Por lo tanto PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ puede servir como un profármaco de acción prolongada de PYY₃₋₃₆, proporcionando de este modo medios más prácticos para el control de la obesidad humana

La porción PEG de conformidad con la invención puede ser PEG lineal o ramificado y tiene un peso molecular en el intervalo de 200 a 200,000 Da, preferentemente hasta 80,000 Da, con mayor preferencia 5,000-40,000 Da, y con la máxima preferencia entre aproximadamente 20,000 Da y 40,000 Da. Preferentemente, la porción PEG es una molécula de PEG ramificado de 40,000 Da.

Los profármacos de la presente invención se preparan mediante el uso de agentes de PEGilación, es decir, cualquier derivado de PEG que es capaz de reaccionar con un grupo funcional tal como NH₂, OH, SH, COOH, CHO, -N=C=O, -N=C=S, -SO₂Cl, -SO₂CH=CH₂, -PO₂Cl, -(CH₂)_xHal, presente en el anillo de fluoreno de la porción Fmoc o FMS. Ejemplos de estos reactivos y de los productos obtenidos se representan en el Esquema 7 en la presente descripción. Estos PEG derivatizados que se pueden usar de acuerdo con la invención y reactivos similares están disponibles comercialmente. Cabe señalar que el agente de PEGilación se usa usualmente en su forma monometoxilada donde sólo un grupo hidroxilo en un terminal de la molécula de PEG está disponible para la conjugación. Sin embargo, una forma bifuncional de PEG, donde ambos extremos están disponibles para la conjugación puede ser usada si, por ejemplo, se desea obtener un conjugado con dos residuos peptídicos o proteicos unidos covalentemente a una única porción de PEG.

En una modalidad preferida de la invención, la porción de PEG está ramificado. Los PEG ramificados ramificados son de uso común. Ellos pueden ser representados como R(PEG-OH)_m en el que R representa una porción de núcleo central tal como pentaeritritol o glicerol, y m representa el número de brazos de ramificación. El número de brazos de ramificación (m) puede variar de tres a cien o más. Los grupos hidroxilo están sujetos a modificación química.

El uso de moléculas de PEG ramificadas tiene varias ventajas, que incluyen el hecho de que requieren sustancialmente menos lugares de conjugación y la pérdida de bioactividad se minimiza. Las moléculas de PEG ramificados se describen en las Patentes de Estados Unidos núm. 6,113,906, núm. 5,919,455, núm. 5,643,575, y núm. 5,681,567.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto pegilado de acuerdo con la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y un portador farmacéuticamente aceptable.

El portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el(los) ingrediente(s) activo(s) de la formulación (y preferentemente, capaz de estabilizar péptidos) y no perjudicial para el sujeto a tratar.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A.R. Gennaro, ed., edición 20va, 2000. Todos los métodos incluyen la etapa de poner en asociación el(los) ingrediente(s) activo(s) con el portador lo cual constituye uno o más ingredientes accesorio.

Cualquier vía de administración adecuada de los conjugados de la invención a los humanos o para fines veterinarios se prevé por la invención, por ejemplo la administración vía oral convencional, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intranasal y transdérmica.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos.

EJEMPLOS

I. Sección química

Materiales y Métodos (Sección Química)

(i) **Materiales:** insulina humana (Zn²⁺-libre) fue donada por Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca) o por Biotecnología General (Rehovot, Israel), y se usó sin purificación adicional. La hGH recombinante fue un regalo de Biotecnología General (Rehovot, Israel). Fmoc-OSu se obtuvo de Novabiochem (Laüfelfingen, Suiza). PEG₅-OSu (además referido en la presente como PEG_{5,000}-OSu) y PEG₄₀-OSu (además referido en la presente como PEG_{40,000}-OSu) fueron de Shearwater (ahora Nektar Therapeutics, San Carlos, CA, Estados Unidos). TNBS, DTNB, α-lactoalbúmina, glutatión reducido (GSH), cistamina-2 HCl, ditioneitol (DTT), yodoacetamida, gentamicina y tripsina tratada con TPCK se compraron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos). El IFN-α2 humano no glicosilado se preparó como se describe en WO 02/36067. La exendina-4, péptido YY₃₋₃₆ y péptido 27, un péptido sintético de 27 aminoácidos que no contiene lisina (AEISGQLSYVRDVNSWQHIWTNVSIEIN) (sec. con núm. de ident.: 14), se usó como control, se sintetizaron por el método en fase sólida mediante el uso de un

sintetizador múltiple de péptidos (AMS 422, Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld, Alemania). Todos los demás reactivos, incluyendo una larga lista de compuestos usados para sintetizar MAL-FMS-NHS, fueron de grado analítico y adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos).

(ii) **HPLC de fase inversa** se realizó con un sistema de cromatografía líquida Spectra-Physics SP8800 (Spectro-Physics, San Jose, CA) equipado con un detector de absorbancia de longitud de onda variable de Applied Biosystem 757. Los efluentes de la columna fueron monitoreados por la absorbancia a 220 nm y los cromatogramas se registraron en un integrador chrom-Jet (Thermo-Separation, Riviera Beach, FL, Estados Unidos). Las columnas de HPLC empacadas previamente usadas en los ejemplos incluyeron LiChroCART 250-10 mm que contienen LiChrosorb RP-18 (7 µm) y LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) 250-4 mm (Merck, Rathway, NJ, Estados Unidos) y columnas empacadas previamente Vydac RP-18 o RP-4 (22 x 250 mm; tamaño de la gota 12 µm; Vydac, Hesperia, CA, Estados Unidos). Los gradientes lineales se usaron entre la solución A (0.1% TFA en H₂O) y la solución B (0.1% TFA en acetonitrilo-H₂O, 75:25). Para los procedimientos de HPLC analítica, un gradiente lineal entre 30 y 100% de la solución B se corrió durante 50 min a un régimen de flujo de 0.8 ml/min.

(iii) **Los análisis de HPLC** se realizaron mediante el uso de un sistema de cromatografía líquida Spectra-Physics SP8800 equipado con un detector de absorbancia Applied Biosystems 757 757 de longitud de onda variable y un sistema de cromatografía líquida Spectra-SYSTEM P2000 equipado con un muestreador automático Spectra-SYSTEM AS100 y un Spectra-SYSTEM UV1000, todos controlados por un sistema de datos de cromatografía ThermoQuest (ThermoQuest Inc., San Jose, CA, Estados Unidos). Los efluentes de la columna se monitorearon mediante la absorbancia UV a 220 nm. La RP-HPLC analítica se realizó mediante el uso de un Chromlith™ preempacado Performance RP-18e (4.6x100mm, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La columna se eluyó con un gradiente binario de 10-100% de solución B en 10 min con régimen de flujo de 3 ml/min (solución A fue 0.1% TFA en H₂O y solución B fue 0.1% TFA en acetonitrilo:agua, 3:1, v:v). Los compuestos pegilados se analizaron mediante el uso de una columna RP-4 (250x4 mm, tamaño de gota de 5 µm, VYDAC, Hesperia, CA) con un gradiente binario de 10-100% solución B en 50 min a un régimen de flujo de 1 ml/min.

(iv) **Espectroscopia de masa:** Los espectros de masas (MS) se determinaron mediante el uso de espectrometría de masas por desorción/ ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (Micromass UK Ltd.) y las técnicas de espectros de masas de ionización por electrospray (ESMS) (modelo Bruker-Reflex-Reflectron, Alemania, y espectrómetro de masas cuadrupolar simple por electrospray VG-platform-II, Micromass UK Ltd., respectivamente). Los polipéptidos se depositaron sobre un objetivo metálico como cocristales con ácido sináptico, y el espectro de masas se determinó en el modo de ion positivo.

(v) **Espectros UV:** Los espectros ultravioleta se obtuvieron con un espectrofotómetro Beckman DU 7500 en cubetas UV de 1 cm de longitud de trayecto.

(vi) **La cromatografía en capa fina** se realizó en placas de gel de sílice, que se desarrollaron o bien con cloroformo: metanol: ácido acético (9.2:0.5:0.3, v:v:v, TLC, A) o por cloroformo: metanol (9:1, v:v, TLC, B).

(vii) **Los análisis de aminoácidos** se realizaron después de la hidrólisis ácida con HCl 6N a 110°C durante 24 h mediante el uso de un analizador de aminoácidos Dionex Automatic HP1090 (Palo Alto, CA, Estados Unidos). Los análisis de la secuencia N-terminal se realizaron con un modelo de secuenciador de proteínas 491A Procise (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

Identificación de los compuestos intermedios - La mayoría de los compuestos químicos usados como reactivos y productos intermedios en los ejemplos son identificados por sus fórmulas en los Esquemas 1-7 de aquí en adelante y la siguiente caracterización: los intermedios se identifican por una letra subrayada en negrita una **a** a la **k** (letra minúscula) o por el término Precursor y un número en negrita y cursiva, es decir Precursores **1-8**.

Ejemplo 1: Síntesis de PEG_{5,000}-Fmoc-OSu (Precursor 1)

Precursor 1 de la fórmula representa en el Esquema 1 se preparó partiendo de 2-aminofluoreno y t-Boc-alanina (BocAla) por varias etapas, como se representa en el Esquema 2.

1(a). Síntesis de 2-(t-BocAla-amino)fluoreno (Intermediario a)

t-Boc-Ala (4.16 gr, 22 mmol) se disolvió en 11 ml de dioxano. N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC) (11 mmol en 11 ml de DMF 1M) se añadió después y la reacción se llevó a cabo durante 3 horas a 25°C bajo agitación. La diciclohexilurea (DCU) formada se eliminó por centrifugación. El producto anhídrido simétrico así obtenido (t-Boc-Ala-anhídrido) se hizo reaccionar durante la noche bajo agitación con 2-aminofluoreno (0.925 g, 11 mmol) en 30 ml de dioxano-agua (1: 1, v:v) que contiene 11 mmol de NaHCO₃. El sólido blanco formado se recogió y se secó en P₂O₅ en vacío durante 24 horas. Intermediario **a** se obtuvo en 60% de rendimiento (1.31 g, 3.34 mmol). Este migró en TLC (diclorometano) con Rt=0.17. La espectroscopia de masas reveló una masa de 352.45 Da (masa calculada = 352.2 Da).

1(b). Síntesis de 9-formilo-2-(t-BocAla-amino)fluoreno (Intermediario b)

El Intermediario a (1.31 g, 3.34 mmol) obtenido en Ejemplo 1(a) se disolvió en 10 ml THF seco y se combina con hidruro de sodio (NaH, 60%) (0.412 g, 11 mmol, 3.3 equivalentes) en suspensión en THF seco. El formiato de etilo (0.675 ml, 8.35 mmol) se añadió después y la reacción se llevó a cabo durante 1 hora bajo agitación y atmósfera de argón. Después de la adición de trozos de hielo y agua, el disolvente orgánico se eliminó por evaporación en vacío. La solución acuosa se lavó con éter y se acidificó a pH 5.0 con ácido acético. El precipitado formado se disolvió en acetato de etilo, la solución orgánica se lavó varias veces con NaHCO₃ 0.5 M, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El sólido amarillo formado después de la evaporación se trituró con éter y se secó en vacío. Intermediario b se obtuvo en 35% de rendimiento (0.46 g, 1.2 mmol). Este migró en TLC (cloroformo:metanol:ácido acético, 9.2:0.5:0.3, v:v:v) con R_f=0.59. El análisis de espectro de masas (técnica de ionización por electrospray) reveló una masa de 380.26 Da (masa calculada = 380.2 Da).

1(c). Síntesis de 9-hidroxitmetilo-2-(t-BocAla-amino) fluoreno (Intermediario c)

El Intermediario b (0.46 g, 1.2 mmol) obtenido en Ejemplo 1(b) se suspendió en metanol seco. El borohidruro de sodio sólido (NaBH₄) (57 mg, 1.5 mmol) se añadió en varias alícuotas y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas. El producto crudo obtenido se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice y se eluyó con cloroformo: metanol (95:5), para producir 80 mg (17%, 0.2 mmol) del Intermediario puro c que migra en TLC (cloroformo:metanol; 9:1, v:v) con R_f=0.53. El análisis del espectro de masas reveló una masa de 382.2 Da (masa calculada=382 Da). ¹H-NMR (CD₃SOCD₃)δ: 1.4 (s, 12H), 3.8-4.0 (m, 2H), 4.29 (d, 1H), 6.2 (s, amplio), 7.2-7.3 (m, 2H), 7.6-8.0 (m, 4H), 8.4 (s, 1H).

1(d). Síntesis de 9-hidroxitmetilo-2-(Ala-amino)fluoreno (Intermediario d)

El Intermediario c (80 mg, 0.2 mmol) obtenido en Ejemplo 1(c) se disolvió en 5 ml de diclorometano:ácido trifluoroacético (TFA) (1:1, v:v). Después de una hora, los disolventes se eliminaron por evaporación, y el Intermediario d se suspendió en éter, se recogió por precipitación y se liofilizó.

1(e). Síntesis del Intermediario e

A una solución de Intermediario d (0.2 mmol) obtenido en Ejemplo 1(d) y NaHCO₃ (0.8 mmol) en 3 ml H₂O, PEG_{5,000}-OSu (1 g, 0.2 mmol) se añadió. La reacción se llevó a cabo a 25°C, durante varias horas, con agitación. La formación de producto se verificó mediante el procedimiento de HPLC analítica mediante el uso de una columna C18 (R_t=36.6 min). El análisis de espectro de masas (MALDI) del Intermediario e reveló una masa de 5342 Da.

1(f). Síntesis de PEG_{5,000}-Fmoc-OSu (Precursor 1)

A una solución del Intermediario e obtenida en Ejemplo 1(e) (0.2 mmol) en 2 ml cloroformo, trifósgeno (1 mmol, exceso molar de 5) se añadió en 3 ml cloroformo frío en porciones. La reacción se lleva a cabo durante la noche con agitación. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en 1.0 ml THF seco. N-hidroxisuccinimida (NHS) (100 mg, 4 equivalentes) y 2,4,6-trimetilpiridina (0.163 ml, 6 equivalentes) se añadieron, y la reacción se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. El producto del título, PEG_{5,000}-Fmoc-OSu, se purificó hasta la homogeneidad mediante procedimiento de HPLC preparativa mediante el uso de una columna C18 (HPLC, R_t=39.0 min). El análisis de espectro de masas reveló una masa de 5654 kDa.

A diferencia de Fmoc-OSu, PEG_{5,000}-Fmoc-OSu es altamente soluble en soluciones acuosas, y absorbe en la región UV con un coeficiente de extinción molar de ε₂₈₀=21,200 y ε₃₀₁=10,100.

Ejemplo 2: Síntesis de PEG_{5,000}-FMS-OSu (Precursor 2)

Precursor 2, PEG_{5,000}-FMS-OSu, representado en el Esquema 1, se preparó por sulfonación del Precursor 1, PEG_{5,000}-Fmoc-OSu, con ácido clorosulfónico, como se representa en el Esquema 2. Brevemente, a una solución de Precursor 1 en **1** en 4.0 ml CH₂Cl₂, se enfrió a 0°C, una solución de ClSO₃H en CH₂Cl₂ se añadió gota a gota durante un período de 15 min y la solución se agitó durante 2 horas a 25°C. El producto, PEG_{5,000}-FMS-OSu, sulfonado en la posición 2 del anillo de fluoreno, se purificó por el procedimiento de HPLC preparativa, y se caracterizó por espectroscopía de masas, análisis elemental (para azufre), después de una diálisis extensiva, y por su velocidad de hidrólisis (a pH 8.5, 37°C)) después de la conjugación con cualquiera de gentamicina o insulina.

Ejemplo 3: Síntesis de PEG₄₀₀₀₀-Fmoc-OSu (Precursor 3) -

El Precursor 3, PEG₄₀₀₀₀-Fmoc-OSu, representado en el Esquema 1, se preparó como se describe en el Ejemplo 1, etapas 1 (e) y 1 (f), pero reemplazando el PEG₅₀₀₀-OSu con PEG₄₀₀₀₀-OSu bajo la mismas condiciones de reacción.

Ejemplo 4: Síntesis de PEG₄₀₀₀₀-FMS-OSu (Precursor 4)

El Precursor 4, PEG₄₀₀₀₀-FMS-OSu, representado en el Esquema 1, se preparó por sulfonación del Precursor 3, PEG₄₀₀₀₀-Fmoc-OSu, como se describe en el Ejemplo 2, pero sustituyendo el Precursor 1 con Precursor 3 en las mismas condiciones de reacción.

Ejemplo 5: procedimiento de "una etapa" para la preparación de conjugados PEGFmoc/fármaco y conjugados PEGFMS-fármaco

Para la preparación de conjugados PEG-Fmoc y PEG-FMS con los fármacos de acuerdo con la invención, un procedimiento de "una etapa" puede usarse en donde un precursor de PEG-Fmoc-OSu o PEG-FMS-OSu reacciona con uno o más grupos amino del fármaco en condiciones acuosas

Así, en los siguientes Ejemplos 6-8, el Precursor sólido 1, PEG₅₀₀₀-FMS-OSu, obtenido en el Ejemplo 1, se añadió en un exceso molar de 10 veces a las soluciones agitadas de gentamicina o insulina (10 mg/ml) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.4, a 0°C. En estas condiciones, de cinco a siete moles de Precursor 1 se incorporaron por mol de proteína. La reacción se completó en 15 minutos después de la adición del PEG-Fmoc-OSu sólido.

Ejemplo 6: Síntesis de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-gentamicina

El Precursor sólido 1 obtenido en el Ejemplo 1 (6 mg, 1 mmol) se añadió a una solución agitada de gentamicina (200 µmol en 1.0 ml de NaHCO₃ 0.01 M, pH ~7.5). La reacción se llevó a cabo durante 3 horas a 25°C y después se dializó frente a H₂O a 7°C durante varios días. Bajo estas condiciones de diálisis, la gentamicina libre, que no se ha unido covalentemente a PEG-Fmoc, se separó mediante diálisis. El producto, PEG₅₀₀₀-Fmoc-gentamicina, contenía un mol de PEG-Fmoc unido covalentemente a un mol de gentamicina, a juzgar por su absorbancia a 280 nm, y por análisis de aminoácidos, después de la hidrólisis ácida de una alícuota medida. El hidrolizado contenía alanina (derivada de la porción de PEG-Ala-Fmoc) y dos picos que surgieron en las posiciones de prolina y leucina, después de la hidrólisis ácida de gentamicina (no mostrado).

Ejemplo 7: Síntesis de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₂-gentamicina

El Precursor sólido 1 (11.3 mg, 2.1 µmol) se añadió a una solución agitada de gentamicina (0.5 mg, 1 µmol, en 1.0 ml 0.05 M NaHCO₃). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas a 25°C y se dializó durante la noche. El producto, (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₂-gentamicina, contenía aproximadamente dos moles de PEG-Fmoc unido covalentemente a la gentamicina, como se han verificó mediante análisis de aminoácidos después de la hidrólisis ácida (ver el Ejemplo 6 anterior) y por determinación de la cantidad de grupos amino no modificados con TNBS.

Ejemplo 8: Síntesis de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina y (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₂-insulina

Para la preparación de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina, a una solución agitada de Zn²⁺-insulina libre (1 mg en 2.0 ml 0.01 M NaHCO₃, 0.172 µmol), una solución fresca de Precursor 1 (8.8 µl, 20 mg/ml en DMF) se añadió (1.76 mg, 0.329 µmol, 1.9 exceso molar de reactivo en la proteína). La reacción se llevó a cabo durante 2 horas a 25°C. La mezcla de reacción se dializó durante la noche contra H₂O, para eliminar NaHCO₃ y DMF. El producto del título contenía aproximadamente un mol de PEG-Fmoc por mol de insulina, como se juzga por varios procedimientos descritos en la Sección Biológica de aquí en adelante. La concentración de insulina en la muestra se determinó rutinariamente por hidrólisis ácida de una alícuota de 20 µl, seguido por análisis de aminoácidos, y se calculó de acuerdo a ácido glutámico (7 residuos), ácido aspártico (3 residuos) e isoleucina (2 residuos).

La preparación de (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₂-insulina se llevó a cabo como se describe anteriormente al usar 4.63 mg, 0.865 mmol, exceso molar de reactivo de 5 sobre la proteína.

Ejemplo 9: Síntesis de N-[2-(3-acetilhiopropionilamino)-9-fluorenil-metoxicarbonilooxi]-succinimida (Precursor 5)

El Precursor **5**, representado en el Esquema 3, se sintetizó a partir de 2-aminofluoreno por el procedimiento representado en el Esquema 4, como sigue

9(a). Síntesis de 2-(t-Boc-amino)fluoreno (Intermediario f)

Di-t-butil-dicarbonato (anhídrido Boc, 14 g, 64.2 mmol) en solución de dioxano (50 ml) se combinó con 2-aminofluoreno (10 g, 55 mmol en 100 ml de dioxano: agua, 1: 1, v: v) y con NaHCO₃ (9.24 g, 110 mmol), y se agitó durante la noche. El sólido blanco así formado se filtró, se lavó con agua helada (200 ml) y se secó bajo alto vacío. El intermediario f se obtuvo con un rendimiento del 60% (9.24 g, 33 mmol. TLC (cloroformo:metanol:ácido acético, 9.5:0.5:0.3, v:v:v); Ref=0.73. ESMS calculado=280.4 Da, ESMS encontrado=280.45 Da.

9(b). Síntesis de 9-formilo-2-(t-Boc-amino)fluoreno (Intermediario g).

Intermediario f (3 g, 10 mmol), obtenido en la etapa 9(a), se disolvió en THF seco (30 ml) y se añadió a una suspensión de hidruro de sodio (NaH) (60%, 1.23 g, 33 mmol, 3.3 eq) en THF seco en atmósfera de argón. Se añadió después formiato de etilo (2 ml, 25 mmol, 2.5 eq) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. Se añadieron trozos de hielo y agua, el disolvente orgánico se evaporó y la solución acuosa se lavó con éter y se acidificó con ácido acético (pH ~5). El precipitado así formado se disolvió en acetato de etilo, se lavó con NaHCO₃ (0.5 N), salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El sólido amarillo se lavó con éter y se secó. Intermediario g se obtuvo en un rendimiento del 90% (2.8 g, 9 mmol). TLC (cloroformo: metanol:ácido acético ; 9.5:0.5:0.3, v:v:v), Ref=0.66. ESMS Calculado =309 Da, ESMS encontrado=309.2 Da. M-1: 308.20, M+Na: 332.36, dímero [M+Na]⁺: 641.59.

9(c) Síntesis de 9-hidroximetil-2-(t-Boc-amino)fluoreno (Intermediario h)

Se añadió en porciones borohidruro de sodio (NaBH₄) (0.38 g, 10 mmol) a una suspensión del Intermediario g (2.8 g, 9 mmol) obtenido en la etapa 9(b), en metanol seco, y la reacción se dejó proceder durante 4 horas. El producto, Intermediario h, se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice, que se eluyó con cloroformo:metanol (98:2, v:v), y se obtuvo en 50% de rendimiento (1.4 g, 4.5 mmol). TLC (cloroformo:metanol, 9:1, v:v), Rf = 0.54; ESMS calculado=311 Da, ESMS encontrado=311.42 Da, para [M+Na]⁺= 334.42, para [M+K]⁺=350.34.

9(d). Síntesis de 9-hidroximetil-2-aminofluoreno (Intermediario i)

El Intermediario h (1.4 g, 4.5 mmol) se obtuvo en la etapa 9(c) se disolvió en 110 ml HCl 5N en dioxano. Después de 1 hora, el disolvente se concentró por evaporación y el producto se precipitó con éter y se liofilizó. El Intermediario i se obtuvo en 84% de rendimiento (0.79 g, 3.78 mmol). TLC (cloroformo:metanol, 9:1,v:v), Rf = 0.38; ESMS calculado=211.26 Da, ESMS encontrado para [M+H]⁺=211.10 Da.

9(e). Síntesis de ácido 3-S-acetilhiopropiónico

La piridina (6.9 ml, 84.6 mmol) se añadió a una mezcla de ácido 3-mercaptopropiónico (2.5 ml, 28.2 mmol) y anhídrido acético (16 ml, 84.6 mmol). La solución de reacción se agitó durante 16 h y se concentró al vacío. Se añadió agua (5 ml) durante 20 min y la solución se concentró al vacío. El aceite obtenido se disolvió en éter (50 ml) y se lavó con agua y KHSO₄ (0.5 N). La fracción de éter se secó con Na₂SO₄ y vacío para producir el producto del título (Rendimiento: 85%, 24 mmol, 3.6 g). ¹H-NMR (CDCl₃)δ: 2.21 (s, 3H), 2.6 (t, 2H), 2.9 (t, 2H).

9(f). Síntesis de 3-S-acetilhiopropiónico anhídrido

El ácido 3-S-acetilhiopropiónico de la etapa 9(e) (1.8 g, 12 mmol) y DCC (1.4 g, 6 mmol) se disolvieron en DMF (15 ml) durante 4 horas. El precipitado de DCU se separó por filtración y el anhídrido así formado se mantuvo a 4°C hasta su uso.

9(g). Síntesis de 9-hidroximetil-2-(3-acetilhiopropionil-amino)-fluoreno (Intermediario j)

El Intermediario i (0.422 g, 2 mmol) obtenido en la etapa 9(d) y NaHCO₃ (0.74 g, 18 mmol) se disolvieron en agua/dioxano (1:1, 20 ml) y se añadió anhídrido 3-S-acetilhiopropiónico de la etapa 9(f) en DMF (17 ml, 6 mmol). La solución de reacción se agitó durante 1 hora. Los disolventes orgánicos se eliminaron mediante vacío y la solución líquida se extrajo con éter, se lavó con Na₂SO₄ (0.5 N) y agua y se secó al vacío. El producto crudo obtenido, el Intermediario j, se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice y elución con acetato de etilo: hexano (1:1, v:v). Rendimiento:

60%, 0.4 g, 1.2 mmol. ESMS, (ca. 431) M+Na⁺: 464, dímero 2M: 682, dímero 2M: Na⁺: 705.67. ¹H-NMR (CDCl₃)δ: HPLC (Columna Chromolith) 5.3 min (10-100% solución B en 10 min, 3 ml/min).

9(h). Síntesis del Precursor 5

5 El Intermediario **j** obtenido en la etapa 9(g) se hizo reaccionar con N-hidroxisuccinimida y fosgeno, tal como se representa en el Esquema 4. Así, la piridina (0.215 ml, 2.7 mmol) se añadió gota a gota a una solución agitada del Intermediario **j** (0.385 g, 0.9 mmol) y trifósgeno (0.265 g, 0.9 mmol, 3 eq) en THF seco (5 ml). Después de 20 min, el precipitado de la sal de clorhidrato de piridina se separó por filtración y el THF se eliminó por evaporación. El aceite obtenido se disolvió en THF
10 seco (10 ml). Se añadieron después N-hidroxisuccinimida (0.5 g, 4.4 mmol, 5 eq) y piridina (0.215 ml, 2.7 mmol) y la solución se agitó durante 20 min. El precipitado de la sal de clorhidrato de piridina se separó por filtración y el THF se eliminó por vacío. El aceite obtenido se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice y elución con acetato de etilo: hexano (1:1 y 4:1). El producto, Precursor 5, se obtuvo con un rendimiento del 88% (0.38g, 0.78 mmol). ESMS: (ca 482) M: 482.2. HPLC (Columna Chromolith) 6.68 min (10-100% solución B en 10 min, 3 ml/min). TLC (etil acetato:hexano, 1:1, v:v) Rf=0.4.

Ejemplo 10: Síntesis de N-[2-(3-acetiltiopropionil-amino)-7-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilooxi]-succinimida (Precursor 6)

20 El Precursor **6**, representado en el Esquema 3, se preparó por sulfonación del Precursor **5** con ácido clorosulfónico como se describió anteriormente en el Ejemplo 2.

Ejemplo 11: Síntesis de MAL-Fmoc-NHS, N-[2-(maleimidopropionil-amino)fluoreno-9-il-metoxicarbonilooxi]succinimida (Precursor 7)

25 El Precursor 7, MAL-Fmoc-NHS representado en el Esquema 3, se preparó como se representa en el Esquema 5 a partir de 2-aminofluoreno a través de la síntesis de los Intermedios de **f** a **i**, descritos en el Ejemplo 9 anterior, seguido de las etapas más abajo:

30 11(a). Síntesis de 9-hidroximetil-2-(maleimidopropionil-amino)fluoreno (Intermediario k)

El anhídrido 3-Maleimidopropiónico se preparó por disolución de ácido 3-maleimidopropiónico (1 g, 5.9 mmol) y DCC (0.69 g, 2.95 mmol) en 10 ml de DMF e incubación durante 4 h. DCU se separó por filtración y el anhídrido así formado se mantuvo a 4°C.

35 El 9-hidroximetil-2-amino-fluoreno (Intermediario **i**; (0.4 g, 1.9 mmol) i NaHCO₃ (0.74 g, 8.85 mmol) se disolvieron en agua y se añadió anhídrido 3-maleimidopropiónico en DMF (12 ml, 2.95 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 40 min y la formación de producto se monitoreó por HPLC analítica en una columna Chromolith (Rt=4.46 min, 10-100% B en 10 min, 3 ml/min). El producto crudo, el Intermediario **k**, se purificó usando HPLC preparativa (columna RP-18, 10-100% acetoneitrilo:agua [75:25; v:v], 60 min, 12 ml/min). Rendimiento: 57%, 1.08 mmol, 0.39 g. ESMS Calculado = 362.38 Da, ESMS encontrado = 362.42 Da).

11(b). Síntesis de MAL-FMOC-NHS

45 La piridina (0.167 ml, 2 mmol) se añadió gota a gota a una solución agitada del Intermediario **k** (0.37 g, 1.02 mmol) obtenido en la etapa 11(a) y trifósgeno (0.425 g, 1.43 mmol, 4.2 eq) en THF seco (10 ml). Después de 20 min el precipitado de la sal de clorhidrato de piridina se separó por filtración y el THF se eliminó por vacío. El aceite obtenido se disolvió en 10 ml de THF seco con N-hidroxisuccinimida (0.61g, 5.3 mmol). La piridina (0.26 ml, 3.2 mmol) se añadió después y la solución se agitó durante 20 min. Algo de la sal clorhidrato de piridina precipitada se separó por filtración y el THF se eliminó por vacío.
50 El aceite obtenido se disolvió en cloroformo (100 ml) y se lavó con una solución acuosa de NaHCO₃ (0.5 N, 3x 50 ml), HCl (0.1 N, 3x 50 ml), agua (2x 50 ml) y salmuera. El cloroformo se eliminó mediante vacío y el producto, el Precursor 7, se desecó. Rendimiento: 89% (0.9 mmol, 0.45 g). HPLC (Columna Chromolith) Rt=5.7 min (10-100% B in 10 min, 3 ml/min). ESMS Calculado = 503 Da, ESMS encontrado para [M+Na]⁺ = 526.38 Da, ESMS encontrado para [M+K]⁺ = 542.30 Da.

