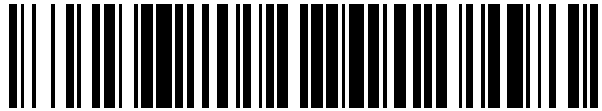


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 531**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2004 E 10175143 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2277550**

54 Título: **Procedimiento de preparación de moléculas biológicas conjugadas**

30 Prioridad:

11.07.2003 GB 0316294

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2015

73 Titular/es:

**POLYTHERICS LIMITED (100.0%)
The London Biotechnology Innovation Centre 2
Royal College Street Camden
London, NW1 0TU, GB**

72 Inventor/es:

**GODWIN, ANTONY ROBERT;
PEDONE, ELISA;
CHOI, JI-WON y
BROCCHINI, STEPHEN JAMES**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 542 531 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

Procedimiento de preparación de moléculas biológicas conjugadas

Esta invención se refiere un procedimiento de preparación de moléculas biológicas conjugadas. Además, se refiere a nuevos derivados químicamente funcionalizados de polietilenglicol.

5 Muchas moléculas terapéuticamente activas no tienen las propiedades requeridas para lograr eficacia en el uso médico clínico. Por ejemplo, se están descubriendo ahora y produciendo por la industria farmacéutica y por ingeniería genética proteínas y polipéptidos terapéuticamente activos. Aunque en la actualidad se comercializan en los Estados Unidos como mínimo 80 medicinas basadas en proteínas y hay como mínimo 350 medicinas más basadas en proteínas sometidas a ensayos clínicos (Harris J., Chess R: Effect of Pegylation on Pharmaceuticals, Nature Review Drug Discovery, 2003, 2, 214-221), la mayoría de las proteínas naturales no permiten hacer
10 medicinas porque, después de administración a pacientes, hay varios inconvenientes inherentes entre los que están incluidos: las proteínas son digeridas por muchas endopeptidasas y exopeptidasas presentes en la sangre o en tejidos, (2) muchas proteínas son inmunógenas en cierta cuantía y (3) las proteínas pueden ser rápidamente excretadas por ultrafiltración en el riñón. Entre otras moléculas usadas como agentes terapéuticos activos en medicinas que son sistémicamente tóxicas o carecen de biodisponibilidad y propiedades farmacocinéticas óptimas están incluidas moléculas de bajo peso molecular de las que una dosis eficaz está limitada por la toxicidad. Tales moléculas se usan rutinariamente para tratar la inflamación y afecciones debidas a neoplasias malignas, infección y enfermedad autoinmune.

Se usan polímeros sintéticos solubles en agua, en particular polialquilenglicoles, para conjugar moléculas terapéuticamente activas tales como proteínas. Estos conjugados terapéuticos han demostrado que alteran favorablemente la farmacocinética por prolongar el tiempo de circulación y disminuir la velocidad de depuración, disminuir la toxicidad sistémica y, en varios casos, presentar una eficacia clínica acrecentada. Este procedimiento de conjugar covalentemente polietilenglicol, PEG, a proteínas, se conoce comúnmente como "PEGilación", y se han examinado muchos polímeros diferentes como polímeros de conjugación.

25 Muchos reactivos polímeros para conjugación comprenden funcionalidad química de conjugación que es hidrolíticamente inestable. Son ejemplos de reactivos polímeros hidrolíticamente inestables de conjugación, ésteres activos que incluyen, por ejemplo, carbonatos de polióxido de alquileo-N-succinimida (Zalipsky, patente U.S. nº. 5.122.614). Estos reactivos tienen semividias relativamente cortas en medio acuoso, que incluye sangre o plasma. Esto da por resultado la necesidad de añadir excesos estequiométricos grandes del reactivo de conjugación del polímero. La estabilidad hidrolítica del reactivo es importante porque el requerimiento de añadir excesos estequiométricos para la conjugación de proteínas requiere un esfuerzo y un coste significativos para purificar el conjugado de polímero-proteína de la mezcla de reacción. Además, estos reactivos hidrolíticamente inestables tienden a reaccionar preferiblemente con la funcionalidad química amina de la proteína, en particular con la amina ϵ de los restos de lisina. Puesto que la mayoría de las proteínas de interés tienen más de un resto de lisina y, frecuentemente, muchos restos de lisina, la conjugación tiende a ser inespecífica en cuanto a que se produce en muchos sitios del resto en la proteína. Es posible purificar la mezcla de reacción de conjugación para aislar proteínas conjugadas a una molécula de polímero, aunque no es posible aislar a un coste razonable conjugados de polímero-proteína de los que la totalidad están conjugados al mismo grupo amina en la proteína. Frecuentemente, la conjugación no específica da por resultado una función proteínica empeorada. Por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con unión de poli(óxido de etileno) al azar mediante restos de lisina dan por resultado anticuerpos modificados (o fragmentos de anticuerpo modificados) capaces de unirse a antígeno diana con afinidad, avidez o especificidad reducida. Además, los reactivos de conjugación de amina específicos para polímeros requieren una condiciones de conjugación que deben seleccionarse para asegurar que las aminas de la proteína no sean protonadas. Estas condiciones requieren un medio con un pH moderadamente alto (8-10), que permite que los restos amina sean lo suficientemente reactivos para reaccionar con el reactivo de conjugación del polímero. Frecuentemente, las condiciones de un pH alto son perjudiciales para la proteína, causando cambios estructurales y desnaturalización. Esto procesos dan por resultado un empeoramiento de la función proteínica. Los reactivos específicos para la conjugación de polímeros a amina tienden a unirse a sitios accesibles de amina de la proteína. Estos reactivos se pueden llamar reactivos cinéticos. Son lábiles y reaccionan con la mayor parte de los sitios nucleófilos amino evaluables de la proteína. Los reactivos que conjugan polímeros específicos a amina que se conjugan por acilación de amina dan por resultado la pérdida de carga positiva en el grupo amina del resto de aminoácido de la proteína que normalmente estaría presente en condiciones fisiológicas para la proteína no conjugada. Estos rasgos de los reactivos de conjugación de polímeros específica a amina frecuentemente dan por resultado un empeoramiento de la función de la proteína. Otros grupos funcionales de conjugación incorporados en polímeros para conjugación a proteínas y que son aminas específicos y que con frecuencia son hidrolíticamente lábiles incluyen los isocianatos (documento WO 94/04193) y los carbonatos (documento WO 90/13540).

Es particularmente relevante para una eficacia optimizada y para asegurar la consistencia de dosis a dosis, cuidar de que el número de moléculas de polímero conjugadas por proteína sea el mismo y que cada molécula de polímero esté específicamente conjugada covalentemente al mismo resto de aminoácido en cada molécula de proteína. La conjugación no específica en sitios a lo largo de una molécula de proteína da por resultado una distribución de productos de conjugación y, frecuentemente, proteína no conjugada, obteniéndose una mezcla compleja que es

difícil, laboriosa y cara de purificar.

