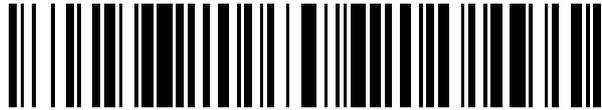


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 882**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 09784718 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2326349**

54 Título: **Nuevos reactivos y procedimiento de conjugación de moléculas biológicas**

30 Prioridad:

21.07.2008 GB 0813339
02.04.2009 GB 0905762

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2015

73 Titular/es:

POLYTHERICS LIMITED (100.0%)
Babraham Research Campus
Babraham, Cambridge CB22 3AT, GB

72 Inventor/es:

GODWIN, ANTHONY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 536 882 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

Nuevos reactivos y procedimiento de conjugación de moléculas biológicas

La presente invención se refiere a nuevos reactivos y a un nuevo procedimiento para conjugar moléculas biológicas, especialmente proteínas y péptidos.

5 Muchas moléculas terapéuticamente activas, por ejemplo proteínas, no poseen las propiedades requeridas para lograr una eficacia en el uso médico clínico. Por ejemplo, con muchas proteínas nativas no se fabrican buenas medicinas debido a que después de su administración a los pacientes existen varias desventajas inherentes entre las que se incluyen:

10 (1) las proteínas son digeridas por muchas endo- y exo-peptidasas presentes en sangre o tejidos; (2) muchas proteínas son inmunógenas en alguna medida; y (3) las proteínas pueden excretarse rápidamente por ultrafiltración en los riñones y por endocitosis. Algunas moléculas que pueden ser útiles como agentes terapéuticos activos en medicinas son sistémicamente tóxicas o carecen de una biodisponibilidad o una farmacocinética óptimas. Cuando las proteínas se eliminan de la circulación sanguínea rápidamente tienen que administrarse al paciente frecuentemente. La administración frecuente aumenta adicionalmente el riesgo de toxicidad, especialmente toxicidades derivadas inmunológicamente.

20 Se usan ampliamente polímeros sintéticos hidrosolubles, particularmente polialquilenglicoles, para su conjugación con moléculas terapéuticamente activas, tales como proteínas, péptidos y fármacos de bajo peso molecular. Se ha demostrado que estos conjugados terapéuticos alteran la farmacocinética favorablemente, prolongando el tiempo en circulación y reduciendo velocidades de aclaramiento, reduciendo la toxicidad sistémica y, en muchos casos, mostrando una eficacia clínica aumentada. El procedimiento de conjugación covalente de polietilenglicol, PEG, con proteínas se conoce comúnmente como "PEGilación".

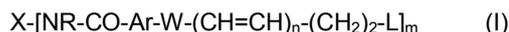
25 Es importante para lograr una eficacia optimizada y para asegurar una coherencia de dosis a dosis que el número de moléculas de polímero conjugadas por proteína sea el mismo para cada molécula, y que cada molécula de polímero esté conjugada específicamente de forma covalente con el mismo residuo de aminoácido en cada molécula de proteína. La conjugación no específica en sitios a lo largo de la molécula de proteína da como resultado una distribución de productos de conjugación y, frecuentemente, proteína no conjugada, dando una mezcla compleja que es difícil y cara de purificar.

30 Para la conjugación específica de tiol, se usan comúnmente reactivos de PEGilación que tienen una cadena de PEG terminada en un extremo con un grupo maleimida. Dichos reactivos se describen en muchas publicaciones, por ejemplo el documento WO 2004/060965. Los reactivos terminados en maleimida están disponibles comercialmente. No obstante, muchas PEG-maleimidias son hidrolíticamente inestables durante su almacenamiento y su conjugación con un fármaco experimental. Específicamente, tiene lugar un grado sustancial de hidrólisis del anillo de maleimida, tanto antes como después de la conjugación.

35 El documento WO 95/34326 y el documento US 5.414.135 divulgan reactivos de PEGilación. Archiv der Pharmazie 316(8) 1983, páginas 657-663 describe estudios cinéticos sobre sulfonas. "Reactive dyes for textile fibers", Society of Dyers and Colourists, 1999, capítulo 1, divulga, describe reacciones de Michael. El documento WO 99/01469 y el documento WO 2006/067221 describen la conjugación de grupos acrílicos con macromoléculas.

40 Los inventores han encontrado ahora una clase de reactivos de PEGilación que pueden usarse para conjugar moléculas que incluyen proteínas y péptidos con polímeros a través de un único residuo nucleófilo, por ejemplo un grupo tiol, y que tiene ventajas sobre dichos reactivos comerciales.

En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento para la conjugación de una molécula que contiene un grupo tiol o amino con un polímero, que comprende hacer reaccionar dicha molécula con un compuesto de la fórmula general:



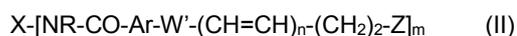
45 en la que X representa un polímero; Ar representa un grupo heteroarilo o arilo opcionalmente sustituido; R representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquil-arilo; W representa un grupo ceto CO; n representa 0 o un número entero de 1 a 4; L representa un grupo saliente; y m representa un número entero de 1 a 8.

50 El producto directo resultante del procedimiento de la invención puede representarse, en general, mediante la fórmula siguiente:



en la que X, Ar, R, W n y m tienen los significados indicados anteriormente y Z representa dicha molécula conjugada a través de un grupo tiol o amino. Si se desea, este compuesto resultante de fórmula IIa puede convertirse en

cualquier otro producto deseado. Específicamente, un compuesto resultante de la fórmula general IIa puede convertirse en un compuesto de la fórmula general II



5 en la que W' representa un resto aceptor de electrones o un resto que puede prepararse por reducción de un resto aceptor de electrones.

Los compuestos de la fórmula general (I) son novedosos y la invención, por lo tanto, también proporciona estos compuestos de por sí. Compuestos novedosos particularmente preferentes de la fórmula (I) son los de la fórmula (Ia) tal como se define más adelante.

10 Los compuestos de la fórmula general (II) son también novedosos y la invención, por lo tanto, también proporciona estos compuestos de por sí. Compuestos novedosos particularmente preferentes de la fórmula (II) son los de la fórmula (IIa) tal como se define más adelante.

m representa un número entero de 1 a 8, por ejemplo 1 a 6, preferentemente 1 a 4, por ejemplo 1. Cuando m es 1, está conjugada una única molécula con el polímero. Cuando m es mayor de uno, puede realizarse la conjugación de más de una molécula con el polímero. De 2 a 8 grupos- NR-CO-Ar-W'-(CH=CH)_n-(CH₂)₂-Z o -NR-CO-Ar-W'-(CH=CH)_n-(CH₂)₂-L se unen al polímero y las variables Ar, R, W, W', n, L y Z pueden ser iguales o diferentes para cada uno de dichos grupos. Están disponibles compuestos poliméricos multifuncionales, por ejemplo, pueden unirse múltiples grupos usando como material de partida compuestos con varios brazos disponibles de NOF con la denominación comercial "Sunbright": por ejemplo, los productos con 4 brazos tienen la fórmula C[CH₂O(CH₂CH₂O)_n-Y]₄ en la que Y puede ser uno de una serie de grupos terminales diferentes. Los conjugados multiméricos pueden dar como resultado beneficios sinérgicos y aditivos. Por ejemplo, si m es 1, el conjugado resultante debe tener un grupo terminal en el extremo de la cadena PEG alejado de la molécula conjugada. Este es comúnmente un grupo alcoxi o similar, y se ha sugerido que dichos grupos pueden tener como consecuencia efectos inmunógenos no deseados cuando se usan para aplicaciones farmacéuticas. Si m es superior a 1, puede unirse una molécula conjugada a ambos extremos de la cadena de PEG, prescindiendo de la necesidad de un grupo terminal tal como alcoxi.

Un polímero X puede ser, por ejemplo, un polialquilenglicol, una polivinilpirrolidona, un poliacrilato, por ejemplo poliacrililormorfolina, un polimetacrilato, una polioxazolona, un poli(alcohol vinílico), una poliacrilamida o polimetacrilamida, por ejemplo policarboximetacrilamida, o un copolímero HPMA. Adicionalmente, X puede ser un polímero que sea susceptible a degradación enzimática o hidrolítica. Dichos polímeros, por ejemplo, incluyen poliésteres, poliacetales, poli(orto-ésteres), policarbonatos, poli(imino-carbonatos) y poliamidas, tales como poliaminoácidos. Un polímero X puede ser un homopolímero, copolímero aleatorio o un copolímero definido estructuralmente tal como un polímero de bloque. Por ejemplo, X puede ser un copolímero de bloque derivado de dos o más óxidos de alquileo, o de poli(óxido de alquileo) y también un poliéster, poliactal, poli(orto-éster) o un poliaminoácido. Los polímeros polifuncionales que pueden usarse incluyen copolímeros de diviniléter-anhídrido maleico y estireno-anhídrido maleico.

También pueden usarse polímeros de origen natural, por ejemplo polisacáridos tales como quitina, dextrano, dextrina, quitosano, almidón, celulosa, glucógeno, poli(ácido siálico) y derivados de los mismos. Puede usarse como el polímero una proteína. Esto permite la conjugación de una proteína, por ejemplo un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, con una segunda proteína, por ejemplo una enzima u otra proteína activa. También, si se usa un péptido que contiene una secuencia catalítica, por ejemplo un sitio aceptor de O-glicano para glicosiltransferasa, esta permite la incorporación de un sustrato o una diana para la reacción enzimática subsiguiente. También pueden usarse poliaminoácidos tales como poli(ácido glutámico) o poliglicina, así como polímeros híbridos derivados de monómeros naturales tales como sacáridos o aminoácidos y monómeros sintéticos tales como óxido de etileno o ácido metacrílico.

45 Si el polímero es un polialquilenglicol, este es preferentemente uno que contiene unidades C₂ y/o C₃, y es especialmente un polietilenglicol. Un polímero, particularmente un polialquilenglicol, puede contener una única cadena lineal o puede tener morfología ramificada constituida por muchas cadenas, pequeñas o grandes. Los denominados Pluronic son una clase importante de copolímeros de bloque de PEG. Estos están derivados a partir de bloques óxido de etileno y óxido de propileno. Pueden usarse polialquilenglicoles sustituidos, por ejemplo metoxipolietilenglicol. En una realización preferente de la invención, una cadena sencilla de polietilenglicol se inicia con un grupo adecuado, por ejemplo un grupo alcoxi, por ejemplo metoxi, ariloxi, carboxi o hidroxilo, y está conectada en el otro extremo de la cadena al grupo enlazador Q.

El polímero X puede derivarse o funcionalizarse, opcionalmente, de cualquier modo deseado. Los grupos reactivos pueden unirse en el extremo o grupo terminal del polímero, o a lo largo de la cadena polimérica a través de enlazantes colgantes; en dicho caso, el polímero es, por ejemplo, una poliacrilamida, polimetacrilamida, poliacrilato, polimetacrilato o un copolímero de anhídrido maleico. Dichos polímeros funcionalizados proporcionan otra oportunidad para preparar conjugados multiméricos (es decir, conjugados en los que el polímero está conjugado a

más de una molécula). Si se desea, el polímero puede acoplarse a un soporte sólido usando procedimientos convencionales.

El peso molecular óptimo del polímero dependerá, por supuesto, de la aplicación deseada. Preferentemente, el peso molecular promedio en número se encuentra en el intervalo de 250 g/mol a aproximadamente 75.000 g/mol. Cuando el compuesto de la fórmula general II se pretende para uso médico y se pretende para que abandone la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de inflamación provocada por tumores malignos, infección o enfermedad autoinmunitaria, o por traumatismo, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular inferior en el intervalo de 2000-30.000 g/mol. Para aplicaciones en las que el compuesto de la fórmula general II se pretende para que permanezca en la circulación puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular superior, por ejemplo en el intervalo de 20.000-75.000 g/mol.

El polímero a usar debería seleccionarse de modo que el conjugado sea soluble en el medio disolvente pretendido para su uso. Para aplicaciones biológicas, particularmente para aplicaciones de diagnóstico y aplicaciones terapéuticas para la administración terapéutica a un mamífero, el conjugado será soluble en medios acuosos. No obstante, muchas moléculas biológicas, por ejemplo proteínas tales como enzimas, tienen utilidad industrial, por ejemplo para catalizar reacciones químicas. Para conjugados pretendidos para su uso en dichas aplicaciones, puede ser necesario que el conjugado sea soluble en cualquiera de medios acuosos u orgánicos, o en ambos. El polímero no debería alterar excesivamente la función pretendida de la molécula con la que está conjugado.

Preferentemente, el polímero es un polímero sintético y, preferentemente, es un polímero hidrosoluble. El uso de un polietilenglicol hidrosoluble es particularmente preferente para muchas aplicaciones.

Los grupos arilo Ar adecuados incluyen grupos fenilo y naftilo, mientras que los grupos heteroarilo Ar adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina.

Los sustituyentes que pueden estar presentes en un grupo arilo o heteroarilo Ar opcionalmente sustituidos incluyen, por ejemplo, uno o más sustituyentes iguales o diferentes seleccionados de alquilo (preferentemente alquilo C₁₋₄, especialmente metilo, opcionalmente sustituido con OH o CO₂H), -CN, -NO₂, -CO₂R, -COH, -CH₂OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO₂R, -SR, -SOR, -SO₂R, -NHCOR, -NRCOR, NHCO₂R, -NR.CO₂R, -NO, -NHOH, -NR.OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR.COR, -N⁺R₃, -N⁺H₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, halógeno, por ejemplo flúor o cloro, -C=CR, -C=CR₂ y -C=CHR, en los que cada R representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (preferentemente alquilo C₁₋₆, arilo (preferentemente fenilo) o alquil-arilo (preferentemente alquilo C₁₋₆-fenilo). La presencia de sustituyentes aceptores de electrones es especialmente preferente. Los sustituyentes preferentes incluyen, por ejemplo CN, NO₂, -OR, -OCOR, -SR, -NHCOR, -NR.COR, -NHOH y -NR.COR.

Preferentemente n es 0.

Un grupo saliente L puede representar, por ejemplo, -SR, -SO₂R, -OSO₂R, -N⁺R₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, halógeno, o -O, en los que R tiene el significado indicado anteriormente, y Ø representa un grupo arilo sustituido, especialmente fenilo, que contiene al menos un sustituyente aceptor de electrones, por ejemplo, -CN, -NO₂, -CO₂R, -COH, -CH₂OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO₂R, -SR, -SOR, -SO₂R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO₂R, -NR'CO₂R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=NNR'COR, -N⁺R₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, halógeno, especialmente cloro, o, especialmente, flúor, -C=CR, -C=CR₂ y -C=CHR, en los que cada R tiene independientemente uno de los significados indicados anteriormente.

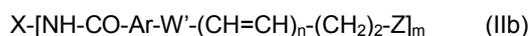
Si m representa un número entero de 2 a 8, pueden estar presentes diferentes grupos L, si se desea. Esto proporciona una oportunidad, seleccionando grupos L de diferente reactividad, de conjugar diferentes moléculas con el polímero X en reacciones sucesivas.

Preferentemente, el procedimiento según la invención usa un reactivo de la fórmula general:



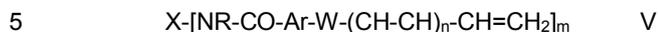
en la que Ar representa un grupo arilo no sustituido o sustituido, especialmente un grupo fenilo, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan de los mencionados anteriormente;

R' representa un átomo de hidrógeno o un alquilo opcionalmente sustituido (preferentemente alquilo C₁₋₆), arilo (preferentemente fenilo) o alquil-arilo (preferentemente alquil C₁₋₆-fenilo); y W y m tienen los significados indicados anteriormente; para producir un conjugado novedoso de la fórmula general:



En estos compuestos preferentes Ia y IIb, preferentemente n es 0 y preferentemente m representa un número entero de 1 a 4, especialmente 1. Preferentemente R' representa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo un grupo alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con hidroxilo tal como -CH₂CH₂OH, o, especialmente, un grupo alquil C₁₋₄-arilo, especialmente p-tolilo. Preferentemente, Ar es un grupo fenilo no sustituido. Preferentemente X es un polialquilenglicol, especialmente polietilenglicol.

Se cree que los compuestos de fórmula I, y especialmente los de fórmula Ia, son sorprendentemente estables y también que tienen una reactividad elevadas hacia moléculas que contienen un tiol o grupo amino. Se cree que el proceso de conjugación según la invención se produce mediante la formación de un compuesto intermedio de la fórmula general



en la que X, Ar, R, W, n y m tiene los significados indicados anteriormente.

La molécula a conjugar mediante el procedimiento de la presente invención puede ser cualquier molécula deseada. Puede ser, por ejemplo, una molécula de origen natural o una molécula derivada de una molécula de origen natural, o puede ser cualquier molécula que tenga actividad biológica, por ejemplo cualquier fármaco, siempre que contenga un grupo tiol (-SH) o amino (-NHR). Por ejemplo, puede ser una proteína o un péptido: a lo largo de la presente memoria descriptiva, el término "proteína" se usará por conveniencia y excepto cuando el contexto lo requiera de forma diferente, debería entenderse que las referencias a "proteína" son referencias a "proteína o péptido".