55 Ejemplo 12: Síntesis de MAL-FMS-NHS, N-[2-(maleimido-propionil-amino)-7-sulfo-fluoreno-9-il]metoxicarbonilooxisuccinimida (Precursor 8)

El Precursor 8, representado en el Esquema 3, en la presente identificado también por la abreviatura MAL-FMS-NHS (o MAL-FMS-OSu), se preparó por sulfonación del Precursor 7, MAL-Fmoc-NHS, con ácido clorosulfónico como se muestra en el Esquema 5, como sigue:

- 5 A una solución del Precursor 7 (0.2 mmol, 0.1 g) obtenido en el Ejemplo 11 en ácido trifluoroacético (TFA) (10 ml), se añadió ácido clorosulfónico (0.5 ml). Después de 15 minutos, se añadió éter frío (90 ml) y el producto precipitado. Precursor 8, se lavó con éter (x3) y se desecó. Rendimiento: 95% (0.11 g, 0.19 mmol). HPLC (Columna Chromolith) Rt=2.65 min (10-100% B in 10 min, 3 ml/min). ESMS Calculado = 583 Da, ESMS encontrado para $[M-H]^+$ = 582.24 Da, para $[M+H]^+$ = 584.52 Da, y para $[M+Na]^+$ = 606.47 Da.

10 **Ejemplo 13: Caracterización química de MAL-FMS-NHS**

MAL-FMS-NHS o MAL-FMS-OSu es un reactivo heterobifuncional soluble en agua que consiste en un éster de N-hidroxisuccinimida fluorenilmetoxicarbonil sulfonado que reacciona con grupos amino de péptidos y proteínas. Un grupo maleimida se unió a la cadena principal de fluorenilo para permitir el acoplamiento a PEG₄₀₀₀₀-SH que contiene sulfhidrilo.

MAL-FMS-NHS es un reactivo escindible capaz de reaccionar covalentemente con las cadenas laterales amino de los péptidos, proteínas y aminoglucósidos. De acuerdo con la presente invención, este permite que las cadenas de PEG se unan a péptidos y proteínas a través de un enlace químico lentamente hidrolizable. Los conjugados PEG-FMS-péptido/proteína así formados experimentan hidrólisis espontánea a una velocidad lenta después de la incubación a pH 8.5, 37°C, con un valor de $t_{1/2}$ de 8-14 ± 2 h, lo que genera la molécula principal sin modificar.

25 *Características químicas de MAL-FMS-NHS.* La Tabla 1 resume varios de los rasgos característicos de MAL-FMS-NHS. Es un compuesto soluble en agua y DMF. El análisis del espectro de masas ha producido una masa calculada de 583 Da. El compuesto absorbe en la región UV con un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{280}=21,000\pm 200 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La curva muestra un máximo a 290 nm, y un hombro que se extiende hasta 330 nm. A 320 nm, donde los péptidos o proteínas absorben insignificante, MAL-FMS-NHS, ya sea libre o unido por enlace covalente a las proteínas, absorbe con un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{320}=16,100\pm 150 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Tabla 1).

30 *Estabilidad de la fracción de MAL-funcional en soluciones acuosas.* Con el fin de probar la estabilidad de la función maleimida de MAL-FMS-NHS en soluciones acuosas a diferentes valores de pH, MAL-FMS-NHS (1 mM) se incubó a temperatura ambiente en agua (pH 6.0), en ácido acético 0.007M (pH~4.0), en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4), y en NaHCO₃ 0.1M (pH 8.5). En varios puntos de tiempo, las alícuotas se dejaron reaccionar con un ligero exceso de glutatión reducido (GSH) (15 min a pH 7.2) y la concentración de GSH sin reaccionar se determinó con DTNB (5,5'-ditio-bis-2-ácido nitrobenzoico, reactivo de Ellman), por medición de la absorbancia del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico producido coloreado de amarillo (TNB) a 405 o 412 nm. **La Figura 1** demuestra la potencia de la reacción de MAL-FMS-NHS con GSH como una función del tiempo, a diferentes valores de pH. MAL-FMS-NHS se encontró totalmente estable a un pH de 4 a 6 durante un período de un día o dos y a pH 7.2 es estable durante un período de varias horas. A pH 8.5, la porción de maleimida se destruyó a una velocidad acelerada ($t_{1/2}$ valor = 2.7 ± 0.3 hr, Fig. 1).

40 **Ejemplo 14: Grado de incorporación de MAL-FMS-NHS a un pH de 7.2 en la α -lactoalbúmina como una función de la cantidad de reactivo añadido**

45 Para evaluar el grado de incorporación de la porción de maleimida en péptidos/proteínas como una función del reactivo, se usó como modelo α -lactoalbúmina. Así, a las muestras de α -lactoalbúmina (α -LA, 1.0 ml de mg/ml), se añadió MAL-FMS-NHS en 0.1 M PBS, pH 7.2, a concentraciones que varían desde 1 equivalente hasta 14 equivalentes molares de MAL-FMS-NHS, durante 30 min a 25°C, esto es, en condiciones experimentales donde la capacidad de alquilación de maleimida del separador permanece sin modificar. Para cada tratamiento, la cantidad incorporada en la proteína se determinó por absorbancia UV a 280 nm, después de la diálisis, y por cuantificación de la cantidad de porciones de cadena lateral amino no modificadas con TNBS. Como se muestra en la **Figura 2**, aproximadamente un mol de MAL-FMS se incorporó en α -LA por 2.1 mol de reactivo añadido, hasta un exceso molar de catorce por encima de la proteína.

50 **Ejemplo 15: Síntesis de PEG₄₀-SH (Ejemplo de referencia)**

55 PEG₄₀-SH se preparó ya sea por reacción de 2-tritilitioetilamina y PEG₄₀-OSu OSu como se describe más abajo en 15(a), o a partir de PEG₄₀-OSu y cistamina [2,2'-ditio-bis(etilamina)] diclorhidrato, como se describe más abajo en 15 (b).

15(a). Síntesis de PEG₄₀-SH a partir de 2-tritilitioetilamina y PEG₄₀-OSu

Síntesis de 2-tritilitioetilamina. Se disolvieron 2-amino-etanol (3 g, 26.5 mmol) y alcohol trifenilmetilo (7 g, 26.9 mmol) en TFA (20 ml) y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. El TFA se eliminó por evaporación y el residuo de aceite restante se disolvió en éter (400 ml) y se almacenó a -20°C. El producto aislado se lavó con éter y agua fríos. Después se añadió una solución concentrada de amoníaco (25%, 30 ml), y la fase acuosa se lavó varias veces con éter. El éter se eliminó por vacío y el producto se desecó. Rendimiento, 78% (6.6 g, 20.7 mmol), Rt=5.35 min.

Se disolvieron 2-tritilitioetilamina y PEG₄₀-OSu (0.25 g, 6.25 µmol) en 4 ml THF:acetonitrilo (1:2, v:v). Después de una hora, el producto se precipitó con éter enfrió y se lavó (x3). El sedimento seco se disolvió en TFA: trietilsilano: agua (95:2.5:2.5, 6 ml) y, después de una hora, PEG₄₀-SH se precipitó con éter frío (100 ml) y se desecó.

15(b). Síntesis de PEG₄₀-SH a partir de cistamina y PEG₄₀-OSu

PEG₄₀-OSu se disolvió a una concentración de 40 mg/ml en una solución acuosa de cistamina-di-HCl (1M) y se llevó a pH 8.5 con NaHCO₃. La reacción se llevó a cabo durante 2 h a 25°C. El producto así obtenido se dializó durante la noche contra NaHCO₃ 0.1 M, se trató con ditiotreitilo 30 mM (25°C, 1 h) y se re-dializó frente a HCl 0.01 M que contiene ácido ascórbico 10 mM. PEG₄₀-SH se obtuvo con un rendimiento del 93%. Este contenía 1 mol de porción de sulfhidrilo por mol de PEG₄₀, como se determina con DTNB en presencia de ascorbato. PEG₄₀-SH se mantuvo congelado hasta su uso.

Ejemplo 16: Preparación de conjugados de PEG-FMS-fármaco a partir de MAL-FMS-NHS (Procedimiento I)

Para la preparación de conjugados de PEG-FMS-fármaco de acuerdo con la invención, un Procedimiento I de "dos etapas" se puede usar como se representa en el Esquema 6 mediante el cual MAL-FMS-NHS se hace reaccionar primero con un fármaco que contiene amino o con el grupo amino de un fármaco peptídico o proteico y el conjugado resultante MAL-FMS-fármaco se hace reaccionar adicionalmente con PEG-SH. como sigue:

16(a). Preparación de conjugados MAL-FMS-fármaco

En una primera etapa, un conjugado MAL-FMS-fármaco se prepara por adición de uno a siete de exceso molar de MAL-FMS-NHS, Precursor 8, a una solución agitada del fármaco (1 mg/ml) en tampón PBS 0.1 M, pH 7.2. La reacción se lleva a cabo durante 30 min a 25°C, y después se dializó contra agua a 7°C durante un período de 24 h para eliminar el exceso de MAL-FMS-NHS. La cantidad de residuos de FMS-MAL incorporados en el fármaco, por ejemplo, un fármaco peptídico o proteico, se determina tanto por la absorción a 320 nm usando el coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{320}=16,100$, como por cuantificación de la función MAL incorporada en el fármaco. Esto se realiza mediante la adición de una alícuota medida en una solución de GSH (en tampón fosfato 0.1 mM, pH 7.2). La concentración de GSH sin reaccionar remanente se determina con DTNB.

16(b). Preparación de conjugados PEG-FMS-fármaco

En la segunda etapa, una cantidad estequiométrica de PEG₄₀-SH sólido se añade al conjugado MAL-FMS-fármaco de la etapa 16(a), y la reacción prosigue por 60 min adicionales en tampón de fosfato 0.1 M, pH 7.2, que contiene ácido ascórbico 2mM. El conjugado de PEG-FMS-fármaco así obtenido se purifica adicionalmente por procedimientos de HPLC usando columnas C4 o C18 de fase inversa bajo condiciones que resuelven el conjugado del fármaco, preferentemente un fármaco peptídico o proteico (o proteína-FMS-MAL) que no se ha unido covalentemente a PEG₄₀-SH.

Ejemplo 17: Preparación de conjugados de PEG-FMS-fármaco a partir de MAL-FMS-NHS (Procedimiento II)

Los conjugados de PEG-FMS-fármaco de acuerdo con la invención se pueden preparar también mediante un procedimiento II de "dos etapas" alternativo representado en el Esquema 6 mediante el cual MAL-FMS-NHS se hace reaccionar primero con PEG-SH y el conjugado de PEG-FMS-NHS resultante se hace reaccionar adicionalmente con un fármaco que contiene amino o con el grupo amino de un fármaco peptídico o proteico, como sigue

17(a). Preparación de conjugados PEG-FMS-NHS

En la primera etapa, un conjugado de PEG-FMS-NHS se prepara por MAL-FMS-NHS a una solución agitada de PEG-SH en tampón PBS, pH 7.4. La reacción se lleva a cabo durante 30 min a 25°C y el producto se purifica después por HPLC y se liofiliza.

17(b). Preparación de conjugados PEG-FMS-fármaco

En la segunda etapa, una cantidad estequiométrica del conjugado MAL-FMS-NHS de la etapa 17(a) se añade al fármaco que contiene amino, y la reacción prosigue con agitación durante 2 horas. El producto se purifica después por HPLC y se liofiliza.

Ejemplo 18: Síntesis de (PEG₄₀-FMS)₁-insulina.

(PEG₄₀-FMS)₁-insulina, se preparó por el procedimiento de dos etapas descrito en el Ejemplo 16. Así, MAL-FMS-NHS (6 g, 10 µmol) se disolvió en agua (0.25 ml) y se añadió a una solución de insulina (Zn²⁺-libre, 25 mg, 4.16 µmol) en PBS (0.5 ml, pH=7.4). El pH se ajustó a 7-8 con NaHCO₃. La reacción se detuvo después de 30 min con una solución de clorhídrico diluido (pH=6). El producto se aisló mediante el uso de HPLC preparativa (columna C18, 10-80% de acetonitrilo: agua, 75:25, v:v, 50 min, 10 ml/min) y se identificó como derivado de insulina monosustituido MAL-FMS-insulina mediante el uso de espectrometría de masas por electrospray (ESMS (ca. 6280), M-1: 6278.83, M+1: 6280.73). HPLC analítica (columna Chromolith), Rt=4.58 min.

PEG₄₀-SH (20 mg, 0.5 µmol) se añadió a una solución del Intermediario Mal-FMS-insulina (2 mg, 0.317 µmol) en PBS (0.3 ml, pH=7.4), el pH se ajustó a 7-8 con NaHCO₃ y la reacción se detuvo después de 30 min con una solución de clorhídrico diluido (pH=6). El producto del título, PEG₄₀-FMS-insulina, se sometió a HPLC analítica (columna Chromolith), Rt= 6.6 min.

Ejemplo 19: Síntesis de PEG₄₀-FMS-exendina-4.

PEG₄₀-FMS-exendina-4 se preparó por el Procedimiento I de dos etapas descrito en el Ejemplo 16. Así, 280 µg de MAL-FMS-NHS (28 µl a partir de una solución fresca de MAL-FMS-NHS en DMF, 10 mg/ml, 2.0 exceso molar sobre el péptido) a una solución agitada de la exendina-4 (1 mg en 1.0 ml de tampón fosfato 0.1 M, ascorbato 2 mM, pH 7.2, 0.239 mM). Después de 7 min, PEG₄₀₀₀₀-SH sólido se añadió a una concentración final de 0.5 mM (2.1 exceso molar sobre el péptido). La reacción se llevó a cabo durante 1 h, se dializó durante la noche contra agua y después se filtró adicionalmente a través de Centricon con un corte de peso molecular de 50 kDa para eliminar cualquier exendina-4 o MAL-FMS-exendina-4 residual que no se había unido a PEG₄₀₀₀₀-SH. La concentración del conjugado se determinó por hidrólisis ácida de una alícuota de 20 µl seguido por análisis de aminoácidos, de acuerdo con ácido aspártico (2 residuos), alanina (2 residuos) y valina (1 residuo), y se monitoreó la absorbancia a 280 nm. El coeficiente de extinción calculado a 280 nm es 26940±100, un valor que es la absorbancia aditiva de la exendina-4 (ε₂₈₀=5740) y PEG₄₀₀₀₀-FMS (ε₂₈₀ = 21200). Una solución de 20 µM PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina tuvo OD₂₈₀= 0. 5 1. Así el conjugado tuvo una estequiometría de 1:1 1 PEG₄₀₀₀₀-FMS/exendina (como se determina a partir de la absorción UV del conjugado después de la purificación y la hidrólisis ácida seguida por análisis de aminoácidos como se describe anteriormente).

Ejemplo 20: Síntesis del PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4.

El PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4 se preparó por el Procedimiento II de dos etapas que se describe en el Ejemplo 17. Así, se añadió MAL-FMS-MHS (1.8 mg, 3 µmol) a una disolución de PEG₅₀₀₀-SH (15 mg, ~3 µmol) en PBS (0.5 ml, pH=7.4) y la reacción se agitó durante 30 min. El producto PEG₅₀₀₀-FMS-NHS se purificó por HPLC en una columna RP-4 y se liofilizó.

PEG₅₀₀₀-FMS-NHS (2.3 mg, ~0.42 µmol) se añadió después a una disolución de exendina-4 (1.6 mg, 0.4 mmol) en PBS (0.5 ml, pH=8) y la disolución de reacción se agitó durante 2 h. El producto PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4 se purificó por HPLC en una columna RP-4 y se liofilizó.

Ejemplo 21: Síntesis y caracterización del PEG₄₀-FMS-IFNα2

La unión de una sola cadena de PEG de 40 kDa al IFNα2 parece suficiente para detener burdamente la filtración renal del conjugado (Bailon y otros, 2001). Por lo tanto, previmos que el enlace de una sola cadena de PEG₄₀-FMS al IFNα2 sería suficiente para obtener un conjugado de acción prolongada que libere IFNα2, con un perfil farmacocinético deseable. En el procedimiento que se encontró óptimo para la introducción de un mol PEG₄₀-FMS proteína/mol, el IFNα2 se dejó reaccionar primero con 3 equivalentes de MAL-FMS-NHS, a pH 7.2, durante 7 min, seguido de la adición de 3 equivalentes de PEG₄₀-SH, a pH 7.2, durante 1 hora. La función de NHS de MAL-FMS-NHS es relativamente inestable en condiciones acuosas neutras prolongadas, mientras que la función de MAL del espaciador conserva su capacidad de alquilación durante varias horas a pH 7.2 (no se muestra). Por lo tanto, preferimos utilizar el Procedimiento I del Ejemplo 16 y hacer reaccionar el MAL-FMS-NHS primero con el IFNα2 y posteriormente enlazar el PEG₄₀-SH al conjugado IFNα2-FMS-MAL.

A una disolución agitada de IFN α 2 (1 mg/1.0 ml) en tampón fosfato, pH 7.2 (52 μ M), se añadieron 91 μ g de MAL-FMS-NHS (9,1 μ l de una disolución fresca de MAL-FMS-NHS, (10 mg/ml) en DMF, (3.0 molar en exceso sobre la proteína). Después de 7 min, el PEG₄₀-SH se añadió para obtener una concentración final de 156 μ M (tres molar de exceso sobre la proteína). La reacción se llevó a cabo durante 1 h, y después se dializó durante la noche contra H₂O para eliminar el DMF residual y el tampón fosfato. El conjugado que se obtuvo así se caracterizó por MALDI-TOF como PEG₄₀-FMS-IFN- α 2.

La Tabla 2 resume varios rasgos característicos del conjugado que se obtuvo así. El análisis de espectros de masas MALDI-TOF muestra una estequiometría 1:1 PEG₄₀-FMS/IFN α 2. La masa experimental que se obtuvo, 63.540 Da, corresponde a las masas aditivas que se encontraron para el PEG₄₀-SH (43818 Da), el IFN α 2 (19278 Da) y la molécula espaciadora después de la conjugación (473 Da). El PEG₄₀-FMS-IFN α 2 migra en una HPLC analítica como un amplio pico con Rt = valor de 43 min. El conjugado es altamente soluble en disoluciones acuosas. Tiene un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{280} = 39270 \pm 100$, lo que corresponde a la absorción de la citocina nativa y del FMS ($\epsilon_{280} = 21,200$) (Gershonov y otros, 2000).

Ejemplo 22: Síntesis de (PEG₄₀-FMS)₂-IFN α 2.

El (PEG₄₀-FMS)₂-IFN α 2 se preparó como se describe anteriormente en el Ejemplo 21 para el PEG₄₀-FMS-IFN α 2, pero utilizando 6 eq (16 μ g, 44.5 nmol, en 10 μ l de DMF) de MAL-FMS-NHS.

Ejemplo 23: Síntesis del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆

En el procedimiento encontraron más óptima para el acoplamiento de aproximadamente un mol de PEG₄₀-SH por mol de MAL-FMS-PYY₃₋₃₆, el PYY₃₋₃₆ se dejó reaccionar en primer lugar con 2 equivalentes de MAL-FMS-NHS, a pH 7.2, durante 7 min, seguido de la adición de 2.1 equivalentes de PEG₄₀-SH, a pH 7.2, durante 1 hora.

A una disolución agitada de PYY₃₋₃₆ (1 mg en 1.0 ml de tampón fosfato, pH 7.2, 10 mM Na ascorbato (0.247 M), se añadieron 288 μ g de MAL-FMS-NHS (28.8 μ l, a partir de una disolución fresca 10 mg/ml de MAL-FMS-NHS en DMF; doble molar de exceso sobre el péptido). Después de 7 min, el PEG₄₀-SH se añadió para obtener una concentración final de 0.52 mM (2.1 molar de exceso sobre el péptido). La reacción se llevó a cabo durante 1 h y después la mezcla se dializó durante la noche contra agua. El PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ resultante se caracterizó mediante MALDI-TOF MS.

Ejemplo 24: Síntesis de (PEG₄₀-FMS)₂-hGH

El (PEG₄₀-FMS)₂-hGH se preparó por el procedimiento de dos etapas descrito en el Ejemplo 16, como sigue: a una disolución agitada de la hormona de crecimiento humana (4.4 mg, 0.22 μ mol) en tampón fosfato (1 ml, 0.1 M, pH 7.2), se añadió MAL-FMS-NHS (4 eq, 0.47 mg, 0.8 μ mol). La reacción se llevó a cabo durante 30 min a 25°C, y se dializó después contra H₂O (pH 6) a 4°C durante 24 h, para eliminar el exceso de MAL-FMS-NHS. Se añadió PEG₄₀-SH sólido (7 eq, 65 mg, 1.5 μ mol), y la reacción procedió durante 2 h en tampón fosfato (1 ml, 0.1 M, pH 7.2, que contenía 2 mM de ácido ascórbico). El compuesto del título que se obtuvo así se purificó por RP-HPLC mediante la utilización de una columna C4, y se caracterizó por electroforesis en gel de SDS (12.5 %) que indicó la presencia de (PEG₄₀-FMS)₂-hGH.

Ejemplo 25: Síntesis del PEG₄₀-FMS-hGH

Se añadió MAL-FMS-NHS (280 μ g) a una disolución de hGH (4.5 mg, 0.225 μ mol) en 0.5 ml de PBS, pH = 7.4. Después de 10 min, se añadió el PEG₄₀-SH (10 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h y se dializó durante la noche contra agua. El producto, PEG₄₀-FMS-hGH, se purificó por RP-HPLC.

Ejemplo 26: Síntesis del PEG₄₀-FMS-ANP

A una disolución agitada de péptido natriurético atrial (PNA) (0.32 mmol, 1 mg) en tampón fosfato (1 ml, 0.1 M pH 7.2), se añadió MAL-FMS-NHS (2 eq, 0.2 mg, 0.7 μ mol). La reacción se llevó a cabo durante 10 min a 25°C. Se añadió el PEG₄₀-SH sólido (2.2 eq, 30 mg, 0.7 μ mol), y la reacción procedió durante 2 h en tampón fosfato (1 ml, 0.1 M, pH 7.2, que contiene 2 mM de ácido ascórbico). El producto se purificó más aun por HPLC.

II. SECCIÓN BIOLÓGICA

En esta sección, la actividad biológica del PEG-Fmoc y del PEG-FMS conjugados con gentamicina, péptidos y proteínas que se prepararon en los ejemplos anteriores, se puso a prueba.

Ejemplo 27: Conjugados inactivos PEGFmoc-gentamicina experimentan reactivación

Para ensayar la potencia antibacteriana de la gentamicina y sus derivados, una suspensión de *Escherichia coli* (*E. coli* cepa N-4156-W.T, 1% v/v en medio LB) se dividió en tubos de plástico (0.5 ml por tubo) y se incubó en un baño de agua con agitación a 37°C, en la ausencia o la presencia de concentraciones crecientes de gentamicina (0.02 a 2 µM) y concentraciones crecientes de derivados PEG_{5,000}-gentamicina (0.02-50 µM). La replicación de *E. coli* se evaluó midiendo la absorbancia a 600 nm. La incubación se terminó cuando la OD₆₀₀ nm en los tubos que no contenían gentamicina alcanzó un valor de 0.6 ± 0.1. Bajo nuestras condiciones de ensayo, la gentamicina nativa inhibe a la mitad del máximo la replicación de *E. coli* a una concentración de 0.22±0.02 µM (0.1 µg/ml), Un derivado del PEG-gentamicina que muestra un valor de IC₅₀ de 2.2±0.2 µM en este ensayo se considera que tiene un 10% de la potencia antibacteriana de la gentamicina nativa.

El (PEG_{5,000}-Fmoc)₁-gentamicina y el (PEG_{5,000}-Fmoc)₂-gentamicina, que contienen uno o dos moles de PEG_{5,000}-Fmoc/mol de gentamicina, respectivamente, se prepararon como un modelo para evaluar la reversibilidad de las porciones del PEG-Fmoc. Ambos derivados (0.2 mM de cada uno) se incubaron en 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.5) a 37°C, y se retiraron alícuotas a diferentes tiempos y después se analizaron para determinar su potencia para detener la replicación de *E. coli* (véase el método (xi) anteriormente). Para cada alícuota se determinó la IC₅₀. La gentamicina nativa inhibió la replicación de *E. coli* con un valor de IC₅₀ de 0.22±0.2 µM. El (PEG_{5,000}-Fmoc)₂- y el (PEG_{5,000}-Fmoc)₁-gentamicina tienen 0.01 y 2.1±0.1% de la potencia antibacteriana de la gentamicina, respectivamente.

Los resultados se muestran en las **Figs. 3A-3B**. El (PEG_{5,000}-Fmoc)₂-gentamicina mostró un período de latencia prolongado (de aproximadamente 15 horas) antes de la reactivación perceptible (Fig. 3A). Una elevación brusca en la potencia antibacteriana ocurrió entonces, hasta alcanzar el 50 o el 100% de la potencia nativa después de 30±2 o 60±3 horas de incubación, respectivamente (Fig. 3A). No se observó un período de latencia tras la incubación del (PEG_{5,000}-Fmoc)₁-gentamicina. La reactivación procedió de forma continua con la reactivación máxima media a 6±0.3 horas, y la activación completa (100%) después de 30 horas de incubación (Fig. 3B).

Ejemplo 28. Actividad biológica de los conjugados PEGFmoc-insulina**Materiales y Métodos**

(i) Materiales. La insulina humana recombinante se obtuvo de Biotechnology General (Rehovot, Israel). La D-[U-¹⁴C]Glucosa (4-7 mCi/mol) de obtuvo de Du Pont NEN (Boston, MA, USA). La colagenasa tipo I (134 U/mg) se adquirió de Worthington (Freehold, NJ, USA).

(ii) Los adipocitos de rata se prepararon a partir de los panículos adiposos de ratas Wistar macho (100-200 gr) mediante digestión con colagenasa como se describe (Rodbell, 1964). Los panículos adiposos se cortaron en trozos pequeños con tijeras y se suspendieron en 3 ml de tampón KRB que contenía NaCl, 110 mM; NaHCO₃, 25 mM; KCl, 5 mM; KH₂PO₄, 1.2 mM; CaCl₂, 1.3 mM; MgSO₄, 1.3 mM; y 0.7% BSA (pH 7.4). La digestión se realizó con colagenasa de tipo I (1 mg/ml) en una botella de 25 ml de plástico flexible bajo una atmósfera de carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) durante 40 min a 37°C con agitación vigorosa. Después se añadieron cinco ml de tampón, y se pasaron las células a través de un tamiz de malla. Las células se dejaron en reposo después durante varios minutos en un tubo de ensayo de plástico de 15 ml a temperatura ambiente, flotando, y el tampón de abajo se eliminó. Este procedimiento (suspensión, flotación, y la eliminación del agente tampón de abajo) se repitió tres veces.

(iii) Lipogénesis (incorporación de [U-¹⁴C] glucosa en los lípidos de adipocitos intactos). La incorporación de [U-¹⁴C] glucosa en el tejido adiposo en adipocitos de rata se realizó como se describe (Moody y otros, 1974). Se dividieron las suspensiones de adipocitos (3x10⁵ células/ml) en viales de plástico (0.5 ml por vial) y se incubaron durante 60 minutos a 37°C bajo una atmósfera de carbógeno con 0.2 mM [U-¹⁴C]glucosa, tanto en la ausencia como en la presencia de insulina. La lipogénesis se terminó por la adición de líquido de centelleo a base de tolueno (1.0 ml por vial) y se contó la radiactividad en los lípidos que se extrajeron. En un experimento típico, la lipogénesis estimulada por insulina fue 4-5 veces mayor que la basal (basal: 2000 cpm por 3x10⁵ células/h; V_{insulina} 8,000-10,000 cpm por 3x10⁵ células/h). En este ensayo, la insulina estimula la lipogénesis con un valor de ED₅₀ = 0.15±0.03 ng/ml. Un análogo de insulina que presenta un valor de ED₅₀ =15 ng/ml se considera que tiene ~1 % de la potencia biológica de la hormona nativa.

(iv) La potencia reductora de glucosa de la insulina y sus derivados se determinó en ratones después de la administración bajo las condiciones que se especificaron en cada experimento. Las muestras de sangre se tomaron de la vena de la cola en diferentes puntos temporales después de la administración, y los niveles de glucosa en sangre se determinaron con un analizador de glucosa (Beckman Instrumen, Fullerton, CA, Estados Unidos)

mediante el método de la glucosa oxidasa. El nivel de glucosa en los ratones-CD1 sanos normales fue de 140 ± 7 mg/dl (7.77 mM). Cada grupo consistió de 4-5 ratones. Los datos se presentan como medias \pm SEM.

28 (i). Modificación progresiva de porciones de aminoácidos de la insulina con PEG₅₀₀₀-Fmoc-OSu.

La insulina humana se modificó con concentraciones crecientes del Precursor 1 y se determinó la pérdida de la potencia biológica como una función del PEG₅₀₀₀-Fmoc que se incorpora a la insulina.

La insulina (17.24 nmoles en 0.2 ml 0.01 M NaHCO₃) reaccionó con concentraciones crecientes del PEG₅₀₀₀-Fmoc-OSu a un exceso molar sobre la proteína como se indica en la Fig. 4A durante 2 horas a 25°C. El grado de derivatización se cuantificó mediante la determinación del número de grupos amino libres que quedaron sin modificar y estaban disponibles para la reacción con TNBS. Teóricamente, la insulina puede incorporar 3 moles de PEG₅₀₀₀-Fmoc en las cadenas laterales amino de la Lys B29, la PheB1 y la GlyA1. Como se muestra en la Fig. 4A, al reaccionar la insulina con 0.6, 1.3, 1.9, 2.5 y 5.0 de exceso molar de PEG₅₀₀₀-Fmoc-OSu, se incorporaron 0.3 ± 0.03 , 0.59 ± 0.05 , 1.1 ± 0.1 , 1.5 ± 0.2 y 2.2 ± 0.2 moles de PEG_{5,000}-Fmoc a la insulina, respectivamente, lo que indica que dos (de las tres) cadenas laterales amino de la insulina son de fácil acceso para la derivación.

Las alícuotas que contenían 0.4, 0.7, 1.1, 1.5 y 2.2 moles de PEG₅₀₀₀-Fmoc covalentemente unidos por mol de insulina, se analizaron para determinar sus potencias biológicas en un ensayo lipogénico en adipocitos de rata. En las condiciones de ensayo, la insulina humana estimula la lipogénesis, 4-6 veces por encima de los niveles basales con un valor de ED₅₀ de 0.2 ± 0.02 ng/ml. Un derivado de insulina que presenta una ED₅₀ de 2.0 ± 0.2 ng/ml en este ensayo se considera que tiene un 10% de la potencia lipogénica de la insulina nativa. Los resultados en la Fig. 4B muestran que las respectivas potencias biológicas fueron 87 ± 4 , 60 ± 3 , 8 ± 1 , 4 ± 0.3 y de menos del 1% cuando se incorporan 0.3, 0.6, 1.1, 1.5 y 2.2 mol PEG₅₀₀₀-Fmoc/mol insulina.