Se han desarrollado reactivos de conjugación de polímeros específica a tiol para proteínas con el fin tratar las limitaciones a la propensión de los reactivos de conjugación a experimentar hidrólisis que sea competitiva con la conjugación a la proteína, la conjugación no específica de polímero en diferentes restos de aminoácido de la proteína y la necesidad de condiciones de pH alto en la reacción de conjugación. Los reactivos de conjugación específica de polímeros a tiol se pueden utilizar a valores del pH próximos a la neutralidad a los que los restos funcionales amina de los restos de aminoácidos de la proteína se protonan y no pueden así competir eficazmente en la reacción de conjugación con el reactivo de conjugación del polímero. Los reactivos de conjugación específica de polímeros a tiol y que son relativamente más estables hidrolíticamente que los reactivos específicos a amina antes mencionados se pueden utilizar en un exceso estequiométrico menor, reduciendo así el coste durante la purificación del conjugado polímero-proteína. Entre los restos funcionales de conjugación que son ampliamente selectivos para grupos tiol están incluidos yodoacetamida, maleimida (documento WO 92/16221), vinilsulfona (documentos WO 95/13312 y WO 95/34326), vinilpiridinas (documento WO 88/05433) y ésteres acrilato y metacrilato (documento WO 99/01469). Estos restos selectivos de conjugación de tiol dan un enlace individual de conjugación tioéter entre el polímero.

La mayoría de las proteínas no tienen sulfhidrales libres porque estos sulfhidrales experimentan reacciones de transposición y desbarajuste con los puentes disulfuro dentro de la proteína dando por resultado una función proteínica empeorada. Para proteínas que tienen sulfhidrales libres, con frecuencia estos sulfhidrales son críticos para la función proteínica. Típicamente, en una proteína, el número de restos sulfhidrales es inferior al número de restos amina (por ejemplo, lisina o histidina). Puesto que la conjugación a una proteína puede hacerse que sea específica a grupos tiol y puesto que las proteínas típicamente no tienen grupos tiol libres, hay ejemplos de modificación específica del sitio de la proteína por mutagénesis para introducir sitios de tiol para la unión de PEG. Pero tales modificaciones aumentan los costes significativamente. El sulfhidral libre introducido puede tener limitaciones similares a las mencionadas antes en la proteína diseñada por ingeniería para arrastre y dimerización de la proteína. También el proceso de mutagénesis y producción de la proteína modificada de fuentes bacterianas frecuentemente causa que los sulfhidrales libres se unan en un enlace disulfuro con glutatona, por ejemplo. La interleuquina 2, por ejemplo, ha sido modificada por mutagénesis para reemplazar un resto de treonina por una cisteína para tener una unión específica al sitio de unión de PEG [Goodson RJ, Katre NV; Bio/Technology (1990) 8, 343-346].

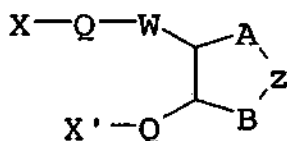
Se sabe en la técnica que los parámetros de conjugación han de casar óptimamente con la molécula terapéuticamente activa de interés en términos de morfología del polímero, características del peso molecular, funcionalidad química. Aunque el conjugado de polímero-proteína puede presentar muchas propiedades favorables y necesarias para un uso seguro, médicamente eficaz, el efecto de la conjugación de polímero sobre la actividad y la estabilidad de la proteína es de vital importancia para el comportamiento. Las variables de conjugación relacionadas con el sitio y la cantidad de conjugación y las características del polímero se deben correlacionar óptimamente con las propiedades biológicas y fisicoquímicas.

El documento WO 99/45964, Adv. Drug Del. Rev., 54(4), 459-476 y el documento WO 95/34326 describen diversos reactivos para la conjugación. Bioconj. Chem. 5(3), 220-235, Bioconj. Chem. 1(1), 51-59, Biocon. Chem. 1(1), y 36-50 J Am Chem Soc 110, 5211-5212 describe reactivos de "transferencia de equilibrio crucifuncionado de alquilación".

El documento WO 01/05818 describe compuestos de ciclosporina solubles en agua conjugados. El documento US 2002/103259 describe conectores poliméricos ramificados en sus finales. El documento US 5.786.387 describe un derivado de lípido de doble cadena que contiene un polioxiétileno. El documento WO 99/55377 describe conjugados PEG-interferón-β.

La invención en su primer aspecto considera la conjugación de los dos átomos de azufre que forman puentes disulfuro naturales en proteínas nativas. Se encuentran enlaces disulfuro en proteínas médicamente relevantes, específicamente, proteínas secretoras, proteínas lisosomales, y los dominios exoplásmicos de proteínas de membrana. La tecnología proporciona ventajas claras sobre técnicas conocidas para conjugar polímeros a proteínas.

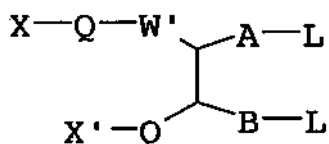
La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula general:



(I)

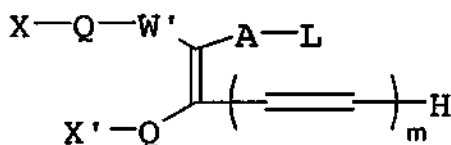
en la que cada uno de X e X' representa polietilenglicol, y el otro representa un átomo de hidrógeno;

cada Q representa independientemente un grupo de unión;
 W representa un grupo ceto CO, un grupo éster -O-CO- o un grupo sulfona -SO₂-, o un grupo obtenido por
 reducción de tal grupo; o, si X' representa polietilenglicol, X-Q-W- juntos representan un grupo ciano;
 Z representa una proteína que está unida a A y B por medio de dos grupos tiol que se han obtenido de un puente
 5 disulfuro de la proteína;
 A es una cadena de alquileo o alquenileno C₁₋₅; y
 B es un enlace o una cadena de alquileo o alquenileno C₁₋₄; que comprende reducir un puente disulfuro en una
 proteína y hacer que el producto resultante reaccione en un medio de reacción acuoso bien con (i) un compuesto
 de la fórmula general



(II)

10 en la que X, X', Q, A, B y L tienen los significados dados anteriormente, W' representa un grupo ceto o aldehído
 CO, un grupo éster -O-CO- o un grupo sulfona -SO₂-, y cada L representa independientemente un grupo
 saliente;
 o (ii) un compuesto de la fórmula general



(III)

15 en la que en el que X, X', Q, A, B y L tienen los significados dados para la fórmula general II, y m representa un
 número entero de 1 a 4.

La invención además proporciona un α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]-acetil]benzamida poli(etilenglicol).

20 Un polialquilenglicol puede contener una cadena individual lineal, o puede tener una morfología ramificada
 compuesta por muchas cadenas, pequeñas o grandes. Se pueden usar polialquilenglicoles sustituidos, por ejemplo,
 metoxipolietilenglicol. En una realización preferente de la invención, se inicia un polietilenglicol de cadena individual
 por un grupo adecuado, por ejemplo, un grupo alcoxi, por ejemplo metoxi, ariloxi, carboxi o hidroxilo, y se conecta en
 el otro extremo de la cadena al grupo conector Q.

25 El polímero de polietilenglicol X o X' opcionalmente se puede derivatizar o funcionalizar de cualquier manera que se
 desee. Por ejemplo, los polietilenglicoles con dos o más restos químicos para conjugación se pueden usar para
 crear conjugados de dos o más moléculas bioactivas unidas. Los grupos reactivos se pueden unir en el grupo
 terminal o final del polímero, o a lo largo de la cadena del polímero mediante conectores pendientes. Los conjugados
 30 multímeros que contienen más de una molécula biológica, típicamente un polipéptido biológicamente activo o
 fármaco, pueden dar por resultado beneficios sinérgicos y aditivos. Si se desea, se puede acoplar el polímero a un
 soporte sólido usando procedimientos convencionales.

35 El peso molecular óptimo del polietilenglicol dependerá, obviamente, de la aplicación prevista. Preferiblemente, el
 peso molecular numérico medio está en el intervalo de 500 g/mol a aproximadamente 75.000 g/mol. Cuando se
 pretende que el compuesto de la fórmula general I abandone la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo, para
 uso en el tratamiento de una inflamación causada por una neoplasia maligna, infección o enfermedad autoinmune, o
 por trauma, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular más bajo, en el intervalo de 2000-
 30.000 g/mol. Para aplicaciones en las que se quiere que el compuesto de fórmula general I permanezca en
 circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular más alto, por ejemplo en el intervalo de 20.000-
 75.000 g/mol.