El grupo tiol o amino a través del que está unida la molécula es un nucleófilo capaz de reaccionar con el reactivo I, con eliminación del grupo saliente L. Dichos grupos pueden estar presentes en una molécula biológica nativa, o pueden introducirse en una molécula biológica antes de la conjugación.

Pueden generarse dos grupos tioles mediante reducción de un puente disulfuro (cisteína) natural o artificial que puede ser intracatenario o intercatenario. Una molécula biológica puede contener uno o una pluralidad de puentes disulfuro y una reducción para dar restos sulfhidrilo libres puede realizarse para reducir uno o una pluralidad de puentes disulfuro. En función de la medida de la reducción del disulfuro y la estequiometría del reactivo de conjugación polimérico que se use, es posible conjugar una o una pluralidad de moléculas poliméricas con la molécula biológica. Pueden usarse agentes reductores inmovilizados, si se desea, para reducir un número inferior a la cantidad total de disulfuros, del mismo modo que puede realizarse una reducción parcial usando condiciones de reacción diferentes o la adición de desnaturalizantes.

Alternativamente, un grupo tiol puede ser un único residuo de cisteína u otro grupo tiol no derivado originariamente de un puente disulfuro. Puede introducirse una única cisteína por medios sintéticos para proporcionar un punto de unión adecuado. Dicho procedimiento es particularmente útil para la conjugación de péptidos.

Los grupos amino pueden ser, por ejemplo, de residuos de lisina o de histidina. Estos pueden estar presentes en una molécula biológica nativa o pueden introducirse sintéticamente. Por ejemplo, un residuo de histidina puede introducirse a modo de una cola his, una cadena corta de residuos de histidina contiguos, que, por ejemplo, contiene hasta 12 residuos de histidina pero que típicamente contiene 5 o 6 residuos, unidos mediante procedimientos sintéticos a una proteína. Las colas his se unen fuertemente a níquel y cobalto, lo que permite unir las a una columna que contiene níquel o cobalto usada en el procedimiento de separación conocido como cromatografía por afinidad a metales inmovilizados. Las colas his se usan ampliamente, uniéndose a una amplia serie de proteínas y péptidos para permitir su separación, o la de productos derivados de los mismos, de mezclas en una fecha futura.

Cuando la molécula es una proteína puede ser, por ejemplo, un péptido, polipéptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, enzima, citosina, quimiocina, receptor, factor sanguíneo, hormona peptídica, toxina, proteína de transcripción o proteína multimérica.

A continuación se ofrecen algunas proteínas específicas que pueden usarse en la presente invención, en función de su aplicación deseada. Las enzimas incluyen enzimas específicas de carbohidratos, enzimas proteolíticas y similares. Las enzimas de interés, tanto para aplicaciones industriales (reacciones basadas en productos orgánicos) como aplicaciones biológicas en general y aplicación terapéuticas en particular incluyen las oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas divulgadas en el documento US 4.179.337. Las enzimas específicas de interés incluyen asparaginasa, arginasa, adenosina deaminasa, superóxido dismutasa, catalasa, quimi tripsina, lipasa, uricasa, bilirrubina oxidasa, glucosa oxidasa, glucuronidasa, galactosidasa, glucocerebrosidasa, glucuronidasa y glutaminasa.

Las proteínas usadas en compuestos de la fórmula general I incluyen, por ejemplo, proteínas de la sangre tales como albúmina, proteínas de transferencia, Factor VII, Factor VIII o Factor IX, factor de von Willebrand, insulina, ACTH, glucágeno, somatostatina, somatotropinas, timosina, hormona paratiroide, hormonas pigmentarias, somatomedinas, eritropoyetina, hormona de luteinización, factores liberadores hipotalámicos, hormonas anti-diuréticas, prolactina, interleucinas, interferones, factores estimulantes de colonias, hemoglobina, citocinas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, gonadotropina coriónica, hormona estimulante de folicúlo, hormona estimulante de tiroides y activador de plasminógeno de tejidos.

Determinadas proteínas de las anteriores tales como interleucinas, interferones y factores estimulantes de colonias también existen en forma no glucosilada, habitualmente el resultado de preparación mediante técnicas de proteína recombinante. Las versiones no glucosiladas pueden usarse en la presente invención.

Otras proteínas de interés son proteínas alergénicas divulgadas por Dreborg y col., Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6 315-365, ya que tienen alergenicidad reducida cuando se conjugan con un polímero tal como poli(óxido de alquileno) y, en consecuencia, son adecuadas para su uso como inductores de tolerancia. Entre los alérgenos divulgados están el antígeno E de Ragweed, veneno de abeja melífera, alérgeno de ácaros y similares.

- 5 Los glucopolipéptidos tales como inmunoglobulinas, ovalbumina, lipasa, glucocerebrosidasa, lectinas, activador del plasminógeno de tejidos e interleucinas glucosiladas, interferones y factores estimulantes de colonias son de interés, como son las inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA, IgD y fragmentos de las mismas.

10 Son de particular interés proteínas receptoras y de unión a ligando y anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se usan en medicina clínica para fines de diagnóstico y terapéuticos. El anticuerpo puede usarse solo o puede estar conjugado ("cargado") con otro átomo o molécula tal como un radioisótopo o un fármaco citotóxico/antiinfeccioso. Pueden usarse epítopes para la vacunación para producir un conjugado polímero-proteína inmunógeno.

15 Si se desea, pueden derivarse o funcionalizarse moléculas biológicas. En particular, antes de la conjugación, la molécula, por ejemplo una proteína nativa, puede haberse hecho reaccionar con diversos grupos bloqueadores para proteger grupos sensibles de la misma; o puede haberse conjugado previamente con uno o más polímeros u otras moléculas, bien usando el procedimiento de la invención o bien usando un procedimiento alternativo.

20 La molécula puede ser una molécula sintética de peso molecular relativamente bajo. Puede ser, por ejemplo, cualquier fármaco para el que la conjugación proporcione ventajas. Para muchas de dichas moléculas será necesario insertar un enlazador adecuado que porte un grupo tiol o amino para posibilitar su conjugación con el reactivo según la invención. Los fármacos típicos incluyen, por ejemplo, captopril, amfotericina B, camptotecina, taxol, irinotecán y sus derivados tales como SN38, docetaxol y ribavirina.

Otras moléculas de interés que pueden conjugarse usando el procedimiento de la invención incluyen las enumeradas en el documento WO 2004/060965.

25 El procedimiento según la invención puede llevarse a cabo en un disolvente o en una mezcla de disolventes en el que, o en la que, todos los reactivos sean solubles. La molécula a conjugar, por ejemplo una proteína, puede dejarse reaccionar directamente con el compuesto de la fórmula general I en un medio de reacción acuoso. Este medio de reacción también puede tamponarse, en función de los requerimientos de pH del nucleófilo (tiol o amina). El pH óptimo para la reacción será, en muchos casos, al menos de 6,0, típicamente entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 8,5, por ejemplo aproximadamente de 7,0 a 8,0, preferentemente 7,5-8,0, pero en otros casos pueden usarse un pH tan reducido como 4,0, particularmente cuando se requiera la conjugación a una cola de polihistidina, que conduce a un intervalo del pH utilizable de 4,0 a 8,5. Si se prefiere generar el compuesto de la fórmula V anterior *in situ* en presencia de la molécula a conjugar, se usa apropiadamente en todo el proceso un pH relativamente alto. Como alternativa, si se prefiere generar el compuesto de la fórmula V anterior en una etapa aparte y subsiguientemente añadir la molécula a conjugar, la primera etapa se lleva a cabo apropiadamente a un pH relativamente alto (por ejemplo 7,5-8,0) mientras que la etapa subsiguiente se lleva a cabo apropiadamente a un pH inferior (por ejemplo de 6,0 a 6,5). Es una ventaja de los reactivos de la presente invención que puedan usarse con éxito en un intervalo relativamente amplio de condiciones de pH.

35 Son generalmente adecuadas temperaturas de reacción entre 3-37 °C: las proteínas pueden descomponerse, agregarse o desnaturalizarse alterando su función y/o su eficacia de reacción si la reacción de conjugación se realiza a una temperatura en la que pueden tener lugar estos procesos. Las reacciones realizadas en medios orgánicos (por ejemplo THF, acetato de etilo, acetona) se realizan típicamente a temperaturas de hasta la temperatura ambiente.

40 La molécula puede conjugarse eficazmente con el reactivo deseado usando un equivalente estequiométrico o un ligero exceso de reactivo, a diferencia de muchos otros reactivos. No obstante, ya que los reactivos no experimentan reacciones de competencia con medios acuosos usados para solvatar por ejemplo proteínas, es posible realizar la reacción de conjugación con un exceso estequiométrico de reactivo. El exceso de reactivo y el producto pueden separarse fácilmente mediante cromatografía de intercambio iónico durante una purificación rutinaria, o mediante separación usando níquel si hay presencia de una cola his.

45 Cuando el grupo a través del que se conjuga la molécula es un grupo tiol, el procedimiento según la invención puede llevarse a cabo reduciendo parcialmente un enlace disulfuro derivado de dos aminoácidos cisteína en la molécula biológica *in situ*, después de lo cual el producto reducido reacciona con el compuesto de fórmula (I). Los disulfuros pueden reducirse, por ejemplo, con ditiotreitól, mercaptoetanol o tris-carboxietilfosfina usando procedimientos convencionales.

50 El producto inmediato del procedimiento según la invención es un compuesto de la fórmula general II en la que W' es un grupo ceto. Dichos compuestos tienen utilidad por sí mismos: debido a que el procedimiento de la invención es reversible en condiciones adecuadas, los compuestos de fórmula (II) en la que W' es un grupo ceto tienen utilidad en aplicaciones en las que se requiere la liberación de la molécula del conjugado, por ejemplo en aplicaciones clínicas directas. Un grupo ceto W', no obstante, puede reducirse para dar un resto que evita la liberación de la molécula y dichos compuestos tendrán también utilidad en muchas aplicaciones clínicas, industriales y de diagnóstico.

Así, por ejemplo, un resto W' que contiene un grupo ceto puede reducirse dando un resto W' que contiene un grupo CH(OH); un grupo éter CH. OR puede obtenerse mediante la reacción de un grupo hidroxilo con un agente de eterificación; un grupo éster CH. O. C(O)R puede obtenerse mediante la reacción de un grupo hidroxilo con un agente de acilación; un grupo amino CH. NH₂, CH. NHR o CH. NR₂ puede prepararse a partir de una cetona o de un aldehído mediante aminación reductora); o una amina CH. NHC(O)R o CH. N(C(O)R)₂ puede formarse mediante acilación de una amina. El uso de un borohidruro, por ejemplo borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, borohidruro de potasio o triacetoxiborohidruro de sodio, como agente reductor es particularmente preferente. Otros agentes reductores que pueden usarse incluyen, por ejemplo, cloruro de estaño (II), alcóxidos tales como alcóxido de aluminio e hidruro de aluminio y litio.

10 Puede prepararse un compuesto de la fórmula general (I) haciendo reaccionar un compuesto de la fórmula general



en la que Ar, R, W, n y L tienen los significados indicados anteriormente, con un compuesto de la fórmula general



15 en la que X representa un polímero; siendo A y B grupos seleccionados de modo que los compuestos de (III) y de (IV) reaccionen conjuntamente dando el compuesto deseado de la fórmula (I).

Los compuestos de la fórmula general II tienen una serie de aplicaciones. Por ejemplo, pueden usarse para la aplicación clínica directa a un paciente y, en consecuencia, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un compuesto novedoso de la fórmula general II junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona un compuesto novedoso de la fórmula general II para su uso en tratamiento, y se usa en un procedimiento de tratamiento de un paciente que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto novedoso de la fórmula II o una composición farmacéutica según la invención al paciente. Puede obtenerse mediante la elección adecuada de la molécula biológica cualquier efecto farmacéutico deseado, por ejemplo tratamiento de traumatismos, reemplazo de enzimas, reemplazo de proteínas, tratamiento de heridas, eliminación de toxinas, antiinflamatorio, antiinfeccioso, inmunomodulador, de vacunación o anticanceroso. Los compuestos de la fórmula general II pueden incluir un agente de obtención de imágenes, por ejemplo un radionucleótico, para permitir el seguimiento del compuesto *in vivo*.

Los compuestos de la fórmula general II también pueden usarse en aplicaciones no clínicas. Por ejemplo, muchos compuestos fisiológicamente activos tales como enzimas son capaces de catalizar reacciones en disolventes orgánicos, y pueden usarse compuestos de la fórmula general II en dichas aplicaciones. Además, pueden usarse compuestos de la fórmula general II como herramientas de diagnóstico.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención. En las figuras adjuntas:

La Fig. 1 muestra el esquema de reacción de la etapa 1 del ejemplo 1.

La Fig. 2 muestra el esquema de reacción de la etapa 2 del ejemplo 1.

La Fig. 3 muestra el esquema de reacción de la etapa 3 del ejemplo 1.

35 La Fig. 4 muestra el esquema de reacción de la etapa 4 del ejemplo 1.

La Fig. 5 muestra el resultado de un análisis por SDS-PAGE del producto del ejemplo 2.

La Fig. 6 muestra el resultado de un análisis por SDS-PAGE del producto del ejemplo 3.

La Fig. 7 muestra el resultado de un análisis por SDS-PAGE del producto del ejemplo 5.

La Fig. 8 muestra el análisis por cromatografía en fase inversa de la reacción del ejemplo 6.

40 La Fig. 9 muestra el resultado de un análisis por SDS-PAGE del producto del ejemplo 7.

La Fig. 10 muestra el análisis por cromatografía de intercambio catiónico de la reacción del ejemplo 8.

La Fig. 11 muestra el resultado de ELISA del ejemplo 8.

La Fig. 12 muestra el resultado de un análisis por SDS-PAGE del producto del ejemplo 9.

La Fig. 13 muestra cromatogramas de tiempo-transcurso de la PEGilación del ejemplo 11.

45 La Fig. 14 muestra la interconversión de los compuestos 9, 10 y 11 mencionados en los ejemplos 10 y 11.

La Fig. 15 muestra los resultados de conversión del ejemplo 11.

La Fig. 16 muestra el resultado de cromatografía en fase inversa del ejemplo 12.

La Fig. 17 muestra los resultados de estabilidad del ejemplo 13.

La Fig. 18 muestra el resultado de un análisis por SDS-PAGE del producto intermedio del ejemplo 17.

La Fig. 19 muestra el resultado de un análisis por SDS-PAGE del producto final del ejemplo 17.

5 La Fig. 20 muestra los resultados de absorbancia del ejemplo 17.

La Fig. 21 muestra el esquema de reacción del ejemplo 19.

La Fig. 22 muestra el esquema de reacción del ejemplo 20.

Ejemplo 1: Síntesis de reactivo PEG: Síntesis de reactivo PEG 9 de 10 kDa.

Etapa 1, Síntesis de clorhidrato de *p*-carboxi-3-piperidinopropiofenona 2.

10 El esquema de reacción para esta etapa se muestra en la figura 1.

Un matraz de fondo redondo de 250 ml se cargó con ácido *p*-acetilbenzoico (15,0 g, 1), 11,11 g de clorhidrato de piperidina y 8,23 g de paraformaldehído. Después se añadió etanol absoluto (90 ml) y ácido clorhídrico concentrado (1 ml) y la suspensión resultante se calentó a reflujo durante 10 h con agitación en atmósfera de argón. Después de detener el reflujo, se añadió acetona (150 ml) y la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. El precipitado blanco resultante se aisló en un filtro de vidrio (G3) y se lavó dos veces con acetona congelada. El sólido se secó después al vacío dando un polvo cristalino blanco (2, 9,72 g). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,79, 2,96, 3,45 (m ancho, CH₂ del resto de piperidina), 3,36 (t, 2H, COCH₂), 3,74 (t, 2H, NCH₂), 8,09 (m, 4H, ArH).

Etapa 2: Síntesis de ácido 4-(3-(*p*-tolilíto)propanoil)benzoico 5.

El esquema de reacción para esta etapa se muestra en la figura 2.

20 Se suspendieron el clorhidrato de *p*-carboxi-3-piperidinopropiofenona 2 (1,0 g) y 4-metilbencenotiol (417 mg, 3) en una mezcla de etanol absoluto (7,5 ml) y metanol (5 ml). Después se añadió piperidina (50 μl) y la suspensión se calentó a reflujo con agitación durante 6 h en una atmósfera de argón. El precipitado blanco obtenido después de enfriamiento a temperatura ambiente se separó por filtración con un filtro de vidrio (G3), se lavó cuidadosamente con acetona fría y se secó al vacío proporcionando 5 (614 mg). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,27 (s, 3H, fenil-CH₃), 3,24, 3,39 (t, 2 x 2H, CH₂), 7,14, 7,26 (d, 2 x 2H, ArH del resto toliilo), 8,03 (m, 4H, ArH del resto de ácido carboxílico).

Etapa 3, Síntesis de ácido 4-(3-tosilpropanoil)benzoico 6.

El esquema de reacción para esta etapa se muestra en la figura 3.