28(ii). Los conjugados PEG₅₀₀₀-Fmoc-insulinas experimentan la reactivación dependiente del tiempo

Los conjugados de insulina que contienen uno y dos moles de PEG₅₀₀₀-Fmoc/mol de insulina se incubaron durante diferentes tiempos a una concentración de $0.172 \mu\text{M}$ en 0.1 M NaHCO₃ -0.5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 1 mM NaN₃ (pH 8.5) a 37°C. Los resultados se muestran en la Fig. 5. A los puntos temporales que se indican se analizaron las alícuotas (en varias concentraciones para cada alícuota) para determinar sus potencias lipogénicas en adipocitos de rata. Con el (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₂-insulina, no pudo observarse ninguna reactivación en las primeras 10 horas de incubación. La actividad lipogénica aumentó después, hasta alcanzar el 45 ± 3 y el 90% de la potencia de la insulina nativa a las 30 ± 2 y las 80 ± 4 horas, respectivamente.

Con el (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina, no se observó tal período de latencia. La actividad se regenera lentamente pero continuamente produciendo un 16, 24, 30, 36 y 95% de la potencia nativa después de 2, 4, 10, 17 y 80 horas de incubación, respectivamente. La insulina que contiene aproximadamente un mol de PEG₅₀₀₀-Fmoc/mol de insulina (PEG₅₀₀₀-Fmoc₁-insulina) por lo tanto se seleccionó para estudios adicionales. Los análisis de espectros de masas y de HPLC analítica revelaron que esta preparación contiene predominantemente derivados monomodificados de insulina (MW=11.096 kDa), siendo el resto insulina no modificada (aproximadamente 5%, PM = 5,813 kDa) y pequeñas cantidades de derivados modificados bis (MW = 16,587 kDa) y tris (MW = 22,661 kDa).

Como se muestra en la Fig. 4B, el (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina tiene $7 \pm 1\%$ de la potencia biológica de la hormona nativa antes de experimentar la hidrólisis PEG-Fmoc. En base a estos hallazgos *in vitro*, el (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina se administró *in vivo* a concentraciones diez veces más altas que la hormona nativa, a fin de obtener el mismo efecto reductor de la glucosa (ver más abajo).

28(iii). El (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina facilita la prolongada acción reductora de la glucosa *in vivo*

La insulina nativa (libre de Zn²⁺, 1.72 nmol/ratón) o el (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina (17.2 nmoles/ratón) se administraron por vía subcutánea a los grupos de ratones (n=5 en cada grupo), y se determinaron los perfiles de disminución de la glucosa. Los resultados se muestran en la Fig. 6. La insulina nativa reduce el nivel de glucosa en la sangre al máximo a los 30 min. Los niveles de glucosa circulante volvieron después a valores normales con un $t_{1/2} = 1.8 \pm 0.2$ horas. Después de la administración subcutánea de (PEG-Fmoc)₁-insulina, los niveles de glucosa circulante se redujeron al máximo a las 4 horas, y después se mantuvieron al bajo nivel de glucosa durante 4 horas, antes de retornar a los valores normales con un $t_{1/2} = 12 \pm 1$ horas (Fig. 6).

28(iv) El (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina manifiesta una prolongada acción reductora de la glucosa después de la administración intraperitoneal

La acción prolongada del (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina que se administra por vía subcutánea se puede atribuir, en teoría, a una velocidad de absorción más lenta desde el compartimento subcutáneo a la circulación, así como también a la corta fracción de material que se administra expuesto a la degradación mediada por el receptor y la hidrólisis de los inactivos hasta la especies activas. Con el fin de diferenciar entre estos factores, el compartimento subcutáneo se dejó de lado por la administración de la insulina nativa (Zn²⁺-libre, 0.345 nmoles/ratón, en 0.2 ml de tampón PBS) o del (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina (3.45 nmoles/ratón, en 0.2 ml de tampón PBS) por vía intraperitoneal. Después se controlaron las capacidades reductoras de glucosa. Los niveles de glucosa sanguínea se determinaron en diferentes puntos temporales.

Los resultados se muestran en la **Fig. 7**. Después de la administración de la insulina, los niveles de glucosa circulante cayeron al máximo a los 15 min y volvieron a niveles normales a un valor de $t_{1/2}$ de 1.0 ± 0.1 horas. En el caso del (PEG₅₀₀₀-Fmoc)₁-insulina que se administró por vía intraperitoneal, el nivel de glucosa circulante disminuyó de manera más gradual, hasta alcanzar una caída máxima a 1.0 hora. Los niveles se elevaron después gradualmente, mostrando un valor de $t_{1/2}$ de 3.4 ± 0.1 horas, y regresando a los valores normales sólo 6 horas después de la administración (Fig. 7).

Ejemplo 29: Actividad biológica de los conjugados PEG-FMS-exendina

La exendina-4 es un agonista insulínico del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) que se asocia con ellas células β -pancreáticas, eleva los niveles de cAMP endógenos, aumenta la secreción de insulina, y reduce los niveles de glucosa circulante (Eng y otros, 1992; Goke y otros, 1993; Schepp y otros, 1994; Fehmann y otros, 1994). Una profunda ventaja farmacológica de este agonista de GLP-1 es que, tras la administración a cualquier dosis, el nivel de glucosa sanguínea circulante (BGL) nunca cae debajo de un nivel umbral de glucosa que, en ratones CD1 sanos no diabéticos, es de 74 ± 7 mg/dl (Shechter y otros, 2003).

De acuerdo con la presente invención, se preparó el conjugado de PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 (Ejemplo 19). La exendina-4 contiene una función amino His N α y dos grupos amino Lys N ϵ , lo que permite la modificación en estas tres posiciones. Claramente, la secuenciación de los aminoácidos N-terminales reveló que, aunque el producto PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 eluyó como un único pico en HPLC, en realidad era una mezcla que contiene principalmente la hormona modificada-N α . Sin embargo, en vista de la reversibilidad de la reacción de pegilación de acuerdo con la presente invención, la regeneración de las hormonas proteicas y de los péptidos nativos en un entorno fisiológico, este punto sólo merece una consideración menor.

35 Materiales y Métodos

(i) Materiales. La exendina-4 y un péptido sintético irrelevante de 27 aminoácidos que no contiene lisina (sec. con núm. de ident.: 14) se sintetizaron por el método en fase sólida que utiliza un sintetizador múltiple de péptido, AMS 422 (Abimed Analizador Technik GmbH, Langenfeld, Alemania). Una estrategia de Fmoc se empleó a lo largo del ensamblaje de la cadena peptídica. El 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), el glutatión reducido (GSH) y el ácido sulfónico trinitrobenzénico (TNBS) se adquirieron de Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA). Todos los demás materiales que se utilizaron en este estudio fueron de grado analítico.

El PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 y el PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4 se prepararon como se describe en los Ejemplos 18 y 19, respectivamente.

Para la preparación del PEG₄₀₀₀₀-exendina-4, se disolvió exendina-4 (0.3 mg, 75 nmol) en PBS (pH = 7.5) y se hizo reaccionar con PEG₄₀₀₀₀-OSu (20 mg, 470 nmol) durante 3 h, se filtró ($\times 7$) a través de un Centricon (valor de corte =50 kDa) y se caracterizó por espectrometría de masas MALDI-TOF (se encontró a 48074 Da).

PEG₄₀₀₀₀-FMS-Péptido 27 se preparó como se describe para el PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4.

Un dispositivo de ultrafiltración Centricon-50 para las soluciones acuosas se adquirió de Millipore S.A. (Francia).

Los espectros ultravioleta se obtuvieron por un espectrofotómetro Beckman DU 7500 en cubetas UV de 1 cm de trayecto óptico. Los espectros de masas se determinaron mediante la utilización de técnicas MALDI-TOF y ESMS (modelo Bruker Reflex--Reflectron, Alemania, y espectrómetro de masas de cuadrupolo sencillo electrospray VG-plataforma-II, Micro Mass, Reino Unido, respectivamente).

(ii) Los análisis de HPLC se realizaron utilizando un sistema de cromatografía en líquido Spectra-Physics SP8800 equipado con un detector de absorbancia de longitud de onda variable Applied Biosystems 757, y un sistema de cromatografía en líquido Spectra SYSTEM-P2000 equipado con un muestreador automático Spectra-SYSTEM AS 100 y un Spectra-SYSTEM UV1000, todos bajo el control de un sistema de datos de cromatografía ThermoQuest (ThermoQuest Inc., San José, CA, Estados Unidos). Los efluentes de la columna se monitorearon mediante

absorbancia UV a 220 nm. Una RP-HPLC analítica se realizó mediante la utilización de una Chromlith™ Performance RP-18e (4.6 x 100 mm, Merck, Darmstadt, Alemania) pre-ensvasada. La columna se eluyó con un gradiente binario de 10-100% de disolución B en 10 min con una velocidad de flujo de 3 ml/min (la disolución A fue 0.1% de TFA en H₂O y la disolución B fue 0.1% de TFA en acetonitrilo:H₂O; 3:1, v:v). Los compuestos pegilados se analizaron mediante la utilización de una columna de RP-4 (250x4 mm, 5 µm de tamaño de grano, VYDAC, Hesperia, CA, Estados Unidos) con un gradiente binario de 10-100% de disolución B en 50 min a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

(iii) **Las separaciones preparativas** se realizaron con columnas preensvasadas VYDAC RP-18 o RP-4 (250x22 mm; Hesperia, CA). La columna se eluyó con una disolución de 10-100% de B durante 60 min (12 ml/min).

(iv) **Ensayo de disminución de la glucosa.** Tres grupos de ratones CD1 (n=6 por grupo) se administraron por vía subcutánea con disolución salina, exendina-4 nativa (4 µg/ratón) o PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 (4 µg péptido/ratón). Los niveles de glucosa circulante se midieron con un analizador de glucosa (Beckman Instrument, Fullerton, CA, Estados Unidos) mediante el método de glucosa oxidasa. Las muestras de sangre para los análisis de glucosa sanguínea se tomaron de las venas de la cola. El nivel de glucosa en los ratones CD1 sanos normales fue de 140±7 mg/dl (7.77 mM).

29(i) El PEG-FMS-exendina-4 libera exendina-4 después de la incubación.

Una disolución de PEG₄₀-FMS-exendina-4 (0.25 mM, 1ml/ml en términos de exendina-4 en 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5) se incubó a 37°C. A diferentes puntos temporales, se retiraron alícuotas (50 µl) y se analizaron para determinar la liberación de exendina-4 a partir del conjugado, mediante la utilización de HPLC en una columna RP-4. Como se muestra en la Fig. 8, la exendina-4 se liberó del conjugado [PEG₄₀-FMS]₂-exendina-4 en una manera lenta, homogénea, con un t_{1/2} de 16±2 h. La exendina-4 se liberó completamente del conjugado después de 48 h de incubación.

29(ii) Las velocidades de hidrólisis y los órdenes de reacción del PEG₄₀-FMS-exendina-4, del PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4 y del PEG₅₀₀₀-FMS-4-nitro-feniletilamina

Se evaluaron las velocidades de hidrólisis y los órdenes de reacción de los conjugados PEG-FMS PEG₅₀₀₀-FMS-4-nitro-feniletilamina, PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4 y PEG₄₀-FMS-exendina-4, y un conjugado MAL-FMS, N-(MAL-FMS)-Péptido 27, se evaluaron a pH = 8.5, 37°C. Las estructuras y la vida media de los conjugados se presentan en la Tabla 3. El PEG₅₀₀₀-FMS-4-nitro-feniletilamina se preparó como se describe en el Ejemplo 20. El conjugado MAL-FMS-Péptido 27 se preparó por la reacción del MAL-FMS-NHS con el péptido no relevante 27 (SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 14).

La Fig. 9 muestra la hidrólisis del PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4 (círculos) y del PEG₅₀₀₀-FMS-4-nitro-feniletilamina (cuadrados) después de la incubación en PBS a pH 8.5, 37°C. Los resultados en las Figs. 8 y 9 se expresan como porcentaje del área máxima del pico de liberación de exendina-4 y de 4-nitrofeniletilamina, como una función del tiempo.

La velocidad de hidrólisis a pH 8.5 es equivalente a la velocidad de hidrólisis en el suero. La liberación de la 4-nitro-feniletilamina y de la exendina-4 se monitoreó mediante RP-HPLC y se determinó como una reacción de primer orden (Tabla 3 y Figs. 8, 9). Como se muestra (Figs. 8-9, Tabla 3), los péptidos y las proteínas se liberaron de los conjugados en una manera lenta homogénea, con un t_{1/2} de 9.4 (PEG₅₀₀₀-FMS-4-nitro-feniletilamina), 13.8 (PEG₅₀₀₀-FMS-exendina-4), y 11.9 (PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4). La exendina-4 se liberó completamente del conjugado PEG₄₀ después de 48 h de incubación.

El conjugado MAL-FMS-Péptido 27 es TNBS negativo debido a que la única porción α amino del péptido 27 se derivatizó. Una disolución del MAL-FMS-péptido 27 (0.5 mM en 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5) se incubó a 37°C. Las alícuotas (0.2 ml) se retiraron en diferentes puntos temporales y se analizaron para la aparición de los grupos libres α-amino mediante la utilización de TNBS. La porción FMS-MAL (maleimida N-etil) se hidrolizó de una manera lenta y casi homogénea de la porción α-amino del péptido, con un valor de t_{1/2} de 8.4 h. La hidrólisis se completó después de 32 horas de incubación.

29(iii) El PEG₄₀-FMS-exendina-4 facilita la acción prolongada de disminución de la glucosa en los ratones.

Las Figs. 10A-10B muestran el perfil de disminución de la glucosa de exendina-4 nativa que se administró por vía subcutánea y del PEG₄₀-FMS-exendina-4, ambos a una dosis de 10 µg (Fig. 10A) o 4 µg (Fig. 10B) péptido/ratón con relación a un grupo de ratones que se trata con la disolución salina.

La Fig. 10A muestra el perfil de disminución de la glucosa de la exendina-4 nativa que se administró por la vía subcutánea y del PEG₄₀-FMS-exendina-4, ambos a una dosis de 10 µg/ratón. Con el péptido nativo, los niveles de glucosa sanguínea se redujeron de 139±10 a 96±7 en 0.5 h hasta alcanzar una caída máxima en 2-4 horas después de la administración (74

mg/dl). Después se procedió al retorno al nivel inicial de la glucosa con un valor de $t_{1/2}$ de 14.2 ± 1 h. Tras la administración subcutánea del PEG₄₀-FMS-exendina-4, se observó poca disminución del nivel de glucosa sanguínea en 0.5 h después de la administración. El nivel de glucosa circulante después cae poco a poco, y alcanza la concentración de glucosa más baja a las 6-8 horas después de la administración (80-90 mg/dl). Las concentraciones de glucosa circulante bajas, estables, se mantienen después durante casi 50 horas, antes de retornar a los niveles iniciales de glucosa con un valor de $t_{1/2}$ de 70 ± 3 hrs.

La Fig. 10B muestra el perfil de disminución de la glucosa de la exendina-4 nativa que se administra por vía subcutánea y del PEG₄₀-FMS-exendina-4, ambos a una dosis de 4 µg/ratón. Con el péptido nativo, los niveles de glucosa sanguínea se redujeron en un 26-28% (de 140 mg/dl a de 104-101 mg/dl), con el mayor porcentaje de cambio en los niveles de glucosa sanguínea que ocurren a las 0.5-1 horas después de la administración. Las concentraciones de glucosa retornaron después a sus niveles iniciales con un valor de $t_{1/2}$ de 3.7 ± 0.3 h. Tras la administración subcutánea del PEG₄₀-FMS-exendina-4, la disminución en el nivel de la glucosa sanguínea tuvo lugar a una velocidad más moderada. La glucosa circulante alcanzó su concentración más baja 8-12 horas después de la administración (92 mg/dl, 33%). Las concentraciones bajas de glucosa circulante, estables, se mantuvieron después durante otras 12 horas. El retorno a los niveles iniciales de glucosa tuvo lugar con un $t_{1/2}$ de 30 ± 2 h, siendo 7.5 veces más largo que el que se obtiene por la misma dosis de la hormona nativa.

Los cálculos que se basaron en las velocidades de hidrólisis de la FMS-exendina-4 (como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/408,262) y del PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 a 37°C en el suero normal y en PBS (pH 8.5), respectivamente, revelaron que el ~ 4% de la exendina-4 se libera del conjugado a cada hora *in vivo* (Shechter y otros, 2001). Se hipotetizó además que esta velocidad de liberación, si se combina con un mantenimiento prolongado del conjugado en el sistema circulatorio, antes de la hidrólisis de la exendina-4, debe producir una señal de larga duración de disminución de la glucosa en los ratones, como de hecho se encuentra después de una sola administración subcutánea del conjugado PEG₄₀₀₀₀-FMS-exendina-4 (**Fig. 10B**). El PEG₄₀₀₀₀-exendina-4 conjugado irreversiblemente tiene sólo $\leq 1\%$ de la actividad de la exendina-4 nativa ($IC_{50} = 250 \pm 30$ pmol/ratón contra la $IC_{50} = 2.5 \pm 0.24$ pmol/ratón para la exendina-4 nativa, no se muestra).

Ejemplo 30. Actividad biológica del PEG₄₀-FMS-IFN α 2

Los interferones de tipo I (IFNs) son proteínas que inician respuestas antivirales y antiproliferativas. Los interferones son clínicamente importantes, y varios subtipos de IFN α 2 se aprobaron como fármacos para el tratamiento de las hepatitis B y C, así como también para los cánceres tales como la leucemia mielógena crónica y la leucemia de células pilosas. Los interferones regulan las señales a través de la tirosina quinasa Janus (proteínas Jak/STAT), y mediante la reducción de la fosforilación y la activación de MEK1 y ERK1/2 a través de las vías independientes *Ras/Raf* (Romerio y otros, 2000). Los interferones humanos de tipo I inducen efectos celulares diferenciales, pero actúan a través de un complejo común de receptor de superficie celular compuesto por las dos subunidades, Ifnar1 e Ifnar2. La subunidad Ifnar2 humana une a todos los IFN de tipo I, pero con una menor afinidad y especificidad que el complejo Ifnar. La subunidad Ifnar1 humana tiene una afinidad de unión intrínseca baja hacia los IFNs humanos, pero modula la especificidad y la afinidad de otros ligandos del complejo Ifnar (Cutrone y Langer, 2001).

El IFN α 2 se puede administrar por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa, lo que resulta en diferentes perfiles farmacocinéticos. En cualquier modo, la citocina que se administra se inactiva rápidamente por los tejidos y fluidos del cuerpo (O'Kelly y otros, 1985), y se aclara del plasma de la sangre varias horas después de la administración (Rostaing y otros, 1998). Las principales rutas de la eliminación del IFN α 2 del sistema circulatorio son a través de la proteólisis, la endocitosis mediada por receptor y la filtración por el riñón (Goodman y Gilman, 2001).

El prolongar la dosis de mantenimiento de IFN α 2 en circulación es una tarea clínica deseable. Un conjugado PEG-IFN α 2 de 12 kDa, irreversible, se aprobó terapéuticamente en el 2001. Se administra una vez a la semana a los pacientes con hepatitis C, y facilita una velocidad de respuesta anti-viral sostenida del 24%, en comparación con una velocidad de respuesta del 12% que se obtiene por la citocina nativa (Schering-Plough Corporation, 2001 comunicado de prensa; Baker, 2003). Sin embargo, mientras que la unión covalente de las cadenas de PEG a las proteínas prolonga su vida *in vivo*, a menudo resulta en una dramática reducción o aun en la pérdida de las actividades biológicas y farmacológicas (Fuertges y Abuchowski, 1990; Katre, 1993; Bailon y Berthold, 1998; Nucci y otros, 1991; Delgado y otros, 1992; Fung y otros, 1997; Reddy, 2000; Veronese, 2001). La formulación pegilada de IFN α 2 en uso actualmente tiene un 7% de la actividad de la citocina nativa, lo que llama a que se administren a dosis más altas (Bailon y otros, 2001). Además, el PEG-IFN no penetra fácilmente en todos los tejidos: mientras que el PEG-IFN α 2b de 12 kDa se distribuye ampliamente, el PEG-IFN α 2a de 40 kDa se restringe a la sangre y el líquido intersticial (Glue y otros, 2000; Reddy y otros, 2002). Este inconveniente principal

puede superarse mediante el diseño de un conjugado PEG-IFN α 2 capaz de generar IFN α 2 nativo a una velocidad lenta en condiciones fisiológicas.

Estos problemas de la técnica anterior pueden superarse por los conjugados mono-y bis-PEG₄₀-FMS-IFN- α 2 de la invención, en los que el IFN- α 2 se une a la porción de PEG a través de la porción de FMS que proporciona el enlace lentamente hidrolizable. Estos novedosos conjugados pegilados reversibles y su actividad anti-viral prolongada *in vivo* se discuten aquí en detalle.

Materiales y Métodos

(i) Materiales. El IFN- α 2 humano no-glicosilado se preparó como se describe en WO 02/36067 como se describe anteriormente por Piehler y Schreiber (1999). La preparación del PEG₄₀-FMS-IFN α 2 y del (PEG₄₀-FMS)₂-IFN α 2 se describe en los Ejemplos 21 y 22, respectivamente.

(ii) Las afinidades de unión al receptor se evaluaron por mediciones en BIAcore (Detección de SPR). El sistema BIAcore[®] 3000, el chip del sensor CM5, el HBS (Hepes 10 mM, EDTA 3.4 mM, NaCl 150 mM, 0,05% de tensioactivo P20, pH 7.4) y el estuche de acoplamiento de aminas eran de BIAcore (Suecia). La inmovilización del chip por Ifnar2 y las mediciones de BIAcore se llevaron a cabo de acuerdo con Piehler y Schreiber (2001). En resumen, el Ifnar2-CE se inmovilizó a la superficie mediante la utilización del mAb 46.10 no neutralizante anti-Ifnar2-CE (Ifnar2-extra celular), seguido por la reticulación con un segundo mAb (117,7) (que amablemente proporcionó D. Novick, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Las curvas de unión se evaluaron con el software BIAevaluation (Biacore AB, Suecia) mediante la utilización de un modelo cinético sencillo uno-a-uno. Un aumento de RU (Unidad de resonancia) después de la unión específica al receptor se corresponde a la cantidad de proteína que se une a la superficie del sensor. Para estimar el aumento en RU resultante del efecto no específico de la proteína en el índice de refracción mayor, la unión de la proteína a una superficie control sin ligando inmovilizado también se midió y se restó. Para la determinación de la concentración activa de interferón la respuesta de equilibrio se representó contra la concentración inicial que se estimó. Los datos se ajustaron mediante la utilización del KaleidaGraph (versión 3.0 0.4, Abelbeck Software) mediante la utilización de la ecuación:

$$y = \frac{1 \cdot 10^8 \cdot m1 \cdot m2}{1 \cdot 10^8 \cdot m1 \cdot m0 + 1}$$

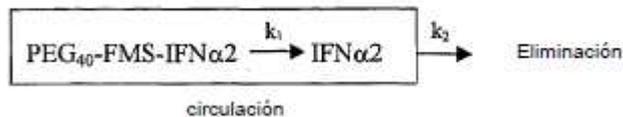
de manera que un K_A de 1×10^8 se determinó de forma independiente para la unión del IFN α 2 y se fijó para todas las muestras, $m1$ = es $Ru/Rmax$ (el porcentaje de interferón activo que se mide en la muestra), $m2$ es $Rmax$, y $m0$ es la Ru observada.

(iii) Los experimentos in vivo se realizaron con ratas Wistar macho (150-170 g). Las ratas se inyectaron por vía subcutánea o por vía intravenosa (0.2 ml/rata).

(iv) La actividad antiviral del IFN α 2 y de sus derivados se determinó por la capacidad de la citocina para proteger las células amnióticas humanas WISH contra los efectos citopáticos que induce el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) (Rubinstein y otros, 1981).

(v) Las simulaciones de los datos experimentales se realizaron mediante la utilización de Pro-Kineticist II, un 2^{do} programa de Order Global Kinetic Analysis (Applied Photophysics Ltd., Inglaterra).

Para la administración *i.v.*, se consideró el siguiente modelo:



De manera que, $k_1=0.01 \text{ hr}^{-1}$ y $k_2=0.65 \text{ hr}^{-1}$ (determinado experimentalmente por ensayo antiviral).

Para la administración s. c., se consideró el siguiente modelo:



De manera que, $k_1=0.02 \text{ hr}^{-1}$, $k_2=0.01 \text{ hr}^{-1}$, y $k_3=0.65 \text{ hr}^{-1}$.

La k_1 , que no pudo determinarse directamente, se estimó en 0.02 hr^{-1} a partir del ajuste de la simulación a los datos experimentales.

30(i) El PEG₄₀-FMS-IFN α 2 modificó su capacidad de unión al receptor

La capacidad de unión del IFN α 2 modificado de la invención hacia la parte extracelular recombinante inmovilizada del receptor IFN α 2 (ifnar2-CE) se controló bajo condiciones de flujo pasante mediante una sonda óptica lo que se llama espectroscopia de interferencia reflectométrica (RIFS). Este método detecta interacciones biomoleculares de ligandos a las proteínas que se unen a un transductor como un cambio en el espectro de interferencia que se causa por el cambio del espesor óptico aparente del chip transductor. Un cambio de 1 pm se corresponde a aproximadamente 1 pg/mm² de proteína en la superficie. La superficie del transductor se modificó con una capa de dextrano y se carboxiló mediante la reacción con glutárico anhídrido fundido (Sigma) a 75° durante 2-8 h. En tales superficies, la preconcentración electrostática y la inmovilización covalente de las proteínas se llevaron a cabo por los protocolos estándares BIAcore. Después de este procedimiento, el ifnar2-CE se inmovilizó en una capa de dextrana carboxilada. Todas las mediciones se llevaron a cabo en HEPES 50 mM (pH 7.4) que contenía NaCl 150 mM y 0.01% de Triton X-100. Se inyectó una muestra de 0.8 ml durante 80 s con una velocidad de adquisición de datos de 1 Hz. Se aplicaron velocidades de flujo de 50 μ l/s. Bajo estas condiciones, se intercambiaron las muestras en la celda de flujo en un segundo, lo que permite el análisis de los procesos en 5 segundos.

Los resultados se resumen en la Tabla 4. Los conjugados monomodificados y bis-modificados conjugados del PEG₄₀-FMS-IFN α 2 tenían 9 \pm 1 y 0.4 \pm 0.05% de la capacidad de unión al receptor del IFN α 2, respectivamente. Estos derivados conjugados, sin embargo, experimentaron una reactivación dependiente del tiempo tras la incubación a 37°C en tampón fosfato pH 8.5 o en suero humano normal (no se muestra). La reactivación procedió con un valor de $t_{1/2}$ de 9 \pm 1 y 24 \pm 3 horas para los derivados mono y bis-pegilados, hasta alcanzar respectivamente la reactivación casi completa tras 50 horas de incubación (Tabla 4).

30(ii) El PEG₄₀-FMS-IFN α 2 libera IFN α 2 nativo-activo tras la incubación, a una constante de velocidad de 0.01hr⁻¹.

En la serie de experimentos se resumen en las Figs. 11A-C, el PEG₄₀-FMS-IFN α 2 se incubó en tampón fosfato 0.1 M en presencia o ausencia de 0.6% de BSA y de 2 mM de azida sódica (NaN₃) (pH 8.5, 37 °C). A este valor de pH, la velocidad de hidrólisis del FMS a partir de los conjugados FMS-proteínas es casi idéntica a la que se obtiene en el suero humano normal, *in vitro*, o en el sistema circulatorio *in vivo* (Gershonov y otros, 2000; Shechter y otros, 2001 y 2002). Se extrajeron alícuotas a diferentes tiempos y se analizaron para determinar la liberación de IFN α 2 del conjugado mediante SDS-PAGE (Fig. 11A) y BIAcore, midiendo la concentración activa de Ifnar2 de acuerdo con la ley de acción de masas (Fig. 11B). La curva de unión del interferón en la superficie del Ifnar2 se asemeja a la de una población homogénea de interferón nativo, lo que sugiere que el PEG₄₀-FMS-IFN α 2 no une el Ifnar2. Para el análisis de SDS-PAGE, las cantidades de IFN α 2 que se descargaron se cuantificaron con relación a una referencia de IFN α 2 de concentración e intensidad conocidas. En ambos casos, los perfiles de descarga están en buen acuerdo. El 10% de interferón activo que se observa en el tiempo cero en el perfil del BIAcore se debe al interferón nativo presente en la muestra. La velocidad de descarga se determinó mediante el ajuste de la cantidad de interferón activo a una única ecuación exponencial (Fig. 11C). En consecuencia, el IFN α 2 se libera a partir del conjugado con una constante de velocidad de 0.01hr⁻¹ (Fig. 11). Después de 66 horas de incubación, el 50% del IFN α 2 en el conjugado se descarga y está completamente activo. A partir de la extrapolación de la curva de ajuste que se obtiene, se asume que casi todo el interferón se liberará eventualmente y recuperará la actividad completa. No se colectaron datos del BIAcore en los puntos temporales muy tardíos debido a que mantener las proteínas durante semanas a 37°C no es recomendable.

30(iii) La administración subcutánea del PEG₄₀-FMS-IFN α 2 aumenta dramáticamente su vida media *in vivo*.

A continuación, se determinó la vida media y la actividad del PEG₄₀-FMS-IFN α 2 en ratas. El IFN α 2 humano no es activo en ratas, aunque su concentración se puede determinar a partir de la potencia antiviral en suero de rata mediante la medición de los efectos citopáticos inducidos por el VSV en células WISH (ver métodos anteriores, el ensayo de actividad antiviral). El IFN α 2 nativo o el PEG₄₀-FMS-IFN α 2 se administraron por vía subcutánea a las ratas. Se extrajeron alícuotas de sangre en varios puntos temporales, y se analizó para determinar su potencia antiviral. Después de la administración del IFN α 2 nativo sin modificar (100 μ g/rata), la actividad antiviral declinó con un valor de $t_{1/2}$ de ~ 1 hr hasta alcanzar un nivel inferior a 20 pM IFN α 2, 12 h después de la administración (Fig. 12).

El comportamiento circulatorio del PEG₄₀-FMS-IFN α 2 después de la administración subcutánea a las ratas (a dosis de 12 μ g/rata, 60 μ g/rata, o 120 μ g/rata) muestra un comportamiento dependiente de la dosis claramente visible (Fig. 12). La administración de 12 μ g/rata del IFN α 2 conjugado produjo niveles de mantenimiento de 70 ± 10 pM IFN α 2 que se mantuvieron 56 horas después de la administración. Cuando se administró un aumento de 10 veces en el PEG₄₀-FMS-IFN α 2, el IFN α 2 estuvo continuamente presente en el suero 56 horas a una concentración molar de 450 pM. La administración de 60 μ g/rata del conjugado resultó en niveles de interferón de 225 pM a las 56 horas, y de 25 pM a las 200 horas. El IFN α 2 nativo presente en la muestra que se administró (aproximadamente el 10% según se determinó por el BIAcore) contribuyó a los inicialmente altos niveles de IFN α 2 que se observaron en el suero de las ratas. Estos valores muestran una curva de clarificación similar a la del IFN α 2 nativo. El 90% restante del IFN α 2 se descargó lentamente a partir del conjugado.