40 Un grupo conector Q puede ser, por ejemplo, un enlace directo, un grupo alquileo (preferiblemente un grupo
 alquileo C₁₋₁₀) o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, cualquiera de los cuales puede estar
 terminado o interrumpido por uno o varios átomos de oxígeno, átomos de azufre, grupos -NR (en los que R tiene el

significado que se da más adelante), grupos ceto, grupos $-O-CO-$ y/o grupos $-CO-O-$. Entre los grupos arilo adecuados están incluidos los grupos fenilo y naftilo, mientras que entre los grupos heteroarilo están incluidos piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina. La unión al polietilenglicol puede ser a través de un enlace hidrolíticamente lábil o un enlace no lábil.

- 5 Entre los sustituyentes que pueden estar presentes en un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido están incluidos, por ejemplo, uno o varios de sustituyentes, iguales o diferentes, seleccionados entre $-CN$, $-NO_2$, $-CO_2R$, $-COH$, $-CH_2OH$, $-COR$, $-OR$, $-OCOR$, $-OCO_2O$, $-SR$, $-SOR$, $-SO_2R$, $-NHCOR$, $-NRCOR$, $-NHCO_2R$, $-NR'CO_2R$, $-NO$, $-NHOH$, $-NR'OH$, $-C=N-NHCOR$, $-C=N-NR'COR$, $-N^+R_3$, $-N^+H_3$, $-N^+HR_2$, $-N^+H_2R$, halógeno, por ejemplo flúor o cloro, $-C\equiv CR$, $-C=CR_2$ y $-C=CHR$, en los que cada R o R' representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo (preferiblemente alquilo C_{1-6}), o arilo (preferiblemente fenilo). Es especialmente preferida la presencia de sustituyentes aceptores de electrones.

10 W representa un grupo ceto CO, un grupo éster $-O-CO-$, o un grupo sulfona $-SO_2-$, o un grupo obtenido por reducción de uno de tales grupos, por ejemplo un grupo CH.OH, un grupo éter CH.OR, un grupo éster CH.O.C(O)R, un grupo amina CH.NH₂, CH.NHR o CH.NR₂, o una amida CH.NHC(O)R o CH.N(C(O)R)₂, o X-Q-W juntos representan un grupo ciano.

15 La proteína Z puede ser, por ejemplo, un polipéptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una enzima, una citocina, quimiocina o un receptor. También se pueden usar polipéptidos constreñidos o cíclicos que usualmente se ciclan a través de un puente disulfuro, y epitopos. Más adelante se da una lista de proteínas adecuadas.

20 El grupo saliente L, o cada uno de ellos, puede representar, por ejemplo, $-SR$, SO_2R , $-OSO_2R$, $-N^+R_3$, $-N^+HR_2$, $-N^+H_2R$, halógeno o $-O\emptyset$, en los que R tiene el significado dado antes y \emptyset representa un grupo arilo sustituido, especialmente arilo que contiene como mínimo un sustituyente aceptor de electrones, por ejemplo, $-CN$, $-NO_2$, $-CO_2R$, $-COH$, $-CH_2OH$, $-COR$, $-OR$, $-OCOR$, $-OCO_2R$, $-SR$, $-SOR$, $-SO_2R$, $-NHCOR$, $-NRCOR$, $-NHCO_2R$, $-NR'CO_2R$, $-NO$, $-NHOH$, $-NR'OH$, $-C=N-NHCOR$, $-C=N-NR'COR$, $-N^+R_3$, $-N^+HR_2$, $-N^+H_2R$, halógeno, especialmente cloro o, especialmente flúor, $-C\equiv CR$, $-C=CR_2$ y $-C=CHR$, en los que cada R y R' tienen el significado dado antes.

25 El procedimiento de acuerdo con la invención se realiza por reducción de un enlace disulfuro derivado de dos aminoácidos de cisteína de la proteína in situ, haciendo reaccionar seguidamente el producto reducido con el compuesto de fórmula (II) o (III) en un medio de reacción acuoso. Los disulfuros se pueden reducir, por ejemplo, con ditioneitol, mercaptoetanol o tris-carboxietilfosfina usando procedimientos convencionales. El medio de reacción acuoso también se puede tamponar dependiendo de los requerimientos de pH de los grupos tiol. Generalmente, el pH óptimo para la reacción es de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8, por ejemplo de 7,4, preferiblemente de aproximadamente 6,0-6,5. Generalmente, las temperaturas de reacción entre 3 y 37 °C son adecuadas: las proteínas se pueden descomponer o desnaturizar con perjuicio de la función si la reacción de conjugación se efectúa a una temperatura a la que pueden producirse estos procesos.

30 Una proteína puede contener un puente disulfuro o una multiplicidad de puentes disulfuro. La reducción para que resulten restos sulfhidral libres se puede realizar para reducir un puente disulfuro o una multiplicidad de puentes disulfuro en una proteína. Dependiendo de la cuantía de la reducción de disulfuros y la estequiometría del reactivo polímero de conjugación que se usa, es posible conjugar una molécula o una multiplicidad de moléculas de polímero a la proteína. Si se desea, se pueden usar agentes reductores inmovilizados para reducir menos de la totalidad de disulfuros, como también se puede reducir usando condiciones de reacción diferentes o añadiendo desnaturizantes.

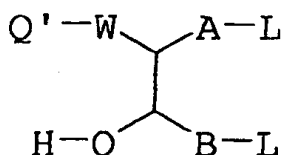
35 La proteína se puede conjugar efectivamente con los reactivos usados en la presente invención usando un equivalente estequiométrico o un ligero exceso de reactivo, a diferencia de muchos reactivos de la técnica anterior. Sin embargo, puesto que los reactivos usados en la presente invención no experimentan reacciones competitivas con el medio usado para solvatar proteínas, es posible llevar a cabo la reacción de conjugación con una estequiometría de reactivo en exceso. El reactivo en exceso puede eliminarse fácilmente por cromatografía de intercambio iónico durante la purificación rutinaria de proteínas.

40 Los compuestos de las fórmulas (II) y (III) son nuevos y, determinados compuestos específicos se reivindican en las reivindicaciones 7 a 9 de la presente solicitud. Estos nuevos reactivos proporcionan una ruptura en la tecnología de conjugados, comprendiendo el resto funcional químico en el polímero un resto funcionalizado cruzado, latentemente conjugado por cruce, de bisalquilación, que es selectivo para dos nucleófilos, particularmente dos tioles derivados de un enlace disulfuro natural en proteínas.

45 El producto inmediato del procedimiento de acuerdo con la invención es un compuesto de la fórmula general I en la que W es un grupo ceto CO, un grupo éster $-O-CO-$ o un grupo sulfona $-SO_2-$. Tales compuestos son útiles en sí; porque el procedimiento de la invención es reversible en condiciones adecuadas; adicionalmente los compuestos de la fórmula (I) en la que W es uno de estos grupos son útiles en aplicaciones en las que se requiere la liberación de la proteína libre, por ejemplo, en aplicaciones clínicas directas. Sin embargo, tal grupo W puede ser reducido, resultando un resto que impide la liberación de la proteína y tales compuestos serán también útiles en muchas aplicaciones clínicas, industriales y diagnósticas.