30 Se suspendió ácido 4-(3-(*p*-tolilíto)propanoil)benzoico 5 (160 mg) en una mezcla de agua (10 ml) y metanol (10 ml). Después de enfriar en un baño de hielo, se añadió oxone (720 mg, Aldrich) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación durante la noche (15 h). La suspensión resultante se diluyó con agua posteriormente (40 ml) de modo que se volviera casi homogénea y la mezcla se extrajo después tres veces con cloroformo (en total 100 ml). Los extractos de cloroformo reunidos se lavaron con salmuera y después se secaron con MgSO₄. La evaporación de compuestos volátiles al vacío a 30 °C proporcionó un sólido blanco 6 (149 mg). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,41 (s, 3H, fenil-CH₃), 3,42 (t, 2H, COCH₂), 3,64 (t, 2H, SO₂-CH₂), 7,46, 7,82 (d, 2 x 2H, ArH del resto toliilo), 8,03 (m, 4H, ArH del resto de ácido carboxílico).

Etapa 4, Síntesis de ácido 4-(3-tosilpropanoil)benzoico PEGilado, reactivo PEG 9.

El esquema de reacción para esta etapa se muestra en la figura 4.

40 El ácido 4-(3-tosilpropanoil)benzoico 6 (133 mg) y O-(2-aminoetil)-O'-metil-PEG 8 (PM 10 kDa, 502 mg, BioVectra) se disolvieron en tolueno seco (5 ml). El disolvente se eliminó al vacío sin calentamiento y el residuo sólido seco se volvió a disolver después en diclorometano seco (15 ml) en atmósfera de argón. A la solución resultante, enfriada en un baño de hielo, se añadió lentamente diisopropilcarbodiimida (DIPC, 60 mg) en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se mantuvo después en agitación durante toda la noche (15 h) a temperatura ambiente. Los compuestos volátiles se eliminaron después al vacío (30 °C, baño de agua) para proporcionar un residuo sólido que se volvió a disolver con un calentamiento suave (354 °C) en acetona (20 ml). La solución se filtró a través de una lana de algodón no absorbente para eliminar material insoluble. La solución se enfrió después en un baño de hielo seco para dar un precipitado blanco que se separó mediante centrifugación (4600 rpm, 30 min). La fase líquida se eliminó por decantación y este procedimiento de precipitación se repitió tres veces. Después, el sólido blancuzco resultante se secó al vacío proporcionando el reactivo PEG 9 (437 mg). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,46 (s, 3H, fenil-CH₃),

3,38 (s, 3H, PEG-OCH₃), 3,44-3,82 (m ancho, PEG), 7,38, 7,83 (d, 2 x 2H, ArH del resto toliilo), 7,95 (m, 4H, ArH del resto de ácido carboxílico).

5 Se prepararon reactivos PEG análogos de diferentes pesos moleculares de PEG mediante el mismo procedimiento general. Así, se preparó PEG de 20 kDa mediante reacción de la sulfona **6** (20,8 mg), O-(2-aminoetil)-O'-metil-PEG (20 kDa, 250 mg, Fluka) y DIPC (8,7mg, **7**) en diclorometano seco (15 ml) proporcionando después del procedimiento de purificación por precipitación en acetona un sólido blancuzco (245 mg). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,46 (s, 3H, fenil-CH₃), 3,38 (s, 3H, PEG-OCH₃), 3,44-3,82 (m ancho, PEG), 7,38, 7,83 (d, 2 x 2H, ArH del resto toliilo), 7,95 (m, 4H, ArH del resto de ácido carboxílico).

10 **Ejemplo 2: PEGilación de un fragmento de anticuerpo Fab que posee un único disulfuro de bisagra (dos tioles) con reactivos PEG **9** de peso molecular de 5, 10 y 20 kDa.**

15 A 100 µl de una solución de Fab (Abcam, N° de cat. AB6520, 1 mg/ml) se añadieron 5 µl de una solución madre de DTT (100 mM en agua desionizada) y la solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 min. La solución se diluyó a 200 µl con 95 µl de tampón de fosfato 50 mM, pH 7,8, con NaCl 0,15 M y EDTA 10 mM, y después se cargó en una columna ilustra NAP-5 (GE Healthcare, N° de cat. 17-0854-01), preequilibrada con

20 tampón de fosfato 50 mM, pH 7,8, con NaCl 0,15 M y EDTA 10 mM. La columna NAP-5 se eluyó con 5 x 300 µl de tampón de fosfato nuevo, pH 7,8. La absorbancia UV a 280 nm se midió para todas las fracciones, después de lo cual se identificó que el Fab reducido estaba principalmente en la fracción 3 y que la concentración de proteína estimada era de 0,23 mg/ml.

25 Se disolvieron tres reactivos PEG con pesos moleculares de 5 kDa, 10 kDa y 20 kDa en tampón de fosfato, pH 7,8, dando soluciones de concentraciones de 0,5 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml, respectivamente.

Para cada reacción de PEGilación, se usaron 5,0 µl de la solución de Fab reducido (0,23 mg/ml) y 0,42 µl de solución PEG (1 equivalente molar con respecto a tioles de disulfuro de bisagra reducidos). Las soluciones de reacción de Fab se diluyeron también con 4,6 µl de tampón de fosfato, pH 7,8, dando un volumen final de 10 µl. Las soluciones de reacción se incubaron a 4 °C durante 12 h.

25 Después se llevó a cabo un análisis por SDS-PAGE sobre las soluciones de reacción usando geles NuPAGE® Novex al 4-12 % Bis-Tris, Invitrogen, N° de cat. NP0321BOX) y tampón de procesamiento NuPAGE MES SDS (Invitrogen N° de cat. NP002). Los geles se tiñeron con InstantBlue (Expedeon, N° de cat. ISB1L). La figura 5, más adelante, muestra el resultado. El PEG en el análisis por SDS-PAGE avanza aproximadamente el doble de su tamaño real frente a marcadores de proteína, de modo que un PEG de 5 kDa avanza como una proteína de 10 kDa.

30 Fab es una proteína de aproximadamente 50 kDa y en gel de SDS-PAGE avanza o bien como una banda única a 50 kDa cuando no está reducida o bien como una banda o dos bandas a aproximadamente 25 kDa para la forma reducida. Estas son las cadenas pesada y ligera que no se mantienen ya juntas por el disulfuro de bisagra después de reducción e incubación con SDS. Por lo tanto, aunque el Fab puede estar di-PEGilado, con lo que se une un PEG único a cada una de las dos cisteínas del disulfuro de bisagra reducido en solución, el análisis por SDS-PAGE

35 muestra mono-PEGilación de las cadenas pesada y ligera de 25 kDa. En el carril etiquetado con 1 están los marcadores proteicos (patrones de proteínas Novex sharp, Invitrogen, N° de cat. LC5800). El carril 2 muestra el Fab mismo. El carril etiquetado con el 4 muestra Fab reducido con DTT (aproximadamente 25 kDa). El carril 5 muestra el resultado de PEGilación de 5kDa con el producto primario una banda a 35 kDa correspondiente a Fab PEGilado. Solo una pequeña cantidad de Fab reducido permanece a 25 kDa, lo que muestra que el Fab estaba en su mayor parte PEGilado. El carril 6 muestra el resultado de PEGilación de 10 kDa con el producto primario una banda superior al marcador de 40 kDa correspondiente a Fab PEGilado de 10 kDa. El carril 7 muestra el resultado de 20 kDa con el producto primario una banda superior al marcador de 60 kDa correspondiente a Fab PEGilado de 20 kDa. El carril 3 muestra el resultado de un intento de PEGilación sin una etapa de reducción previa: el hecho de que no hay producto PEGilado indica que el sitio de reacción para la PEGilación es un enlace disulfuro reducido.

45 **Ejemplo 3. PEGilación de asparaginasa con reactivo PEG **9** de 5 kDa**

50 A 1 ml de 1 mg/ml de solución de asparaginasa (Sigma, N° de cat. A3809) en tampón de fosfato de sodio 20 mM que contenía NaCl 150 mM y EDTA 5 mM a pH 7,8 se añadió DTT (15,4mg) y después de agitación con vórtice durante varios segundos la solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante 40 min. Después se añadió dicho 1 ml de solución a una columna PD-10 (GE Healthcare, N° de cat. 17-0851-01) preequilibrada con tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,8, que contenía NaCl 150 mM y EDTA 5 mM, recogiendo el eluyente como la fracción de carga. La columna se eluyó después con 5 x 1 ml de tampón de fosfato nuevo. Las fracciones 3 y 4 se combinaron dando 2 ml.

55 Se preparó una solución de 10 mg/ml de reactivo PEG **9** de 5 kDa en agua desionizada y se añadieron 2,0 µl (1,5 equivalentes de PEG a tioles libres) a 100 µl de la asparaginasa reducida. La solución se agitó en vórtice durante varias segundos y se dispuso a 4 °C durante la noche, después de lo cual se tomó una muestra para el análisis por SDS-PAGE. El resultado se muestra en la figura 6. El carril 1 muestra los marcadores proteicos usados para estimar el PM, el carril 2 muestra asparaginasa antes de la PEGilación y el carril 3 muestra la solución de reacción de asparaginasa reducida con reactivo PEG de 5 kDa. Se observa una banda fuerte correspondiente a la PEGilación de

ambas cisteínas como el producto primario justo por encima del marcador proteico de 60 kDa. Una segunda banda de PM inferior está presente justo por encima del marcador proteico de 50 kDa que corresponde a la PEGilación de solo una de las cisteínas. Solo hay una banda muy tenue correspondiente a la asparaginasa reducida entre los marcadores proteicos de 30 y 40 kDa, lo que muestra que casi toda la proteína se había PEGilado con el reactivo PEG 9.

Ejemplo 4, PEGilación de G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) que posee una única cisteína libre con reactivo PEG 9 con pesos moleculares de 5, 10 y 20 kDa y comparación con un PEG de 5 kDa que posee un grupo funcional maleimida.

Una solución madre de G-CSF (0,66 mg/ml en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2, con NaCl 150 mM y EDTA 10 mM) se dividió en 5 fracciones de 100 μ l cada una (G-CSF nativo y cuatro fracciones para las reacciones de PEGilación). Las fracciones se incubaron durante la noche a 4 °C con 1 equivalente molar de reactivo PEG a G-CSF. Para reactivo PEG 9 de 5 kDa y para PEG-maleimida de 5 kDa (Fluka, N° de cat. 63187), esto implica añadir 3,5 μ l de una solución de 5 mg/ml de PEG en agua desionizada. Para reactivo PEG 9 de 10 kDa esto implica añadir 7 μ l de una solución de 5 mg/ml de PEG en agua desionizada. Para reactivo PEG 9 de 20 kDa esto implica añadir 14,0 μ l de una solución de 5 mg/ml en agua desionizada. Las reacciones de PEGilación se analizaron mediante SDS-PAGE (geles NuPAGE® Novex al 4-12 % Bis-Tris, tampón MES, todo de Invitrogen, y tinción con Instant-Blue (Expedeon, N° de cat. ISB1L). El G-CSF sin reactivo PEG añadido mostró una banda entre los marcadores proteicos de 15 y 20 kDa. Para la PEGilación de 5 kDa con 9 se observó una banda a aproximadamente 30 kDa correspondiente a G-CSF monoPEGilado de 5 kDa. Para la PEGilación de 10 kDa con 9 fue visible una banda inferior a 40 kDa correspondiente a G-CSF monoPEGilado de 10 kDa. Para el resultado de PEG de 20 kDa PEG fue visible una banda entre 50 y 60 kDa correspondiente a G-CSF monoPEGilado de 20 kDa. Para la reacción de PEG-maleimida de 5 kDa no se observó ninguna banda diferente a la del G-CSF sin reaccionar, lo que muestra que no tuvo lugar ninguna reacción con este reactivo.

Ejemplo 5. PEGilación sobre histidina en IFN α -2b con una secuencia de 8 histidinas en su extremo C terminal con reactivo PEG 9 de 10 kDa y de 20 kDa.

A una solución de 20 μ l de IFN α -2b (1,13 mg/ml en tampón de fosfato de sodio 10 mM que contenía EDTA 2 mM y NaCl 150 mM, pH 7,5) se añadió 1 equivalente molar de reactivo PEG 9 de 10 kDa (1,8 μ l de una solución de 6 mg/ml en agua desionizada) y al solución resultante se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Se realizó también una repetición con 1 equivalente molar de reactivo PEG 9 de 20 kDa (3,3 μ l de una solución de 6,6 mg/ml en agua desionizada). Ambas muestras se analizaron después mediante SDS-PAGE (geles NuPAGE® Novex al 4-12 % Bis-Tris, tampón MES, todo de Invitrogen, y tinción con Instant-Blue (Expedeon, N° de cat. ISB1L). El resultado se muestra en la figura 7. En el carril etiquetado con 1 están los marcadores proteicos. El carril 2 es solo el IFN de partida. El carril 3 muestra el resultado de la reacción del reactivo PEG 9 de 10 kDa. Hay 5 bandas distintas entre los marcadores proteicos de 30 y 160 kDa correspondientes a IFN con 1 a 5 cadenas de PEG conjugadas. El carril 4 muestra el resultado de la reacción del reactivo PEG 9 de 20 kDa. Hay tres bandas distintas entre los marcadores proteicos de 60 y 110 kDa correspondientes a IFN con 1 a 3 cadenas de PEG conjugadas. El carril etiquetado como 5 es el reactivo PEG de 20 kDa que no se tiñe, de modo que no hay ninguna banda visible. El carril etiquetado como 6 es el reactivo PEG de 10 kDa que no se tiñe, de modo que no hay ninguna banda visible.

Ejemplo 6. PEGilación de un péptido (fragmento de leptina, con una única cisteína libre en la estructura) con reactivo PEG 9 de 5 kDa.

Un fragmento de leptina de 116-130 amidas de ratón (Sigma, N° de cat. L6788) de 1 mg se disolvió en 1 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM que contenía NaCl 150 mM y EDTA 10 mM a pH 7,8. Se preparó una solución de 5 mg/ml de reactivo PEG 9 de 5 kDa en el mismo tampón a pH 7,8. A 50 μ l de solución de fragmento de leptina se añadieron 50 μ l de tampón y 96,1 μ l de la solución de PEG (3 equivalentes molares de PEG con respecto al tiol libre de la cisteína). La solución se agitó en vórtice durante varios segundos y se dispuso a 4 °C durante la noche, después de lo cual se tomaron muestras para el análisis por RP-HPLC. La RP-HPLC consistía en una columna analítica Source 5RPC 4.6/150 (Amersham bioscience, N° de cat. 17511601) unida a un sistema de HPLC JASCO. El tampón A fue agua + el 0,05 % de ácido trifluoroacético (grado HPLC de Fisher scientific) y el tampón B fue acetonitrilo (grado HPLC de Fisher scientific). El procedimiento fue del 100 % al 0 % de tampón A en 30 minutos con un caudal de 1 ml/min. Se realizó un seguimiento del perfil de HPLC a 214 nm y 280 nm. Los resultados para el fragmento de leptina, el reactivo PEG y la solución de reacción se muestran en la figura 8.

El fragmento de leptina tenía un tiempo de retención de 11,4 min. En la mezcla de reacción este pico desapareció y se reemplazó por un pico a 16,5 minutos, mostrando que el fragmento se había derivado con éxito.

Ejemplo 7: PEGilación y actividad biológica de un fragmento de anticuerpo de dominio marcado con polihistidina con reactivo PEG 9 de peso molecular de 20 kDa.

A 2,7 ml de una solución de fragmento de anticuerpo de dominio anti-TNF-alfa (secuencia proteica tomada de la patente WO 2005/035572 como la secuencia listada como TAR1-5-19 en la figura 12 y expresada con una cola de seis histidinas en el extremo C terminal de la proteína, 1,5 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150

mM e imidazol 350 mM, pH 7,5) se añadieron 0,3 ml de una solución de reactivo PEG en agua desionizada (40 mg/ml, 1,9 equivalentes molares con respecto a la proteína). La solución se transfirió a un dializador D-Tube™ (Novagen, N° de cat. 71508-3) y se dializó frente a 1 l de tampón a pH 6,2 (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 20 mM) a 4 °C durante 16 h.

- 5 La solución de reacción se purificó en una columna Resource S (GE Healthcare, N° de cat. 17-1178-01) usando un gradiente lineal en 30 min desde acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, hasta acetato de sodio 20 mM con cloruro de sodio 700 mM, pH 4,5.