30(iv) Administración intravenosa del PEG₄₀-FMS-IFN α 2 a las ratas.

Para eliminar la contribución del intercambio subcutáneo, tanto el conjugado como la citocina nativa se administraron a las ratas (30 μ g/rata) por vía intravenosa. Para el interferón nativo, se midió la misma vida media, lo que indica que penetra fácilmente en el sistema circulatorio tras la administración subcutánea (Fig. 13). Para el PEG₄₀-FMS-IFN α 2, la actividad antiviral se detectó todavía 150 horas después de la administración intravenosa, lo que demuestra los efectos prolongados de la citocina pegilada. El nivel de IFN α 2 que se descargó de 10 pM todavía permanecía 150 horas después de la administración, mientras que el IFN α 2 nativo se eliminó en 30 horas después de la administración. Hay que señalar que el gran hombro que se observa tras la administración subcutánea del conjugado (Fig. 12) no se observa cuando el PEG₄₀-FMS-IFN α 2 se administró por vía intravenosa (Fig. 13).

30(v) Simulaciones de los datos experimentales.

Mediante la utilización de las constantes de velocidad que se obtuvieron a partir de los datos del BIAcore ($k = 0.01 \text{ hr}^{-1}$ para la descarga del IFN α 2 a partir del conjugado PEG) y el ensayo de la actividad antiviral del IFN α 2 nativo ($k = 0.65 \text{ hr}^{-1}$ para la eliminación del interferón), tanto la administración subcutánea como la intravenosa del PEG₄₀-FMS-IFN α 2 a las ratas se estimuló (Figs 14A y 14B, respectivamente). En ambos casos, los datos que se simularon y los resultados experimentales se encontraban en buen acuerdo. Como se hizo evidente a partir de los datos que se simularon, el paso del conjugado, pero no del interferón nativo, a partir del volumen subcutáneo al torrente sanguíneo, procede a una velocidad lenta y está en el orden de la descarga de interferón a partir del conjugado. Esto explica el hombro que se observa entre las 10-70 horas en la concentración de proteína activa. Como era de esperar, este hombro no se encuentra cuando el PEG₄₀-FMS-IFN α 2 se administra por la vía intravenosa.

Discusión

Como se mencionó antes, la tecnología pegilante que se aplicó a las proteínas terapéuticas frecuentemente conduce a una pérdida drástica en las potencias biológica y farmacológica de los conjugados. En principio, esta deficiencia se puede superar mediante la introducción de las cadenas de PEG a través de un enlace químico que sea sensible a la hidrólisis o que se pueda escindir enzimáticamente por las proteasas o las esterasas del suero. Una condición previa para una eficiente pegilación es que la hidrólisis de las cadenas de PEG del conjugado se lleve a cabo a una velocidad lenta, y de un modo homogéneo *in vivo*.

Dos conjugados PEG-IFN α 2 básicos irreversibles están en uso terapéutico en la actualidad. El primero, un PEG-IFN α 2 de 12 kDa, que permea de manera satisfactoria en los tejidos. Esta preparación, sin embargo, es relativamente de vida corta *in vivo*, debido a que su baja masa molecular (masa calculada = 32 kDa) es insuficiente para detener marcadamente la filtración renal. La segunda formulación, un PEG-IFN α 2 de 40 kDa, es una especie de vida extremadamente larga *in vivo*. Este conjugado, sin embargo, tiene poca permeabilidad en los tejidos. Después de la administración, el conjugado se

distribuye sólo en el sangre y en los fluidos intestinales (Bailon y otros, 2001). Tenemos, por lo tanto, por anticipado que los dos prerrequisitos para un conjugado óptimo de PEG-IFN α 2, entiéndase, un mantenimiento prolongado *in vivo* en combinación con el acceso libre a los tejidos periféricos, se pueden obtener mediante el enlazamiento de una cadena de PEG₄₀ lentamente hidrolizable al IFN α 2.

5

Se encontró previamente que después del enlazamiento del FMS a las proteínas, el conjugado FMS-proteína experimenta una hidrólisis en condiciones fisiológicas con un patrón farmacocinético deseable (Gershonov y otros, 2000; Shechter y otros, 2001, 2002, 2003). La velocidad de hidrólisis del FMS se dicta exclusivamente por el pH y la nucleofilicidad del suero, los cuales se mantienen en mamíferos bajo una estricta homeostasis (Shechter y otros, 2001). Por lo tanto, basamos nuestro nuevo desarrollo en el principio del FMS. En disoluciones neutras, acuosas, las porciones de FMS experimentan una hidrólisis espontánea, lenta, lo que resulta en la regeneración de las proteínas nativas (Shechter y otros, 2001). Para este propósito, se sintetizó el NHS-FMS-MAL, que nos permite enlazar las cadenas de PEG que contienen sulfhidrilo a los grupos amino de los péptidos y proteínas a través de la función hidrolizable de FMS. La hipótesis de trabajo era que un conjugado PEG-interferón inactivo podría regenerar la proteína nativa a su forma activa de un modo continuo durante un largo período de tiempo. El principal conjugado monomodificado de PEG₄₀-FMS-IFN α 2 que se obtiene (Tabla 2) no tiene la potencia de unión de la citocinas y por lo tanto puede referirse como un 'profármaco'. Tras la incubación, la citocina nativa se libera por hidrólisis, y la potencia de unión del IFN α 2 al Ifnar2 se regenera con una constante de velocidad de 0.01hr⁻¹.

10

15

Una sola administración subcutánea del PEG₄₀-FMS-IFN α 2 prolongó significativamente los niveles de IFN α 2 en el suero de las ratas. Mientras que el IFN α 2 era de vida corta *in vivo*, con una vida media de ~1 hr, el conjugado PEG₄₀-FMS-IFN α 2 ejerce su actividad antiviral durante un periodo de 200 horas. Además, hay una relación dependiente de la dosis entre la cantidad administrada y los niveles de interferón activos durante una duración prolongada *in vivo*. Esta observación es beneficiosa para la optimización de los regímenes de dosificación en el futuro uso clínico.

20

25

Debe señalarse que la molécula de IFN α 2 contiene 13 funciones amino teóricamente disponibles para la unión del PEG₄₀-FMS. El sitio exacto de la pegilación no se determinó. En vista sin embargo, de su reversibilidad y de la generación de la proteína nativa, parece que este punto merece una consideración más bien menor.

30

En resumen, siguiendo el nuevo enfoque conceptual para la pegilación reversible de la invención, de manera que un conjugado farmacológicamente 'silente' está 'atrapado' en el sistema circulatorio y libera la proteína parental con un perfil farmacocinético deseable, tuvimos éxito en combinar el mantenimiento prolongado del IFN α 2 *in vivo* con la liberación de IFN α 2 nativo activo para garantizar el acceso a los tejidos periféricos.

35

Ejemplo 31: Actividad biológica del conjugado PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆

La familia hipotalámica de los receptores del neuropéptido Y (NPY), desempeña una función importante en la regulación de la saciedad y la ingesta de alimentos (Schwartz, 2000). El receptor putativo de Y2 inhibidora presináptica (Y2R) se expresa en el núcleo arqueado, que es accesible a los agonistas locales y periféricos de la familia NPY (Broberger y otros, 1997; Kalra y otros, 1999). Uno de tales agonistas de Y2R es el péptido YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆), que se libera en el tracto gastrointestinal post-prandialmente en proporción al contenido calórico de una comida (Pedersen-Bjergaard y otros, 1996; Adrian y otros, 1985; Grandt y otros, 1994). Recientemente, se demostró que la administración periférica de PYY₃₋₃₆ inhibe la ingesta de alimentos en los seres humanos, los ratones y las ratas y reduce el aumento de peso en las ratas [Pittner y otros, 2002; Batterham y otros, 2002, 2003]. Por lo tanto, la infusión de PYY₃₋₃₆ para alcanzar las concentraciones circulatorias normales post-prandiales de este péptido conducen a un pico en el suero de PYY₃₋₃₆ en los 15 minutos, seguido de un rápido descenso a niveles normales a los 30 min. A pesar de este rápido aclaramiento, la administración de PYY₃₋₃₆ para acelerar a los individuos disminuye su apetito y reduce la ingesta de alimentos en un 33% en un periodo de 12 h después de la administración de PYY₃₋₃₆. Además, no se produce la ingesta de alimentos compensatoria en las próximas 12 h (Batterham y otros, 2002). Por lo tanto, el PYY₃₋₃₆ puede encontrar un uso clínico en el tratamiento de la obesidad y de sus trastornos asociados, incluyendo la diabetes mellitus de tipo II y las enfermedades cardiovasculares (Schwartz y Morton, 2002).

50

La corta vida media circulatoria de PYY₃₋₃₆ y su potencial en el manejo de la obesidad nos llevó a desarrollar una forma de acción más prolongada de PYY₃₋₃₆. De hecho, en nuestras manos la saciedad que se induce por el PYY₃₋₃₆ en ratones duró sólo 2-4 h tras la inyección subcutánea (sc). Como se mencionó antes, la unión covalente del PEG a las proteínas y los péptidos prolonga su vida media *in vivo* pero frecuentemente conduce a una drástica pérdida de su actividad biológica o farmacológica. Encontramos que el PYY₃₋₃₆, pegilado mediante la utilización de la química estándar, es decir, a través de la formación de un enlace estable, claramente pierde su actividad biológica. Después preparamos y comprobamos aquí la actividad biológica del pro-fármaco de la invención PEG₄₀-FMS- PYY₃₋₃₆.

55

Materiales y Métodos

(i) Animales. Se utilizaron ratones machos C57BL/6J (Harlan Labs) de edad de 9 ± 1 semanas (20-30 g de peso corporal). Los ratones se mantuvieron a temperatura (21-23°C) y condiciones de luz controladas (luz de 6:00-18:00) en el animalario del Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel). Los ratones se aclimataron durante al menos una semana antes del inicio del estudio. Los ratones tenían libre acceso al agua potable en todo momento durante los experimentos. Todos los protocolos experimentales estuvieron de acuerdo con las regulaciones israelíes de bienestar de los animales de laboratorio y se aprobaron por el Comité Interno Institucional para el Bienestar de los Animales.

(ii) Reactivos. El péptido YY₃₋₃₆ se sintetizó por el método en fase sólida, mediante la utilización de un sintetizador de péptido múltiple AMS 422 (Abimed Analizador Technik GmbH, Langenfeld, Alemania). El péptido resultante se purificó por HPLC y se caracterizó por espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF y microsecuenciación del N-terminal de las proteínas. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico y se adquirieron de Sigma Chemical Co. (Ness Ziona, Israel).

(iii) Procedimientos analíticos. Los espectros de masas se determinaron mediante la utilización de las técnicas de MALDI-TOF y de Electro Spray (ES-MS) (modelo Bruker-Reflex-Reflectrón, Alemania, y espectrómetro de masas de cuadrupolo sencillo VG-plataforma-II electrospray, Micro Misa, Reino Unido, respectivamente). El PYY₃₋₃₆, el PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ y el PEG₄₀ se resolvieron por una HPLC analítica (columna Lichrosorb RP-4, 4x250 mm, Merck). El tampón A fue 0.1% de ácido trifluoroacético ac. (TFA) y el tampón B fue 0.1% de TFA en 75% aq. Acetonitrilo. Se utilizó un gradiente de 10-100% de tampón B durante 50 min. a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Los tiempos de retención (Rt) del PYY₃₋₃₆, del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ y del PEG₄₀-9-sulfo-fulveno fueron 21.53, 39.03 y 44.387 min., respectivamente. Los análisis de aminoácidos se desarrollaron después de la hidrólisis con HCl 6N a 110°C durante 24 h mediante la utilización de un analizador de aminoácidos HP1090 Dionex Automatic (Palo Alto, CA, Estados Unidos). Los análisis de la secuencia N-terminal se realizaron con un secuenciador de proteínas modelo 491A Procise (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

(iv) Procedimientos de Síntesis:

El PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ se preparó como en el Ejemplo 23.

Éster etílico de PEG₄₀-FMS-Glicina (PEG₄₀-FMS GEE). A una disolución agitada de PEG₄₀-SH (0.25 mM en 0.1M de tampón fosfato pH 7.2-10 mM Na ascorbato), se añadieron 292 µg de MAL-FMS-NHS (dos veces de exceso molar sobre el PEG₄₀-SH). Después de 7 min, se añadieron 0.2 ml de una disolución de 0.5 M de éster etílico de glicina. La reacción se llevó a cabo durante 1 h, y después la mezcla se dializó durante la noche contra agua. El éster etílico de PEG₄₀-FMS-glicina resultante se caracterizó y cuantificó mediante su absorbancia a 280 nm/ $\epsilon_{280} = 21,200$) y por la cantidad de glicina en la preparación después de la hidrólisis ácida de una alícuota de 20 µl y análisis de aminoácidos.

PEG₄₀-PYY₃₋₃₆. Se preparó el PYY₃₋₃₆ irreversiblemente pegilado mediante la reacción del PYY₃₋₃₆ (1 mg/ml en 0.1 M de tampón fosfato pH 7.2) con cuatro equivalentes de PEG₄₀-OSu sólido, (43 mg). La reacción se llevó a cabo durante 1 h y después la mezcla se dializó durante la noche contra agua. El conjugado que se obtiene así contiene un residuo de PEG₄₀ por PYY₃₋₃₆, como se determinó mediante MALDI-TOF MS. (PEG₄₀-OSu, 43,626 D; PYY₃₋₃₆, 4,047 D; conjugado, 47,712 D).

(v) Mediciones de la ingesta de alimentos: Grupos de 10 ratones se privaron de alimentos durante 24 horas y después se le dio un exceso de alimento estándar que se pesó previamente por un periodo de 2 h. El agua potable se le proporcionó en todo momento. Los ratones recibieron inyecciones sc de disolución salina (0.1 ml/ratón), de PYY₃₋₃₆ nativo o de derivados de PYY₃₋₃₆ a las dosis y tiempos que se indicaron dentro de las 24 horas antes del inicio del período de 2 h de realimentación. Un intervalo mínimo de 1 h se introdujo entre la inyección y la realimentación para evitar una disminución dependiente del estrés en la ingesta de alimentos. La cantidad de alimento que se consumió por grupo se determinó al final del período de alimentación. El pienso restante se pesó después de las 2 h del período de realimentación y se calculó la ingesta de alimentos acumulativa por 10 ratones. Los valores de la ingesta de alimentos en los experimentos que se replicaron se normalizaron de acuerdo con los controles de disolución salina. Los resultados se expresan como la ingesta de alimentos por 10 ratones \pm SD de 2-5 experimentos que se replicaron.

(vi) Análisis estadísticos. La significación de las diferencias en el consumo de alimentos se determinó mediante la prueba t de Student, utilizando el peso total de alimentos que se consumieron por cada grupo de 10 ratones como un solo valor. Un grupo de 10 ratones que se inyectó con la disolución salina se incluyó en cada experimento como un control. Una prueba t pareada, de dos colas se realizó entre el control y los grupos que se trataron.

31(i) El efecto de PYY₃₋₃₆ en la ingesta de alimentos en ratones.

Para evaluar la duración y la magnitud del efecto de PYY₃₋₃₆ y de sus derivados sobre la ingesta de alimentos, empleamos el modelo de ratón de realimentación de 24 h de inanición seguido de un período de realimentación de 2 h. Inicialmente repetimos los estudios anteriores, donde el PYY₃₋₃₆ se administró inmediatamente antes del período de realimentación. Sin embargo, encontramos que el estrés de la mera manipulación de los ratones tuvo un efecto profundo e inconsistente en la ingesta de alimentos, lo que reduce de esta manera la diferencia entre la disolución salina y el PYY₃₋₃₆. Después inyectamos los ratones sc 1 h antes del inicio del período de realimentación y obtuvimos una diferencia mucho más consistente entre el PYY₃₋₃₆ y la salina. La Fig. 15 muestra que el PYY₃₋₃₆ inhibió la ingesta de alimentos de una manera dependiente de la dosis. Los ratones que recibieron la disolución salina o el PYY₃₋₃₆ a una dosis de 5 nmol/ratón consumieron 10.7±1.26 y 5.26±1.47 g de pienso por cada 10 ratones, respectivamente (P<0.001, N=5). Estas cifras se corresponden a una disminución del 50% en la ingesta de alimentos por los grupos que recibieron el PYY₃₋₃₆, en comparación con los grupos de control que recibieron la disolución salina. La inhibición fue estadísticamente significativa en todas las dosis que se utilizaron, incluyendo la dosis más baja de 0.2 nmol/ratón (0.8 µg/ratón, P>0.05, N=3). La dosis-respuesta corresponde a la mitad del efecto máximo del PYY₃₋₃₆ a aproximadamente 0.5 nmol/ratón (Fig. 15).

Después determinamos la duración de la saciedad que se induce por la administración sc del PYY₃₋₃₆ (5 nmol/ratón) en diferentes momentos antes del período de realimentación. La saciedad que se induce por el PYY₃₋₃₆ fue máxima cuando se administró 1 h antes de la realimentación y disminuyó rápidamente cuando el PYY₃₋₃₆ se administró a tiempos anteriores. La vida media de su respuesta biológica fue de alrededor de 3 h y no se observó efecto con 5 nmol de PYY₃₋₃₆ cuando se administró casi 10 h antes del período de realimentación (Fig. 16).

La administración por vía intraperitoneal (en lugar de por vía subcutánea) de PYY₃₋₃₆ a los ratones indujo un efecto de saciedad considerablemente de menor duración. Por ejemplo, una dosis ip de 5 nmol de PYY₃₋₃₆/ratón fue completamente efectiva cuando se administró 30 min antes de la realimentación, pero no tuvo efecto cuando se administró 2 h antes de la comida (no se muestra).

A continuación, intentamos extender la actividad biológica del PYY₃₋₃₆ por la pegilación convencional. Así, el PYY₃₋₃₆ monopegilado se preparó (ver Materiales y Métodos anteriormente) y se probó para determinar su actividad biológica mediante la administración sc (5 nmol/ratón) 1 h antes del período de realimentación. No se obtuvo una reducción significativa en la ingesta de alimentos en comparación con el control que recibió la disolución salina, lo que indica que la pegilación convencional, que resulta en un péptido pegilado estable, abolió la actividad biológica del PYY₃₋₃₆ (Fig. 17).

Después comprobamos si la inactivación del PYY₃₋₃₆ se debió a la voluminosidad del grupo PEG o se debió al bloqueo de los residuos amino del PYY₃₋₃₆. La acetilación de los dos grupos amino del PYY₃₋₃₆ abolieron en gran medida el efecto del PYY₃₋₃₆ de inducir *in vivo*. Así, los ratones que se inyectaron con 20 µg de N α -N ϵ -diacetil-PYY₃₋₃₆ por ratón comieron 10.54±0.08 g de pienso por cada 10 ratones, en comparación con 10.6±1.26 g en el grupo que recibió la disolución salina y 5.26±1.47 g en el grupo que recibió PYY₃₋₃₆. Por lo tanto, incluso la unión de un pequeño grupo acetilo fue suficiente para alterar la actividad biológica del PYY₃₋₃₆.

31(ii) Preparación y caracterización del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆

La falta de actividad biológica después de la pegilación o incluso de la acetilación del PYY₃₋₃₆ nos impulsó a preparar el conjugado PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ que se describe en el Ejemplo 23 anteriormente. Este producto se analizó por espectrometría de masas para determinar la relación del PEG₄₀ respecto al PYY₃₋₃₆ mediante análisis de MALDI-TOF MS. El PYY₃₋₃₆ exhibió una masa molecular de 4047.51 D (calc. = 4049.6 D). El PEG₄₀-SH tenía una masa media de 43,626 D, y el conjugado produjo un pico principal correspondiente a una masa molecular de 47,712.6 D (no se muestra). La masa calculada del conjugado 1:1 del PEG₄₀-SH y del MAL-FMS-PYY₃₋₃₆ es 48,087 D. Así, el principal producto se corresponde a tal conjugado 1:1.

31(iii) El PEG₄₀-FMS se unió al grupo α amino del PYY₃₋₃₆.

El péptido PYY₃₋₃₆ contiene el grupo- α amino N-terminal de isoleucina y un grupo ϵ -amino de lisina en la posición 2, los cuales están potencialmente disponibles para la acilación por el MAL-FMS-OSu. Para determinar el (los) sitio (s) de acilación, el PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ se hizo reaccionar con 500 de exceso molar de anhídrido acético a pH 7.0 durante 1 h, seguido por la diálisis contra agua durante la noche. El grupo PEG₄₀-FMS se eliminó después por incubación del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ acetilado durante 4 días a pH 8.5. El producto se sometió después al análisis de la secuencia N-terminal de las proteínas. Como se muestra en la Fig. 18, los ciclos 1, 2 y 3 produjeron las cantidades que se esperaban de isoleucina, ϵ -acetil lisina y

prolina, respectivamente. No se encontró lisina libre en el ciclo 2. Así, el conjugado consiste del PEG₄₀-FMS y del PYY₃₋₃₆ a una relación 1:1. Además, basándose en los rendimientos de secuenciación, el grupo PEG₄₀-FMS se vincula principalmente con el grupo α-amino N-terminal del PYY₃₋₃₆. Sin embargo, este análisis no podría excluir por completo la presencia de un PYY₃₋₃₆ mono-sustituido en su cadena lateral de ε-lisina. Sin embargo, en vista de la regeneración completa del péptido nativo, este punto es de un significado más bien menor.

31(iv) El PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ se hidroliza para obtener el PYY₃₋₃₆ bajo condiciones fisiológicas.

Para evaluar la velocidad de liberación del PYY₃₋₃₆ a partir del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆, incubamos el conjugado en tampón fosfato (pH 8.5, 0.1 M, 37°C). Se retiraron alícuotas en diferentes momentos y se sometieron a una HPLC analítica, utilizando condiciones de elución, que resuelven el PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ del PYY₃₋₃₆. A pH 8.5, la velocidad de hidrólisis del FMS a partir de proteínas o péptidos-FMS es casi idéntica a la que se obtiene en el suero humano normal (Shechter y otros, 2001). Como se muestra en la Fig. 19, el PYY₃₋₃₆ se liberó del conjugado de un modo lento, casi homogéneo, con una vida media de 5.3 h. Después de 40 h, la cantidad que se acumuló de PYY libre₃₋₃₆ alcanzó el 79% del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ introducido.

31 (v) Hidrólisis del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ en suero de ratón normal.

Se encontró que el PYY₃₋₃₆ experimenta una proteólisis rápida en suero de ratón normal a 37°C con una vida media de 3±0.7 min. (Fig. 20, inserto). Por lo tanto, la velocidad de hidrólisis del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ se evaluó por la cantidad de 2-PEG₄₀-9-sulfo-fluoreno que se liberó durante la hidrólisis. El PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ se incubó en suero de ratón normal a 37°C. Se tomaron alícuotas en diferentes momentos, se añadió etanol (3 volúmenes) para precipitar las proteínas del suero, y después de la centrifugación se midió la cantidad de 2-PEG₄₀-9-sulfo-fluoreno en los sobrenadantes mediante HPLC. Como se muestra en la Fig. 20, la hidrólisis del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ en el suero de ratón normal a 37°C procedió de un modo casi homogéneo con una vida media de 7.0 ± 0.3 h.

31(vi) El PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ induce una prolongada saciedad en ratones.

Después se determinó la duración de los efectos del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ (5 nmol/ratón) en la ingesta de alimentos. La vida media de la respuesta biológica del PYY₃₋₃₆ fue de aproximadamente 3 h (Fig. 16). En comparación, la actividad biológica del PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ fue mucho más persistente (Fig. 21). Los ratones que recibieron el PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ 18 h antes de la realimentación comieron 4.7±0.14 g de pienso por cada 10 ratones, un valor que representa una reducción del 52% en la ingesta de alimentos en comparación con el grupo control (disolución salina) $P > 0.05$). Una reducción estadísticamente significativa del 27% en la ingesta de alimentos se observó además en los ratones que recibieron el PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ 24 h antes de la realimentación ($P < 0.05$; Fig. 21). Así, la vida media del efecto de saciedad que se ejerce por el PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆ fue de aproximadamente 24 h, es decir, 8 veces más larga que el del PYY no modificado₃₋₃₆. En un estudio de control, la administración sc de éster etílico de PEG₄₀-FMS-Glicina (5 nmoles/ratón) 15 h antes de la realimentación no tuvo efecto alguno sobre la ingesta de alimentos en comparación con la administración de la disolución salina (Fig. 21, columnas derechas).

Ejemplo 32: Actividad biológica del (PEG₄₀-FMS)₂-hGH y del PEG₄₀-FMS-hGH

La hormona de crecimiento humano (hGH) es una hormona pituitaria esencial que regula el crecimiento y el desarrollo de los tejidos periféricos. La hGH es un fármaco que se aprobó por la FDA que se utiliza ampliamente para terapia de reemplazo en niños con deficiencia de la hormona de crecimiento. Como es válido para otros fármacos de proteínas no glicosiladas de masa molecular inferior a 50 kDa, la hGH se elimina rápidamente del sistema circulatorio con un valor de $t_{1/2}$ de 20-30 min en seres humanos. El aclaramiento tiene lugar principalmente a través del riñón. La unión covalente de las cadenas de PEG a la hGH puede disminuir sustancialmente el aclaramiento por filtración glomerular a través de los riñones, y por lo tanto alargar el tiempo de vida *in vivo*. Varias cadenas de PEG se deben introducir a la hGH con el fin de alargar considerablemente su tiempo de vida *in vivo*. La pegilación a menudo resulta en una disminución drástica de las potencias biológicas o farmacológicas de los péptidos y proteínas. Esto es especialmente válido para la hGH debido al área de superficie relativamente grande del sitio 1 y del sitio 2 a través de los cuales la hormona se une al primer receptor y después al segundo receptor para formar un complejo receptor homodimérico que inicia la señalización.

La unión covalente de cadenas de PEG a la hGH en un modo irreversible sin embargo, conduce a una pérdida drástica de la potencia biológica de esta hormona. Por ejemplo, Clark y otros, 1996, unieron de dos a y siete cadenas de PEG₅₀₀₀ a las porciones de cadena lateral de aminoácidos de la hGH. La unión de dos PEG₅₀₀₀/hGH sólo condujo anteriormente a la pérdida del ~90% en la potencia biológica de la hGH. Aproximadamente cinco de tales cadenas de PEG₅₀₀₀ tenían que

vincularse a la proteína para aumentar sustancialmente la vida media en circulación. Tales conjugados de (PEG₅₀₀₀)₅ hGH sin embargo tenía menos del 0.1% de la potencia biológica de la hGH.

Dos conjugados del PEG-FMS-hGH se prepararon de acuerdo con la invención (Ejemplos 24-25). De hecho, la hGH contiene varias funciones amino conjugables. Sin embargo, en vista de la reversibilidad de la reacción de pegilación de acuerdo con la presente invención y la regeneración de las hormonas peptídicas y proteicas nativas en la condición fisiológica, este punto sólo merece una consideración menor.

32(i) Capacidad de unión al receptor del (PEG₄₀-FMS)₂-hGH y del PEG₄₀-FMS-hGH

El ensayo de desplazamiento de la hGH se realizó como se describió previamente (Tsushima y otros, 1980). El (PEG₄₀-FMS)₂-hGH, que se preparó por la unión de dos porciones del PEG₄₀-FMS a la hGH, tiene un peso molecular efectivo de aproximadamente 120 kDa y exhibe un 9±2% de la potencia de unión al receptor la hGH. La capacidad de unión al receptor se regenera tras la incubación a 37°C en suero normal de rata o en tampón fosfato 0.1 M (pH 8.5) a 37°C con un valor de t_{1/2} de ~20 hrs, hasta alcanzar un 70-80% de la capacidad de unión del receptor nativa tras 50 horas de incubación (no se muestra).

32(ii) La velocidad de la hidrólisis y el orden de reacción del PEG₄₀-FMS-hGH

La velocidad de hidrólisis y el orden de reacción del PEG₄₀₀₀₀-FMS-hGH se evaluaron a pH = 8.5, 37°C. La liberación de la hGH se monitoreó mediante RP-HPLC y se determinó que era una reacción de primer orden (Tabla 3, Fig. 22). *In vitro*, el PEG₄₀₀₀₀-FMS-hGH no exhibió afinidad de unión al receptor. Tras la incubación, se preservó el reconocimiento de la hGH liberada por el receptor nativo de la hGH (Fig. 22). La hormona del crecimiento humano se liberó del conjugado de modo homogéneo lento, con una t_{1/2} de 11.8 h (Tabla 3, Fig. 23).

Ejemplo 33: el PEG₄₀-FMS-ANP experimenta una hidrólisis dependiente del tiempo en condiciones fisiológicas

El péptido natriurético atrial (ANP) es un péptido de 28-mer de aminoácidos que no contiene lisina que ejerce acciones diuréticas y vasorrelajantes. Desempeña una función importante en la homeostasis del volumen sanguíneo y de la presión sanguínea del cuerpo. El ANP tiene una afinidad muy alta por sus sitios receptores (10 pm), y por lo tanto se clarifica muy rápidamente (t_{1/2}~0.5 min) por el receptor y los eventos mediados por las proteasas. El ANP no es, por tanto, adecuado como un fármaco para la administración subcutánea para regular la homeostasis de la presión arterial en los seres humanos. La unión covalente de una cadena de PEG₄₀ a la porción α-amino del ANP genera un conjugado que es totalmente carente de afinidad de unión al receptor (no se muestran los datos).

El PEG₄₀-FMS-ANP, que se prepara por la unión del PEG₄₀-FMS a la cadena lateral α-amino del ANP, es negativo al TNBS. Tras la incubación a pH 8.5 y 37°C, este conjugado experimenta una hidrólisis espontánea con un valor de t_{1/2} de 23±2 hrs, generando el ANP parental después de 50 horas de incubación (Tabla 5). Las mediciones preliminares en ratas *in vivo* revelaron que el PEG₄₀-FMS-ANP que se administró por vía subcutánea tiene un aumento de 60 veces en la vida media en suero, en comparación con el ANP nativo. El conjugado se protege totalmente de la degradación mediada por el receptor antes de la separación de las cadenas del PEG₄₀-FMS a partir del ANP mediante la hidrólisis.

REFERENCIAS

- Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR: Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterol.* 89:1070-1077 (1985).
- Bailon, P. & Berthold, W. Poly(ethylene glycol)-conjugated pharmaceutical proteins. *Pharm. Sci. Technol. Today* 1, 352-356 (1996).
- Bailon P, Palleroni A, Schaffer C.A., Spence C.L., Fung W-J, Porter J.E., Ehrlich G.K., Pan W, Xu Z.X., Modi M.W., Farid A, Berthold W y Graves M. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug Chem* 12: 195-202 (2001).
- Baker, D. E. Pegylated interferon plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C. *Rev. Gastroenterol. Disord.* 3, 93-109 (2003).
- Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR: Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. *Nature* 418:650-654 (2002).
- Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR: Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 349:941-948 (2003).

Broberger C, Landry M, Wong H, Walsh JN, Hokfelt T: Subtypes of Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin and neuropeptide-Y containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinol.* 66:393-408 (1997).