5 Así por ejemplo, un grupo ceto puede reducirse a un grupo CH(OH); se puede obtener un grupo éter CH.OR por reacción de un grupo hidroxilo con un agente de eterificación; se puede obtener un grupo éster CH.O.C(O)R por reacción de un grupo hidroxilo con un agente de acilación; se puede obtener un grupo amina CH.NH₂, CH.NHR o CH.NR₂ a partir de una cetona o un aldehído por aminación reductora; o se puede formar una amida CH.NHC(O)R o CHN(C(O)R)₂ por acilación de una amina. Un grupo X-Q-W que es un grupo ciano se puede reducir a un grupo amina.

Un compuesto de la fórmula general (II) en la que X representa un polietilenglicol se puede preparar haciendo reaccionar un compuesto de la fórmula general



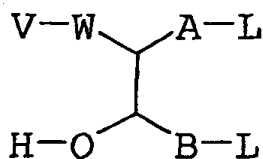
(VI)

10 en la que Q', W, A, B y L tienen el significado dado antes, con un polímero de la fórmula general



en la que X representa un polietilenglicol; siendo Q' y V grupos seleccionados de manera que los compuestos de fórmula (VI) y (VII) reaccionarán juntos dando el compuesto deseado de fórmula (II). Alternativamente, un compuesto de la fórmula

15



(VIII)

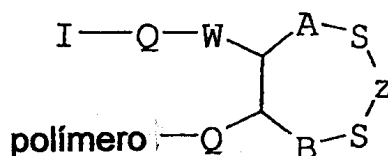
se puede hacer reaccionar con un polietilenglicol de la fórmula general



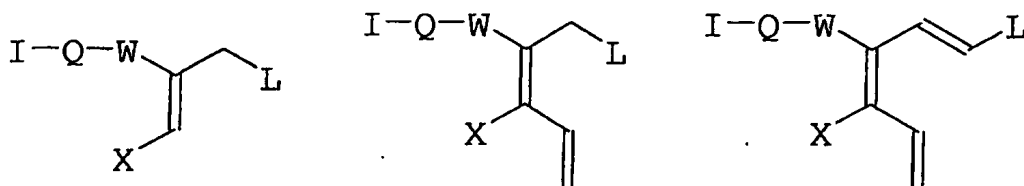
20 Se puede preparar un compuesto de la fórmula general (III) por eliminación mediada por una base de un grupo saliente L de un compuesto de la fórmula general (II).

Los compuestos de la fórmula general I pueden incluir un agente de obtención de imágenes, por ejemplo, un radionucleótido, para poder seguir un compuesto in vivo. El radionucleótido o el agente de obtención de imágenes I se puede unir a través del grupo W para que resulten, por ejemplo, compuestos del tipo

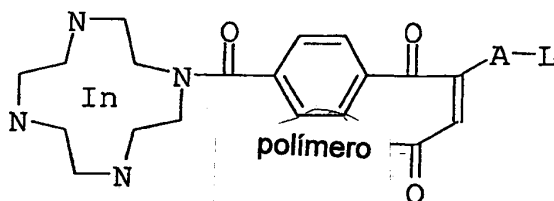
25



En los que el "polímero" es polietilenglicol que se pueden preparar, por ejemplo, a partir de reactivos del tipo



por ejemplo



5

Los compuestos de la fórmula general I tienen varias aplicaciones. Se pueden usar, por ejemplo, para aplicación clínica directa a un paciente. Eligiendo adecuadamente la proteína, se puede obtener cualquier efecto farmacéutico deseado, por ejemplo, tratamiento de un trauma, reemplazo de enzimas, eliminación de toxinas, antiinflamatorio, antiinfeccioso, inmunomodulador, vacunación o anticanceroso.

10 Los compuestos de la fórmula general I se pueden usar también en aplicaciones no clínicas. Por ejemplo, muchos compuestos fisiológicamente activos tales como enzimas son capaces de catalizar reacciones en disolventes orgánicos y los compuestos de fórmula general I se pueden usar en tales aplicaciones. Además, se pueden usar compuestos de la fórmula general I como herramientas diagnósticas.

15 Seguidamente se dan algunas proteínas específicas que pueden tener utilidad en la presente invención dependiendo de la aplicación deseada. Las enzimas incluyen enzimas específicas para carbohidratos, enzimas proteolíticas y similares. Las enzimas de interés, tanto para aplicaciones industriales (basadas en reacciones orgánicas) como biológicas en general y aplicaciones terapéuticas en particular incluyen las oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas consideradas desveladas en el documento US 4.179.337. Entre las enzimas específicas de interés están incluidas asparaginasa, arginasa, adenosina desaminasa, superóxido
20 dismutasa, catalasa, quimotripsina, lipasa, uricasa, bilirrubinaoxidasa, glucosaoxidasa, glucuronidasa, galatosidasa, gluco-cerbrosidasa, glucuronidasa y glutaminasa.

Entre las proteínas usadas en compuestos de la fórmula general I de la presente invención están incluidos, por ejemplo, factor 8, insulina, ACTH, glucagén, somatostatina, somatotropinas, limosina, hormona paratiroide, hormonas pigmentarias, somatomedinas, eritropoyetina, hormona luteinizante, factores de liberación hipotalámica,
25 hormonas antidiuréticas, prolactina, interleuquinas, interferones, factores estimulantes de colonias, hemoglobina, citoquinas, anticuerpos, corionicgonadotropina, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante del tiroides y activante de tejido plasminógeno.

Ciertas de las proteínas anteriores, tales como interleuquinas, interferones y factores estimulantes de colonias, existen también en forma no glicosilada, usualmente resultado de la preparación por técnicas de proteínas recombinantes. Las versiones no glicosiladas se pueden usar en la presente invención.
30

Por ejemplo, para interferones, la invención permite la preparación de conjugados en los que la actividad fisiológica se retiene en comparación con Interferones no conjugados. Este muy sorprendente resultado no es posible usando técnicas de conjugación conocidas.

Otras proteínas de interés son proteínas alérgicas descritas por Dreborg y otros, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6.315.365, como que tienen una alergia reducida cuando se conjugan con un polímero tal como poli(óxido de alquileo) y que consecuentemente son adecuadas para uso como inductores de tolerancia. Entre los alérgenos descritos están el antígeno de ambrosia E, el veneno de abeja obrera, el alérgeno de ácaro y similares.
35

Son de interés glicopolipéptidos tales como inmunoglobulinas, ovalbumina, glucocerebrosidasa, lectinas, activante de tejido plasminógeno e interleuquinas glicosiladas, interferones y factores estimulantes de colonias, como lo son inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA, IgD y fragmentos de ellas.
40

Son de interés particular anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se usan en medicina clínica a fines diagnósticos y terapéuticos. El anticuerpo se puede usar solo o se puede conjugar covalentemente ("cargar") con

otro átomo o molécula tal como un radioisótopo a un fármaco citotóxico/antiinfeccioso. Para la vacunación se pueden usar epítopos para producir un conjugado de polímero inmunógeno/proteína.

Un rasgo clave del procedimiento de la invención es que un grupo saliente α -metileno y un doble enlace se conjugan por cruce con una función aceptora de electrones que actúa como un resto activante de Michael. Si el grupo saliente es propenso a la eliminación en el reactivo crucifuncional más bien que a dirigir el desplazamiento y el grupo aceptor de electrones es un resto activante adecuado para la reacción de Michael, la reacción intramolecular secuencial de bisalquilación puede ocurrir por las reacciones consecutivas de Michael y retro Michael según se describe en J. Am. Chem. Soc. 1979, 101, 3098-3110 y J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5211-5212). El grupo aceptor de electrones y el grupo saliente se seleccionan óptimamente de forma que la bisalquilación se pueda producir por las reacciones secuenciales de Michael y retro Michael.