Las fracciones se recogieron y se analizaron usando SDS-PAGE y el resultado se muestra en la figura 9. Se usaron geles NuPAGE® Novex al 4-12 % Bis-Tris, Invitrogen, N° de cat. NP0321BOX) y tampón de proceso NuPAGE MES SDS (Invitrogen, N° de cat. NP002) y los geles se tiñeron con InstantBlue (Expedeon, N° de cat. ISB1L). El PEG en el análisis por SDS-PAGE avanza aproximadamente el doble de su tamaño real frente a marcadores de proteína, de modo que un PEG de 20 kDa avanza como una proteína de 40 kDa. El fragmento de anticuerpo de dominio es una proteína de aproximadamente 12,7 kDa. En el carril etiquetado con 1 están los marcadores proteicos (patrones de proteínas Novex sharp, Invitrogen, N° de cat. LC5800). El carril 2 muestra solo la proteína. El carril etiquetado con 3 es la solución de reacción. Una banda de 53 kDa corresponde a proteína monoPEGilada. La DiPEG-proteína se representa mediante una banda a aproximadamente 80 kDa y existe una cantidad traza de proteína multiPEGilada en la parte superior del carril. El carril 4 muestra el fragmento de anticuerpo de dominio monoPEGilado como una única banda sin ninguna contaminación de proteína no PEGilada.

20 **Ejemplo 8. PEGilación y unión por ELISA de un Affibody anti-TNF-alfa (cisteína con 1 tiol libre) con reactivo PEG 9 de 20 kDa.**

A 1 ml de una solución de 1 mg/ml de Affibody anti-TNF-alfa (Affibody AB, N° de cat. 10.0841.01) en tampón de fosfato de sodio 50 mM que contenía NaCl 150 mM y EDTA 20 mM a pH 7,8, se añadió DTT (3,0 mg) para reducir cualesquiera enlaces disulfuro y después de agitar en vórtice durante varios segundos la solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. El 1 ml se cargó después a una columna PD-10 (GE Healthcare, N° de cat. 17-0851-01) preequilibrada con tampón de fosfato a pH 6,2 (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 20 mM). La columna se eluyó después con 5 x 1 ml de tampón de fosfato nuevo a pH 6,2. Las mediciones a 280 nm indicaron que las fracciones 3 y 4 contenían la proteína reducida y se combinaron para dar 2 ml. A la solución de proteína se añadieron 10 µl de una solución de hidroquinona acuosa saturada y se mezcló bien. Se preparó una solución de 20 mg/ml de reactivo PEG 9 de 20 kDa en agua desionizada y se añadieron 73 µl (1 equivalente molar de PEG con respecto a tioles de cisteína libres) al Affibody tratado con DTT. La solución se agitó en vórtice durante varios segundos y después se dispuso a temperatura ambiente durante 3 h, después de lo cual se tomó una muestra para el análisis por SDS-PAGE.

Después de 3 h, una cantidad significativa de proteína PEGilada se había formado, de modo que la reacción de PEGilación se purificó sin permitir que la reacción se completara. La purificación se realizó usando una columna de cromatografía de intercambio catiónico Resource S (GE Healthcare, N° de cat. 17-1178-01) con un gradiente de sal lineal (NaCl 0-700 mM) en un periodo de 30 min con pH 4,5, fase móvil de acetato de sodio 20 mM. El resultado se muestra en la figura 10. El carril etiquetado con 1 en la figura 10 muestra los marcadores proteicos usados a un PM estimado. El carril etiquetado con 2 muestra la solución de Affibody antes del tratamiento con DTT. El Affibody en presencia de DTT se muestra en el carril etiquetado con 3. El carril 4 muestra el Affibody después de eliminar el DTT por medio de la columna PD-10 y son visibles dos bandas que corresponden al Affibody monomérico (cisteína con tiol libre disponible para PEGilación) y Affibody dimérico (cisteínas no disponibles para PEGilación). El carril etiquetado con 5 muestra la solución de reacción de PEGilación. Una banda justo por encima del marcador proteico de 50 kDa puede observarse para el Affibody monoPEGilado. El Affibody purificado por cromatografía de intercambio catiónico se muestra en el carril 6 como una única banda sin ninguna contaminación a partir de una proteína no PEGilada.

La actividad de unión del producto monoPEGilado purificado a TNF-α se analizó mediante un procedimiento ELISA:

Se añadió TNF-α (10 µg/ml en Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 34,9 mM, pH 9,6) a una placa de microvaloración de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) a 100 µl/pocillo y se incubó a 4 °C durante la noche. Después se eliminó el TNF-α y se añadió PBS/1 % de BSA a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 h a TA. Después se eliminó el PBS/1 % de BSA y se añadió el Affibody anti-TNF-α (0,026, 0,13, 0,65, 3,25 µg/ml en PBS/1 % de BSA) y se incubó durante 1 h a TA. Se añadió Affibody no PEGilado a los pocillos de control. La placa se lavó después tres veces con 300 µl/pocillo de PBS/0,1 % de Tween 20 (PBS/T). Después se añadió anticuerpo de conejo anti-PEG (Epitomics, N° de cat. 2061-1; 1:1000 en el 1 % de BSA/PBS) a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 h a TA. Después de estos tres lavados con PBS/T, se añadió anticuerpo anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Abcam, N° de cat. ab6721; 1:1000 en PBS/1 % de BSA) a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 h a TA. Los pocillos se lavaron después tres veces con PBS/T y se añadió sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich, N° de cat. T0440) a 100 µl/pocillo. Después de 15 min de incubación en la oscuridad, se añadió reactivo de detección (Sigma-Aldrich, N° de cat. 55689) a 100 µl/pocillo y se leyó la absorbancia a 650 nm.

El resultado de ELISA mostrado en la figura 11 muestra la unión específica a TNF- α mediante el Affibody PEGilado, confirmando que la proteína retiene actividad post-PEGilación. En ausencia de TNF- α no hubo ninguna unión de anticuerpo anti-PEG.

Ejemplo 9. PEGilación sobre una secuencia de histidina de interferon alfa-2b (IFN α -2b) que posee una secuencia de 8 histidinas en su extremo N terminal usando reactivo PEG 9 de 20 kDa. La actividad antivírica del IFN PEGilado de 20 kDa con y sin reducción con borohidruro de sodio.

A una solución de 4,67 ml de IFN α -2b con una secuencia de 8 histidinas en el extremo N terminal (1,07 mg/ml en tampón de fosfato de sodio 50 mM que contiene NaCl 150 mM, pH 7,4) se añadieron 2,6 equivalentes molares de reactivo PEG 9 de 20kDa (217 μ l de una solución de 60 mg/ml en agua desionizada) y la solución resultante se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La muestra de reacción después del análisis por SDS-PAGE (geles NuPAGE® Novex al 4-12 % Bis-Tris, tampón de proceso MES, todos de Invitrogen, y tinción con InstantBlue (Expedeon, N° de cat. ISB1L)) se sometió a cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (columna TOSOH DEAE, STSKgel DEAE-5PW, Supelco, N° de cat. 8-07164, conectada a un sistema Jasco HPLC) para purificar el IFN- α -2b monoPEGilado. Las fracciones obtenidas (1 ml cada una) de la columna de intercambio iónico se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían predominantemente IFN monoPEGilado se sometieron a liofilización. El residuo resultante obtenido después de la liofilización se disolvió en tampón de fosfato de sodio 50 mM que contenía NaCl 150 mM y borohidruro de sodio 2 mM y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 h. La solución resultante se sometió después a cromatografía de exclusión por tamaño (HiLoad 16/60, Superdex 200, PBS 50 mM como eluyente, 1,6 ml/min de caudal y detección a 214 nm) para aislar el IFN monoPEGilado. La muestra aislada se analizó por SDS-PAGE y el resultado se muestra en la figura 12. En el carril etiquetado con 1 de la figura 12 están los marcadores proteicos. El carril etiquetado con 2 muestra solo el IFN de partida. El carril 3 muestra una única banda entre los marcadores proteicos de 50 y 60 kDa correspondientes al IFN α -2b monoPEGilado de 20 kDa.

Actividad antivírica: El ensayo antivírico se realizó sobre células A549 cultivadas en DMEM/10 % de suero de carnero fetal (FCS) que contenía penicilina y estreptomina. Se resuspendieron células A549 en DMEM/10 % de FCS a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml y se dividió en partes alícuotas a 50 μ l/pocillo en placas de microvaloración de 96 pocillos. El día siguiente, se prepararon muestras de IFN PEGilado y nativo en una dilución de dos veces y se añadieron a los pocillos 50 μ l de cada dilución. Las placas se incubaron después durante 24 h. Después el medio se eliminó y las células se incubaron con virus de la encefalomiocarditis (EMCV) preparado en DMEM/5 % de FCS (50 μ l/pocillo). Las células se incubaron durante otras 24 h, después se lavaron con 300 μ l/pocillo de PBS y se tiñeron con formaldehído al 4 %/violeta de metilo al 0,1 % (50 μ l/pocillo; Sigma-Aldrich, N° de cat. 198099) durante 30 min. La placa se lavó después dos veces con 300 μ l/pocillo de PBS y se secó al aire. El colorante se solubilizó con solución de SDS al 2 % (50 μ l/pocillo) y la absorbancia se midió a 570 nm. El IFN- α 2b PEGilado de 20 kDa (A) sin tratar (B) tratado con borohidruro de sodio mostró una actividad de 64 pg/ml y 68 pg/ml, respectivamente.

Ejemplo 10. Estabilidad de reactivo PEG 9 en comparación con reactivos PEG comerciales con grupos funcionales maleimida.

La estabilidad de reactivo PEG 9 (muestras de 5 kDa y 20 kDa) se comparó con metoxi-poli(etilenglicol)maleimido-propionamida (Chirotech Technology Ltd, N° de cat. 008-008, N° de lote 223126001) y α -metoxi- ω -etil-maleinimido-poli(etilenglicol) (Iris Biotech, N° de cat. PEG1146, N° de lote 128512) mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) a pH de 7,4. Se preparó una solución de D₂O a pH de 7,4 liofilizando una solución acuosa de fosfato de sodio 50 mM que contenía NaCl 150 mM y EDTA 20 mM a pH 7,4 y se reconstruyó usando el mismo volumen con óxido de deuterio. Se añadió acetona como patrón al tampón a 1,0 μ l por 3 ml. Se disolvieron muestras de reactivos PEG a 1 μ mol en 0,75 ml del tampón y se analizaron después de 4 h y después de 25,5 h por espectroscopia de RMN a 400 MHz. La estabilidad de las muestras de PEG maleimida se determinaron comparando la integral a 6,86 ppm después de normalizar usando la integral para el patrón de acetona a 2,17 ppm. La estabilidad de reactivo PEG 9 se determinaron comparando la integral total para las señales a 7,31, 7,40, 7,47, 7,73 y 8,03 ppm después de normalizar usando la integral para el patrón de acetona a 2,21 ppm. Los picos a 7,31, 7,47 y 8,03 son del reactivo PEG 10 (figura 14) activo con proteínas formado como se esperaba a partir del reactivo PEG 9. La relación de 9 con respecto a 10 varió de 1,46 a 1,77 a 1 para ambas muestras 1 y 2 durante el transcurso del experimento. Los resultados del estudio de estabilidad se muestran en la tabla 1. Las muestras de PEG-maleimida se degradaron entre el 19 y el 55 % en un periodo de 21,5 h a pH 7,4 mientras que las muestras de reactivo PEG 9 no se degradaron en las mismas condiciones.

Tabla 1. Resultados de un estudio de estabilidad por RMN comparando reactivo PEG 9 con PEG maleimida

Muestra	Integral de 4 h para pico de 6,86 ppm	Integral de 25,5 h para pico de 6,86 ppm	% de degradación en un periodo de 21,5 h a pH de 7,4
Muestra 1 de PEG-maleimida	1,16	0,52	55
Muestra 2 de PEG-maleimida	0,75	0,61	19
	Integral total de 4 h para picos de 7,31, 7,40, 7,47, 7,73, 8,03 ppm	Integral total de 25,5 h para picos de 7,31, 7,40, 7,47, 7,73, 8,03 ppm	
Muestra 1 de reactivo PEG 9	4,85	4,82	<1
Muestra 2 de reactivo PEG 9	3,93	4,01	0

Ejemplo 11. PEGilación del fragmento de laminina 925-983 (Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃) que contenía un único tiol de cisteína libre a pH variable.

- 5 Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ es un nonapéptido lineal (Cys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂) (Sigma, N° de cat. C0668), que corresponde a residuos 925-933 de la cadena B1 de laminina y contiene un único tiol de cisteína.

10 *PEGilación con reactivo PEG **9** a pH variable:* Se disolvió péptido Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ liofilizado (1 mg) en 500 μ l de agua desionizada dando una solución madre de 2 mg/ml. Después de agitación con vórtice, la solución madre de péptido se usó recién preparada o se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su uso. La solución madre de Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ se diluyó dos veces dando una concentración final de 1 mg/ml (1 mM) en la mezcla de reacción de PEGilación. Se disolvió péptido el reactivo PEG **9** de 5 kDa (5 mg) en 200 μ l de agua desionizada dando una solución madre de 25 mg/ml. Después de agitación con vórtice, la solución madre de reactivo PEG se usó recién preparada o se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su uso. La solución madre de PEG se diluyó cinco veces dando una concentración final de 5 mg/ml (1 mM) en la mezcla de reacción de PEGilación.

- 15 La solución madre de tampón contenía tampón de fosfato de sodio 1 M para el intervalo de pH de 6,0-8,0 y tampón de carbonato-bicarbonato de sodio 1 M para el intervalo de pH de 8,5-10,0. Para todos los valores de pH, la solución madre de tampón contenía también EDTA 10 mM e hidroquinona 381 μ M. La solución madre de tampón se diluyó diez veces dando una concentración final de agente tampón 100 mM (fosfato de sodio o carbonato-bicarbonato de sodio), EDTA 1 mM e hidroquinona 38 μ M.

- 20 Cada una de las mezclas de reacción de PEGilación contenía 5 μ l de solución madre de Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃, 1 μ l de solución tampón, 2 μ l de solución de reactivo PEG (correspondientes a una relación molar 1:1 de reactivo PEG con respecto al péptido modelo Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃) y 2 μ l de agua desionizada dando un volumen de reacción total de 10 μ l. Después de agitación con vórtice durante varios segundos, seguida por una breve centrifugación (30 s a 5.000 x g) para recoger la solución en el fondo del tubo, las mezclas de reacción se incubaron en reposo a temperatura ambiente durante 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 16 y 24 horas. Después de la incubación a temperatura ambiente, los tubos que contenían las mezclas de reacción se dispusieron a -80 °C y se almacenaron hasta el análisis por cromatografía en fase inversa.

- 30 Para el ensayo de cromatografía en fase inversa se usó una columna Source 5RPC ST 4.6/150 (GE Healthcare, N° de cat. 17-5116-01). La columna se conectó a un sistema de HPLC Jasco que comprendía una bomba de HPLC Jasco PU-980 Intelligent, una unidad de gradiente Jasco LG-980-02 Ternary, una unidad de desgasificación Jasco Degassys Populaire, un detector de UV Jasco UV-970 4- ω Intelligent, una interfaz Jasco LC-NetII/ADC para conexión a PC y una válvula de inyección manual Rheodyne 7725i. El sistema de HPLC se controló mediante un ordenador usando el paquete informático de cromatografía EZchrom SI versión 3.2.1 Build 3.2.1.34 (Agilent Technologies). El análisis del cromatograma y la exportación de datos se realizaron usando el sistema de datos de cromatografía EZchrom SI.

35 Se usó un sistema de tres eluyentes. El eluyente A contenía el 5 % de acetonitrilo (Far UV, grado HPLC, Fisher, N° de cat. A/0627/17) y el 0,065 % de ácido trifluoroacético (TFA) (Acros, N° de cat. 139721000) en agua desionizada. El eluyente B contenía el 0,075 % de TFA en acetonitrilo, mientras que el eluyente C fue el 100 % acetonitrilo. Los eluyentes se desgasificaron por sonicación antes de su uso. El programa de elución implicó un gradiente del 0-64 %

de B en 20 minutos, seguido por lavado en el 100 % de acetonitrilo y reequilibración en eluyente A (Tabla 2). Se mantuvo un flujo constante de 1 ml/min a lo largo del proceso. Se registró la absorbancia a 215, 250, 280 y 350 nm a lo largo del proceso. Cada muestra (10 μ l) se descongeló y se centrifugó brevemente (1 min a 14.000 g) inmediatamente antes de que se inyectaran 5 μ l de sobrenadante en la columna de cromatografía en fase inversa.

5 **Tabla 2:** Ajustes para el programa de elución con gradiente usado para el ensayo de cromatografía en fase inversa

Tiempo (min)	Caudal (ml·min ⁻¹)	A (%)	B (%)	C (%)
inicial	1,00	100	0	0
20,00	1,00	36	64	0
20,20	1,00	0	0	100
24,00	1,00	0	0	100
24,20	1,00	100	0	0
30,00	1,00	100	0	0

10 La identidad de cada pico en los cromatogramas se confirmó procesando muestras estándar (reactivo PEG, péptido sin reaccionar reducido y oxidado) y mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC) para una estimación de tamaño relativa (para conjugado de producto de PEGilación: péptido-PEG). La columna usada para SEC analítico fue una columna analítica BioSep-SEC-S3000 (300 x 7,8 mm) (Phenomenex, N° de cat. 00H-2146-KO). El eluyente de proceso usado fue tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0) que contenía acetonitrilo al 10 % (v/v) y el caudal se mantuvo constante a 2 ml/min a lo largo del proceso.