Clark R. y otros, Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol. *J Biol Chem* 271, 21969-77 (1996).

Cutrone, E. C. y Langer, J. A. Identification of critical residues in bovine IFNAR-1 responsible for interferon binding. *J. Biol. Chem.* 276, 17140-48 (2001).

Delgado, C., Francis, G.E. & Derek, F.F. The uses and properties of PEG-linked proteins. *Critical Rev. Ther. Drug Carriers Syst.* 9, 249-304 (1992).

Eng. J., Kleinman, W.A., Singh, L., Singh, G., Raufman, J.P. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin 3 analogue for *heloderma suspectum* venom: further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 267, 7402-7405 (1992).

Fehmann, H.C., Jiang, J., Schweinfurth, J., Wheeler, M.A., Boyd, A.E., Göke, B. Stable expression of the rat GLP-I receptor in CHO cells activation and binding characteristics utilizing GLP-(7-36)-amide, oxyntomodulin, exendin-4, and exendin-(9-39). *Peptides* 15, 453-456 (1994).

Fuerteges, F. y Abuchowski, A. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *J. Controlled Release* 11, 139-148 (1990).

Fung, W.-J., Porter, J.E. & Bailon, P. Strategies for the preparation and characterization of polyethylene glycol (PEG) conjugated pharmaceutical proteins. *Polymer Preprints* 38, 565-566 (1997).

Gershonov, E., Shechter, Y. & Fridkin, M. New concept for long-acting insulin, spontaneous conversion of an inactive modified insulin to the active hormone in circulation: 9-fluorenylmethoxycarbonyl derivative of insulin. *Diabetes* 48, 1437-1442 (1999).

Gershonov, E., Goldwasser, I., Fridkin, M. & Shechter, Y. A novel approach for a water-soluble long-acting insulin prodrug: Design, preparation, and analysis of [(2-sulfo)-9-fluorenylmethoxycarbonyl]3-insulin. *J. Med. Chem.* 43, 2530-2537 (2000).

Glue, P., Fang, J. W., Rouzier-Panis, R., Raffanel, C., Sabo, R., Gupta, S. K., Salfi, M. y Jacobs, S. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. *Hepatitis C Intervention Therapy Group. Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 556-567 (2000).

Göke, R., Fehmann, H.C., Linn, T., Schmidt, H., Krause, M. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting β -cells. *J. Biol. Chem.* 268, 19650-19655 (1993).

Goodman, L. S. y Gilman, A. G. (2001) *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman, L. S., Gilman, A. G., Limbird, L. E., y Hardman, J. G. Eds.) 9o ed., pp. 1211-1213, The McGraw-Hill Company, Nueva York.

Grandt D, Schimiczek M, Belinger C, Layer P, Goebell H, Eysselein VE, Reeve JRJ: Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36. *Regul. Pept.* 51:151-159 (1994).

Greenwald R.B., Pendri A, Conover C.D., Zhao H, Choe Y.H., Martinez A, Shum K, Guan S. Drug delivery systems employing 1,4- or 1,6-elimination: poly(ethylene glycol) prodrugs of amine-containing compounds. *J.Med. Chem.* 42, 3657-3667 (1999).

Greenwald, R.B., Choe, Y.H., Conover, C.D., Shum, K., Wu, D., & Royzen, M., Drug delivery systems based on trimethyl lock lactonization: poly(ethylene glycol) prodrugs of amino-containing compounds. *J.Med.Chem.* 43, 475-487 (2000)

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS: Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev.* 20:68-100 (1999).

Katre, N.V. The conjugation of proteins with poly(ethylene glycol) and other polymers: altering properties to enhance their therapeutic potential. *Adv. Drug. Delivery Sys.* 10, 91-114 (1993).

Lee S, Greenwald R.B., McGuire J, Yang K, Shi C. Drug delivery systems employing 1,6-elimination: releasable poly(ethylene glycol) conjugates of proteins. *Bioconjugate Chemistry* 12, 163-169 (2001).

Moody AJ, Stan MA, Stan M, Gliemann J. A simple free fat cell bioassay for insulin. *Horm Metab Res.* 6(1):12-6 (1974).

Nucci, M.L., Shorr, R. & Abuchowski, A. The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Adv. Drug Delivery Rev.* 6, 133-151 (1991).

O'Kelly, P., Thomsen, L., Tilles, J. G. y Cesario, T. Inactivation of interferon by serum and synovial fluids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 178, 407-411 (1985).

Pedersen-Bjergaard U, Host U, Kelbaek H, Schifter S, Rehfeld JF, Faber J, Christensen NJ: Influence of meal composition on postprandial peripheral plasma concentrations of vasoactive peptides in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56:497-503 (1996).

Piehler, J. y Schreiber, G. Biophysical analysis of the interaction of human ifnar2 expressed in *E. coli* with IFNalpha2. *J. Mol. Biol.* 289, 57-67 (1999).

Piebler, J. y Schreiber, G. Fast transient cytokine-receptor interactions monitored in real time by reflectometric interference spectroscopy. *Anal. Biochem.* 289, 173-186 (2001).

Reddy, K.R. Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: New mechanisms in the delivery of injectable drugs. *The Annals of Pharmacotherapy* 34, 915-923 (2000).

5 Reddy R.K., Modi M.W. y Pedder S. Use of peginterferon alfa-2a (40KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C. *Adv Drug Delivery Rev* 54, 571-586 (2002).

Roberts, M.J., Bentley, M.D. & Harris, J.M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev.* 54: 459-476 (2002).

10 Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375-380 (1964).

Romerio, F., Riva, A. y Zella, D. Interferon-alpha2b reduces phosphorylation and activity of MEK and ERK through a Ras/Raf-independent mechanism. *Br. J. Cancer* 83, 532-538 (2000).

15 Rostaing, L., Chatelut, E., Payen, J. L., Izopet, J., Thalamas, C., Ton-That, H., Pascal, J. P., Durand, D. y Canal, P. Pharmacokinetics of alphaIFN-2b in chronic hepatitis C virus patients undergoing chronic hemodialysis or with normal renal function: clinical implications. *J. Am. Soc. Nephro.* 9, 2344-2348 (1998).

Rubinstein, S., Familletti, P. C. y Pestka, S. (1981) Convenient assay for interferons. *J. Virol.* 37, 755-758.

Schepp, W., Schmidler, J., Riedel, J., Dehne, K., Schusdziaarra, V., Hoist, J.J. exendin-4 and exendin-(9-39)NH₂ agonist and antagonist, respectively, at the rat parietal cell receptor for glucagon-like peptide-1-(7-36)NH₂. *Eur. J. Pharmacol.* 269, 183-191 (1994).

20 Schwartz MW, Morton GJ: Obesity: keeping hungar at bay. *Nature* 418:595-597 (2002).

Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG: Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-67 (2000).

25 Shechter, Y., Goldwaser, I., Lavon, I., Gershonov, E., Mester, B., Mironchik, M., Patt, L. P. y Fridkin, M. A new approach for prolonging the half-life of peptides, proteins and low-molecular-weight drugs in vivo. *Drugs of the Future* 26, 472-480 (2001).

Shechter, Y., Patt, L. P., Schreiber, G. y Fridkin, M. Prolonging the half-life of human interferon-alpha 2 in circulation: Design, preparation, and analysis of (2-sulfo-9-fluorenylmetoxycarbonilo)7- interferon-alpha 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1212-1217 (2001a).

30 Shechter, Y., Tsubery, H. y Fridkin, M. N-[(2-Sulfo)-9-fluorenylmetoxycarbonilo](3)-gentamicin C(1) is a long-acting prodrug derivative. *J. Med. Chem.* 45, 4264-4270 (2002).

Shechter, Y., Tsubery, H. y Fridkin, M. [2-Sulfo-9-fluorenylmethoxycarbonyl]3-exendin-4-a long-acting glucose-lowering prodrug. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 386-391 (2003).

Tsushima, T., Sasaki, N., Imai, Y., Matsuzaki, F., Friesen H.G. Characteristics of solubilized human-somatotropin-binding protein from the liver of pregnant rabbits *Biochem J.* 187 479-492 (1980).

35 Veronese, F.M. Peptide and protein PEGylation: A review of problems and solutions. *Biomaterials* 22, 405-417 (2001).

Working, P.K., y otros, Safety of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene glycol) derivatives. In: J.M. Harris y S. Zalipsky, Editors, *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications*, ACS Books, Washington, DC (1997), pp. 45-57.

40 Zalipsky S, Qazen M, Walker J.A. 2nd, Mullah N, Quinn Y.P., Huang S.K. New detachable poly(ethylene glycol) conjugates: cysteine-cleavable lipopolymers regenerating natural phospholipid, diacyl phosphatidylethanolamine. *Bioconjugate Chemistry* 10, 703-707 (1999).

Tabla 1. Características químicas de MAL-FMS-NHS

Características	Valor numérico
Solubilidad en un tampón acuoso (pH 7.2)	>10 mg/ml
Datos de espectros de masas ^a	
ESMS calculados	583 Da
ESMS encontrado para [M+H] ⁺	584.52 Da
ESMS encontrado para [M+Na] ⁺	606.47 Da
Tiempo de retención (HPLC analítica) ^b	2.65 min
Coeficiente de extinción molar a 280nm ^c	21,200±200 mol ⁻¹ cm ⁻¹
Coeficiente de extinción molar a 320nm ^c	16,100±150 mol ⁻¹ cm ⁻¹
^a Los espectros de masas se determinaron mediante la utilización de la técnica de ionización por electrospray ^b La columna HPLC que se utilizó es una columna Chromolith; (C ₁₈); gradiente lineal de 10-100% de disolvente B (3 ml/min). ^c Basados en la absorbancia a 280 y 301 nm en PBS, pH 7.2, con una concentración de compuesto que se determinó por la cuantificación de la función MAL con un exceso de GSH y de DTNB.	

Tabla 2. Características químicas del PEG₄₀-FMS-IFN α 2

Característica ^a	Valor numérico
Absorbancia a 280nm ^{b,c}	$\epsilon_{280} = 39270 \pm 100$
Espectros de masas ^d	
PEG-FMS-IFN α 2 ^e , calculado	63569 daltons
PEG-FMS-IFN α 2 ^e , medido	63540 daltons
Tiempo de retención (HPLC analítica) ^f	43 \pm 0.5 min.
Solubilidad en tampón acuoso, pH 7.4	>20 mg/ml
<p>(^a) Para la caracterización, el IFNα2-FMS-MAL se dializó contra H₂O antes de unirlo al PEG₄₀-SH. El producto final se filtró a través de un centricon que tiene un valor de corte de 50 kDa. Estos procedimientos eliminan el MAL-FMS-NHS libre y cualquier IFNα2 nativo residual, o IFNα2 -FMS-MAL que no se haya unido al PEG₄₀-SH.</p> <p>(^b) Determinado mediante espectroscopía de UV. La concentración del derivado se determinó por hidrólisis ácida de una alícuota de 20 μl seguido por un análisis de aminoácidos, que se calculó de acuerdo con el ácido aspártico (14 residuos), la alanina y la isoleucina (8 residuos).</p> <p>(^c) El IFNα2 nativo absorbe a 280 nm con $\epsilon_{280} = 18070$ (30).</p> <p>(^d) Los espectros de masas se determinaron mediante la utilización de la espectroscopía de masas MALDI - TOF.</p> <p>(^e) La masa calculada se obtiene por las masas aditivas que se encontraron para el IFNα2 nativo (19278 daltons); para el PEG₄₀-SH (43818 daltons) y para la molécula espaciadora después de la conjugación (473 daltons).</p> <p>(^f) El IFNα2 nativo eluye bajo procedimientos idénticos de HPLC analíticas con un tiempo de retención = 33.9 min.</p>	

Tabla 3. Estructuras y tiempo de vida media de los conjugados PEG-FMS

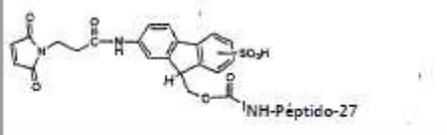
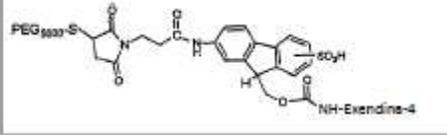
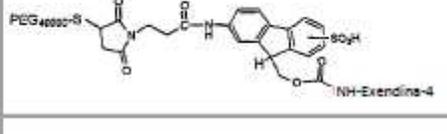
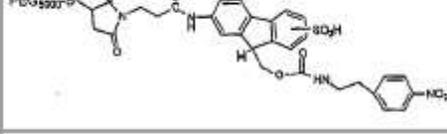
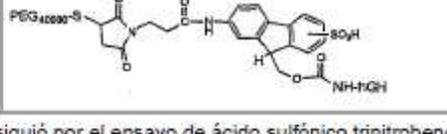
	Estructura	k (h^{-1}) ^b	$t_{1/2}$ (h) ^c
5			
10		0.082	8.4
15		0.058	11.8
20		0.050	13.8
25			
30		0.074	9.4
35		0.059	11.8
40	<p>^a La velocidad de hidrólisis se siguió por el ensayo de ácido sulfónico trinitrobenzeno ^b k es la constante de la pendiente derivada del gráfico de \ln [PEG-FMS conjugado] contra el tiempo (h) ^c $t_{1/2}$ se determinó a partir de la fórmula $t_{1/2} = \ln 2/k$. ^d el gráfico de hidrólisis se puede encontrar como la Fig. 23.</p>		
45			
50			
55			

Tabla 4. Capacidad de unión al receptor de mono-y bis-PEG-FMS-IFN- α 2 conjugados antes de, y después de, la incubación con ifnar-2-CE.

Designación derivada	Mol de PEG ₄₀ -FMS por mol de IFN α 2	Capacidad de unión al receptor ^(a) %	Capacidad de unión al receptor después de 50 h de incubación a pH 8.5, 37°C % ^(b)	t _{1/2} de regeneración de la capacidad de unión al receptor (h)
IFN α 2 Nativa	-	100	97 \pm 2	-
(PEG ₄₀ -FMS) ₁ -IFN α 2	1.0	9 \pm 1	95 \pm 4	9 \pm 1
(PEG ₄₀ -FMS) ₂ -IFN α 2	1.9	0.4 \pm 0.05	92 \pm 3	24 \pm 3

(a) La capacidad de unión al receptor por la ifnar-2-EC inmovilizada se evaluó mediante el procedimiento-RIFS de espectroscopía de interferencia reflectométrica.

La incubación se realizó en tampón fosfato 0.1 M, pH 8.5, que contiene 0.5% de BSA.

Tabla 5. Velocidad de hidrólisis del PEG₄₀-FMS-ANP a pH 8.5, 37°C.

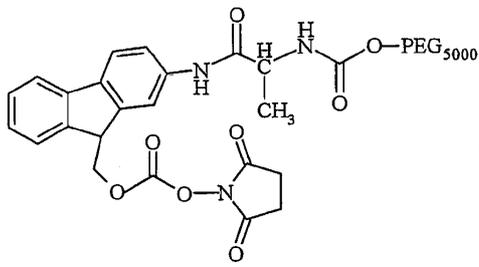
Tiempo de Incubación (pH 8.5, 37°C) horas	% hidrolizado
0	0
3	7
6	18
10	27
15	40
23	50
33	75
43	87
50	100

Esquema 1: Precursores 1-4

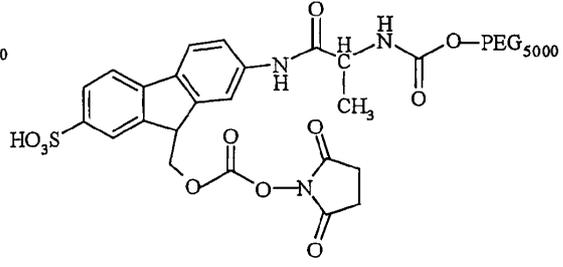
5

10

15



Precursor 1



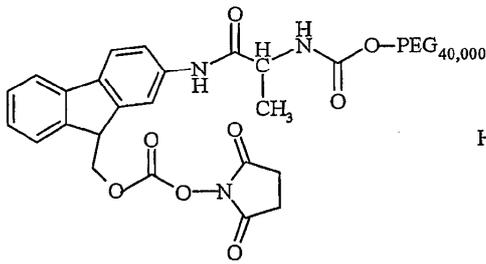
Precursor 2

20

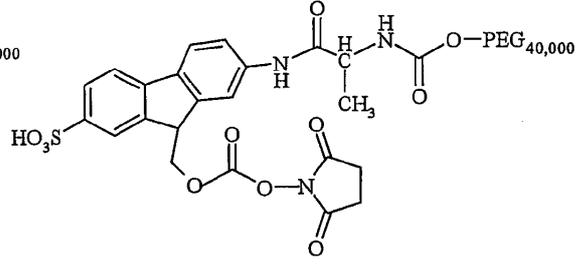
25

30

35



Precursor 3



Precursor 4

40

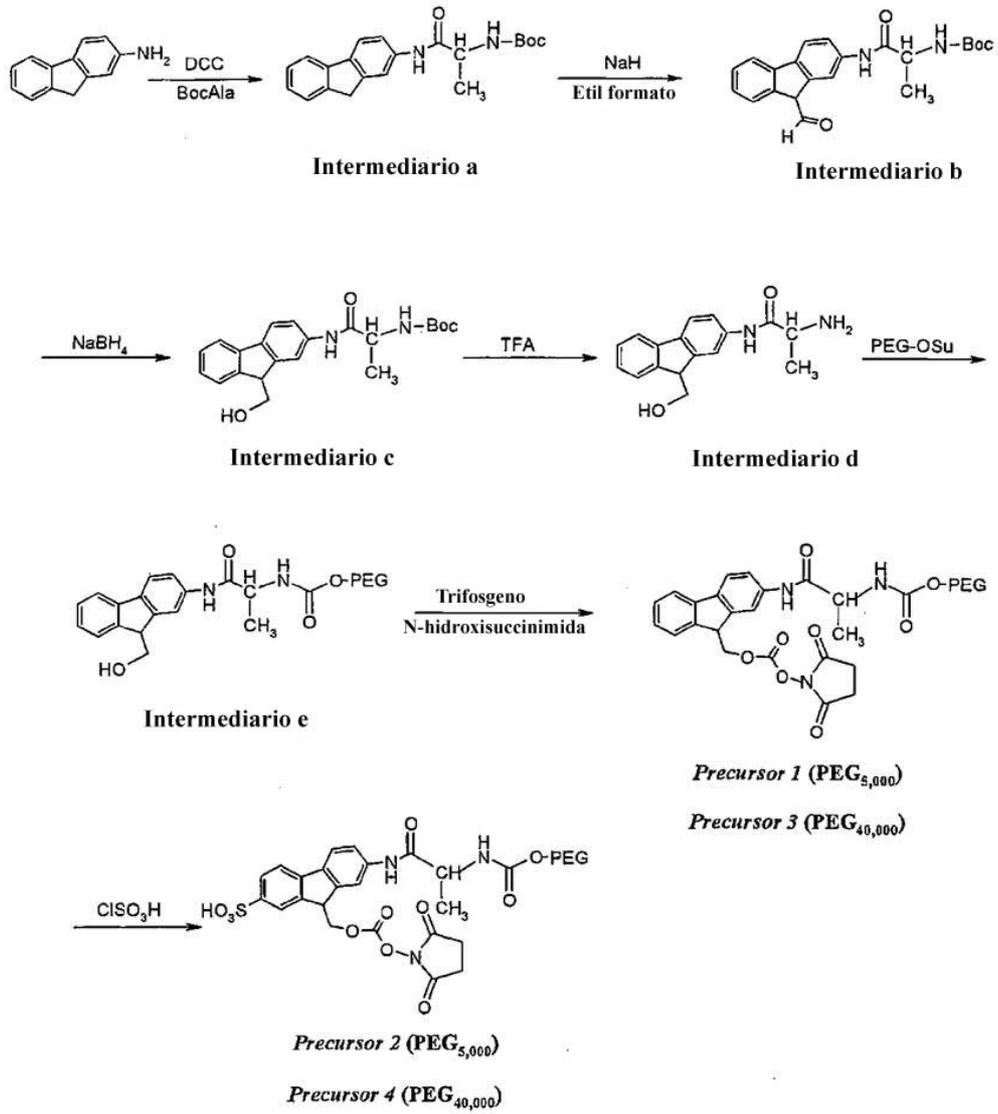
45

50

55

Esquema 2: Síntesis de los Precursores 1-4

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

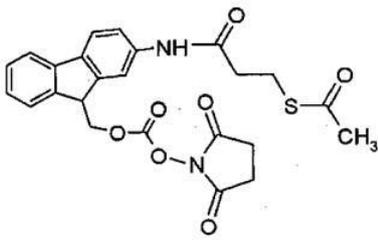


Esquema 3: Precursores 5-8

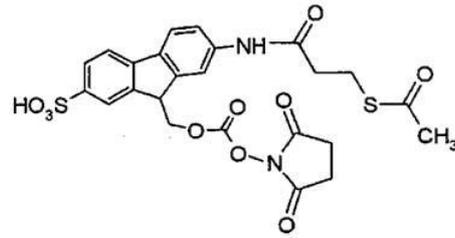
5

10

15



Precursor 5



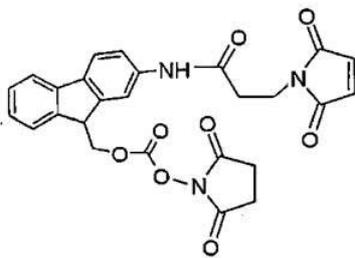
Precursor 6

20

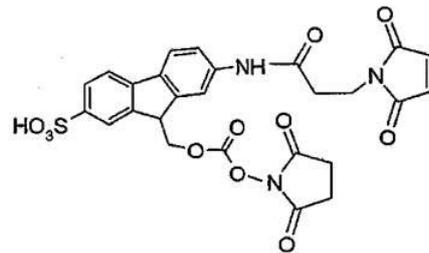
25

30

35



Precursor 7



Precursor 8

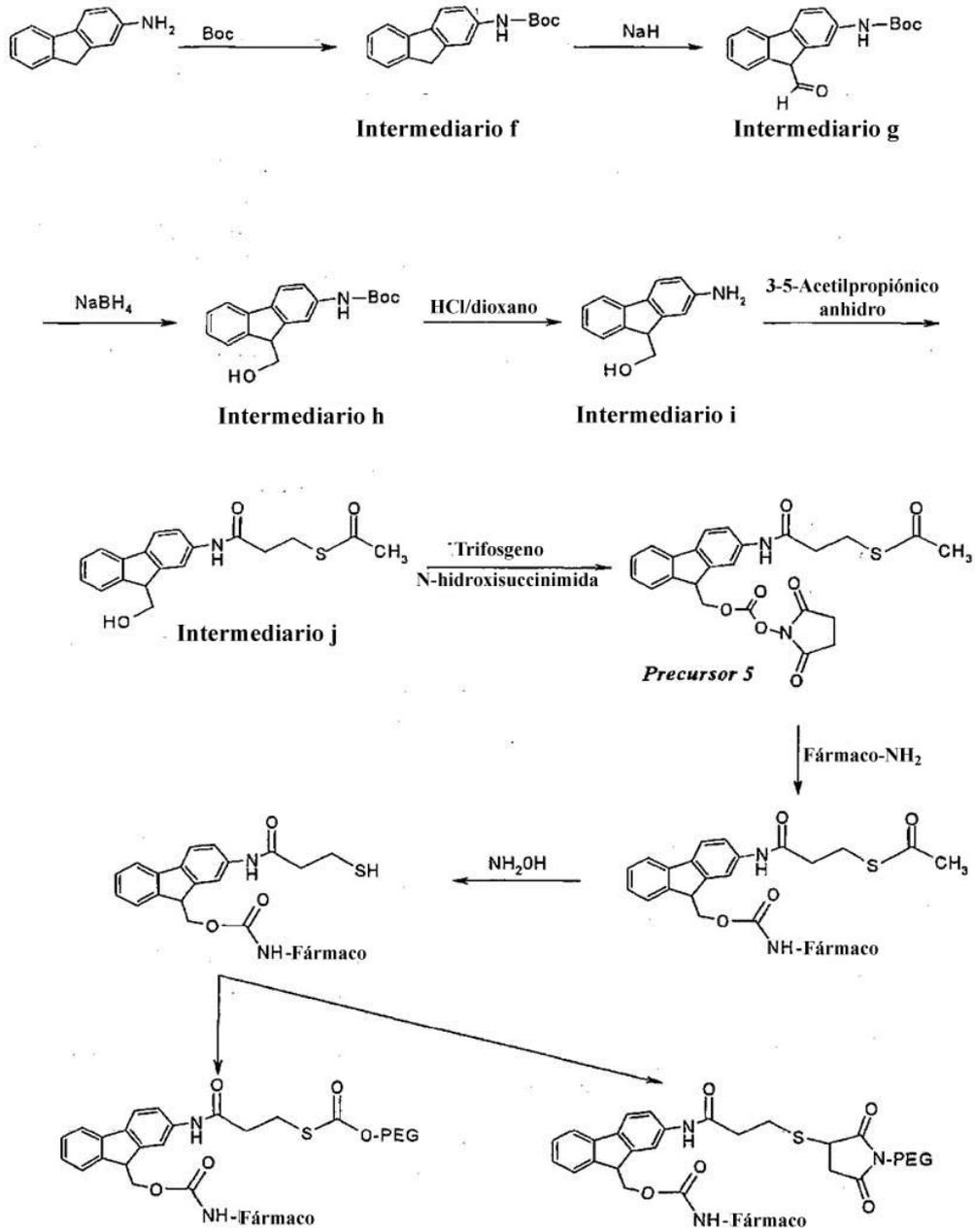
40

45

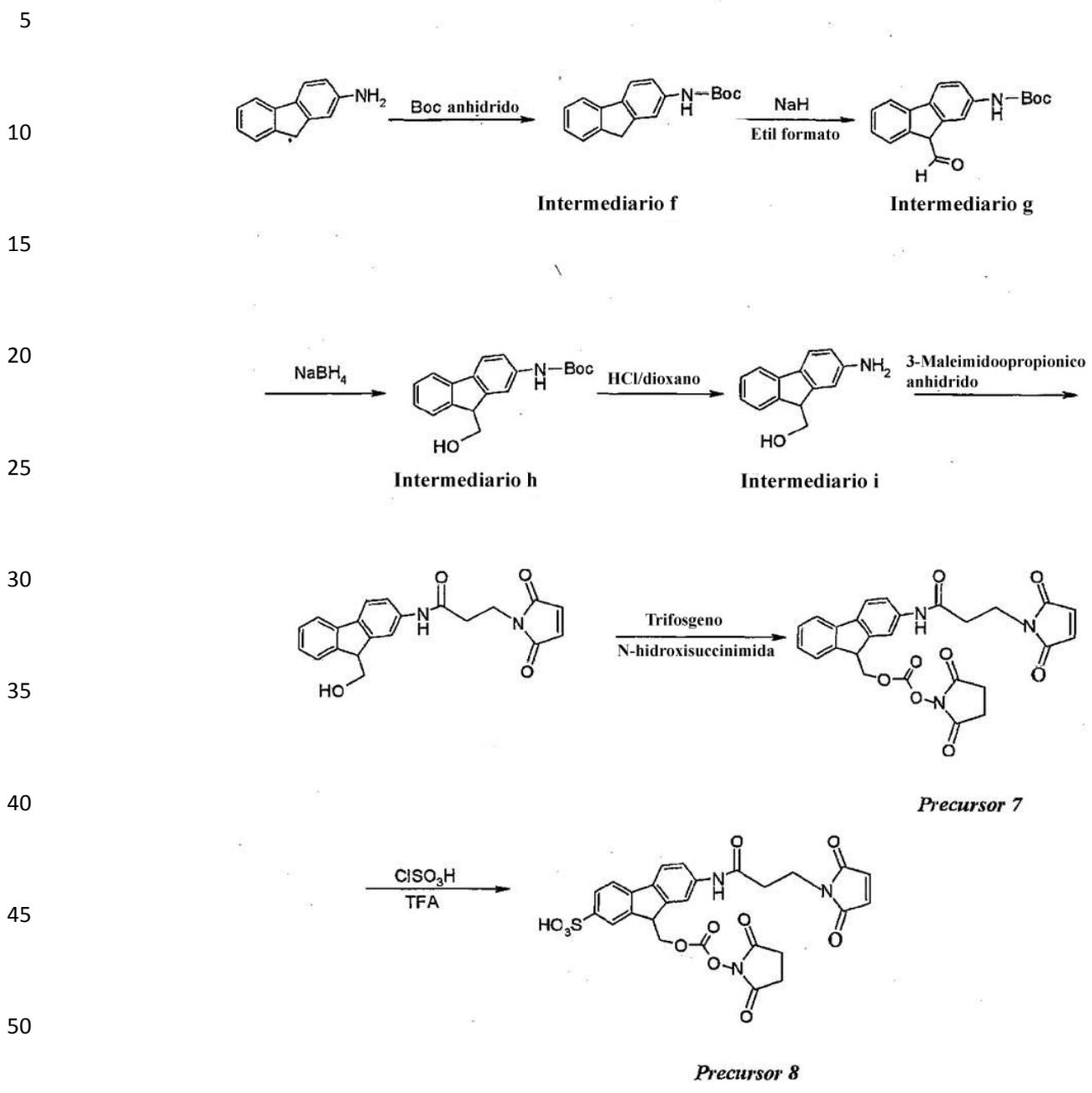
50

55

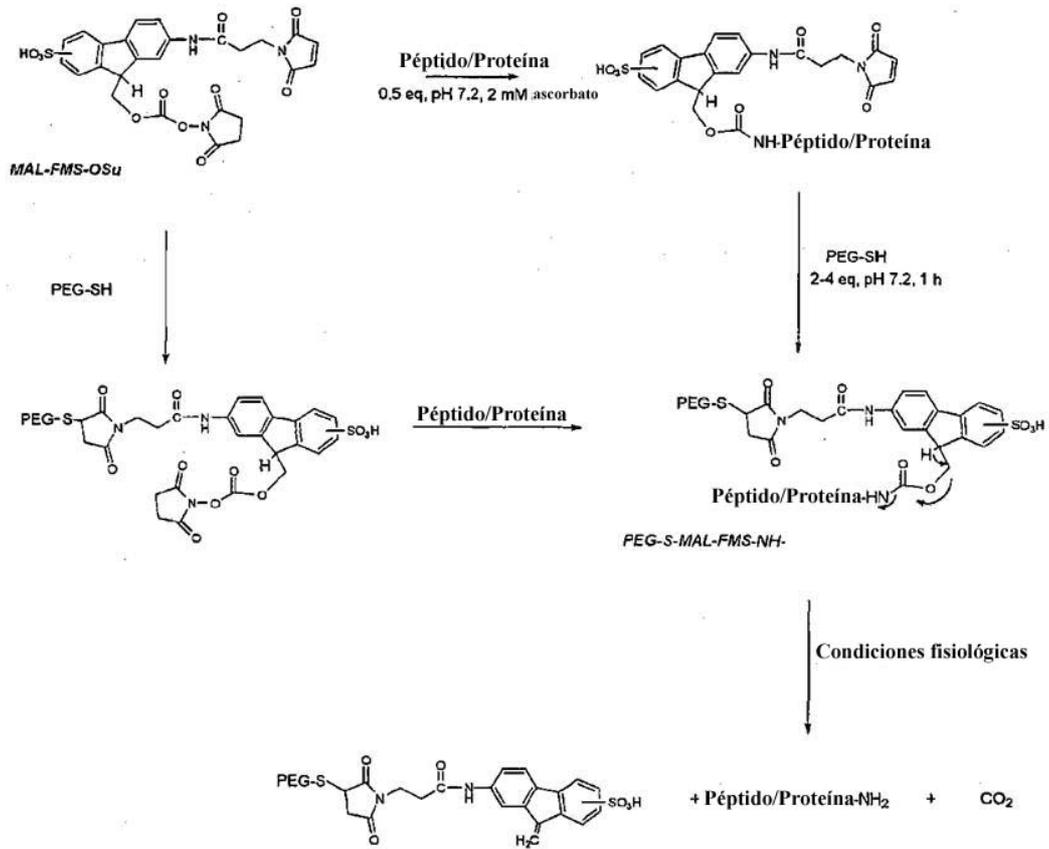
Esquema 4: Síntesis del Precursor 5



Esquema 5: Síntesis de los Precursores 7 y 8

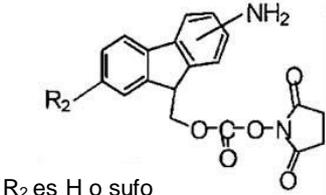
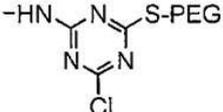
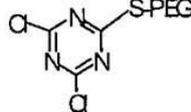
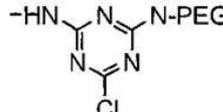
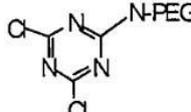
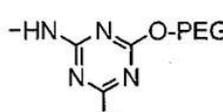
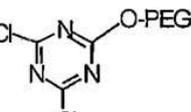