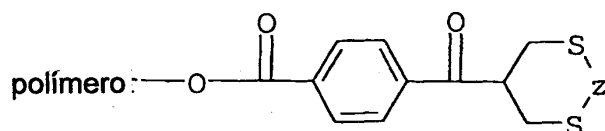
También es posible preparar agentes de alquilación crucifuncionales con múltiples enlaces adicionales conjugados al doble enlace o entre el grupo saliente y el grupo aceptor de electrones según se describe en J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5211-5212.

Dado que los reactivos de alquilación crucifuncionalizados del tipo mencionado antes experimentan una alquilación que es controlada por equilibrios Michael-retro Michael y dado que es posible reducir parcialmente un número, desde uno a más de uno, de enlaces disulfuro en una proteína de modo controlado reteniendo sustancialmente la estructura terciaria, es posible conseguir que la bisalquilación ocurra a través de los dos sulfhidrales de cisteínas de un enlace disulfuro dado. Tal secuencia de reacciones da por resultado la condensación del puente disulfuro con el reactivo de bisalquilación.

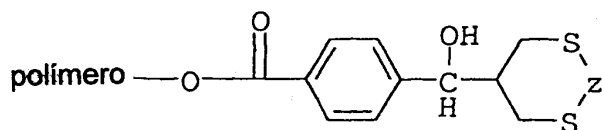
Los enlaces tioréter formados después de la conjugación para que resulte un compuesto de fórmula I son, generalmente, hidrolíticamente estables en solución acuosa. Los reactivos en sí son también hidrolíticamente estables. En este contexto, se considera que un compuesto es hidrolíticamente estable si no experimenta una degradación sustancial a pH fisiológico y una temperatura de hasta 45 °C. Se considera que una degradación de menos de 50 % en estas condiciones en un periodo de 8 horas es no sustancial.

Se apreciará que la invención permite la producción de reactivos de polietilenglicol que poseen funcionalidad de bisalquilación crucifuncionalizada en cualquiera de los terminales o en cadenas pendientes a lo largo de la cadena principal de un polímero.

Entre algunos ejemplos de nuevos conjugados de acuerdo con la invención están incluidos los siguientes:



30 y



en los que el "polímero" representa polietilenglicol.

Los Ejemplos siguientes ilustran la preparación y uso del reactivo de la presente invención. Las Figuras 1 a 5 muestran los resultados del Ejemplo 7.

35 Ejemplo 1

Síntesis de un reactivo de conjugación de polímero.

Hidrocloreto de p-nitro-3-piperidinopropiufenona: $C_{14}H_{19}ClN_2O_3$

Un matraz de fondo redondo de una boca, de 250 ml, se cargó con p-nitroacetofenona (16,5 g), paraformaldehído (4,5 g), hidrocloreto de piperidina (12,1 g), etanol absoluto (100 ml) y una barra de agitación magnética. A la mezcla heterogénea sometida a agitación se añadió ácido clorhídrico (al 37 % en agua, 1 ml) y la solución se calentó a reflujo bajo nitrógeno. Después de un tiempo de 1-2 horas se añadió más paraformaldehído (3,0 g). La solución se mantuvo a reflujo durante aproximadamente 18 h, tiempo durante el cual se añadió más paraformaldehído (3,0 g). Después de dejar que la solución se enfriara, sedimentó un sólido cristalino que no se disolvería después de reflujo. Se aisló el sólido por filtración y se recristalizó usando metanol muy caliente, obteniéndose cristales amarillos grandes (10,9 g). RMN¹H (D MSO-d₆) δ 1,34-1,50 (m, 1H), 1,64-1,79 (m, 2H), 1,79-1,94 (m, 4H), 2,89-3,05 (m, 2H),

3,41 (q, 2H), 3,51-3,54 (m, 2H), 3,82 (t, 2H), 8,26 (s,1H), 8,29 (s, 1H), 8,41 (s, 1H),8,44 (s, 1H).

3-(2-hidroxiethylol)-p-nitropropiofenona

Una solución en agitación de hidrocloreuro de p-nitro-3-piperidinopropiofenona (30 g, 0,1 mol) y mercaptoetanol (0,5 g, 0,12 mol) en etanol al 95 % (200 ml) se calentó lentamente hasta homogeneidad. Se añadió piperidina (1,0 mol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h. Después de enfriar, se rotoevaporó la mayor parte del disolvente, se añadió acetato de etilo (200 ml) y se separó el sólido por filtración. La solución de acetato de etilo se sometió a extracción secuencialmente con solución acuosa al 10 % de HCl, solución de NaHCO₃ al 5 % y salmuera y luego se secó sobre Na₂SO₄; luego se evaporó el acetato de etilo, resultando un aceite que cristalizó, obteniéndose 23,2 g del producto deseado que se cristalizó en acetato de etilo-etil éter.

10 2,2-bis(p-toliltilmetil)-p-nitroacetofenona: C₂₄H₂₃NO₃S₂

En un matraz de fondo redondo de 100 ml, de una boca, se añadió hidrocloreuro de p-nitropiperidinopropiofenona (10,0 g), 4-metilbencenotiol (8,2 g), formaldehído (solución acuosa al 37 % p/p, 10 ml, exceso), metanol (40 ml) y una barra de agitación magnética. La mezcla heterogénea en agitación se calentó hasta que se formó una solución homogénea amarilla (un par de minutos a 50-60 °C). Se añadieron luego 5 gotas de piperidina y la solución de reacción se calentó a reflujo. En 15 min la mezcla de reacción se hizo heterogénea debido a la presencia de algún sólido blanco/amarillo y, al cabo de 2 h, este sólido presentaba un color naranja fuerte. Al cabo de este tiempo se paró el reflujo y se dejó que la mezcla de reacción se enfriara durante la noche a temperatura ambiente. Luego se calentó nuevamente a reflujo la mezcla de reacción con más formaldehído (solución acuosa al 37 % p/p, 10 ml, exceso). Después de tener en reflujo durante aproximadamente 30 min, era visible un aceite de color naranja y no se veía sólido alguno. El aceite sedimentó en el fondo del matraz cuando se paró la agitación. Después de otras 7 horas de reflujo, se dejó que la mezcla se enfriara durante la noche, lo que dio por resultado la cristalización del aceite sedimentado. Se aisló el sólido cristalino y se purificó por recristalización en metanol muy caliente habiendo añadido varias gotas de acetona, obteniéndose cristales amarillos (10,0g). RMN¹H (D MSO-d₆) δ 2,31 (s,6H), 3,31-3,33 (m, 4H), 3,97 (quintete, 1H), 7,14 (q, 8H), 7,80 (d, 2H), 8,24 (d,2H).

25 2,2-bis(p-tolilsulfonilmetil)-p-nitroacetofenona: C₂₄H₂₃NO₇S₂

En un matraz de fondo redondo de 250 ml se agitó una suspensión de 2,2-bis(p-toliltilmetil)-p-nitroacetofenona (2,5 g) y oxona (18,4 g) en metanol:agua 1:1 (100 ml) durante 16 h. Esto dio una suspensión de un sólido blanco a la que se añadió cloroformo (100 ml) y la fase orgánica resultante se aisló usando un embudo separador, dejando una suspensión de un sólido blanco dentro de la fase acuosa. A la fase acuosa se añadió más agua hasta que se formó una solución homogénea, que luego se lavó nuevamente con cloroformo (100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, la combinación se lavó con salmuera (50 ml x 2), se secó con sulfato magnésico y se eliminó el disolvente, obteniéndose un producto sólido en bruto blancuzco después de secar en vacío (2,5 g). El producto se recristalizó en acetona, obteniéndose cristales blancos. RMN¹H (CDCl₃) δ 3,43-3,62 (m,4H), 4,44 (quintete, 1H), 7,35 (d,4H), 7,68 (d, 4H), 7,88 (d, 2H), 8,22 (d, 2H). Análisis calculado para C₂₄H₂₃NO₇S₂ (hallado): C 57,47 (57,27); H 4,62 (4,74); N 2,79 (2,58). MS (FAB) m/z 502 ([M+1]⁺).