15 La figura 13 muestra cromatogramas de tiempo-transcurso de un experimento de PEGilación a pH 6,5, usando 1 equivalente molar de reactivo PEG **9** de 5 kDa. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, eran visibles cinco picos: el péptido reactivo con PEG Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ (pico 1); un dímero de péptido no reactivo formado mediante formación de disulfuro (pico 2); grupo saliente de ácido sulfónico del reactivo PEG **9** (pico 3, compuesto **11** en la figura 14); un pico correspondiente al producto peptídico PEGilado (conjugado de PEG de 5 kDa-Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃) (pico 4) y el reactivo PEG **9** (pico 6, forma no reactiva).

20 Después de 4 horas de incubación, todo el péptido libre (pico 1) se había consumido cuando se completó la PEGilación. Algún pico de reactivo PEG activado en exceso (pico 5, compuesto **10** en la figura 14) también está presente debido a que alguno de los péptidos formó un dímero no reactivo (pico 2, nótese que el reactivo PEG absorbe más fuertemente que el péptido a concentraciones equivalentes). El Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ oxidado (pico 2) no podía estar PEGilado ya que no posee ningún tiol libre y, por lo tanto, su pico correspondiente (pico 2) permaneció sin cambios durante el transcurso del experimento. Este resultado es coherente con la PEGilación del tiol de cisteína que tiene lugar en el péptido reducido.

25 La reactividad del reactivo PEG **1** hacia Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ a entre pH 6,0 y pH 8,0 se evaluó midiendo la conversión del péptido (pico 1) a producto de Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ PEGilado de 5 kDa (pico 4). Los resultados de los picos del péptido se normalizaron asignando el valor de 100 al área del pico calibrado correspondiente a la cantidad total de péptido usada en cada reacción de PEGilación, mientras que los resultados de los picos del producto se normalizaron usando un área de pico de producto máxima deducida correspondiente a la conversión total del péptido en producto. La conversión (%) se definió como la proporción de péptido PEGilado con respecto a la cantidad inicial de péptido usada en la reacción. El resultado se muestra en la figura 15. A pH de 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0 todo el péptido se PEGiló. La velocidad hasta completar la reacción depende del pH, cuanto mayor sea el pH, más rápida será la velocidad, y refleja la diferente velocidad de formación de la estructura reactiva **10** (figura 14) a diferentes pH.

35 **Ejemplo 12. Comparación de la reactividad de reactivo PEG **9** y una PEG-maleimida disponible comercialmente a pH variable.**

40 La reactividad de reactivo PEG **9** hacia el péptido Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ del ejemplo 11 se comparó con un reactivo PEG reactivo con tiol disponible comercialmente, PEG maleimida (O-(2-maleimidoetil)- Ω '-metil-politilenglicol 5.000, Fluka, N° de cat. 63187). Para asegurar que el reactivo PEG **9** estaba inmediatamente disponible para la reacción en el experimento de tiempo-escala, el reactivo se dejó formar en primer lugar la forma reactiva con tiol (reactivo **10**, figura 14) mediante incubación a pH 7,5 (2 horas, 4 °C) y el reactivo **10** se aisló mediante cromatografía en fase inversa antes de su conjugación con el péptido. Todas las reacciones de péptidos se llevaron a cabo con reactivo PEG recién disuelto. Brevemente, la solución de reacción de PEGilación (escala de reacción: 10 μ l) contenía 10 μ g de Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃, 50 μ g de reactivo PEG (5 kDa) (correspondiente a una relación molar de 1:1 de reactivo PEG con respecto al péptido modelo Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃) en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 6,0-8,0) o carbonato-bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,5-10,0) y EDTA 1 mM. Después de la incubación a temperatura ambiente, las

mezclas de reacción se analizaron mediante cromatografía en fase inversa como se ha descrito previamente en el ejemplo 11. El resultado se muestra en la figura 16. Para reactivos PEG **9** (pH 9,0 a 10) y **10** (pH 6,0 a 8,0), la conversión total del péptido en la forma PEGilada pudo lograrse entre pH 6,0 y pH 10 en un periodo de 15 minutos.

5 Para la conversión del reactivo PEG-maleimida solo se alcanzó un máximo del 78,9 % después de 15 minutos. A pH superior, la conversión fue incluso inferior (51,2 a pH 10). Se tomó una muestra de la reacción de PEG-maleimida a pH 8,5 de nuevo después de 16 h y todo el péptido se había consumido.

A todos los valores de pH analizados, por lo tanto, los reactivos PEG **9** y **10** eran más eficaces que el reactivo de PEG-maleimida.

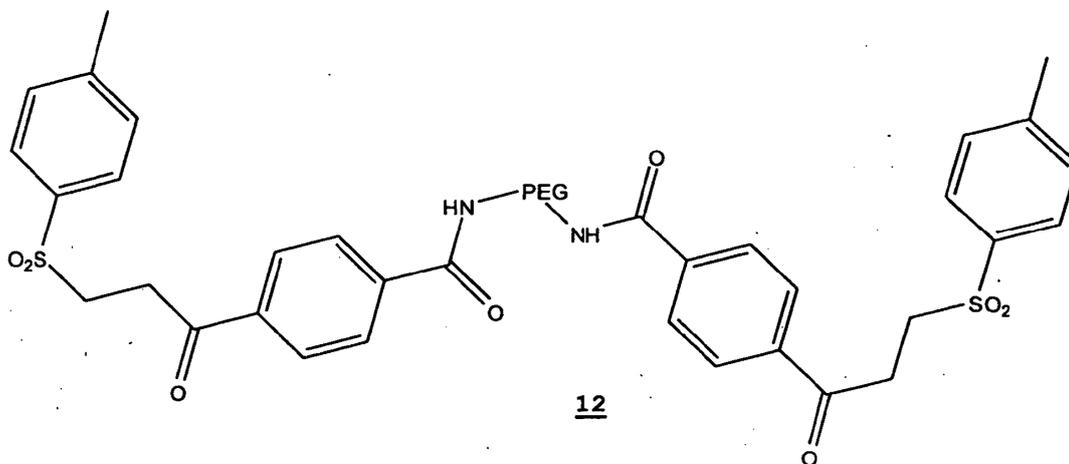
10 **Ejemplo 13. Estabilidad de un conjugado de reactivo PEG péptido y comparación con un conjugado de péptido derivado de PEG-maleimida.**

La estabilidad de conjugados de péptido Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ purificados preparados a partir de reactivo PEG **9** y PEG-maleimida del ejemplo 12 se compararon a lo largo de 12 días. La estabilidad de los conjugados se determinó realizando un seguimiento del área del pico de PEG-péptido usando cromatografía en fase inversa tal como se ha descrito en el ejemplo 11.

15 *Síntesis de Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ PEGilado con reactivo PEG **9**:* El conjugado se preparó usando un procedimiento modificado del ejemplo 11 (pH de 6,0 usando una concentración final de péptido de 1,6 mg/ml y 0,4 mg de péptido). El producto se aisló mediante cromatografía en fase inversa. El pico de elución correspondiente al conjugado Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃-PEG se recogió, se liofilizó y subsiguientemente se resuspendió en agua desionizada. Finalmente, se añadieron 2 mM de borohidruro de sodio (Acros Organics, N° de cat. 200050250) y después la muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,5). *Síntesis de Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ PEGilado con PEG-maleimida:* Se usó Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ (0,4 mg) para la PEGilación con reactivo PEG-maleimida de 5 kDa (5 kDa, Fluka, N° de cat. 63187). Brevemente, se añadieron 20 μ l de 10 x solución madre de tampón (que contenía tampón de fosfato de sodio 1 M (pH 8,0) y EDTA 10 mM) y 40 μ l de solución madre de reactivo PEG (25 mg/ml en agua desionizada) a 200 μ l de solución madre de péptido (2 mg/ml en agua desionizada). Después de 1,5 horas de incubación a temperatura ambiente, el producto se purificó usando cromatografía en fase inversa tal como se describe en el ejemplo 11. La muestra del pico de elución se liofilizó y subsiguientemente se resuspendió en agua desionizada y después se añadió tampón de fosfato de sodio 50 mM se ajustó el pH a 8,0. Se usó cromatografía en fase inversa para asegurar que las concentraciones de ambas solución de PEG-péptido fueran aproximadamente iguales.

30 Ambas muestras de estabilidad se incubaron a temperatura ambiente. Después de 12 días, las muestras se analizaron mediante RPC y la estabilidad determinada con el cambio en el área de integración para los picos del conjugado se muestra en la figura 17. El conjugado derivado de reactivo PEG **9** permaneció estable a lo largo de 12 días. Para el conjugado derivado de PEG-maleimida, solo permaneció el 63 % en el cromatograma que mostraba que el reactivo PEG **9** conduce a un producto más estable.

35 **Ejemplo 14. PEGilación usando PEG funcionalizado en ambos extremos – reactivo PEG **12**.**



40 Se preparó reactivo PEG **12** de un modo análogo al reactivo PEG **9** usando O,O'-bis(2-aminoetil)polietilenglicol 6000 (Fluka, N° de cat. 14504) y se hizo reaccionar con el péptido modelo del ejemplo 11 (Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃). Se añadieron agua (6 μ l), 2 μ l de 10 x solución madre de tampón (que contenía tampón de fosfato de sodio 1 M (pH 8,0), 381 μ M de hidroquinona y EDTA 10 mM) y 2 μ l de reactivo PEG **12** (25 mg/ml) se añadieron a 10 μ l de solución madre de Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ (2 mg/ml en agua desionizada). Esto correspondió a una relación molar de 1:0,375 de péptido modelo

con respecto al reactivo PEG. La solución de reacción (5 μ l) se analizó mediante RPC analítica (tal como se describe en el ejemplo 11) después de 2,5 h de incubación a temperatura ambiente. Todos los componentes de la solución de reacción eluyeron como picos separados: El monómero Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ eluyó a 8,1 min, el dímero de Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ oxidado eluyó a 8,9 min, el reactivo PEG no activado eluyó a 17,3 min, el reactivo PEG activado eluyó a 15,7 min y el grupo saliente **11** a 10,1 min. El pico del producto eluyó a 14,2 minutos. Después de 2,5 h, el 65 % del Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ libre presente (86 % de reacción en el reactivo **12**) en la solución de reacción se había conjugado mostrando que ambos extremos reactivos del reactivo PEG **12** experimentan reacción y que este reactivo disfuncional puede unirse exitosamente a una molécula peptídica en ambos extremos de una molécula PEG.

Ejemplo 15. Uso de poli(1-vinil-2-pirrolidona) (PVP) como el componente polimérico: Conjugación de PVP con péptido modelo Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃.

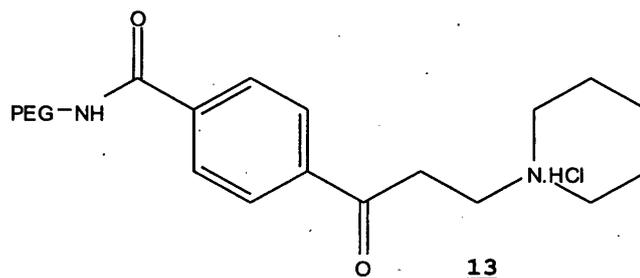
Preparación de reactivo PVP (3 etapas):

Etapa 1: PVP con un grupo amino terminal: Un tubo a presión se cargó con cisteamina (0,028 g), dioxano (8 ml) y una barra de agitación magnética. Después de un suave calentamiento para permitir formar una solución, la solución se purgó con argón a temperatura ambiente durante 5 min. Mientras aún se purgaba, se añadió después 1-vinil-2-pirrolidona (2,0 g) y después de otros 5 min se continuó añadiendo 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (0,089 g). Después de otros 2 min el tubo a presión se selló con un tapón roscado en atmósfera de argón y se dispuso en un baño de aceite a 60 °C durante 17 h con agitación. Después de dejar enfriar el tubo y su contenido a temperatura ambiente, se añadió dietiléter (15 ml), lo que causó la precipitación del producto polimérico. La fase líquida se separó por decantación y el residuo sólido se volvió a disolver en acetona (3 ml). La solución de acetona resultante se añadió después gota a gota a dietiléter (25 ml) con agitación rápida y el precipitado se aisló en un embudo de vidrio sinterizado N° 2 con un ligero estallido de vacío. Con sólido se lavó con dietiléter nuevo (10 ml) y después se dejó secar al vacío a temperatura ambiente (masa = 1,44 g, sólido blanco).

Etapa 2 – Conjugación de grupo terminal reactivo con proteína a PVP-amina: Se mezclaron PVP-amina (500 mg), ácido 4-(3-tosilpropanoil)benzoico (estructura **6** en la figura 3, 166 mg) y 4-dimetilaminopiridina (6 mg) con diclorometano anhidro (10 ml) en atmósfera de argón y con agitación se añadió después 1,3-diisopropilcarbodiimida (155 μ l). La mezcla resultante se dejó en agitación durante un fin de semana a temperatura ambiente. Los compuestos volátiles se evaporaron durante el fin de semana, de modo que el residuo sólido se volviera a disolver en diclorometano (10 ml) y después se filtró a través de una lana de algodón no absorbente. Al filtrado se añadió después dietiléter (30 ml) y el precipitado resultante se aisló por centrifugación (4.600 rpm, -9 °C, 10 min). La fase líquida se separó por decantación y el residuo remanente se volvió a disolver en diclorometano (10 ml). El procedimiento de purificación por precipitación de dietiléter se repitió dos veces más y el residuo se dejó secar al vacío (513 mg). Las señales de RMN de diagnóstico para el grupo enlazante conjugado a PVP tuvieron lugar a 7,97, 7,82, 7,59 y 7,38 en CDCl₃.

Etapa 3 – Fraccionamiento de reacción PVP: Una porción (120 mg) del material sólido obtenido en la etapa anterior se mezcló con tampón de acetato de sodio acuoso 20 mM, NaCl 150 mM, pH 4,0 y después se centrifugó a 13.000 rpm hasta que se pudo observar una solución transparente y la fase líquida se filtró en 0,45 μ m. El filtrado, después, se fraccionó (se cargaron 1,9 ml) en una columna de exclusión por tamaño de grado 200 prep HiLoad 16/60 Superdex™ (GE Healthcare) procesándose en tampón de acetato de sodio 20 mM, 150 mM, pH 4,0 a 1 ml/min, recogiendo fracciones cada 1 min durante la elución del pico. La fracción que eluyó entre 73,9 y 74,9 min se usó para la conjugación de proteína después de liofilización. La reacción del péptido se llevó a cabo en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 1 mM, hidroquinona 38 μ M, Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ 1,03 mM y reactivo PVP en exceso. La mezcla de reacción se analizó mediante RPC analítica tal como se describe en el ejemplo 11. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, aproximadamente el 60 % del péptido modelo Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃ libre en la mezcla de reacción se convirtió en conjugado Lam β 1₉₂₅₋₉₃₃-PVP (tiempo de retención de RPC de 11,3 min) que demuestra exitosamente que pueden usarse polímeros diferentes a PEG.

Ejemplo 16. Síntesis y uso de un reactivo PEG con un grupo saliente L basado en amina.



Síntesis de reactivo PEG 13: El reactivo PEG **13** (figura 19) se preparó a partir de la conjugación directa de compuesto **2** (26 mg) con mPEG de 5 kDa-NH₂ (40 mg) en DMSO (5 ml) usando DIPC (11 mg) en un procedimiento análogo al del ejemplo 1 para proporcionar un sólido blancuzco (31 mg). El espectro de RMN del producto (en CDCl₃) dio señales de diagnóstico a 8,02 y 7,59 ppm.

5 **Reacción con el péptido modelo Lamβ₁₉₂₅₋₉₃₃ del ejemplo 11:** La reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 7,5) que contenía EDTA 1 mM, hidroquinona 38 pM, Lamβ₁₉₂₅₋₉₃₃ 1,03 mM y 3 equivalentes molares de reactivo PEG **13**. La mezcla de reacción se analizó por RPC analítica tal como se describe en el ejemplo 11. El Lamβ₁₉₂₅₋₉₃₃ monomérico eluyó a 8,1 min, el Lamβ₁₉₂₅₋₉₃₃ dimerizado eluyó a 8,9 min, el grupo saliente de amina eluyó a 9,3 min, el reactivo PEG **13** sin grupo saliente amina a 15,2 min, el reactivo PEG **13** a 15,75 min y el pico del producto fue a 14,2 min. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, aproximadamente el 10 % del péptido modelo Lamβ₁₉₂₅₋₉₃₃ libre presente en la mezcla de reacción se convirtió en conjugado Lamβ₁₉₂₅₋₉₃₃-PEG.

Ejemplo 17. La PEGilación del tiol y la actividad de IL-1-Ra usando reactivo PEG **9**

15 Una forma no glucosilada recombinante del antagonista del receptor de interleucina 1 humana (IL-1-Ra) se usó como una proteína modelo. La IL-1-Ra consiste en 153 aminoácidos, dos enlaces disulfuro (Cys69/Cys116 y Cys66/Cys122), tiene un peso molecular de 17,3 kDa y contiene una cola de hexahistidina N-terminal.