Esquema 6: Procedimientos para la preparación de PEG-FMS-fármacos



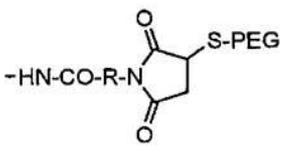
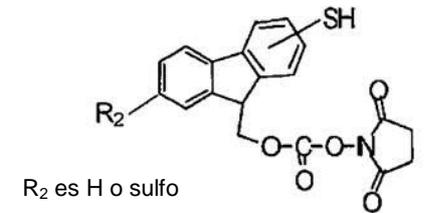
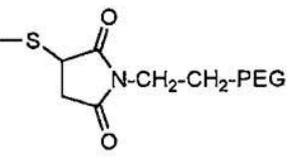
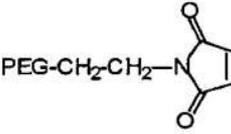
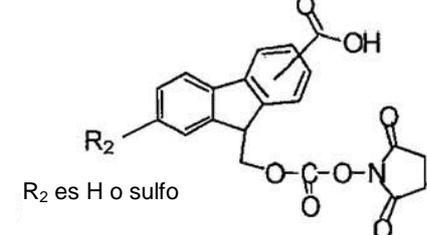
Esquema 7 (página a)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

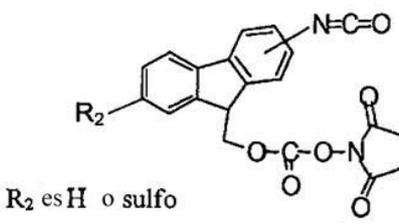
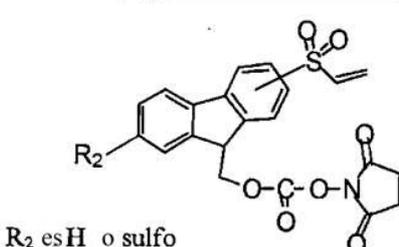
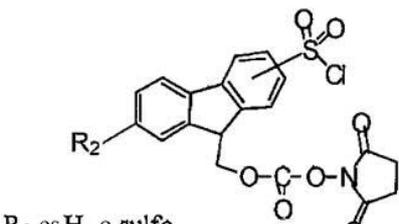
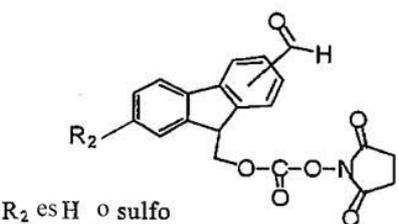
Fmoc/FMS derivado	R ₅ -R ₆ -PEG	PEG derivado
 <p>R₂ es H o sufo</p>	-NH-CO-O-PEG	PEG-OCO-Cl
	-NH-CO-CH ₂ -NH ₂ -CO-NH-PEG	PEG-NH ₂
	-NH-CO-PEG	PEG-COOH
	-NH-CH ₂ -PEG	PEG-CHO
	-NH-CO-NH-PEG	PEG-N=C=O
	-NH-CS-NH-PEG	PEG-N=C=S
		
		
		

Esquema 7 (página b)

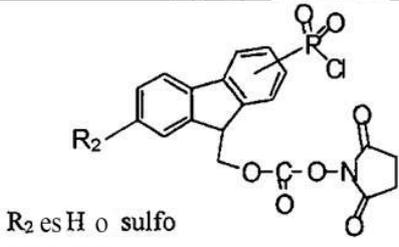
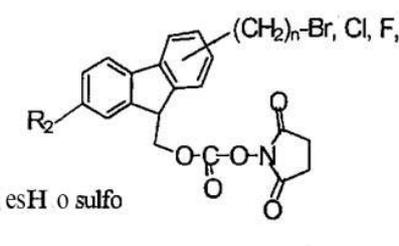
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Fmoc/FMS derivado	R ₅ -R ₆ -PEG	PEG derivado
 <p>R₂ es H o sulfo</p>	 <p>-HN-CO-R-N</p>	<p>PEG-SH</p>
 <p>R₂ es H o sulfo</p>	 <p>-S-N-CH₂-CH₂-PEG</p>	 <p>PEG-CH₂-CH₂-N</p>
 <p>R₂ es H o sulfo</p>	<p>-CO-O-PEG</p>	<p>PEG-OH</p>
	<p>-CO-NH-PEG</p>	<p>PEG-NH₂</p>

Esquema 7 (página c)

Fmoc/FMS derivado	R ₅ -R ₆ -PEG	PEG derivado
<p>5</p> <p>10</p>  <p>R₂ es H o sulfo</p>	<p>-NH-CO-NH-PEG</p>	<p>PEG-NH₂</p>
<p>15</p> <p>20</p>  <p>R₂ es H o sulfo</p>	<p>-SO₂-CH₂-CH₂-S-PEG</p>	<p>PEG-SH</p>
<p>25</p> <p>30</p>  <p>R₂ es H o sulfo</p>	<p>-SO₂-NH-PEG</p>	<p>PEG-NH₂</p>
<p>35</p>	<p>-SO₂-O-PEG</p>	<p>PEG-OH</p>
<p>40</p> <p>45</p>  <p>R₂ es H o sulfo</p>	<p>-CH₂-NH-PEG</p>	<p>PEG-NH₂</p>

Esquema 7 (página d)

Fmoc/FMS derivado	R ₅ -R ₆ -PEG	PEG derivado
 <p>R₂ es H o sulfo</p>	-PO ₂ -NH-PEG	PEG-NH ₂
 <p>R₂ es H o sulfo</p>	-(CH ₂) _{n-1} -CH ₂ -NH-PEG	PEG-NH ₂
	-(CH ₂) _{n-1} -CH ₂ -S-PEG	PEG-SH

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. FRIDKIN, Matityahu SHECHTER, Yoram TSubERY, Haim

<120> REVERSIBLE PEGYLATED DRUGS

<130> YEDA-041 PCT

<150> US 60/460,816

<151> 2003-04-08

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

ES 2 512 499 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal
 5
 <400> 1

 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 15
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 20
 <210> 2
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Sintético
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (40)..(40)
 <223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal
 <400> 2
 35
 His Ser Asp Gly Thr Phe Ile Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu
 1 5 10 15
 Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro
 20 25 30
 40
 Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35 40
 45
 <210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 3
 55

ES 2 512 499 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

5 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro
20 25 30

10 <210> 4
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

20 <400> 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

25 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Tyr
20 25 30

30 <210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Sintético

<400> 5

40 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

45 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
20 25 30

50 <210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Sintético

<220>
<221> MOD_RES

ES 2 512 499 T3

<222> (30)..(30)
<223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal

<400> 6

5

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	

10

Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly
			20					25					30

15

<210> 7
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Sintético

25

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(28)
<223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal

<400> 7

30

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	

35

Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn
			20					25			

40

<210> 8
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45

<220>
<223> Sintético

50

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal

<400> 8

55

ES 2 512 499 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

5 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

10 <210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (28)..(28)
 <223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal

<400> 9

25 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

30 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn
 20 25

<210> 10
 <211> 28
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal

45 <400> 10

50 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Ala Ile Glu Phe Leu Lys Asn
 20 25

55

ES 2 512 499 T3

5 <210> 11
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Sintético

 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (36)..(36)
 <223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal
 <400> 11

 Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
 1 5 10 15

 20 Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
 20 25 30

 25 Arg Gln Arg Tyr
 35

 30 <210> 12
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> Sintético

 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> AMIDACIÓN del residuo C-terminal
 <400> 12

 45 Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15

 50 Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

 55 Arg Tyr

ES 2 512 499 T3

<210> 13
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Humano
 5
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (7)..(23)
 <223> Péptido cíclico: enlace disulfuro a partir de la Cys en la posición 7 a la Cys en la posición 23
 10
 <400> 13

 15 Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly
 1 5 10 15

 Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
 20 25
 20

 <210> 14
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 14
 25

 30 Ala Glu Ile Ser Gly Gln Leu Ser Tyr Val Arg Asp Val Asn Ser Trp
 1 5 10 15

 Gln His Ile Trp Thr Asn Val Ser Ile Glu Asn
 20 25
 35

Reivindicaciones

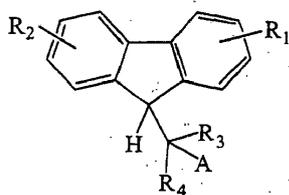
1. Un compuesto de la fórmula:



en donde

Y es una porción de un droga que contiene al menos un grupo funcional que se selecciona de amino libre, carboxilo, fosfato, hidroxilo y/o mercapto, y

X es un radical de la fórmula:



en donde:

R₁ es un radical que contiene una porción de polietilenglicol (PEG) lineal o ramificada con un peso molecular en el intervalo de 5000 a 40000 Da;

R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, (C1-C8)alquilo, (C1-C8) alcoxi, (C1-C8)alcoxialquilo, (C6-C10)arilo, (C1-C8)alcarilo, (C6-C10)ar(C1-C8)alquilo, halógeno, nitro, -SO₃H, -SO₂NHR, amino, amonio, carboxilo, PO₃H₂, y OPO₃H₂;

R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, (C1-C8)alquilo y (C6-C10)arilo;

R₃ y R₄, iguales o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, (C1-C8)alquilo y (C6-C10)arilo;

A es un enlace covalente cuando el radical se une a un grupo carboxilo, fosfato o mercapto del fármaco Y o A es -OCO- cuando el radical se une a un grupo amino o hidroxilo del fármaco Y;

n es un entero de al menos uno,

y sales farmacéuticamente aceptables de éste.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₂, R₃ y R₄ cada uno es hidrógeno y A es -OCO- (de aquí en adelante "Fmoc").

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₂ es -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno, R₃ y R₄ cada uno es hidrógeno, y A es -OCO- (de aquí en adelante "FMS").

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₁ es un radical de la fórmula:

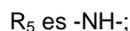


en donde

R₅ se selecciona del grupo que consiste en -NH-, -S-, -CO-, -COO-, -CH₂-, -SO₂-, -SO₃-, -PO₂-, y -PO₃-, y

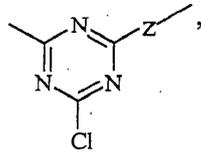
R₆ es un enlace o un radical a través del cual la porción de polietilenglicol (PEG) se une covalentemente a R₅.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:



R₆ se selecciona del grupo que consiste en -CO-, -COO-, -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CO-NH-, -CS-NH-, -CO-CH₂-NH-CO-, -CO-CH(CH₃)-NH-CO-, -CO-CH₂-NH-CO-NH,

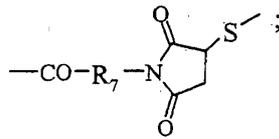
5



10

y

15



20

Z es O, S o NH que se une a la porción PEG; y

R₇ se selecciona del grupo que consiste de un alquileo C1-C18 lineal o ramificado, un fenileno, un radical oxialquileo que tiene 3-18 átomos de carbono en la cadena principal, un residuo de un péptido que contiene 2-10 residuos de aminoácidos, y un residuo de un sacárido que contiene 1-10 residuos de un monosacárido.

25

6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, en donde el radical R₁ contiene una porción ramificada de PEG que tiene un peso molecular de 40000 Da o de 5000 Da.

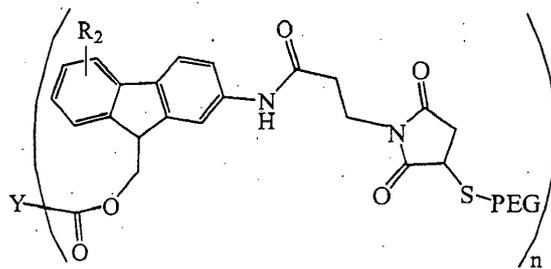
30

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde Y es una porción de un fármaco que contiene al menos un grupo amino, tal como un aminoglucósido antibiótico, preferentemente gentamicina o anfotericina; un fármaco antineoplásico, preferentemente ácido aminolevulínico, daunorrubicina o doxorubicina; o un péptido o un fármaco proteico de peso molecular bajo o medio, tal como la insulina, preferentemente la insulina humana, un interferón tal como el IFN- α 2, un agonista de PYY tal como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tal como la exendina-3 y la exendina-4 y los análogos y agonistas de las exendinas, el péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humano (hGH), la eritropoyetina, el TNF- α , la calcitonina, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o un análogo de ella, la hirudina, el glucagón, o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como el fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF- α .

35

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 de la fórmula:

40



50

55

en donde

R₂ es H o -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno,

Y es el residuo de un fármaco que contiene al menos un grupo amino, y

PEG es una porción lineal o ramificada de PEG que tiene un peso molecular en el intervalo de 5000 a 40000 Da, preferentemente la porción PEG es una molécula ramificada de 40000 Da o 5000 Da.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde R₂ es H, que se designa en la presente invención como conjugado (PEG-Fmoc)_n-fármaco.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en donde n es un entero de 1 a 3, preferentemente 1 o 2.

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el fármaco es un fármaco aminoglucósido antibiótico como la gentamicina o la anfotericina B; un fármaco antineoplásico tal como el ácido aminolevulínico, la daunorrubicina o la doxorubicina; o un péptido o un fármaco proteico de peso molecular bajo o medio tal como la insulina, preferentemente la insulina humana, un interferón tal como el IFN-α₂, un agonista de PYY tal como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tal como la exendina-3 y la exendina-4 y los análogos y agonistas de la exendina, el péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humano (hGH), la eritropoyetina, el TNF-α, la calcitonina, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o un análogo de ella, la hirudina, el glucagón, o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como el fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF-α.

12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde R₂ es -SO₃H, que se designa en la presente invención como (PEG-FMS)_n-fármaco.

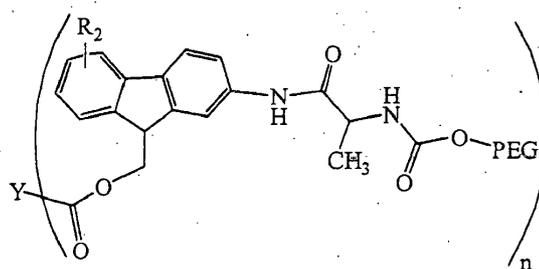
13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, en donde n es un entero de 1 a 3, preferentemente 1 o 2.

14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 10 o 13, en donde la porción PEG es una molécula ramificada con un peso molecular de 40000 Da o 5000 Da.

15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el fármaco es un fármaco aminoglucósido antibiótico tal como la gentamicina o anfotericina B; un fármaco antineoplásico tal como el ácido aminolevulínico, la daunorrubicina o la doxorubicina; o un péptido o un fármaco proteico de peso molecular bajo o medio, tal como la insulina, preferentemente la insulina humana, un interferón tal como el IFN-α₂, un agonista de PYY como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tal como la exendina-3 y la exendina-4 y los análogos y agonistas de las exendinas, el péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humano (hGH), la eritropoyetina, el TNF-α, la calcitonina, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o un análogo de ella, la hirudina, el glucagón, o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como el fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF-α.

16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho péptido o fármaco proteico es la insulina humana, que se identifica en la presente invención como el conjugado PEG₄₀-FMS-insulina; el IFN-α₂, que se identifica en la presente invención como el conjugado PEG₄₀-FMS-IFN-α₂ o (PEG₄₀-FMS)₂-IFN-α₂; el PYY₃₋₃₆ [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:12], que se identifica en la presente invención como el conjugado PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆; la hormona de crecimiento humano (hGH), que se identifica en la presente invención como el conjugado PEG₄₀-FMS-hGH o el (PEG₄₀-FMS)₂-hGH; el péptido natriurético atrial (ANP) [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:13], que se identifica en la presente invención como el conjugado PEG₄₀-FMS-ANP; la exendina-4 [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1], que se identifica en la presente invención como el conjugado PEG₄₀-FMS-exendina-4; la exendina-3 [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2]; o dicho agonista de la exendina se selecciona del grupo que consiste de [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9], y [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10].

17. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 de la fórmula:



en donde

R₂ es H o -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno,

Y es el residuo de un fármaco que contiene al menos un grupo amino, y

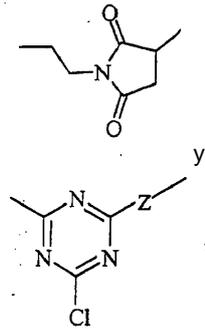
El PEG es una porción lineal o ramificada de PEG que tiene un peso molecular en el intervalo de 5000 a 40000 Da, preferentemente la porción PEG es una molécula ramificada de 40000 Da o 5000 Da.

18. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 17, en donde Y es una porción de un fármaco que contiene al menos un grupo amino, tal como un aminoglucósido antibiótico, preferentemente gentamicina o anfotericina B; un fármaco antineoplásico, preferentemente el ácido aminolevulínico, la daunorrubicina o la doxorrubicina; o un péptido o un fármaco proteico de peso molecular bajo o medio, tal como la insulina, preferentemente la insulina humana, un interferón tal como el IFN-α₂, un agonista de PYY tal como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tal como la exendina-3 y la exendina-4 y los análogos y agonistas de las exendinas, el péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humana (hGH), la eritropoyetina, el TNF-α, la calcitonina, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o un análogo de ella, la hirudina, el glucagón, o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como el fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF-α.

19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:

R₅ es -S-; y

R₆ se selecciona del grupo que consiste de

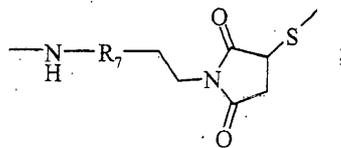
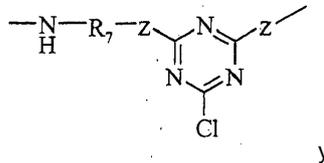


en donde Z es O, S o NH.

20. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:

R₅ es -CO-;

R₆ se selecciona del grupo que consiste en -O-, -NH-, -NH-R₇-COO-, -NH-R₇-NH-, -NH-R₇-CO-NH-,



Z es O, S o NH; y

R₇ se selecciona del grupo que consiste de un alquileo C1-C18 lineal o ramificado, un fenileno, un radical oxialquileno que tiene 3-18 átomos de carbono en la cadena principal, un residuo de un péptido que contiene 2-10 residuos de aminoácidos, y un residuo de un sacárido que contiene 1-10 residuos de monosacárido.

21. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:

R₅ es -CH₂-;
y R₆ es -(CH₂)_n-S- o -(CH₂)_n-NH-, en donde n es 0 a 18.

22. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:

R₅ es -SO₂-; y
R₆ es -O-; -NH- o -CH₂-CH₂-S-.

23. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:

R₅ es -PO₂-; y
R₆ es -O- o -NH-.

24. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 19 a la 23, en donde el radical R₁ contiene una porción PEG ramificada que tiene un peso molecular de 40000 Da o 5000 Da.

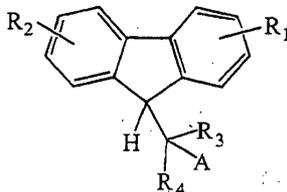
25. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 24, en donde Y es una porción de un fármaco que contiene al menos un grupo amino, tal como un aminoglucósido antibiótico, preferentemente gentamicina o anfotericina B; un fármaco antineoplásico, preferentemente el ácido aminolevulínico, la daunorrubicina o la doxorrubicina; o un péptido o un fármaco proteico de peso molecular bajo o medio, tal como la insulina, preferentemente la insulina humana, un interferón tal como el IFN-α₂, un agonista de PYY tal como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tal como la exendina-3 y la exendina-4 y los análogos y agonistas de las exendinas, el péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humano (hGH), la eritropoyetina, el TNF-α, la calcitonina, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o un análogo de ella, la hirudina, el glucagón, o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como el fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF-α.

26. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula:



en donde

Y es una porción de un droga que contiene al menos un grupo funcional que se selecciona entre el amino libre, el carboxilo, el fosfato, el hidroxilo y/o el mercapto, y
X es un radical de la fórmula:



en donde:

R₁ es un radical que contiene una porción de polietilenglicol (PEG);

R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, (C1-C8)alquilo, (C1-C8) alcoxi (C1-C8)alcoxialquilo, (C6-C10)arilo, (C1-C8)alcarilo, (C6-C10)ar(C1-C8)alquilo, halógeno, nitro, -SO₃H, -SO₂NHR, amino, amonio, carboxilo, PO₃H₂, y OPO₃H₂;

R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, (C1-C8)alquilo y (C6-C10)arilo;

R₃ y R₄, iguales o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, (C1-C8)alquilo y (C6-C10)arilo;

A es un enlace covalente cuando el radical se une a un grupo carboxilo, fosfato o mercapto del fármaco Y, o A es -OCO- cuando el radical se une a un grupo amino o hidroxilo de la droga Y; y

n es un número entero de al menos uno,

o una sal farmacéuticamente aceptable de ella, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

27. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 26, en donde R₁ es un radical de la fórmula:



en donde

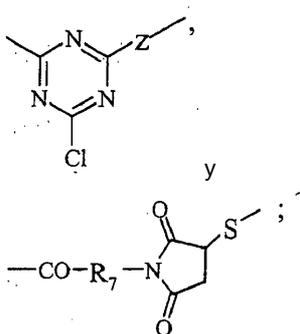
R₅ se selecciona del grupo que consiste en -NH-, -S-, -CO-, -COO-, -CH₂-, -SO₂-, -SO₃-, -PO₂-, y -PO₃-; y

R₆ es un enlace o un radical a través del cual la porción PEG se une covalentemente a R₅.

28. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 27, en donde

R₅ es -NH-;

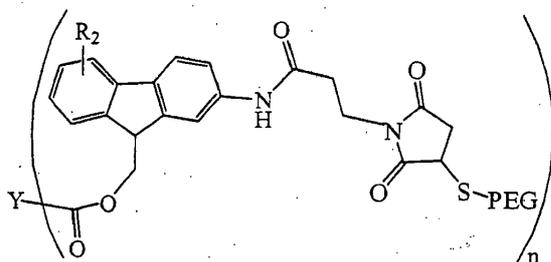
R₆ se selecciona del grupo que consiste en -CO-, -COO-, -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CO-NH-, -CS-NH-, -CO-CH₂-NH CO-, -CO-CH(CH₃)-NH-CO-, -CO-CH₂-NH-CO-NH,



Z es O, S o NH que se une a la porción PEG; y

R₇ se selecciona del grupo que consiste de un alquileo C1-C18 lineal o ramificado, un fenileno, un radical oxialquileo que tiene 3-18 átomos de carbono en la cadena principal, un residuo de un péptido que contiene 2-10 residuos de aminoácidos, y un residuo de un sacárido que contiene 1-10 residuos de monosacárido.

29. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 28, en donde dicho compuesto tiene la fórmula:



en donde

R₂ es H o -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno,

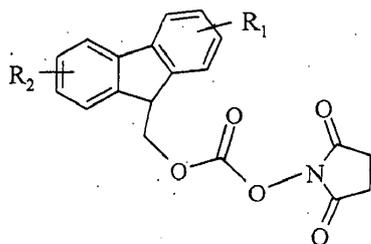
Y es el residuo de un fármaco que contiene al menos un grupo amino, y

El PEG es una porción PEG lineal o ramificada con un peso molecular en el intervalo de 200 a 200000 Da, preferentemente en el intervalo de 5000 a 40000 Da, con mayor preferencia la porción PEG es una molécula ramificada de 40000 Da o 5000 Da.

30. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 27 que comprende un compuesto que se designa en la presente invención como conjugado (PEG-FMS)_n-fármaco, en donde R₂ es -SO₃H; n es un entero del 1 al 3, preferentemente 1 o 2; el PEG es preferentemente una molécula ramificada de 40000 Da o de 5000 Da; y el fármaco es un aminoglucósido antibiótico, fármaco tal como la gentamicina o la anfotericina B; un fármaco antineoplásico, tal como el ácido aminolevulínico, la daunorrubicina o la doxorrubicina; o un péptido o un fármaco proteico de peso molecular bajo o medio, tal como la insulina, preferentemente la insulina humana, un interferón tal como el IFN-α₂, un agonista de PYY tal como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tal como la exendina-3 y la exendina-4 y los análogos y agonistas de las exendinas, el péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humano (hGH), la eritropoyetina, el TNF-α, la calcitonina, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o un análogo de ella, la hirudina, el glucagón, o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como el fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF-α.
31. Un conjugado FMS pegilado de insulina de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus y la hiperglicemia.
32. Un conjugado FMS pegilado de IFN-α₂, preferentemente el PEG₄₀-FMS-IFN-α₂ o el (PEG₄₀-FMS)₂-IFN-α₂, de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de una enfermedad viral tal como la hepatitis B o la hepatitis C, o para el tratamiento del cáncer, como el cáncer de vejiga, el cáncer de ovario, el melanoma, el cáncer de páncreas, el linfoma no Hodgkin, la leucemia de células peludas, o el sarcoma de Kaposi que se relaciona con el SIDA.
33. Un conjugado FMS pegilado de PYY₃₋₃₆, preferentemente el PEG₄₀-FMS-PYY₃₋₃₆, de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en la reducción de la ingesta de alimentos y para el tratamiento de la obesidad y las enfermedades, afecciones o trastornos que se pueden aliviar mediante la reducción de la ingesta de alimentos tales como la hipertensión, la dislipidemia, el riesgo cardiovascular, la resistencia a la insulina, y la diabetes mellitus.
34. Un conjugado FMS pegilado de la hGH, preferentemente el PEG₄₀-FMS-hGH o el (PEG₄₀-FMS)₂-hGH, de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de niños de baja estatura patológicamente, o para el tratamiento anti-envejecimiento.
35. Un conjugado FMS pegilado de ANP, preferentemente el PEG₄₀-FMS-ANP, de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, la insuficiencia cardíaca congestiva, la hipertensión, la insuficiencia renal aguda o el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS).
36. Un conjugado FMS pegilado de una exendina o agonista de la exendina, preferentemente [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:4], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:6], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8], [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9] o [SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10], de acuerdo con la reivindicación 16,

para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus dependiente de la insulina, la diabetes mellitus no dependiente de insulina, o la Diabetes mellitus gestacional, o para la prevención de la hiperglucemia.

37. Un compuesto intermedio de la fórmula:



en donde:

R₁ es un radical de la fórmula:

-R₅-R₆-B;

R₂ es H o -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno;

B es maleimido, -S-CO-CH₃ o una porción PEG; -

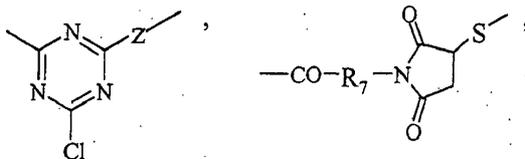
R₅ se selecciona del grupo que consiste en -NH-, -S-, -CO-, -COO-, -CH₂-, -SO₂-, -SO₃-, -PO₂-, y -PO₃-; y

R₆ es un enlace o un radical por el cual el maleimido, -S-CO-CH₃ o porción PEG se une a R₅.

38. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 37, en donde:

R₅ es -NH-;

R₆ se selecciona del grupo que consiste en -CO-, -COO-, -CH₂-, -CH(CH₃)-, CO-NH-, -CS-NH-, -CO-CH₂;NH-CO-, -CO-CH(CH₃)-NH-CO-, -CO-CH₂-NH-CO-NH,



y -CO-R₈-;

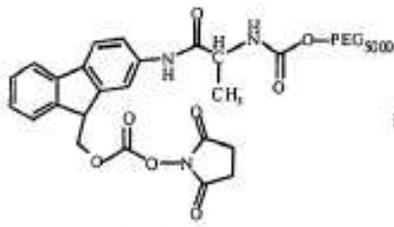
Z es O, S o NH;

R₇ se selecciona del grupo que consiste en un alquileo C1-C18 lineal o ramificado, un fenileno, un radical oxialquileo que tiene 3-18 átomos de carbono en la cadena principal, un residuo de un péptido que contiene 2-10 residuos de aminoácidos, y un residuo de un sacárido que contiene 1-10 residuos de monosacárido; y

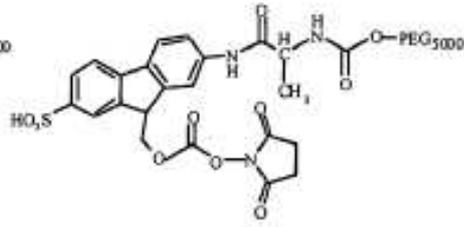
R₈ es un alquileo C1-C8 lineal o ramificado, preferentemente etileno, cuando B es maleimido o -S-CO-CH₃.

39. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 38 identificado en la presente descripción como Precursores 1-8 de la fórmulas:

5

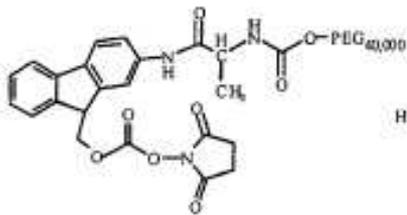


Precursor 1

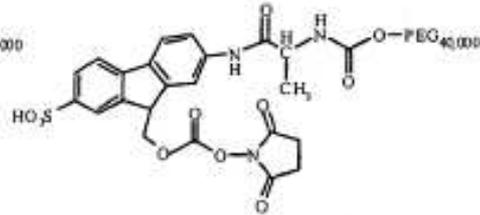


Precursor 2

10



Precursor 3

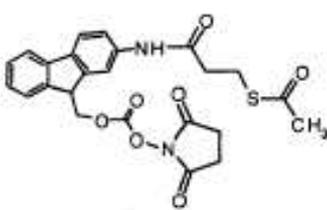


Precursor 4

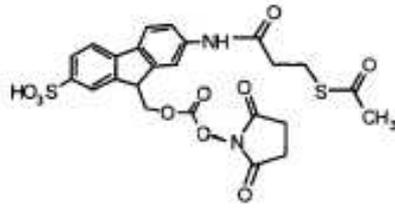
15

20

25



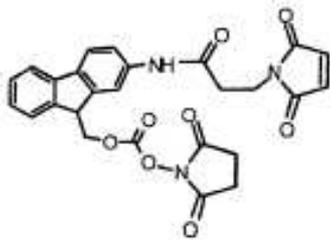
Precursor 5



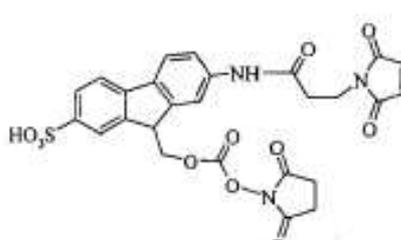
Precursor 6

30

35



Precursor 7



Precursor 8

40

45

50

40. Un conjugado en la presente invención identificado por la fórmula:



55

en donde Y es una porción de un péptido o fármaco proteico que se selecciona del grupo que consiste de insulina, IFN- α 2, PYY₃₋₃₆, exendina-4, hGH y ANP, n es un número entero de al menos uno, preferentemente 1 o 2, y Y se une al radical FMS través de un grupo amino, y MAL-FMS es 2-(maleimido-propionil amino)-7-sulfo-fluoreno-9-il-metoxi-carboniloxi.

5

41. Un método para la preparación de un conjugado designado en la presente invención como (PEG-FMS)_n-fármaco de la reivindicación 13, en donde el FMS es el 2-sulfo -9 radical-fluorenilmetoxicarbonilo, n es un entero del 1 al 3, preferentemente 1 o 2, más preferentemente 1, y el fármaco es un péptido o un fármaco proteico de peso molecular bajo o medio, que comprende:

10

- (i) hacer reaccionar un péptido o fármaco proteico de peso molecular bajo o medio con al menos un equivalente de MAL-FMS-NHS, obteniendo así un conjugado (MAL-FMS)_n-péptido/fármaco proteico; y
- (ii) hacer reaccionar el conjugado (MAL-FMS)_n-péptido/fármaco proteico con el PEG-SH, para obtener así el conjugado (PEG -FMS)_n-péptido/fármaco proteico.

15

42. Un método de acuerdo con la reivindicación 41, en donde dicho péptido o proteína es la insulina, un interferón tal como el IFN- α 2, un agonista de PYY tal como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tal como la exendina-3 y la exendina-4 y los análogos y agonistas de la exendina, el péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humana (hGH), la eritropoyetina, el TNF- α , la calcitonina, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o un análogo de ella, la hirudina, el glucagón, o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como el fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF- α .

20

43. Un método para la preparación de un conjugado que se designa en la presente invención como (PEG-FMS)_n-fármaco de la reivindicación 13, en donde el FMS es el 2-sulfo-9 radical-fluorenilmetoxicarbonilo, n es un entero del 1 al 3, preferentemente 1 o 2, más preferentemente 1, y el fármaco es un péptido o un fármaco proteico de peso molecular bajo o medio, que comprende:

25

- (i) hacer reaccionar el MAL-FMS-NHS con el PEG-SH, para obtener así un conjugado PEG-FMS-NHS; y
- (ii) hacer reaccionar un péptido o fármaco proteico de peso molecular bajo o medio con al menos un equivalente de conjugado PEG-FMS-NHS, para obtener así el conjugado (PEG-FMS)_n-péptido/fármaco proteico.

30

44. Un método según la reivindicación 41 o 43, en donde la porción PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 5000 a 40000 Da, preferentemente la porción PEG es una molécula ramificada de 40000 Da o 5000 Da.

35

45. Un método según la reivindicación 43, en donde dicho péptido o proteína es la insulina, un interferón tal como el IFN- α 2, un agonista de PYY tal como el péptido PYY₃₋₃₆, una exendina tal como la exendina-3 y la exendina-4 y los análogos y agonistas de la exendina, el péptido natriurético atrial (ANP), la hormona de crecimiento humana (hGH), la eritropoyetina, el TNF- α , la calcitonina, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la hirudina, el glucagón, o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como el fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TNF- α .