2-(2-hidroxiethylsulfonilmetil)-p-nitro-2(Z), 4-pentadienofenona

Un matraz de fondo redondo secado a la llama, purgado con argón y provisto de termómetro y embudo de adición, se cargó con 3-(2-hidroxiethylol)-p-nitropropiofenona (0,5 g, 2,0 mmol) y tetrahidrofurano anhidro (50,0 ml). Se agitó la solución y se enfrió en baño de hielo seco-acetona, luego se añadió con jeringa TiCl₄ (0,23 ml, 2,1 mmol). Se retiró el baño de hielo y se dejó que la solución se calentara a temperatura ambiente, luego se enfrió a -40 °C y se añadió con jeringa diisopropiltilamina (1,1 ml). Se quitó el baño de enfriamiento y se dejó que la mezcla se calentara a entre -15 °C y 0 °C, adquiriendo color rojo. Luego la mezcla de reacción se calentó a 25 °C en un tiempo de 3-5 min y se añadió una solución de acroleína (0,14 g, 2,1 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (20 ml), añadiéndolo a gotas en el embudo de adición en un período de 30-40 min. La reacción exotérmica causó que la temperatura de la mezcla de reacción subiera a 30-40 °C y la solución se agitó 20 min más después de la adición del aldehído antes de añadir acetato de etilo (75 ml). Se usó cromatografía en capa fina para confirmar la desaparición de la 3-(2-hidroxiethylol)-p-nitropropiofenona de partida y la formación de la deseada 2-(2-hidroxiethylsulfonilmetil)-p-nitro-2(Z), 4-penta-dienofenona (R_f -0,38-0,45). Se pudo observar el producto minoritario (isómero E) a R_f más bajo, en el intervalo de 0,29-0,34. La mezcla de reacción en acetato de etilo se sometió a extracción con HCl acuoso al 10 % y salmuera. Se combinaron las capas acuosas y la combinación se sometió a extracción dos veces con acetato de etilo y todas las fracciones de acetato de etilo se lavaron dos veces con HCl acuoso al 10 %, NaHCO₃ acuoso al 5 % y salmuera, luego se secaron sobre Na₂SO₄ sólido. El acetato de etilo se rotoevaporó, obteniéndose la 2-(2-hidroxiethylsulfonilmetil)-p-nitro-2(Z), 4-pentadienofenona en bruto como un aceite que se oxidó inmediatamente como para la síntesis de 2,2-bis(p-tolilsulfonilmetil)-p-nitroacetofenona, resultando la 2-(2-hidroxiethylsulfonilmetil)-p-nitro-2(Z), 4-pentadienofenona como un sólido que se purificó por cromatografía en columna o se recristalizó en acetato de etilo o metanol y luego se unió covalentemente a polietilenglicol terminado en amino como se ha descrito en otro lugar en esta memoria.

La secuencia de reacciones anterior se realizó con muchos aldehídos, entre los que están incluidos acetaldehído, metacroleína, etacroleína, butiraldehído, crotonaldehído, 2,4-pentadienilo, sorbaldehído, tolualdehído, cinamaldehído, metilcinamaldehído, clorocinamaldehído, 5-fenil-2,4-pentadienal y 7-fenil-2,4,6-heptatrienal. Esta secuencia de reacciones se realizó con muchos cetoderivatizados, incluidos 3-(p-tolilmetil)-m-nitroacetofenona, 3-(2-hidroxi-etiltio)-m-nitropropiofenona, 3-(etilmetil)-m-nitropropiofenona, 3-(dimetilamino-etiltio)-m-nitropropiofenona, 3-(2-hidroxi-etiltio)-3-fenilpropiofenona, 3-(2-hidroxi-etiltio)-5-fenil-4(E)-pentenofofenona, 3-(etilmetil-o-nitropropiofenona, 3(etiltio)-propiofenona, 3(2-hidroxi-etilsulfonil)propiofenona, 2-(3-(2-hidroxi-etiltio)-1-propenil)-m-2(E)-4-pentadienofofenona. Esta secuencia de reacciones se realizó también con cetoderivatizados alifáticos, incluidos 4-(etilmetil)-2-butanona, 4-(p-toliltio)-2-butanona, 4-(4-nitrofeniltio)-2-butanona, 4-(2-hidroxi-etiltio)-2-butanona y metil-3-(2-hidroxi-etiltio)-propanoato. Los productos finales de las reacciones antes mencionadas para estos precursores se pueden unir covalentemente a polietilenglicol como se ha descrito en otro lugar en esta memoria.

Hidrocloruro de 2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]-p-aminoacetofenona $C_{24}H_{26}ClNO_5S_2$

Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con 2,2-bis(p-tolilsulfonil)metil-p-nitroacetofenona (2 g), etanol (25 ml), ácido clorhídrico (al 37 % en peso en agua, 8 ml) y una barra de agitación magnética. A la mezcla heterogénea resultante se añadió luego cloruro de estaño(II) dihidratado y la mezcla se calentó a 45 °C en baño de aceite durante 2h. A la solución homogénea amarilla que se formó se añadió luego agua hasta que se observó que podía haber precipitación si se añadía más agua. Se dejó enfriar la solución homogénea a temperatura ambiente, resultando un compuesto amarillo que precipitó/ cristalizó, que se aisló por filtración en vacío. El producto aislado se mezcló luego con una mezcla caliente de acetona y metanol (aprox. 90:10 v/v). Se aisló por filtración en vacío un sólido insoluble y se secó a peso constante en horno de vacío (1,4g). RMN¹H (D MSO-d₆) δ 2,50 (s, 6H), 3,57-3,73 (solapamiento m's, 5H), 6,27 (s, 2H), 6,39 (d, 2H), 6,96 (d, 2H), 7,47 (d, 4H), 7,55 (d,4H).

Acoplamiento de 2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metal]-p-aminoacetofenona a α-metoxi-ω-aminopoli(etilenglicol)

Un matraz de fondo redondo de 100 ml, de una boca, equipado con un embudo de adición y un conducto para nitrógeno se cargó con trifosgeno (23 mg), hidrocloruro de 2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]-p-aminoacetofenona (125 mg), tolueno anhidro (2,5 ml) y una barra de agitación magnética bajo atmósfera de nitrógeno. El embudo de adición se cargó separadamente con trietilamina anhidra (68 μl) y tolueno anhidro (2,5 ml). Se puso un baño de acetona/hielo seco bajo el matraz de fondo redondo y se dejó que se enfriara el contenido. Luego se añadió a gotas la solución de trietilamina a la solución de trifosgeno agitando durante 5-10 min. Se dejó que el matraz y el baño de hielo seco se calentaran a temperatura ambiente, lo que tardó varias horas en hacerlo y, una vez que estaba a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se dejó en reposo durante aproximadamente 2 h bajo atmósfera de nitrógeno. A la mezcla de reacción a temperatura ambiente se añadió luego a gotas una solución de O-(2-aminoetil)-O'-metilpoli(etilenglicol) 2.000 (490 mg) y trietilamina anhidra (68 μl) en tolueno anhidro. La mezcla resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche (aprox. 20 h en total). Luego se abrió la mezcla de reacción a la atmósfera y se filtró por gravedad a través de una jeringa desechable de 5 ml con un trozo de lana de algodón no absorbente para que actuara de filtro. El eluyente homogéneo se pasó a un embudo separador de 100 ml y luego se lavó dos veces con agua desionizada (30 ml y luego 10 ml). Se combinaron las fases acuosas y luego la combinación se lavó con dietiléter (aprox. 25ml). La fase acuosa se liofilizó, obteniéndose un producto sólido blancuzco (160mg). Se encontró producto también en las fases de dietiléter y tolueno. RMN¹H (CDCl₃) δ 2,5 (s), 3,39 (s), 3,41-3,53 (solapamiento m's), 3,53-3,76 (m), 3,82 (t), 4,17 (quintete), 7,35-7,39 (m, 1,39), 7,46 (d), 7,68 (d).