Una serie de PEGilaciones de tiol se llevó a cabo usando 1-4 equivalentes molares de reactivo PEG **9** de 10 kDa en tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,0 y 7,5). Debido a que la proteína se expresaba reducida, la reducción de los disulfuros antes de la PEGilación no fue necesaria. La concentración de proteína fue de 0,1 mg/ml. Después de 1 hora de incubación a 4 °C, se tomaron muestras para el análisis por SDS-PAGE y el resultado se muestra en la figura 18. A ambos pH de 6,0 y 7,5, el producto principal de la reacción de PEGilación fue IL-1-Ra monoPEGilado cuando se usó 1 equivalente molar de reactivo PEG. Una banda tenue correspondiente a un producto di-PEGilado también puede observarse, así como una banda correspondiente a un IL-1-Ra noPEGilado. El aumento de los equivalentes molares de PEG usados en la reacción dio como resultado un aumento de especies di-, tri- y tetra-PEGiladas. Una PEGilación a gran escala a pH 6,0 se realizó después usando 1,5 mg de IR-1-Ra (0,2 mg/ml) y 1,5 equivalentes molares de reactivo PEG **9** de 20 kDa en tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,0 que contenía EDTA 20 mM. La solución se agitó con vórtice brevemente y se dispuso a 4 °C durante 2 horas. El IL-1-Ra PEGilado se purificó mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados y cromatografía de exclusión por tamaño. Antes de la IMAC, se eliminó el EDTA mediante ciclos repetidos de concentración y dilución con tampón de fosfato nuevo a pH 7,4 usando un dispositivo de centrifugación por ultrafiltración Amicon ultra-4 3.000 Da MWCO (Millipore, N° de cat. UFC 800324). Finalmente, la muestra se concentró a 4 ml y se trató con borohidruro de sodio 2 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y se continuó cargándola en una columna HisTrap HP (1 ml) (GE Healthcare, N° de cat. 17-5247-01) preequilibrada con solución salina de tampón de fosfato (PBS) a pH 7,4. La columna se lavó con 20 ml de PBS y la elución implicó un gradiente de PBS a PBS que contenía imidazol 500 mM en 40 minutos. Las fracciones (1 ml) de eluato se recogieron y una parte alícuota de cada fracción se analizó por SDS-PAGE para identificar las fracciones que contenían el producto PEGilado. Subsiguientemente, las fracciones que contenían el producto PEGilado se combinaron conjuntamente y se concentraron mediante ultrafiltración (Amicon ultra-4 3.000 Da MWCO) a un volumen final de 0,6 ml. Las fracciones de IMAC concentradas se cargaron en una columna HiLoad Superdex 200 16/600 (GE Healthcare, N° de cat. 17-1069-01) que se preequilibró con PBS a pH 7,4. El caudal se mantuvo a 1 ml/min a lo largo del proceso y los productos mono-PEGilados eluyeron a aproximadamente 62 min. Las fracciones (1 ml) se recogieron alrededor del pico de elución y una parte alícuota de cada fracción se analizó mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían producto mono-PEGilado puro se concentraron mediante ultrafiltración y se volvieron a analizar mediante SDS-PAGE para confirmar la pureza y el resultado se muestra en el carril 2 de la figura 19. El gel muestra una única banda correspondiente a proteína mono-PEGilada y es visible proteína no libre.

Después de cuantificación por espectrofotometría, la muestra se analizó para determinar su actividad biológica in vitro evaluación la inhibición de la liberación de IL-6 dependiente de IL-1β en células MG-63. Se añadieron células MG-63 a 20.000 células/pocillo en 100 μl de DMEM/10 % de FCS. El día siguiente se retiró el medio y se añadieron 50 μl/pocillo de medio nuevo. Las muestras se añadieron en una dilución de 5 veces por duplicado (25 μl/pocillo), se preincubaron durante 1 h y después se añadió IL-1β a una concentración final de 0,3 ng/ml (25 μl/ml). La placa se incubó durante 24 h adicionales. Para evaluar la viabilidad celular, se añadieron 10 μl de bromuro de tiozolid-azul-tetrazolio (MTT; 5 mg/ml en DMEM; Sigma-Aldrich, N° de cat. M5655) a cada pocillo y se incubó durante 3 h. Después, la placa se centrifugó a 1.500 g durante 5 min y el medio se aspiró cuidadosamente. El producto de formazán en células con actividad metabólica se disolvió después en DMSO (100 μl/pocillo) y la absorbancia se midió a 570 nm. El resultado se muestra en la figura 20 y muestra que el IL-1Ra PEGilado mantenía actividad inhibidora después de PEGilación con el reactivo **9**.

Ejemplo 18. PEGilación sobre una secuencia de polihistidina de IL-1Ra usando reactivo PEG **9** y actividad de la proteína PEGilada

60 El IL-1Ra del ejemplo 17 se PEGiló también en la cola de polihistidina después de oxidar las cisteínas exentas de proteína a disulfuros con sulfato de cobre antes de la reacción de PEGilación como sigue: Se añadió sulfato de

5 cobre (1 mM) a 2,5 ml de solución de IL-1Ra (0,6 mg/ml, 1,5 mg de IL-1-Ra) en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 200 mM. Después de incubación durante 16 horas a 4 °C, se añadieron 25 mM de EDTA y la muestra se cargó en una columna PD-10 (GE Healthcare) preequilibrada con tampón de fosfato de sodio 50 mM pH 7,5 que contenía EDTA 20 mM. La columna se eluyó después con x 3,5 ml de tampón de fosfato nuevo. La concentración de proteína usada para la PEGilación fue de 0,43 mg/ml y el pH de 7,4 y se incubó durante 16 horas a 4 °C. Reactivo PEG **9** (20 kDa) a 1,5 equivalentes molares con respecto a la proteína. La reacción se incubó durante 16 h a 4 °C. Las especies monoPEGiladas se aislaron usando la misma cromatografía que es describe en el ejemplo 17 junto con el tratamiento de borohidruro de sodio. El resultado de SDS-PAGE del producto se muestra en el carril 2 de la figura 19 en el que no puede observarse nada de proteína libre. La bioactividad del producto se evaluó midiendo la inhibición de la liberación de IL-6 dependiente de IL-1 β en células MG-63 tal como se describe en el ejemplo 17 y el resultado se muestra en la figura 20. El IL-1Ra pegilado poseía actividad inhibidora en el ensayo.

Ejemplo 19: Síntesis de reactivo PEG: Síntesis de reactivo PEG **15** de 10 kDa.

15 Se preparó reactivo de ácido 4-(3-(2-hidroxietilsulfonil)propanoil)benzoico PEGilado **15** a partir de ácido 4-(3-(2-hidroxietilsulfonil)propanoil)benzoico **14** de un modo análogo al descrito para la síntesis de ácido 4-(3-tosilpropanoil)benzoico **9** del ejemplo 1, tal como se muestra en la fig. 21. En primer lugar, se preparó ácido 4-(3-(2-hidroxietilsulfonil)propanoil)benzoico **14** de un modo análogo al ácido 4-(3-tosilpropanoil)benzoico pero usando mercaptoetanol en lugar de 4-metilbencenotiol (etapa 2, ejemplo 1). RMN **14** (400 MHz) δ 3,35 (t, 2H, COCH₂), 3,5 (m sobrelapado, 4H, CH₂SO₂CH₂), 3,8 (t, 2H, CH₂OH), 5,2 (s ancho, CH₂OH), 8,05 (m, 4H, CH aromático), 13,4 (s ancho, 1H, COOH). Para la etapa de conjugación a PEG, la sulfona **14** (143 mg) y O-(2-aminoetil)-O'-metil-PEG (PM: 10 kDa, 1 g, BioVectra) se disolvieron en tolueno seco (5 ml). El disolvente se eliminó al vacío sin calentamiento y el residuo sólido seco se volvió a disolver después en diclorometano seco (10 ml) en atmósfera de argón. A la solución resultante, enfriada en un baño de hielo, se añadió lentamente diisopropilcarbodiimida (DIPC, 87 mg) en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se mantuvo después en agitación durante toda la noche (15 h) a temperatura ambiente. Los compuestos volátiles se eliminaron después al vacío (30 °C, baño de agua) para proporcionar un residuo sólido que se volvió a disolver con calentamiento suave (35 °C) en acetona (45 ml). La solución se filtró a través de lana de algodón no absorbente para eliminar material insoluble. La solución se enfrió después en un baño de hielo seco para dar un precipitado blanco que se separó mediante centrifugación (4600 rpm, 30 min). La fase líquida se decantó y este procedimiento de precipitación se repitió tres veces. Después, el sólido blancuzco resultante se secó al vacío proporcionando el reactivo PEG **15** (1 g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,30 (t, 2H, COCH₂), δ 3,40 (s, 3H, PEG-OCH₃), δ 3,40 – 3,85 (m ancho, PEG), δ 3,50 (m sobrelapado, 2 x 2H, CH₂SO₂CH₂), δ 3,80 (t, 2H, CH₂OH), δ 7,95, δ 8,05 (2 x d, 2 x 2H, ArH de resto de ácido carboxílico).

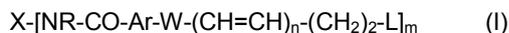
35 Reactivos PEG análogos de diferentes pesos moleculares de PEG se prepararon mediante el mismo procedimiento general. Así, se preparó PEG de 5 kDa mediante reacción de la sulfona **14** (256 mg), O-(2-aminoetil)-O'-metil-PEG (5 kDa, 1 g, BioVectra) y DIPC (174 mg) en diclorometano seco (15 ml) proporcionando después del procedimiento de purificación por precipitación en acetona un sólido blancuzco **15** (1 g).

Ejemplo 20: Síntesis de reactivo PEG: Síntesis de reactivo PEG **17** de 10 kDa.

40 Se preparó reactivo PEG **17** a partir de reactivo PEG **9** como sigue (figura 22): Se dejó reactivo PEG **9** (10 kDa, 75 mg) en agitación con ácido mercaptosuccínico (6 mg) e hidrogenocarbonato de sodio (20 mg) en agua desionizada (2 ml) durante aproximadamente 18 h. Los productos volátiles se eliminaron en un evaporador rotatorio y el residuo sólido se volvió a disolver en acetona caliente (4 ml) eliminándose por filtración compuestos insolubles a través de lana de algodón no absorbente. Después, el producto se precipitó a partir de la acetona enfriando la solución en un baño de hielo seco y después se aisló por decantación la fase líquida siguiendo a la centrifugación. La precipitación de acetona se repitió otras tres veces y el sólido se secó después al vacío dando **16** (51 mg). El compuesto **16** (40 mg) se oxidó después a la forma de sulfona **17** mezclándolo con oxone en metanol:agua 1:1 (1 ml) durante aproximadamente 18 h. La mezcla se diluyó después con acetona (10 ml) y los productos insolubles se eliminaron después por filtración por gravedad a través de una lana de algodón no absorbente. El filtrado homogéneo se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio y después se volvió a disolver en acetona (2 ml) con 2 gotas de HCl 1 N añadidas y después se aisló mediante precipitación en acetona sencilla como se ha descrito para **16** (mg). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,24-3,08 (m sobrelapado, CH₂CH, COCH₂), 3,38 (s, PEG-OCH₃), 3,44 a 3,84 (s ancho, m sobrelapado, PEG y CH₂SO₂), 4,44 (dd, SO₂CH), 7,45 (s ancho, NH), 7,98 y 8,06 (2 x d, 4H, ArH de resto de ácido carboxílico).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula general:



en la que X representa un polímero; Ar representa un grupo heteroarilo o arilo opcionalmente sustituido; R representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquil-arilo; W representa un grupo ceto CO ; n representa 0 o un número entero de 1 a 4; L representa un grupo saliente; y m representa un número entero de 1 a 8.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que X es un polialquilenglicol, polivinilpirrolidona, poliacrilato, polimetacrilato, polioxazolona, poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, polimetacrilamida, copolímero HPMA, poliéster, poliactal, poli(orto-éster), policarbonato, poli(iminocarbonato), poliamida, copolímero de diviniléter-anhídrido maleico y estireno-anhídrido maleico, polisacárido o proteína.

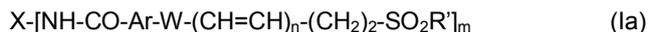
3. Un compuesto según la reivindicación 2, en el que X es un polialquilenglicol.

4. Un compuesto según la reivindicación 3, en el que X es un polietilenglicol.

5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que n es 0.

6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que L representa $-SR$, $-SO_2R$, $-OSO_2R$, $-N^+R_3$, $-N^+HR_2$, $-N^+H_2R$, halógeno o $-O\emptyset$, en las que R representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquil-arilo y 0 representa un grupo arilo sustituido que contiene al menos un sustituyente aceptor de electrones.

7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene la fórmula general:



en la que Ar representa un grupo arilo no sustituido o sustituido y R' representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquil-arilo no sustituido o sustituido.

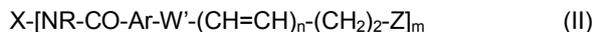
8. Un compuesto según la reivindicación 8, en el que Ar representa un grupo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes iguales o diferentes seleccionados de, $-CN$, $-NO_2$, $-CO_2R$, $-COH$, $-CH_2OH$, $-COR$, $-OR$, $-OCOR$, $-OCO_2R$, $-SR$, $-SOR$, $-SO_2R$, $-NHCOR$, $-NRCOR$, $-NHCO_2R$, $-NRCO_2R$, $-NO$, $-NHOH$, $-C=N-NHCOR$, $-C=N-NR.COR$, $-N^+R_3$, $-N^+H_3$, $-N^+HR_2$, $-N^+H_2R$, halógeno, $-C=CR$, $-C=CR_2$ y $-C=CHR$, en los que cada R representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquil-arilo.

9. Un compuesto según la reivindicación 8, en el que Ar representa un grupo fenilo y R' representa un grupo p -tolilo.

10. Un procedimiento de conjugación de una molécula que contiene un tiol o un grupo amino con un polímero que comprende hacer reaccionar dicha molécula con un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha molécula es un péptido o una proteína.

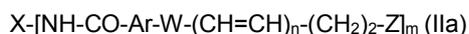
12. Un compuesto de una fórmula general II:



en la que X , R , Ar , n y m tienen los significados dados en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, Z representa una molécula conjugada a través de un grupo tiol o amino, y W' representa un grupo ceto CO o un grupo que puede prepararse mediante reducción de dicho grupo.

13. Un compuesto según la reivindicación 12, en el que W' representa un grupo ceto CO , un grupo $CH.OH$ o un grupo amino $CH.NH_2$, $CH.NHR$ o $CH.NR_2$, en los que cada R representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquil-arilo.

14. Un compuesto según la reivindicación 12, que tiene la fórmula general:



en la que Ar representa un grupo arilo no sustituido o sustituido.

15. Un compuesto según la reivindicación 14, en el que Ar representa un grupo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes iguales o diferentes seleccionados de, $-CN$, $-NO_2$, $-CO_2R$, $-COH$, $-CH_2OH$, $-COR$, $-OR$, $-OCOR$, $-OCO_2R$, $-SR$, $-SOR$, $-SO_2R$, $-NHCOR$, $-NRCOR$, $-NHCO_2R$, $-NR.CO_2R$, $-NO$, $-NHOH$, $-NR.OH$, $-C=N-NHCOR$, $-C=N-NR.COR$, $-N^+R_3$, $-N^+H_3$, $-N^+HR_2$, $-N^+H_2R$, halógeno, $-C=CR$, $-C=CR_2$ y $-C=CHR$, en los que cada R representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquil-arilo.