40

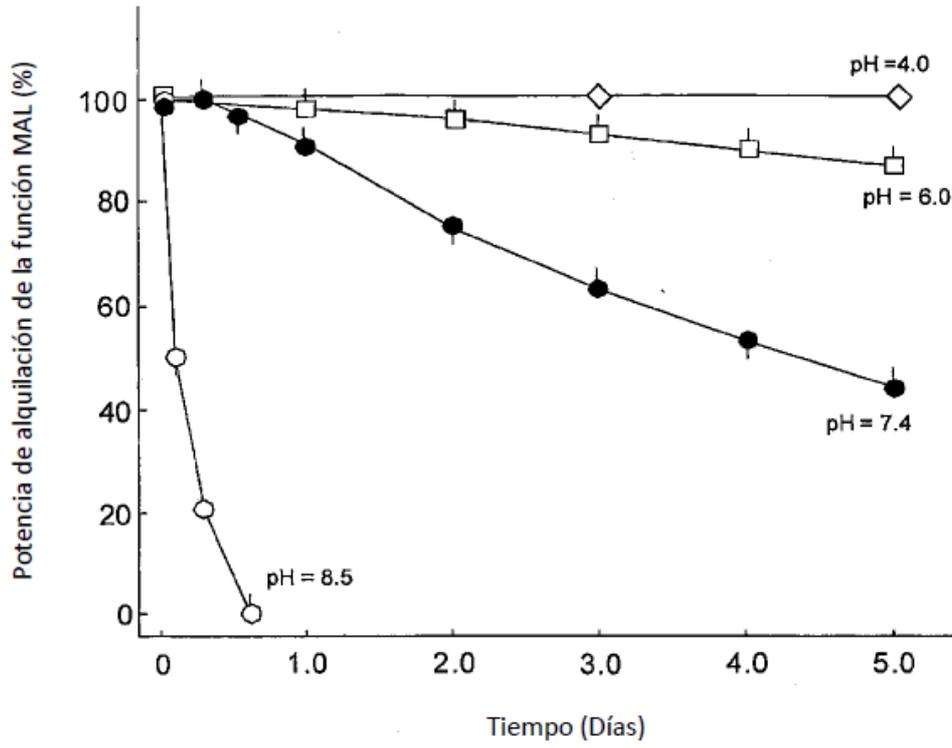


Fig. 1

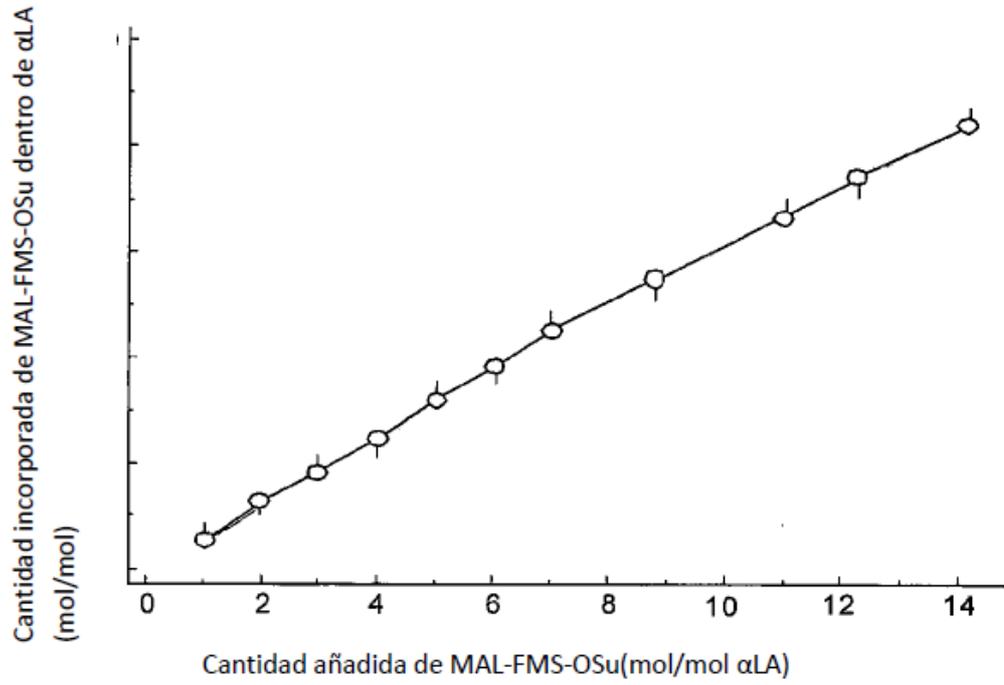


Fig. 2

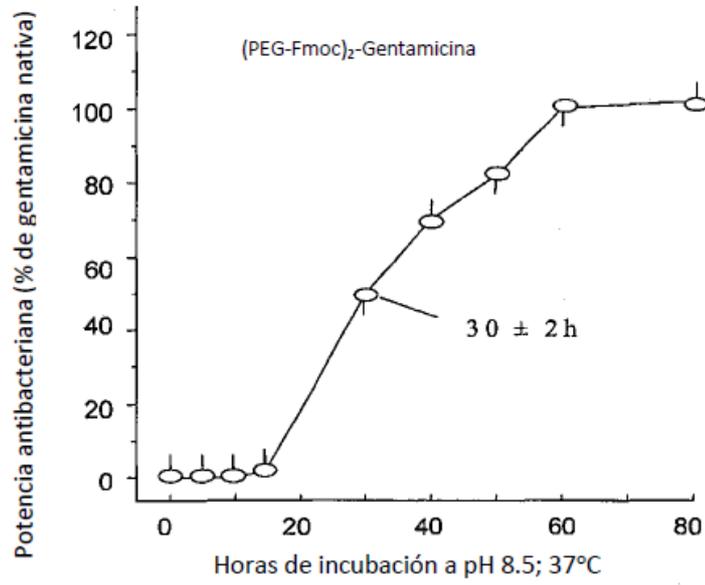


Fig. 3A

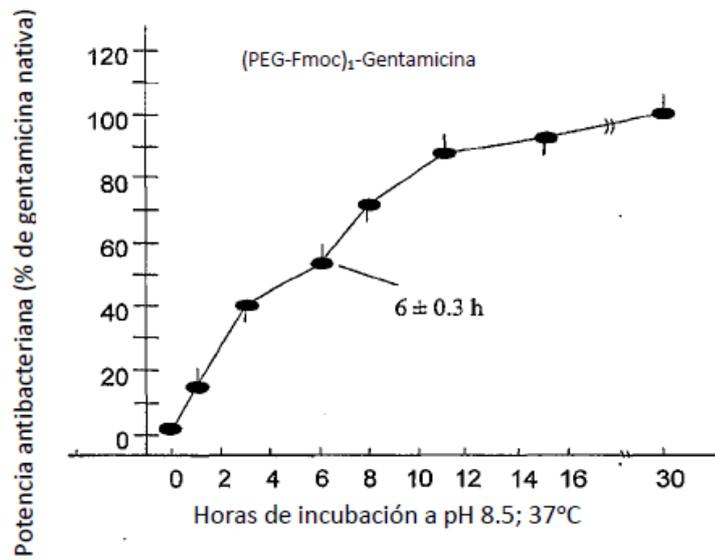


Fig. 3B

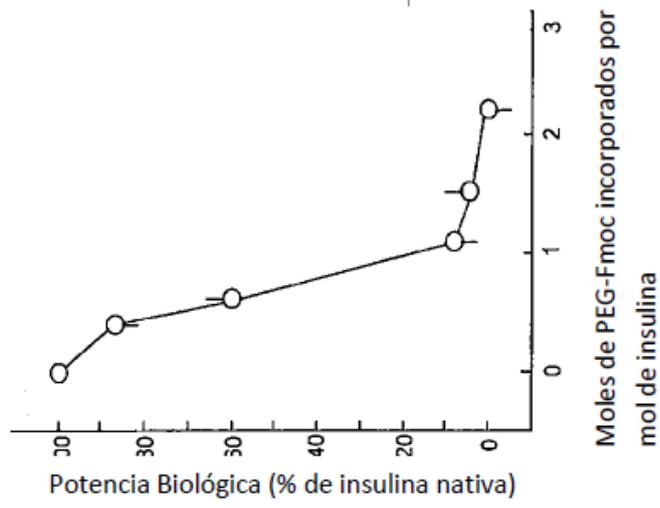


Fig. 4B

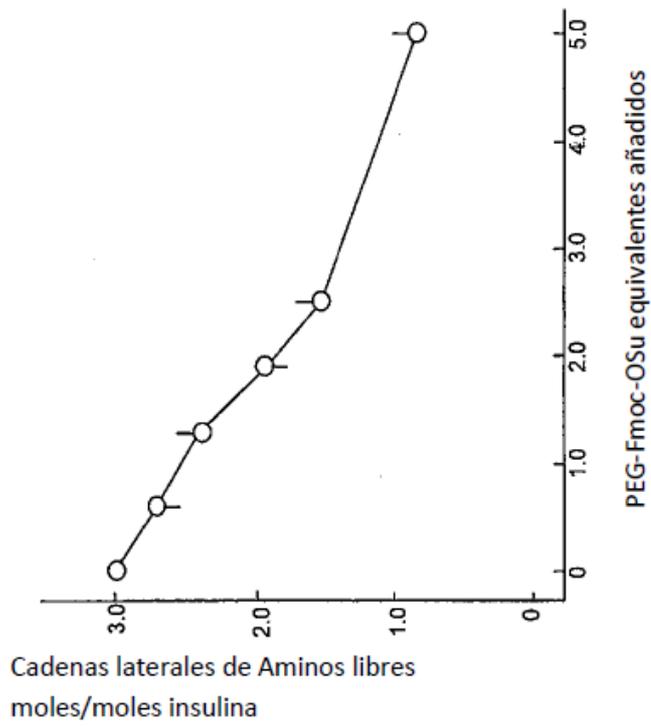


Fig. 4A

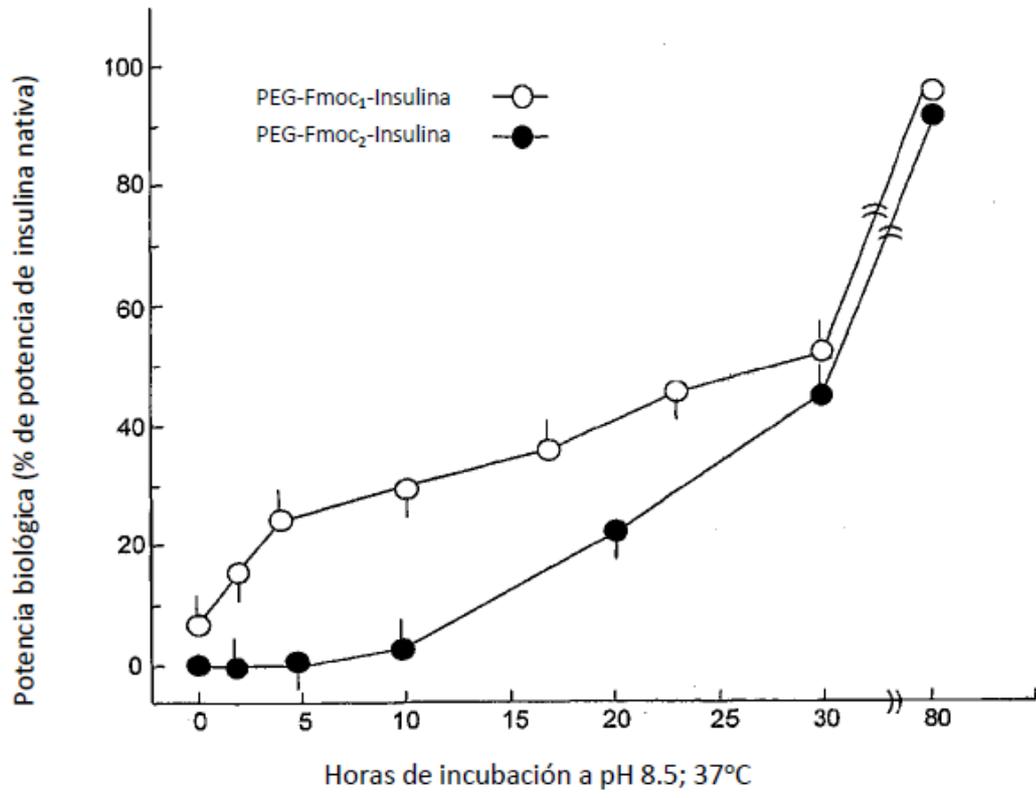


Fig. 5

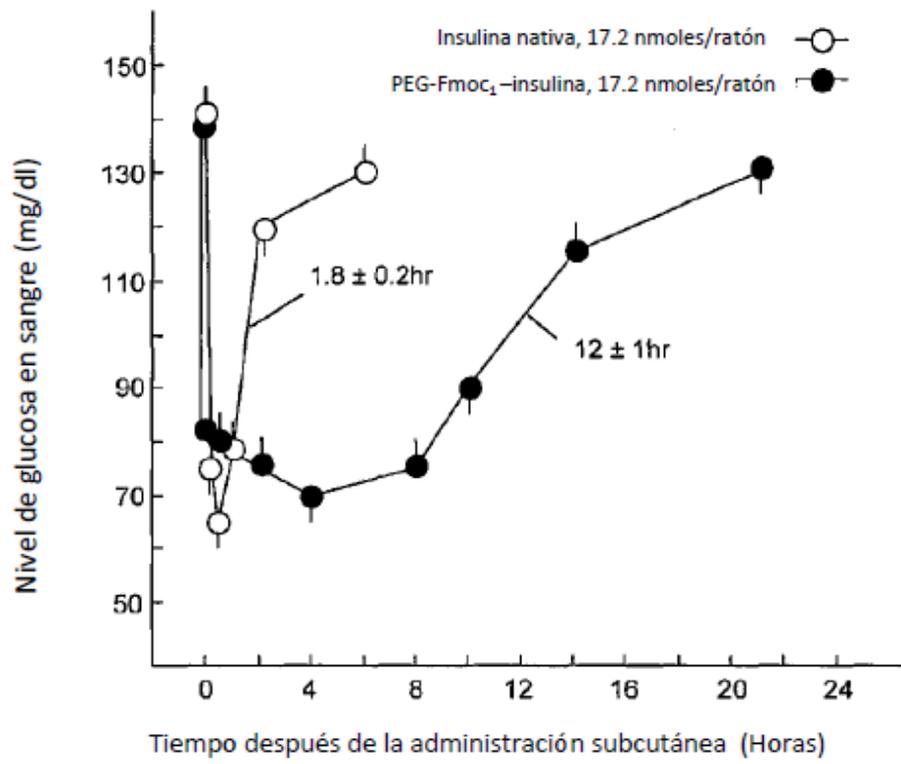


Fig. 6

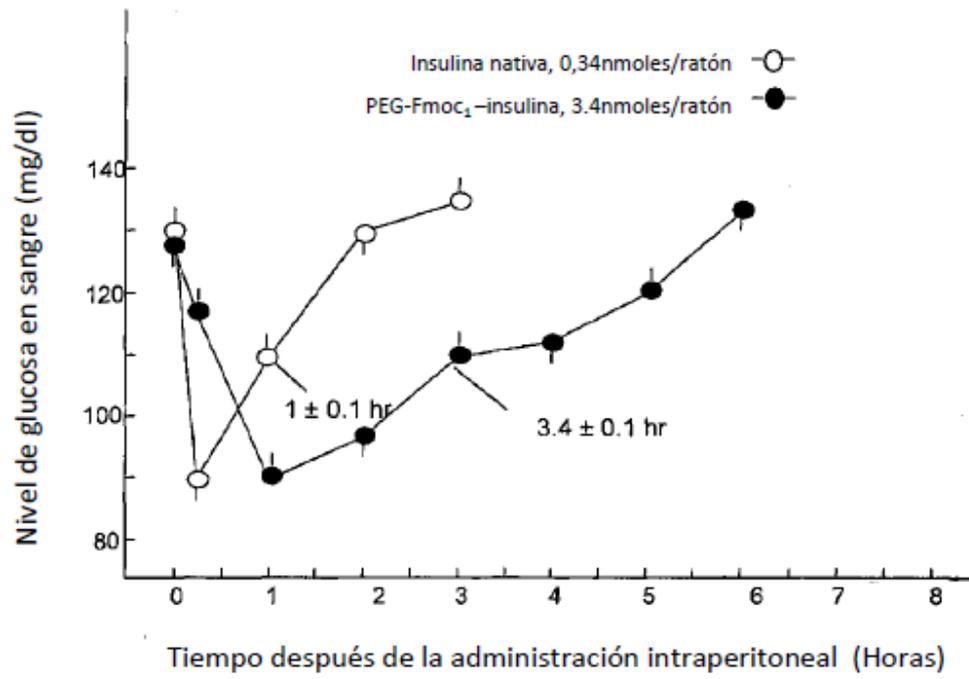


Fig. 7

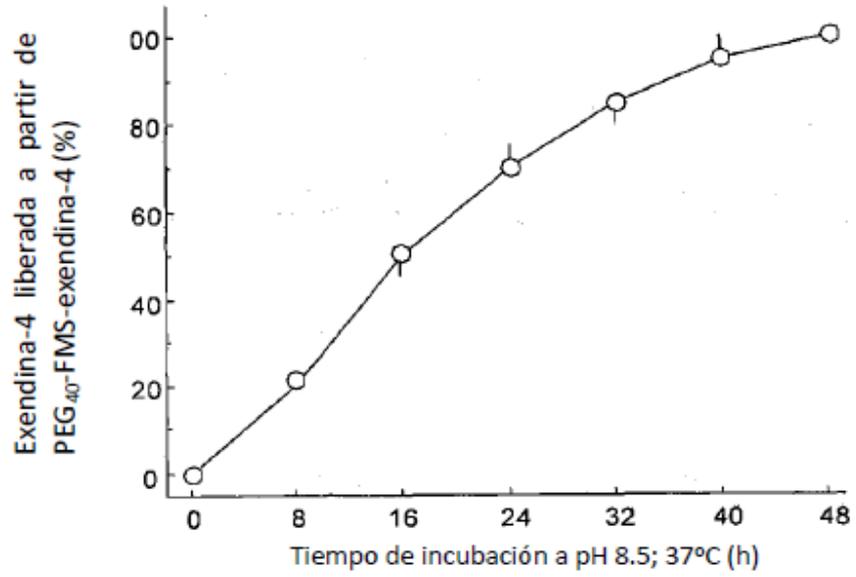


Fig. 8

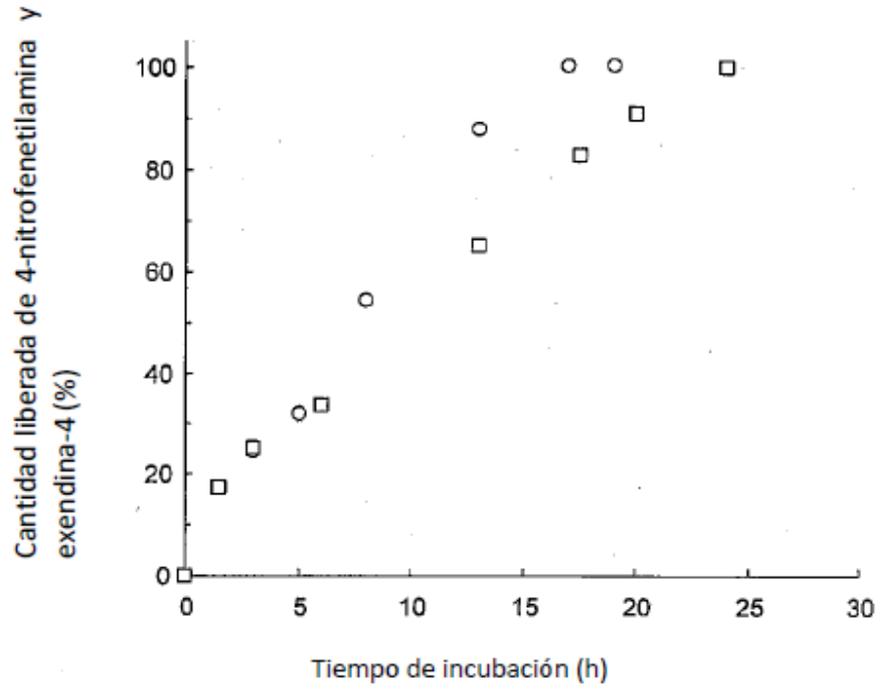


Fig. 9

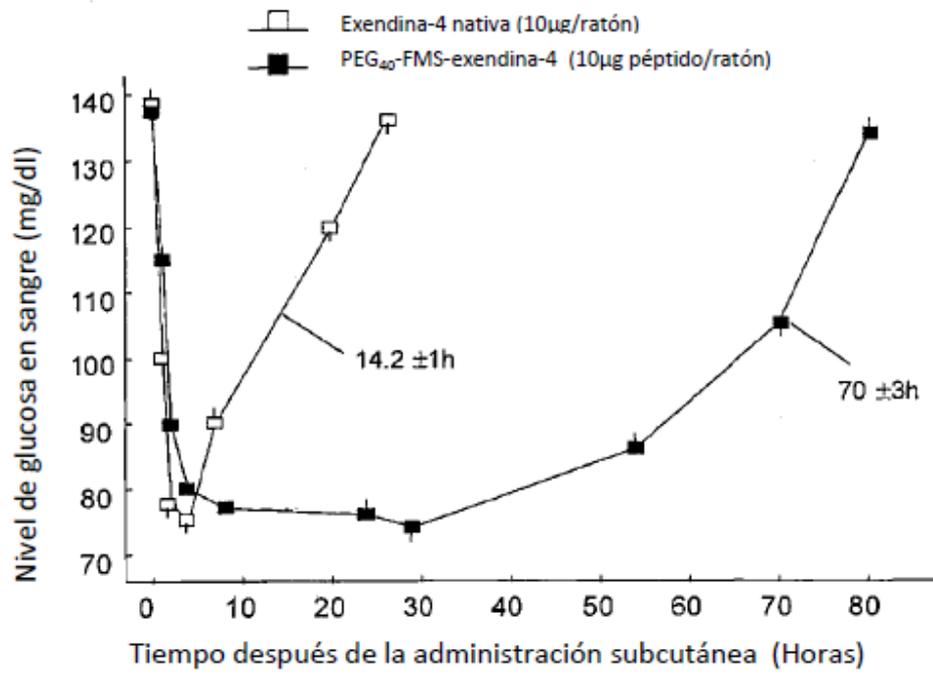


Fig. 10A

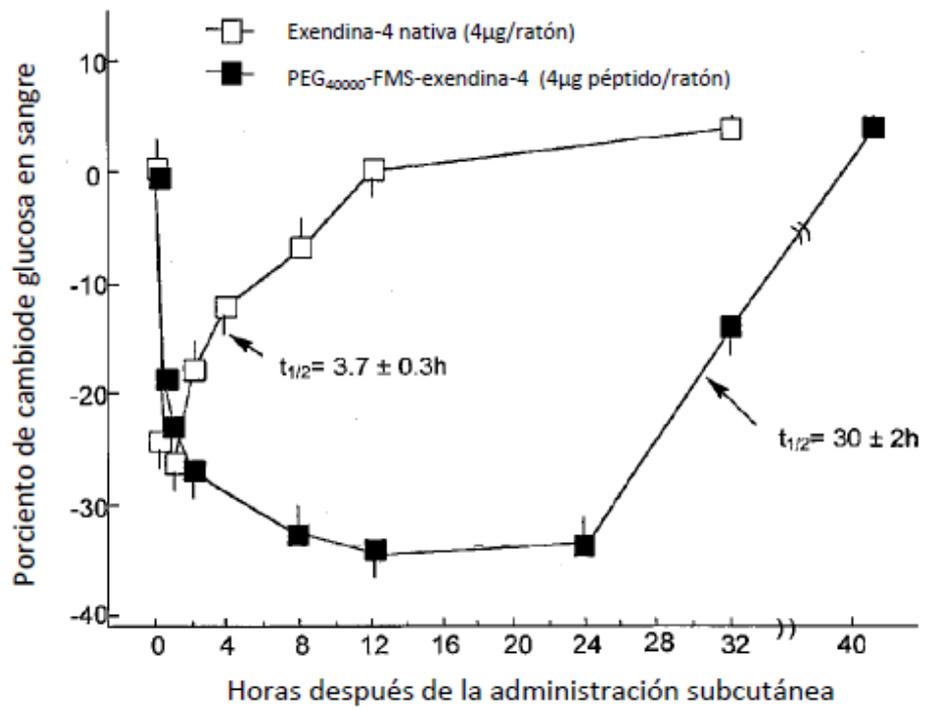


Fig. 10B

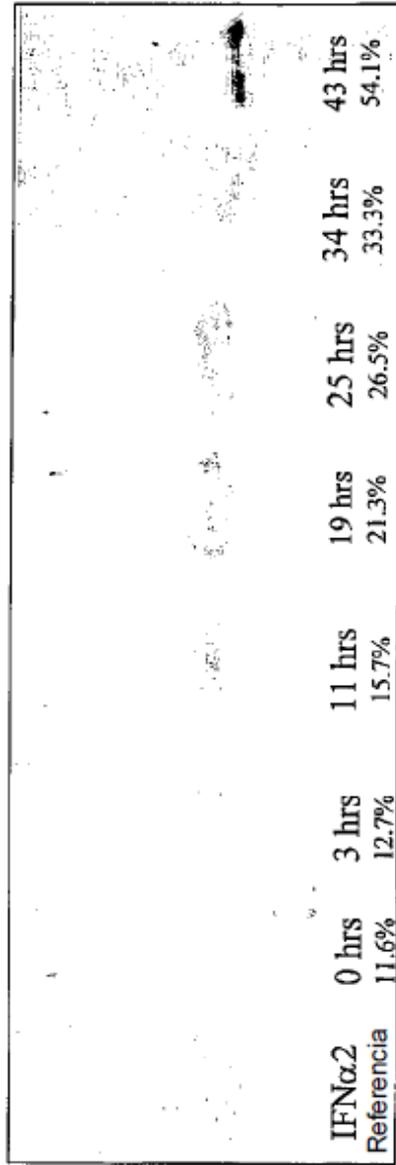


Fig. 11A

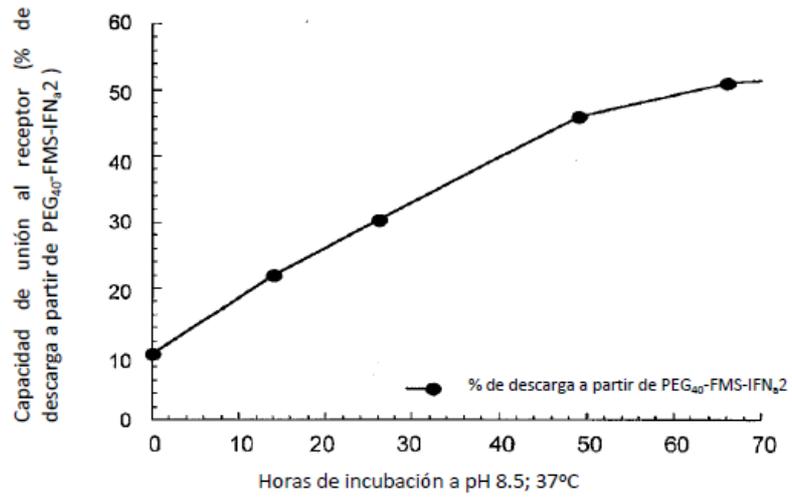


Fig. 11B

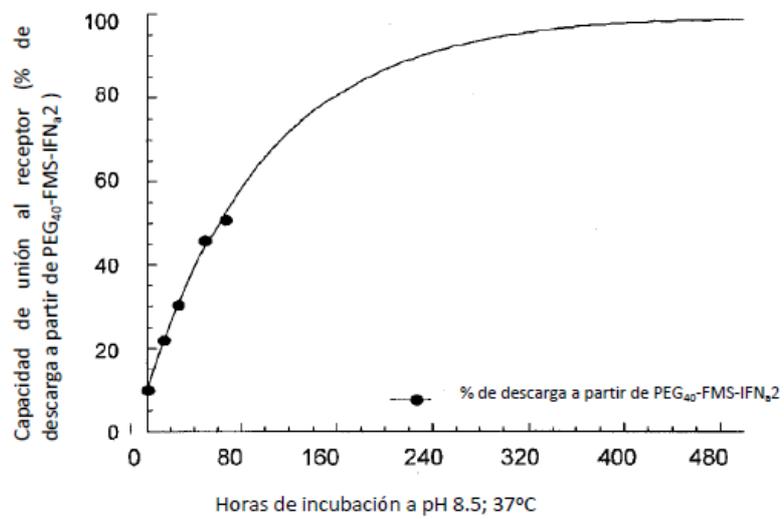


Fig. 11C

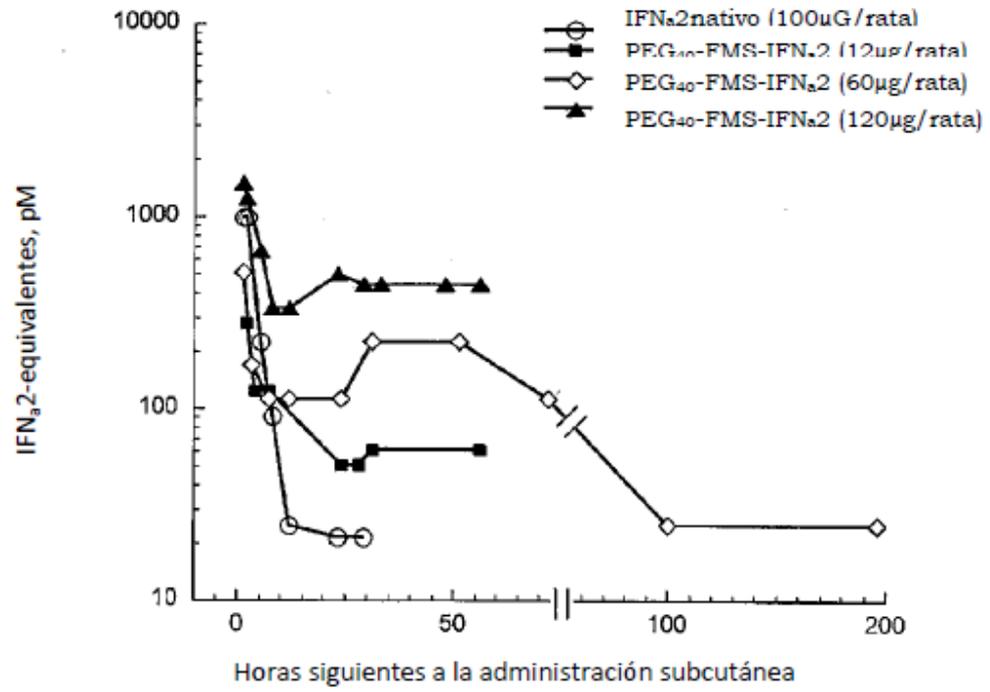


Fig. 12

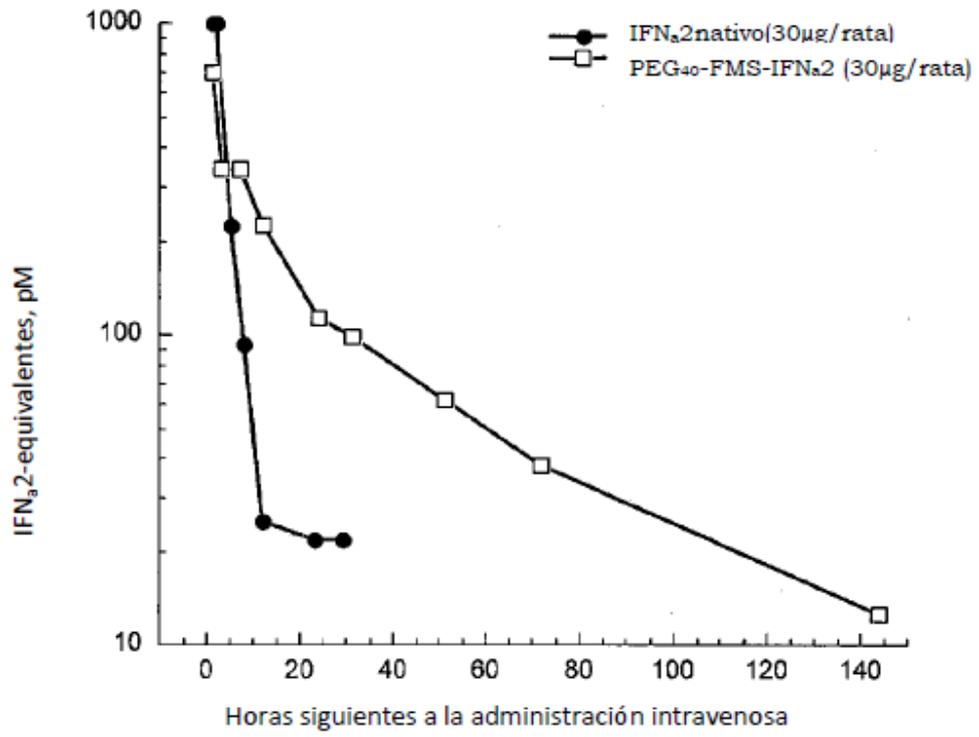


Fig. 13

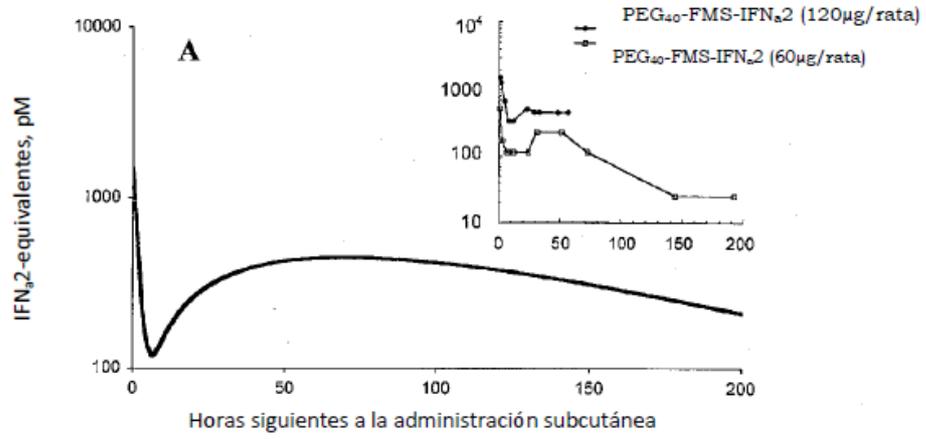


Fig. 14A

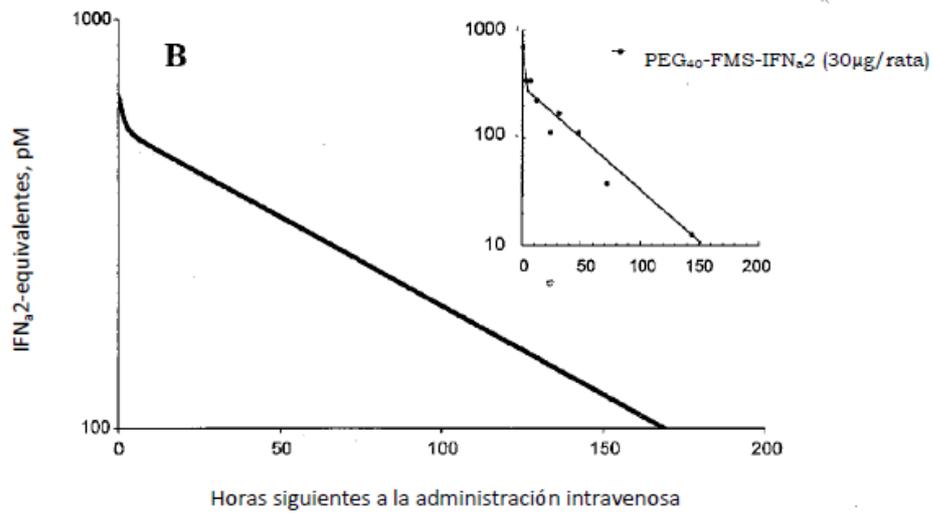


Fig. 14B

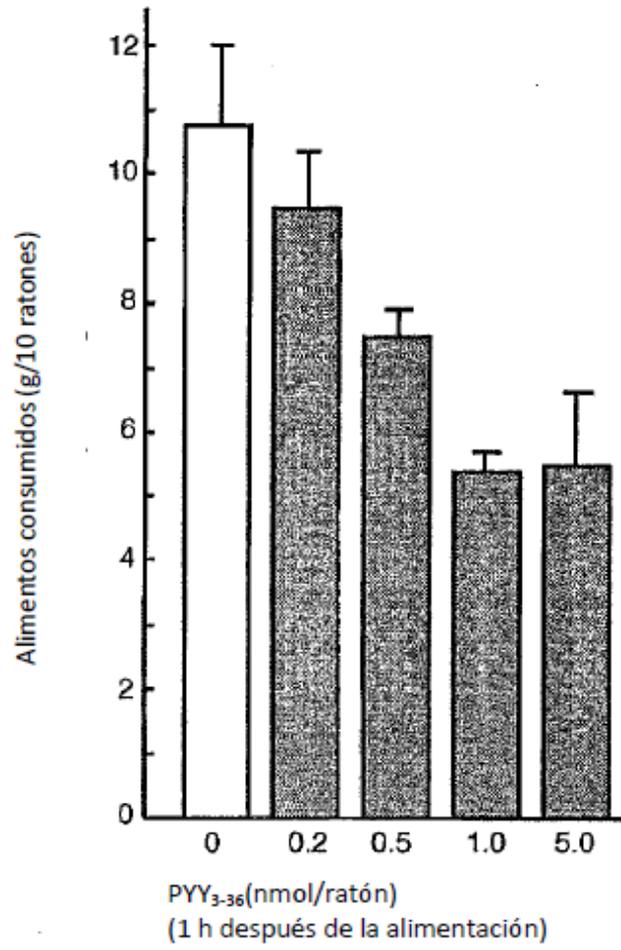


Fig. 15

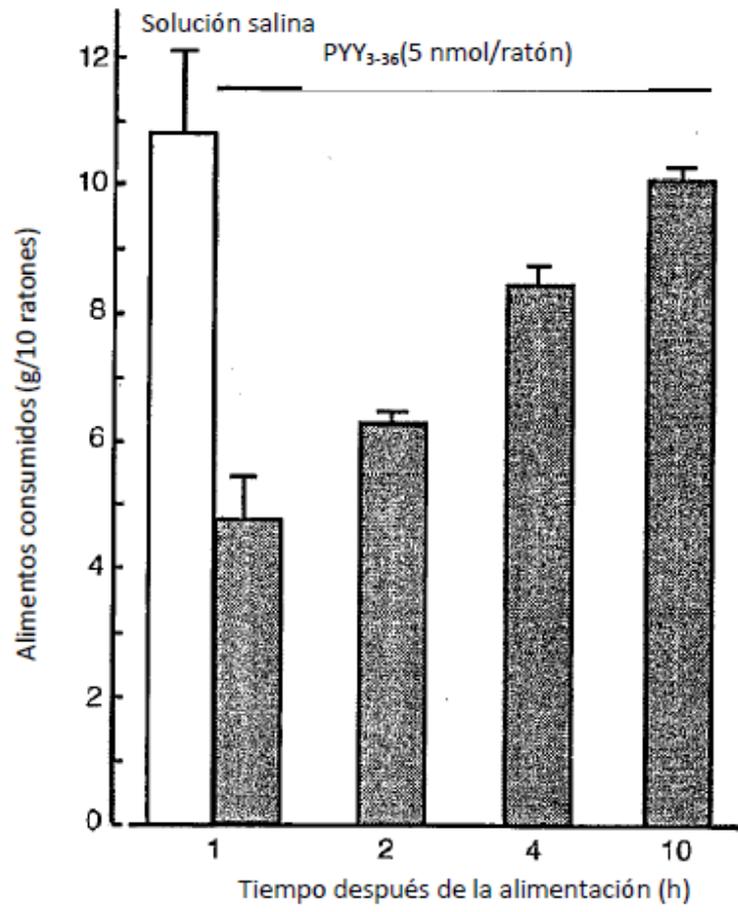


Fig. 16

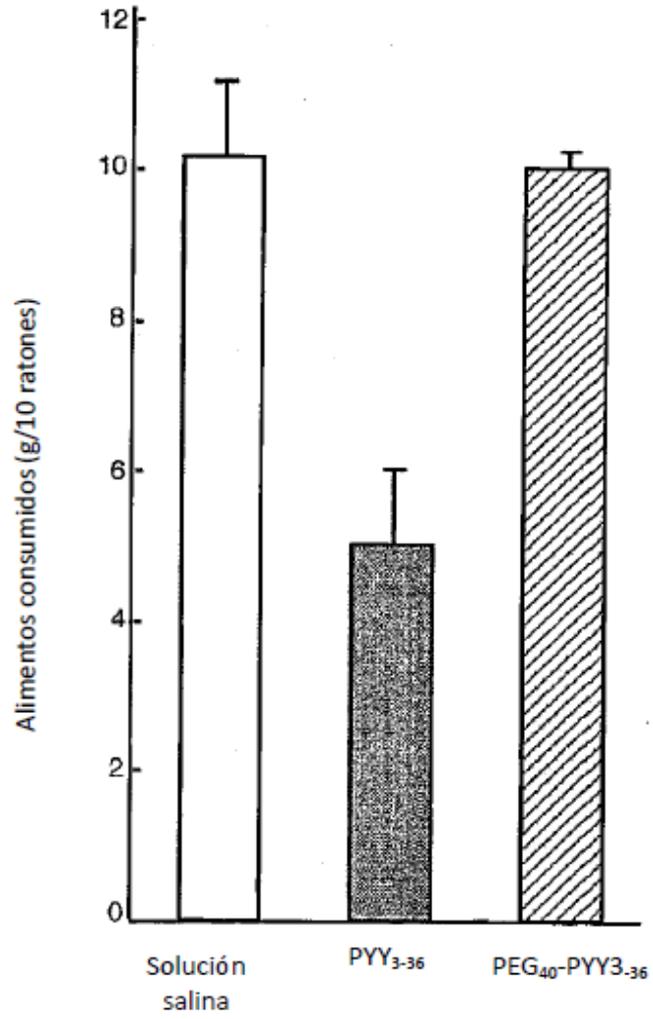


Fig. 17

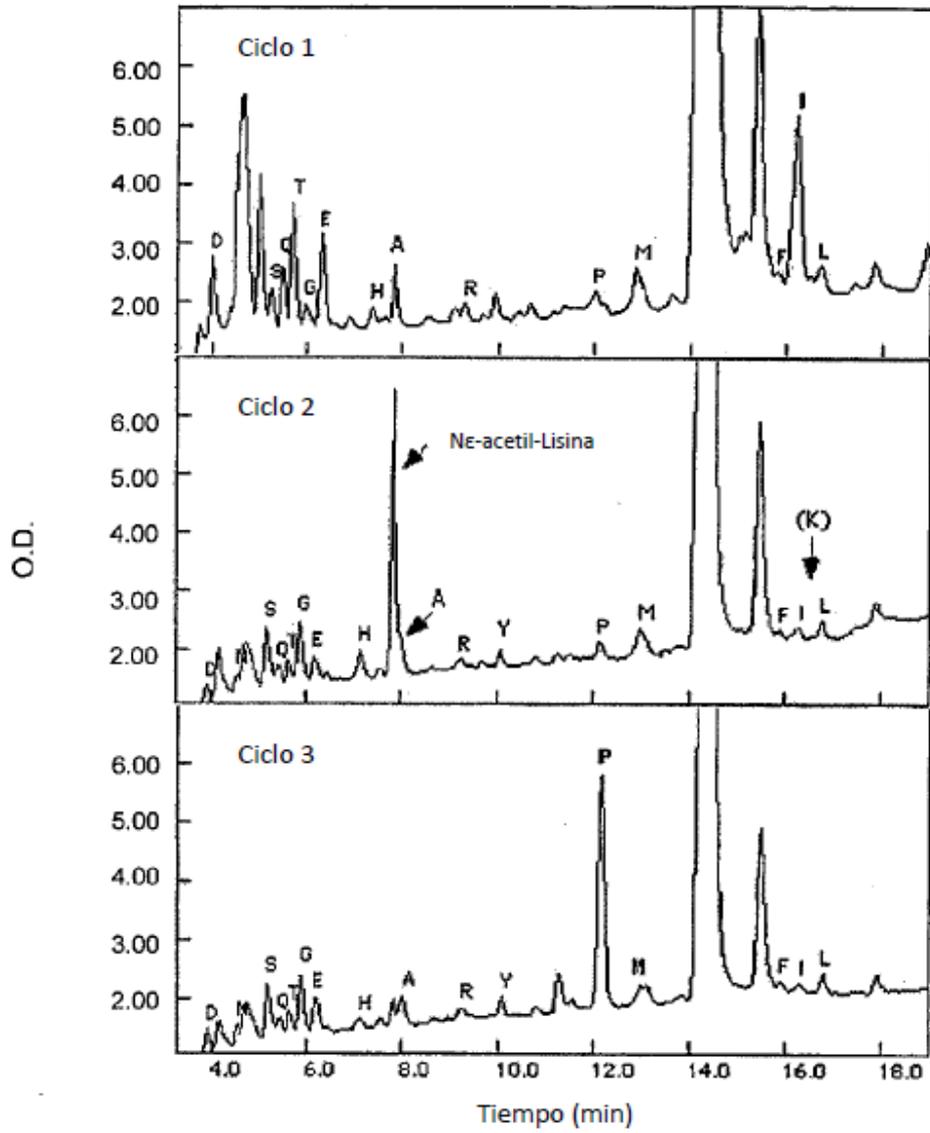


Fig. 18

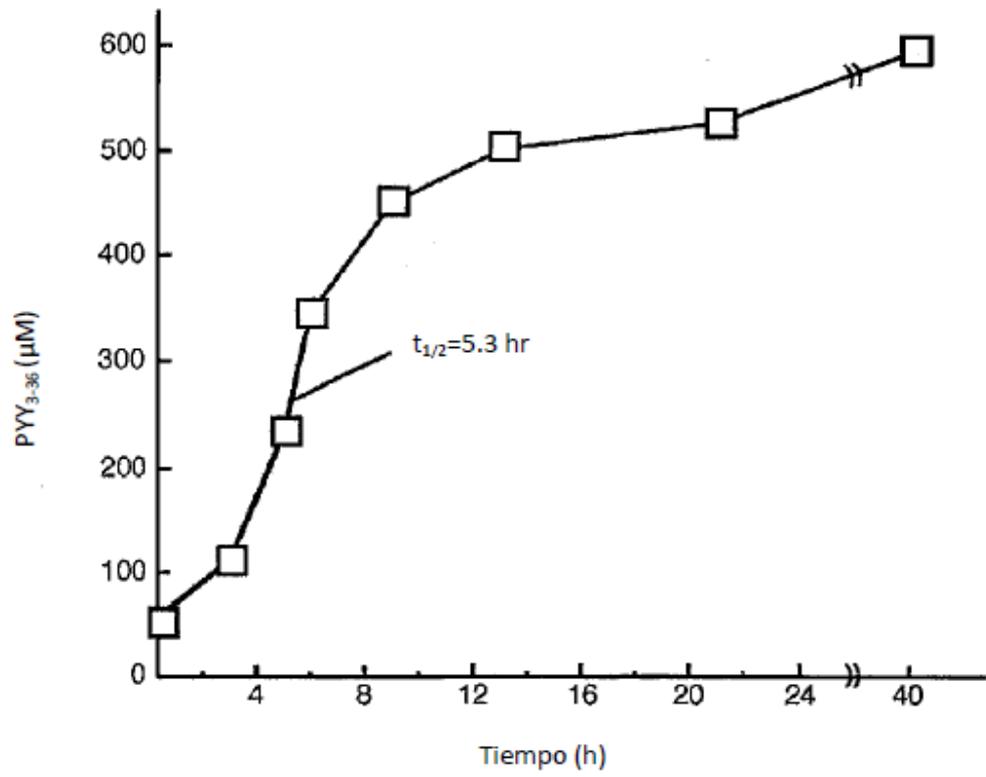


Fig. 19

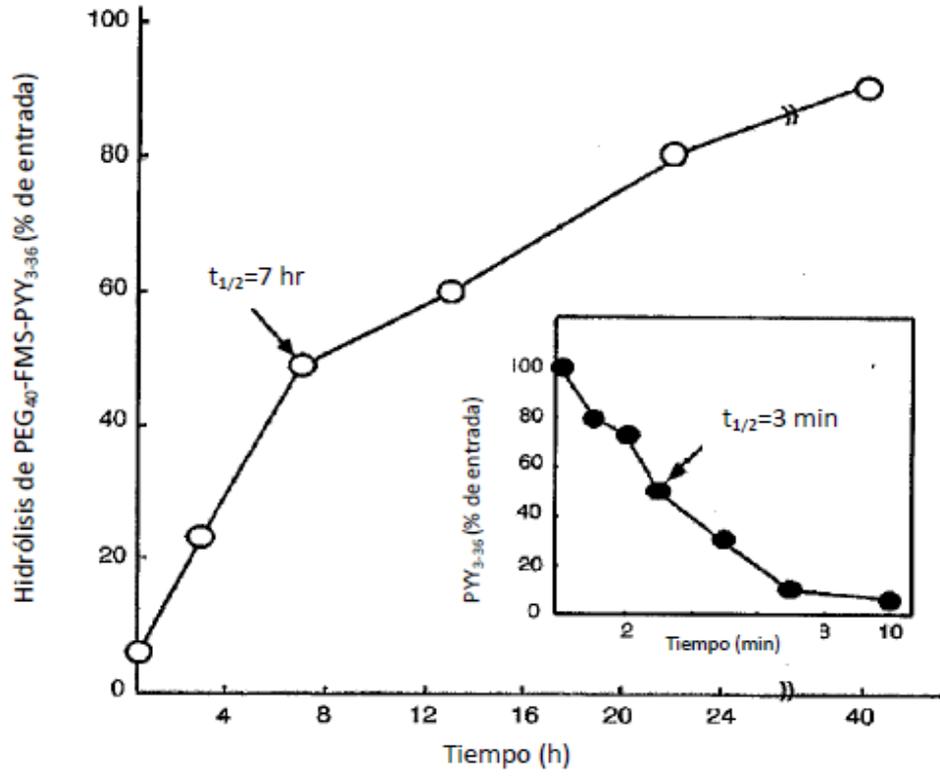


Fig. 20

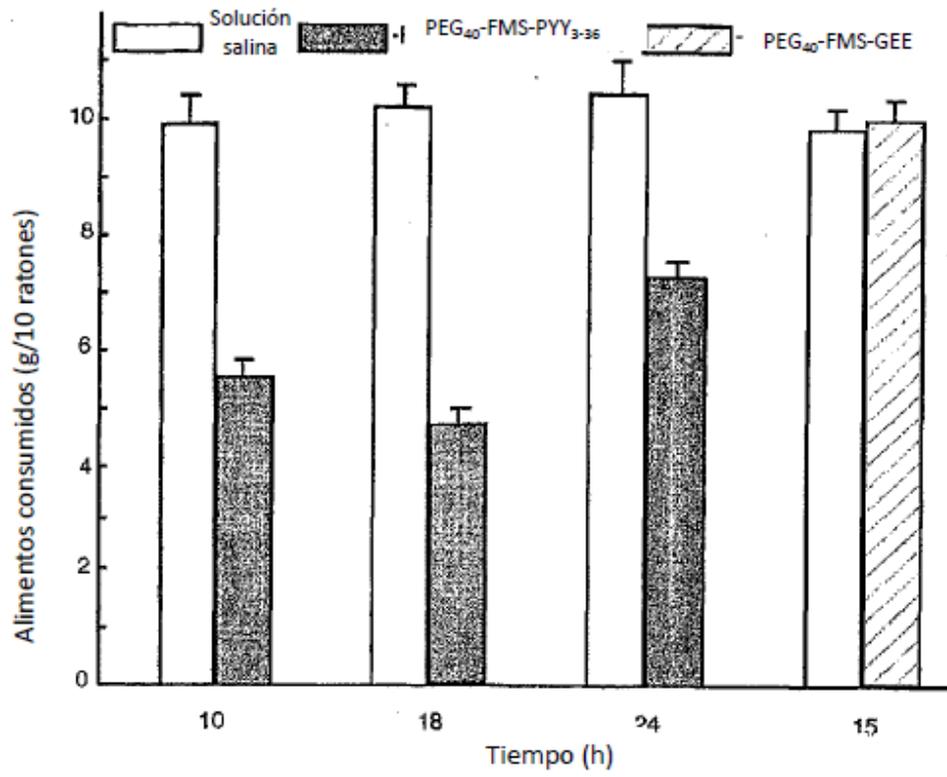


Fig. 21

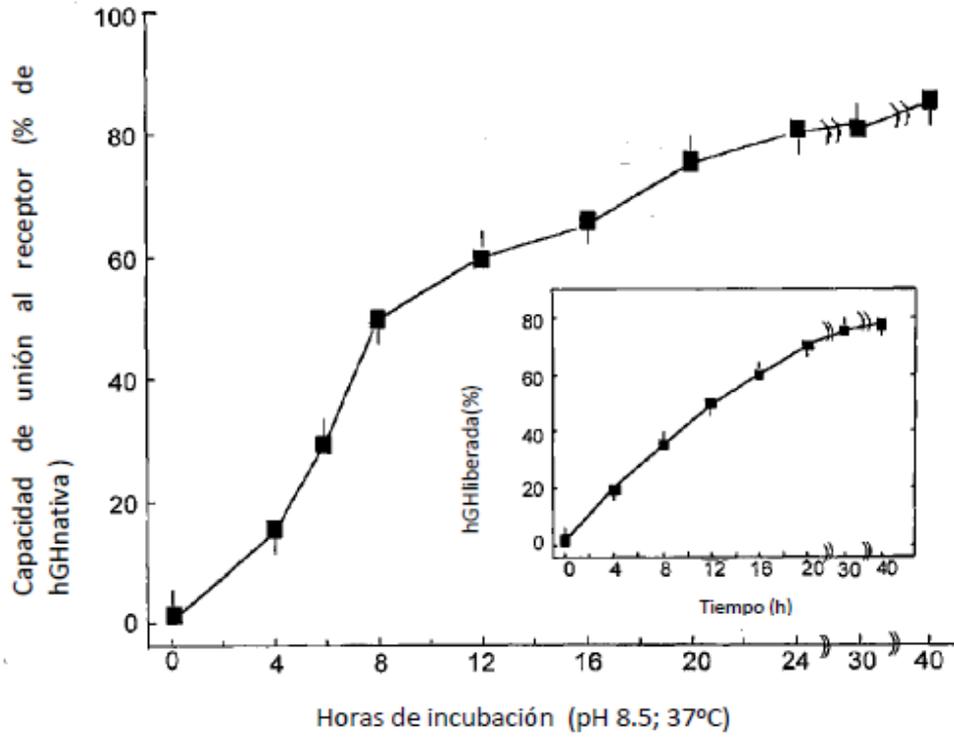


Fig. 22

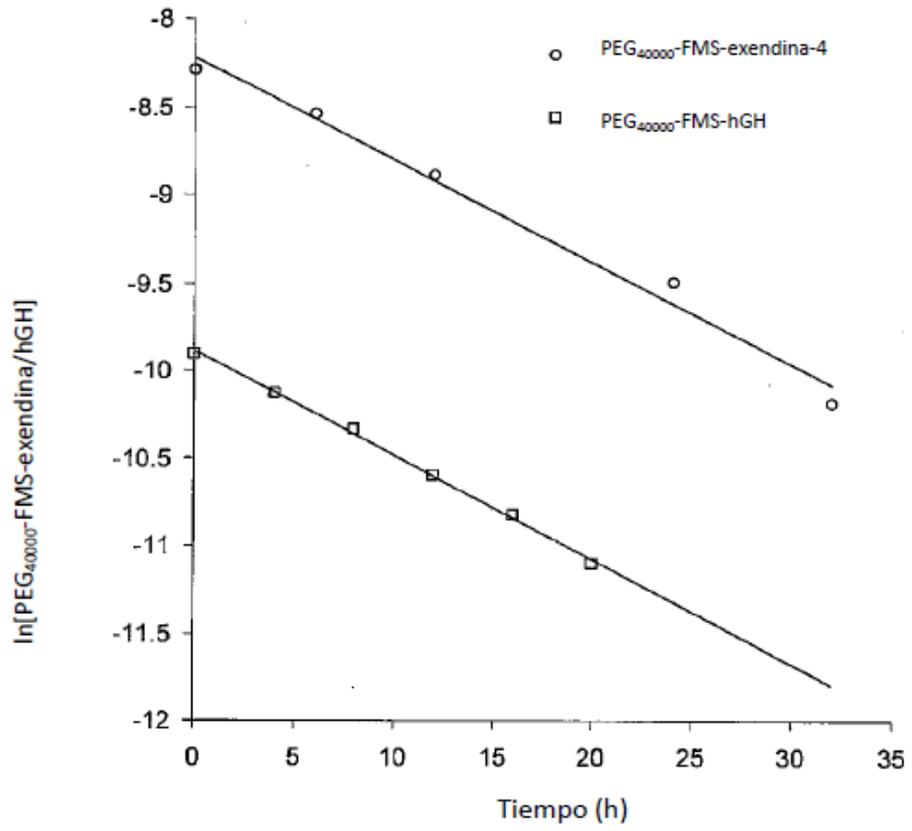


Fig. 23