Ejemplo 2

Síntesis de reactivo de conjugación de polímero

Hidrocloruro de p-carboxi-3-piperidinopropiofenona

Un matraz de fondo redondo de 250 ml, de una boca, se cargó con ácido p-acetilbenzoico (10 g) e hidrocloruro de piperidina (7,4 g), 100 ml de etanol absoluto y una barra de agitación magnética. A la mezcla heterogénea en agitación se añadió ácido clorhídrico concentrado (1 ml) y la solución se calentó luego a reflujo bajo nitrógeno. Al matraz se añadió paraformaldehído (3,7 g) y se continuó el reflujo durante aproximadamente 1,5 horas. Se formó una solución homogénea a la que se añadió más paraformaldehído (3,7 g). Se continuó calentando durante aproximadamente 6 horas, tiempo durante el cual se añadió más formaldehído (3,7 g). Se dejó enfriar a temperatura ambiente la solución de reacción y se dejó durante una semana. Se aisló por filtración de la mezcla de reacción enfriada un sólido blanco. Después de disolverlo en metanol muy caliente se intentó cristalizar el sólido. Se aisló por filtración un producto insoluble (1,96 g) y del filtrado cristalizó un segundo producto (0,88 g). Ambos productos aparecían como idénticos por análisis de espectroscopia de infrarrojos y cromatografía de capa después de secar en vacío, por lo que se combinaron para usarlos en posteriores reacciones. ATR-FT-IR 1704, 1691, 1235, 760.

Ácido 4-[2,2-bis[(p-toliltio)metil]acetil]benzoico: $C_{25}H_{24}O_3S_2$

A un matraz de fondo redondo de 50 ml, de una boca, se añadió hidrocloruro de p-carboxi-3-piperidinopropiofenona (2,5 g), 4-metilbencenotiol (2,1 g), formaldehído (al 37 % p/p, solución acuosa, 2,5 ml), etanol (10 ml), una barra de

agitación magnética y piperidina (aprox. 10 gotas). Luego se acopló al matraz un condensador y la solución de reacción se calentó a reflujo. Luego se añadió metanol (5 ml). Después de aproximadamente 2 horas, se añadió más formaldehído (2,5 ml) y se calentó durante otras 2 horas. Luego se dejó enfriar el matraz a temperatura ambiente y después se diluyó la solución de reacción con dietil éter (aprox. 150 ml). La fase orgánica resultante se lavó luego con agua (acidificada con ácido clorhídrico 1 N a pH 2-3, 50 ml x 2), agua (50 ml) y salmuera (75 ml) y seguidamente se secó sobre sulfato magnésico. La filtración seguida de la eliminación de volátiles en un evaporador rotatorio dio un residuo sólido. El sólido se disolvió en un volumen mínimo de una mezcla predominantemente de metanol y acetona calentando. La solución homogénea se puso luego en un congelador durante la noche, obteniéndose cristales blancuzcos que se aislaron por filtración en vacío, se lavaron con acetona fresca y luego se secaron a peso constante en horno de vacío (2,5 g). RMN¹H (CDCl₃) δ 2,38 (s, 6H), 3,16-3,31 (m, 4H), 3,85 (quintete, 1H), 7,15 (d, 4H), 7,18 (d, 4H), 7,64 (d, 2H), 8,07 (d, 2H). Análisis calculado para C₂₅H₂₄O₃S₂ (hallado): C 68,78 (68,84), H 5,54 (5,77).

Ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico: C₂₅H₂₄O₇S₂

Un matraz de fondo redondo de 250 ml se cargó con una suspensión de ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilitio)metil]acetil]benzoico (2 g) y oxona (16,9 g) y se agitó en metanol:agua 1:1 v/v (100 ml) durante 16 h. Resultó una suspensión de un sólido blanco a la que se añadió cloroformo (100 ml) y la fase orgánica resultante se aisló usando un embudo separador, quedando una suspensión de un sólido blanco con la fase acuosa. A la fase acuosa heterogénea se añadió más agua hasta homogeneidad (aprox. 170 ml) y luego la fase acuosa se lavó con cloroformo (75 ml). Se combinaron las fases orgánicas, la combinación se lavó con agua (50 ml x 2, acidificada con unas pocas gotas de ácido clorhídrico 1N) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó con sulfato magnésico, se filtró y se eliminó el disolvente usando un evaporador rotatorio, obteniéndose un producto sólido blancuzco en bruto (2,2 g). La purificación (de un 1 g de producto) se realizó por recristalización en acetato de etilo muy caliente, acetona y hexano, obteniéndose 0,6 g de producto. RMN¹H (CDCl₃) δ 2,51 (s, 6H), 3,49-3,72 (m, 4H), 4,44 (quintete, 1H), 7,40 (d, 4H), 7,37-7,78 (m, 6H), 8,13 (d, 2H). Análisis calculado para C₂₅H₂₄O₇S₂ (hallado): C 59,98 (59,88), H 4,38 (4,76).

Acoplamiento de ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico a α-metoxi-ω-amino PEG (2000 g/mol)

Un matraz con llave de 50 ml, de una boca, se cargó con ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico (100 mg) y una barra de agitación magnética. El matraz se selló y se aplicó un vacío fuerte durante aproximadamente 15 min. Se introdujo en el matraz atmósfera de argón y se añadió con jeringa cloruro de tionilo (1 ml) mientras que se agitaba. La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 2 h. Se eliminaron en vacío los líquidos volátiles, obteniéndose una espuma amarilla. Se introdujo nuevamente atmósfera de argón en el matraz y se añadió con jeringa diclorometano anhidro (5 ml), obteniéndose una solución homogénea. Nuevamente se eliminaron en vacío los líquidos volátiles. Se repitió el proceso de adición/eliminación de disolvente hasta que quedó un residuo blanco. Al matraz con llave se añadió nuevamente diclorometano anhidro (5 ml) para formar una solución homogénea. Separadamente, en un matraz de fondo redondo de 25 ml, provisto de diafragma y con barra de agitación magnética se disolvieron O-(2-aminoetil)-O'-metilpoli(etilenglicol) (2.000 g/mol) (0,2 g) y trietilamina anhidra (30 μl) en diclorometano anhidro (5 ml) bajo atmósfera de argón. La solución de reacción con ácido bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico fue inyectada en el matraz que contenía la solución de polietilenglicol gota a gota, produciéndose inmediatamente el desprendimiento de un gas blanco. La solución resultante se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente y luego se añadió más trietilamina (28 μl). Al cabo de 1 hora la solución de reacción se añadió a gotas mediante una pipeta de vidrio a dietil éter sometido a una rápida agitación. Para conseguir la precipitación fue necesario añadir hexano a la solución de dietil éter y poner el matraz en baño de hielo. El precipitado obtenido se aisló por centrifugación y se secó en horno de vacío a peso constante, obteniéndose un producto sólido blancuzco (230 mg). Se logró una pureza mayor por precipitación disolviendo primeramente el producto en diclorometano y añadiendo la solución a una solución enfriada de dietil éter. RMN¹H (CDCl₃) δ 2,51 (s), 3,40 (s), 3,60-3,75 (m), 3,84 (t), 4,36 (quintuplete), 7,39 (d), 7,68 (d), 7,71 (d), 7,85 (d).