16. Un compuesto según la reivindicación 15, en el que Ar representa un grupo fenilo.
17. Un compuesto según cualquiera de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que Z es un péptido o una proteína.
18. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5

Figura 1

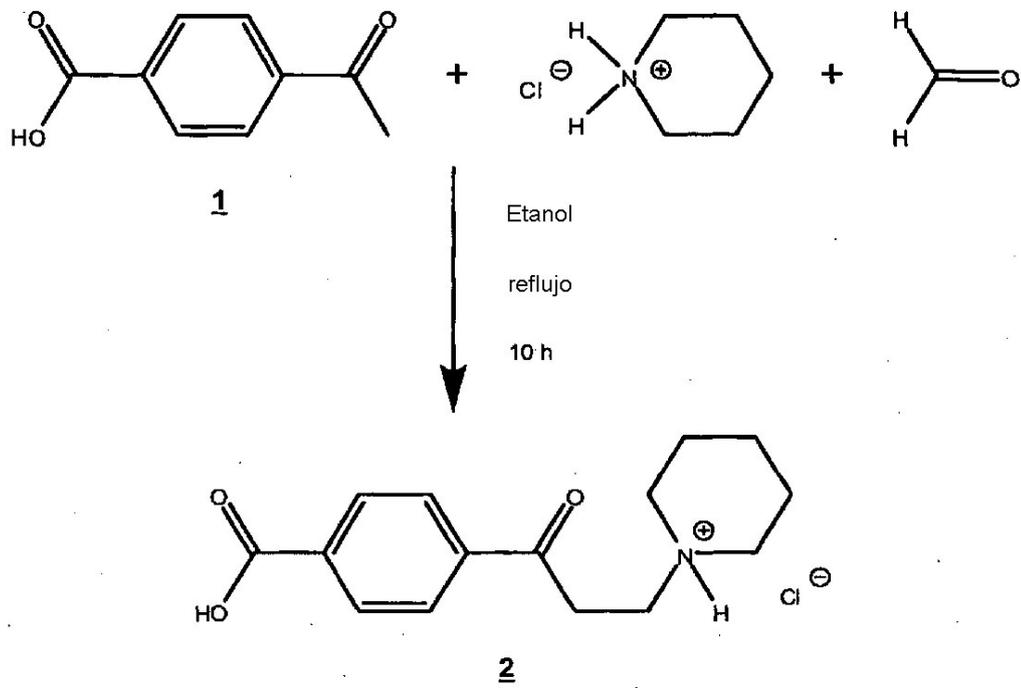


Figura 2

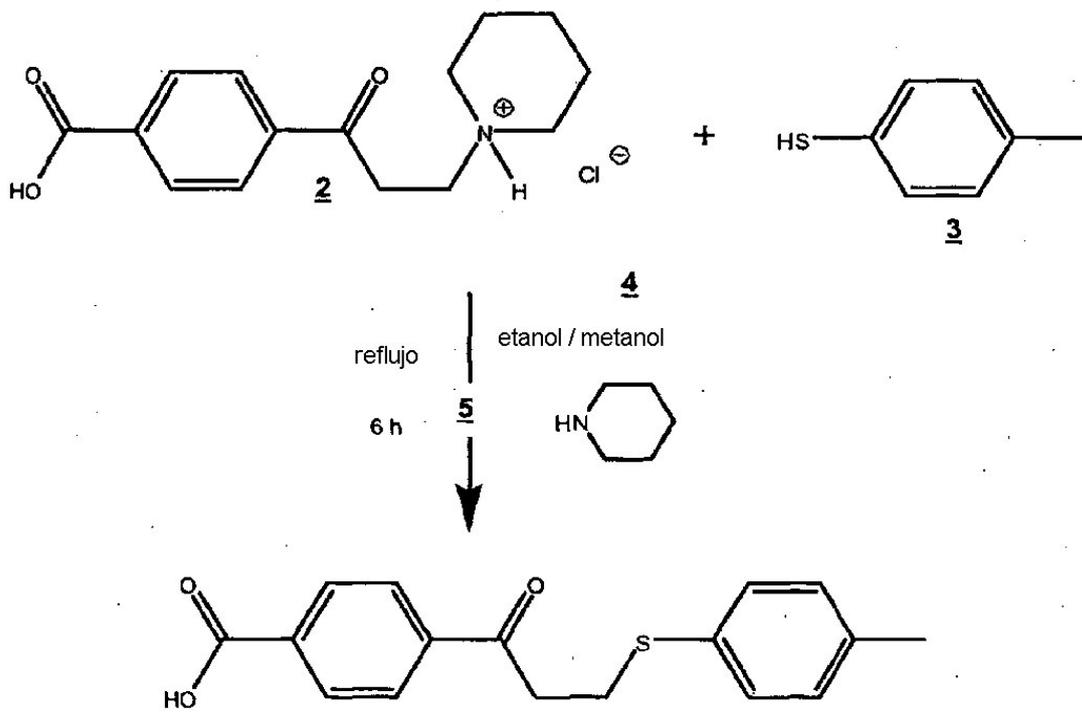


Figura 3

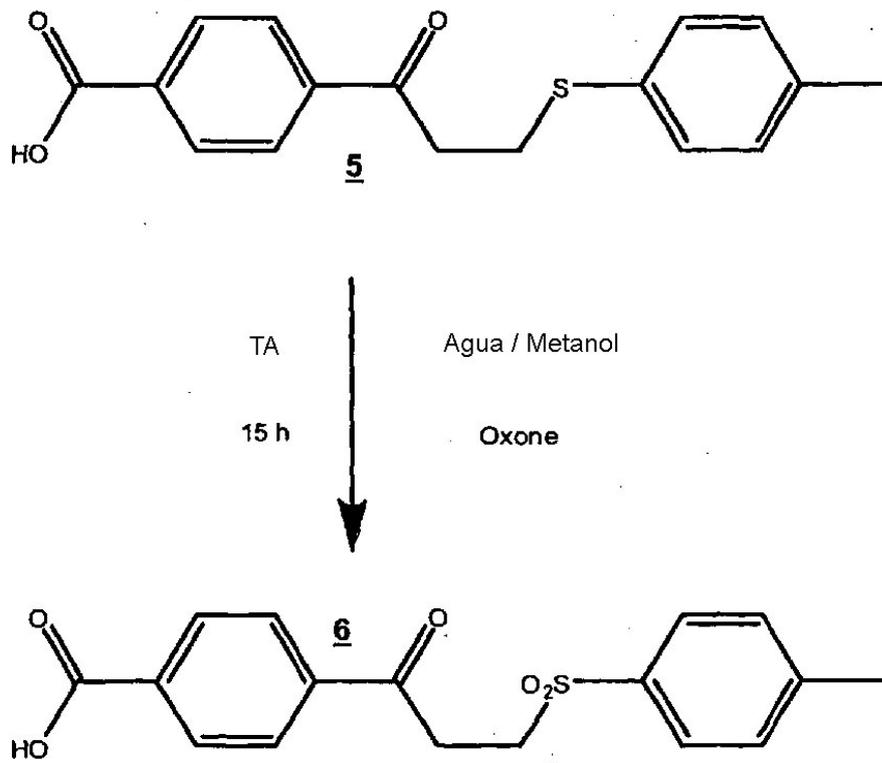


Figura 4

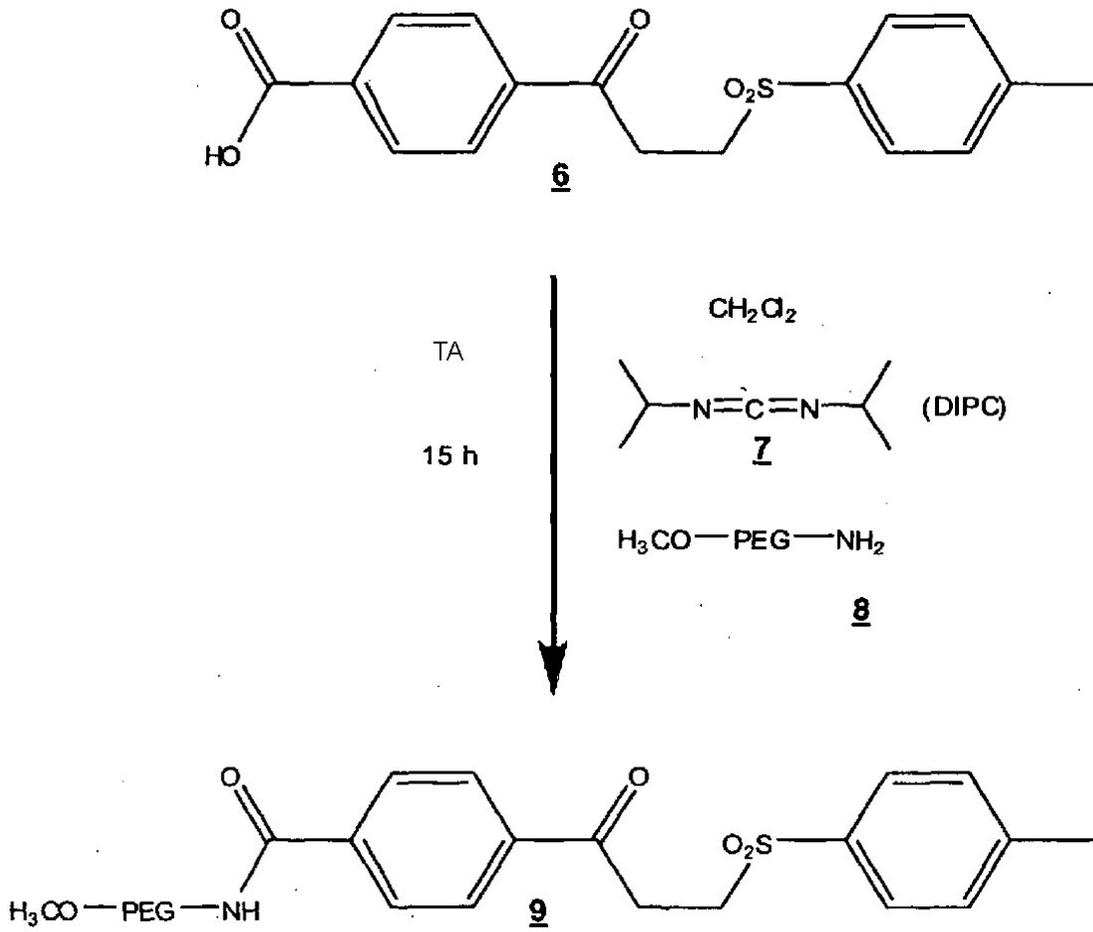


Figura 5

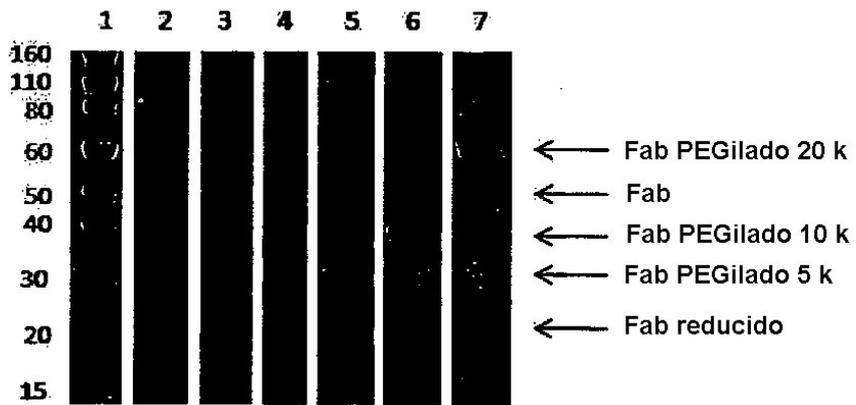


Figura 6

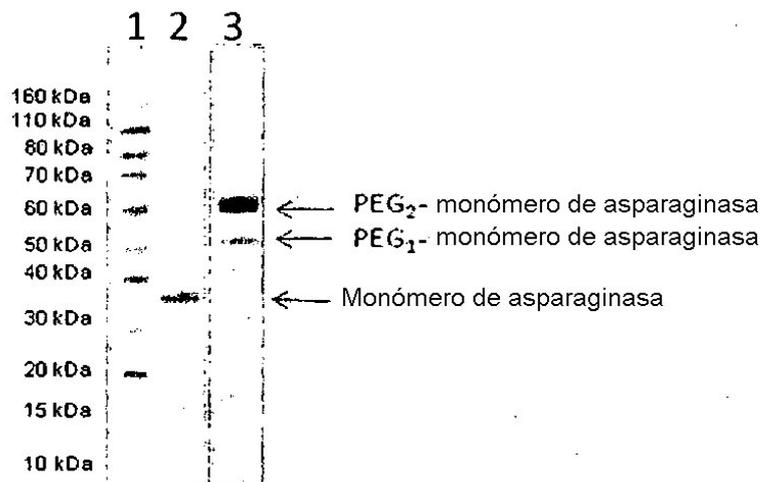


Figura 7

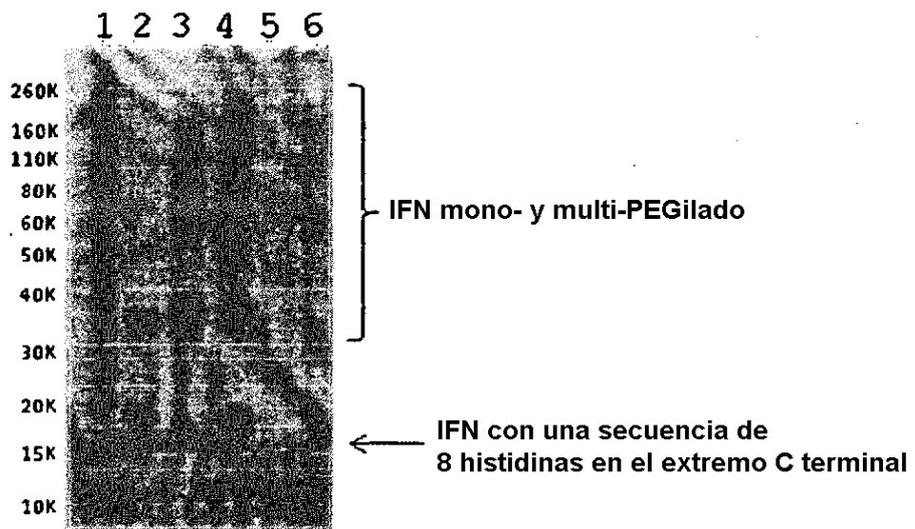


Figura 8

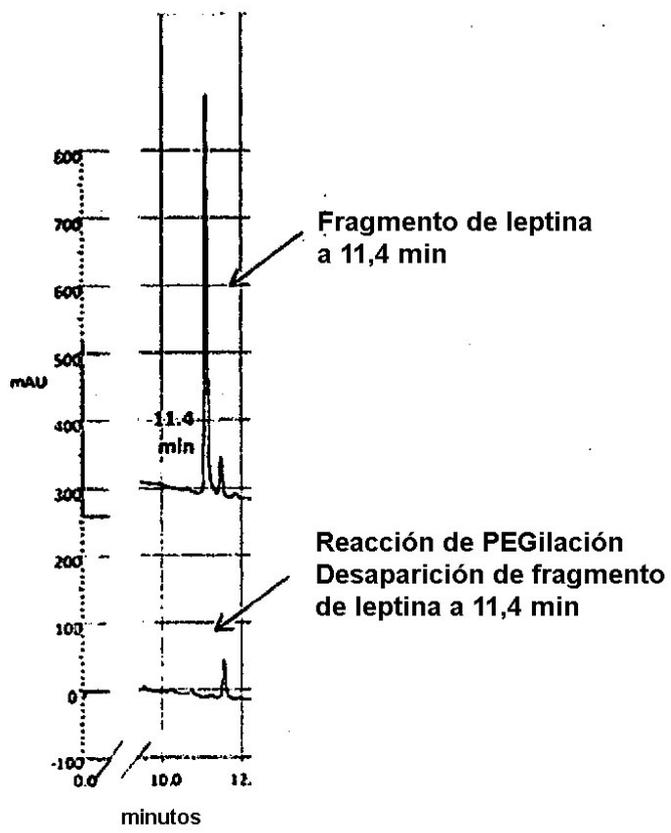


Figura 9

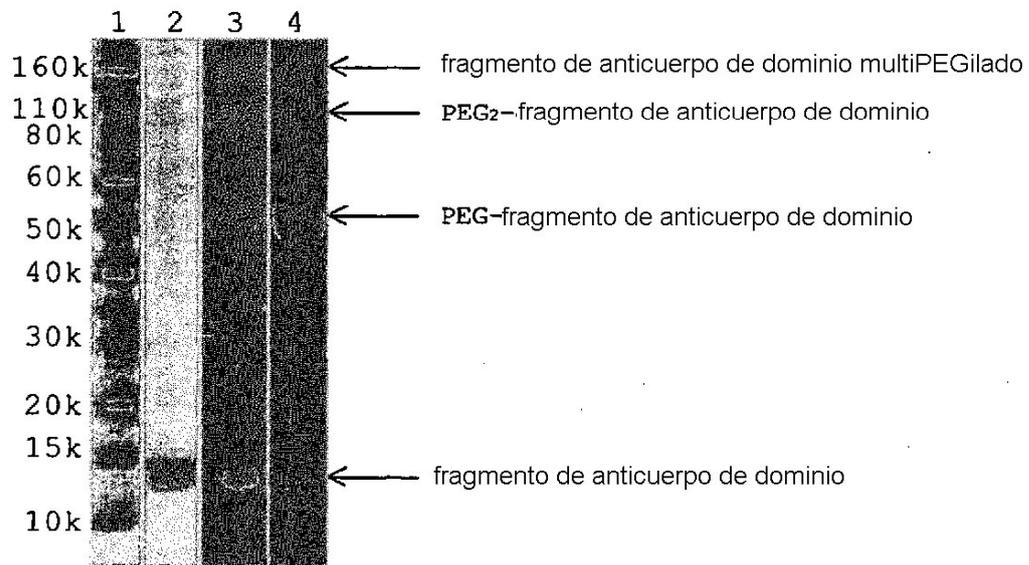


Figura 10

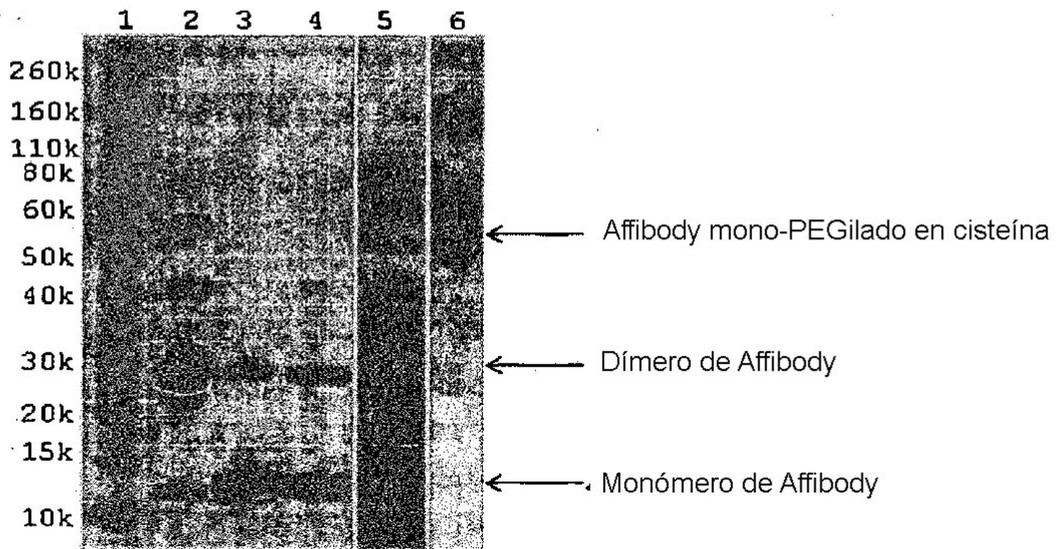


Figura 11

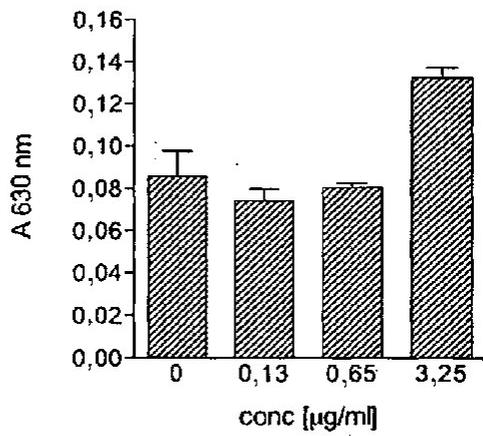


Figura 12

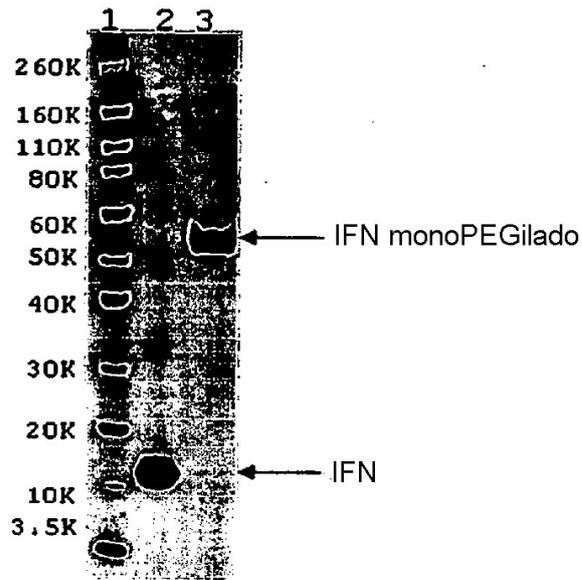


Figura 13

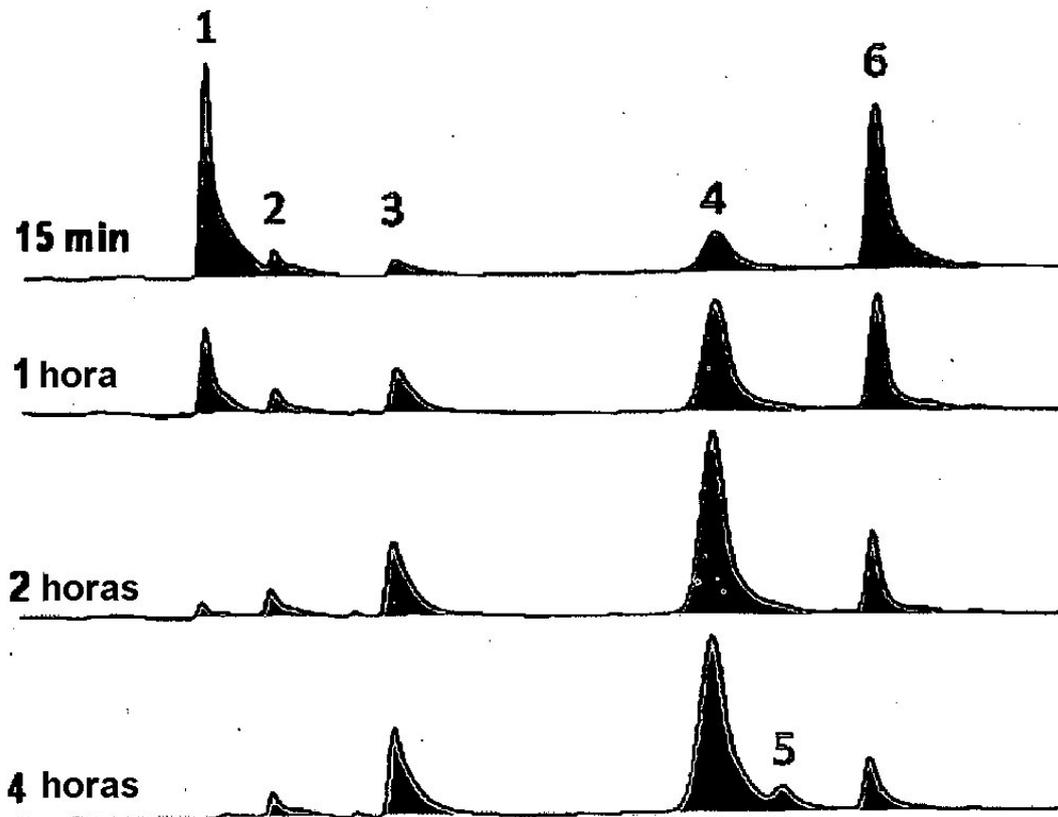


Figura 14

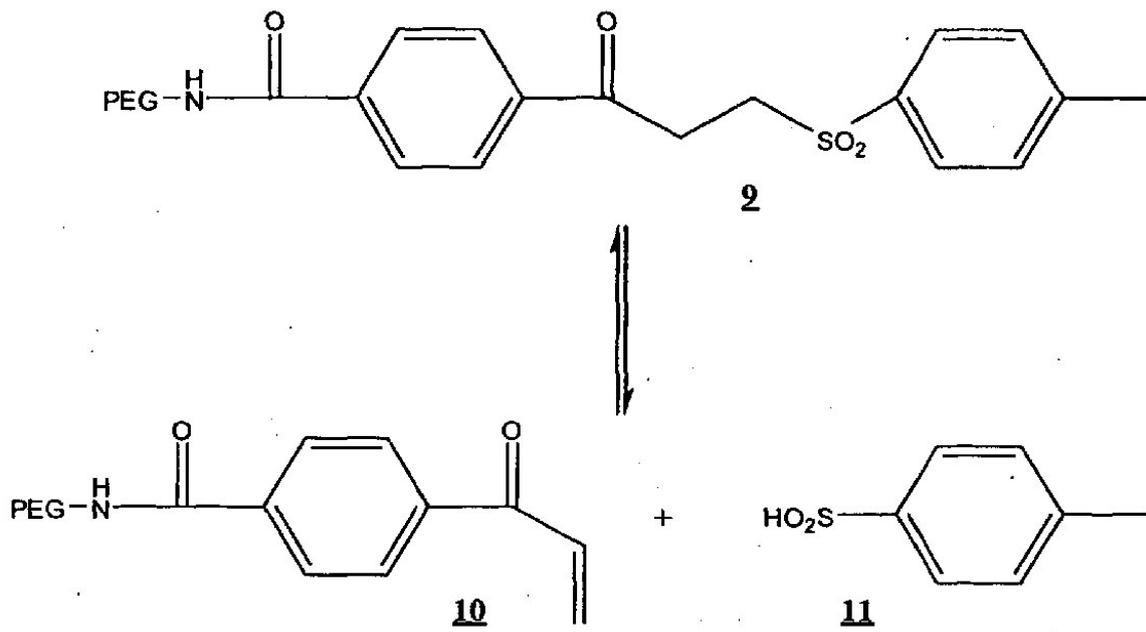


Figura 15

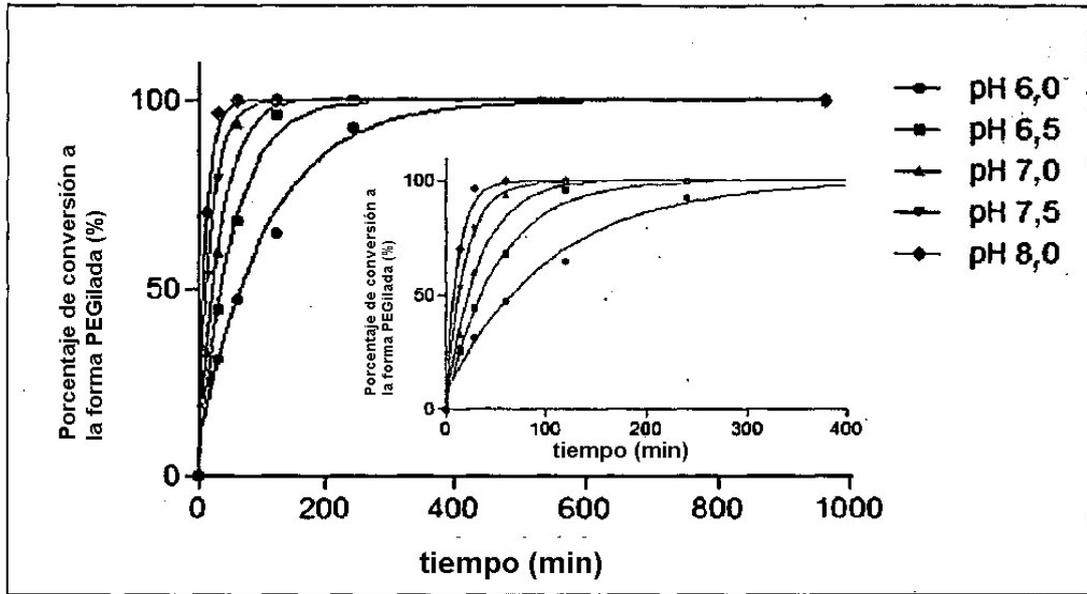


Figura 16

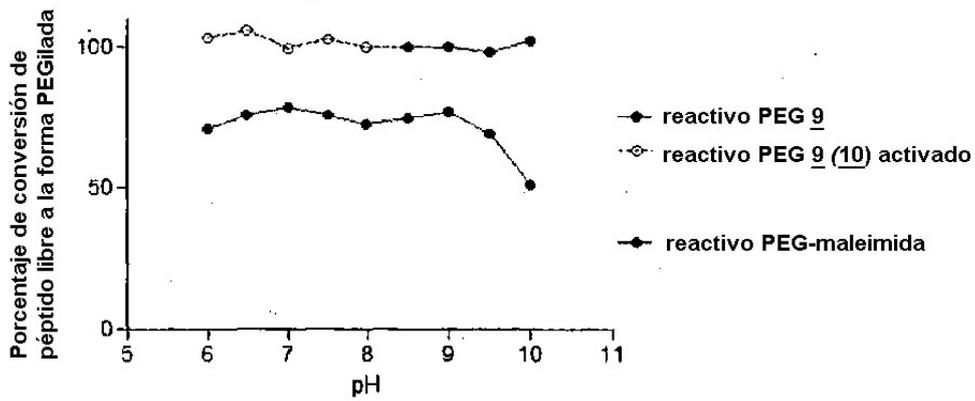


Figura 17

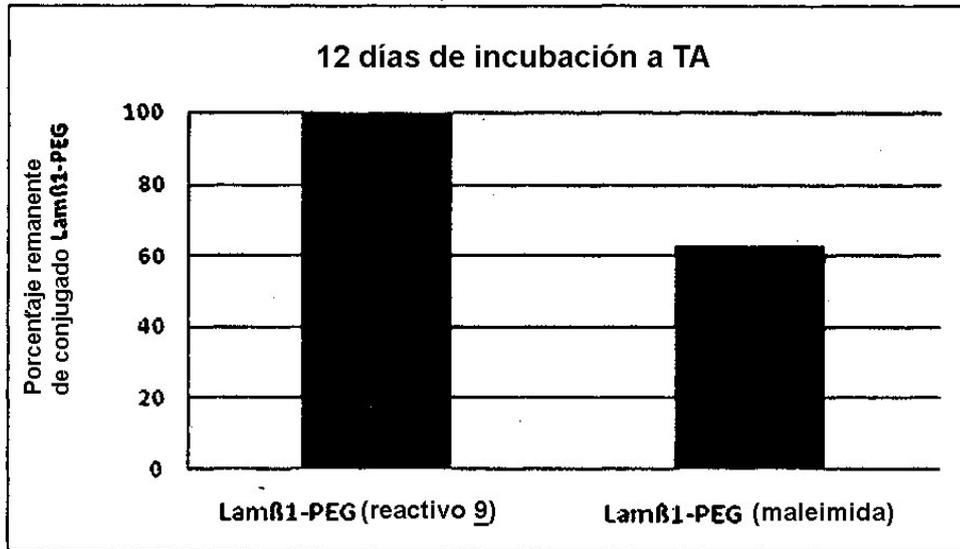


Figura 18

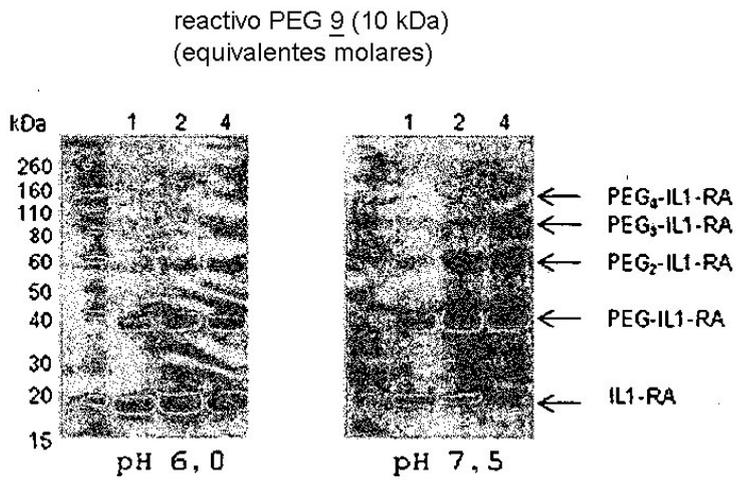


Figura 19

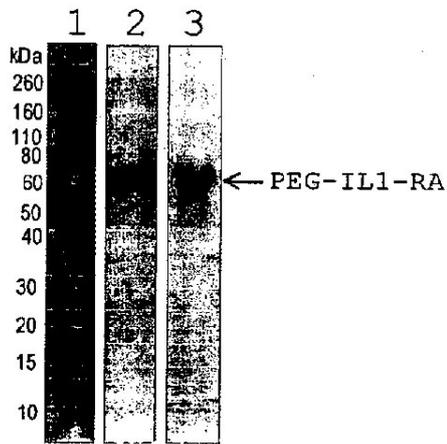


Figura 20

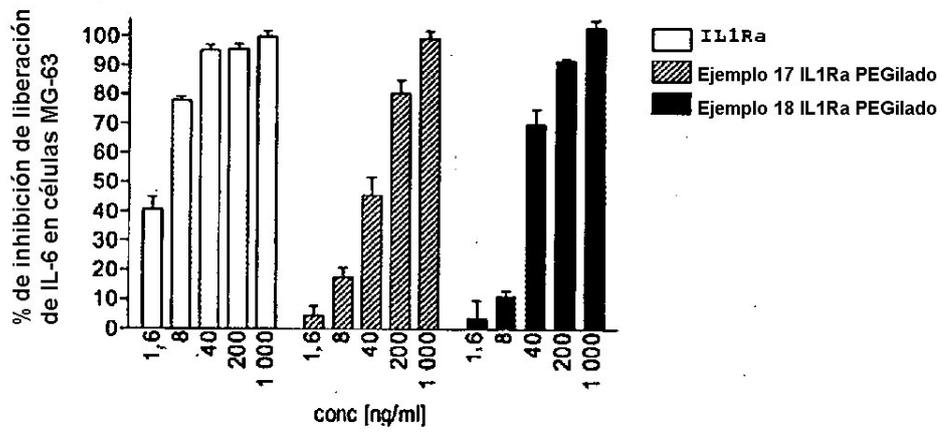


Figura 21

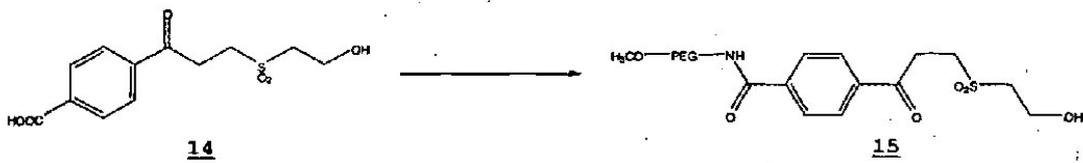


Figura 22