Acoplamiento de ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico a α-metoxi-ω-amino PEG (20.000 g/mol)

Un matraz con llave de 50 ml, de una boca, se cargó con ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico (100 mg) y una barra de agitación magnética. El matraz se selló y se aplicó vacío fuerte durante aproximadamente 15 min. Se introdujo en el matraz atmósfera de argón y se añadió con jeringa cloruro de tionilo (1 ml) mientras que se agitaba. La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 2 h. Se eliminaron en vacío los líquidos volátiles, obteniéndose una espuma amarilla. Se introdujo nuevamente atmósfera de argón en el matraz y se añadió con jeringa diclorometano anhidro (5 ml), obteniéndose una solución homogénea. Nuevamente se eliminaron en vacío los líquidos volátiles. Se repitió el proceso de adición/eliminación de disolvente hasta que quedó un residuo blanco. Finalmente, al matraz se añadió diclorometano anhidro (5 ml) bajo argón para formar una solución homogénea.

En un matraz con llave de 50 ml distinto se disolvió O-(2-aminoetil)-O'-metilpoli(etilenglicol) (20.000 g/mol) (0,5 g) en 4 ml de tolueno anhidro en atmósfera de argón y luego la solución se evaporó a sequedad en vacío. El residuo blanco obtenido se mantuvo en vacío durante 3 h y luego se disolvió en diclorometano anhidro (5 ml) en atmósfera de argón.

La solución de reacción de ácido bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico se añadió lentamente a gotas a la solución de polietilenglicol, que estaba en agitación y enfriada en baño de hielo. Finalizada la adición completa, se añadieron a gotas a la solución resultante 40 μ l de trietilamina seca. Cuando se había añadido la trietilamina, se dejó la solución resultante en agitación durante la noche y que se calentara a la temperatura ambiente.

5 La solución de reacción se filtró luego a través de un filtro de 0,45 μ m y se eliminaron los líquidos volátiles del eluyente, obteniéndose un residuo ligeramente amarillo/naranja que se redisolvió en acetona caliente (10 ml). El matraz que contenía la solución homogénea resultante se puso en un baño de hielo-agua y se agitó hasta que se produjo precipitación. El precipitado blanco se aisló en un embudo de vidrio sinterizado n°. 3 y se lavó con acetona fresca enfriada (aprox. 30 ml). El sólido aislado se dejó secar en vacío, obteniéndose 0,4 g de sólido blanco. RMN¹H (CDCl₃) δ 2,42 (s), 3,31 (s), 3,40-3,75 (m), 4,27 (m), 7,30 (d), 7,59 (d), 7,63 (d), 7,75 (d).

10 El reactivo de conjugación α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]-benzamida polietilenglicol (20.00 g/mol) (0,4 g) se disolvió en 10 ml de una mezcla de acetónitrilo-agua (24:1, v/v, 2 mg de hidroquinona) purgada con argón y la solución se filtró a través de un filtro PP de 0,45 μ m. El eluyente se puso bajo argón en un matraz de fondo redondo y se añadió trietilamina (50 μ l) mientras que se agitaba. El matraz se puso luego en un baño de aceite a 30 °C durante 20 h mientras que se agitaba y al cabo de este tiempo el matraz se enfrió a temperatura ambiente y los líquidos volátiles se eliminaron en vacío. El residuo obtenido se disolvió en acetona caliente (10 ml) y, una vez que la solución se hizo homogénea, se puso en baño de hielo-agua, después de lo cual se produjo precipitación mientras que se agitaba la solución. El precipitado blanco se aisló en un embudo de vidrio sinterizado n°. 3 y se lavó con acetona fresca enfriada (aprox. 30 ml). Se dejó secar en vacío el sólido aislado, obteniéndose 0,3 g de un sólido blanco. RMN¹H (CDCl₃) δ 2,35 (s), 3,31(s), 3,39-3,78 (m), 4,28 (s), 5,84 (s), 6,22 (s), 7,26 (d), 7,65 (d), 7,72 (d), 7,81 (d).

Ejemplo 3

Reacción de 4-metilbencenotiol y α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]-benzamida polietilenglicol

25 El reactivo que conjuga al polímero, α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]-benzamida polietilenglicol (2.000 g/mol) (30 mg, 12,1 μ mol, 1 equiv), y 4-metilbencenotiol (3 mg, 24,2 mmol, 2 equiv) se disolvieron en cloroformo deuteriado (aprox. 0,75 ml). A la solución homogénea se añadió luego trietilamina (1,7 μ l, 12,1 μ mol, 1 equiv). Se agitó la mezcla de reacción y se obtuvo un espectro de RMNH. El espectro obtenido confirmó que se había efectuado la adición de 4-metilbencenotiol al reactivo de conjugación al polímero. Se realizó una reacción similar con propanotriol.

30 Ejemplo 4

Conjugación de polímero a ribonucleasa A

35 Se añadieron a un tubo de centrifugadora de 15 ml que contenía ribonucleasa A (30 mg) 3 ml de una solución acuosa 8 M de urea y seguidamente 60 μ l de 2-mercaptoetanol. Se ajustó a 8 el pH de la solución resultante usando solución acuosa de metilamina al 10 %. Luego se burbujeó nitrógeno a través de la solución durante aproximadamente 30 min. Mientras que se continuaba burbujeando nitrógeno, se calentó el tubo a 37 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se enfrió luego en baño de hielo-agua salada y a la solución de reacción se añadieron 10 ml de una solución enfriada, purgada con argón, de HCl 1N:etanol absoluto (1:39 v/v). Se produjo precipitación y el precipitado se aisló por centrifugación y luego se lavó tres veces con más porciones de 10 ml de la mezcla de HCl:etanol absoluto y dos veces con dietil éter enfriado, purgado con nitrógeno (2 x 10 ml). Después de cada lavado, 40 el precipitado se aisló por centrifugación. El precipitado lavado se disolvió luego en agua desionizada purgada con nitrógeno y se liofilizó, obteniéndose un sólido seco. Se confirmó la reducción parcial de ribonucleasa A y se cuantificó usando el Ensayo de Ellman, que dio 5,9 tioles libres por molécula de proteína.

45 En un eppendorf, la ribonucleasa A parcialmente reducida (10,9 mg) se disolvió en solución de amoniaco pH 8 (500 μ l) purgada con argón. En un eppendorf separado se disolvió también en solución de amoniaco (250 μ l) el reactivo de conjugación a polímero, α -metoxi- ω -4-[2,2-bis [(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzamida derivada de polietilenglicol (2000 g/mol) (5 mg) y la solución resultante se añadió a la solución de ribonucleasa A. El eppendorf con PEG se lavó con 250 μ l de solución recientemente preparada de amoniaco y ésta se añadió también al eppendorf de reacción principal. Luego se cerró bajo argón el eppendorf de reacción principal y se calentó a 37 °C durante aproximadamente 24 h, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se analizó la solución de 50 reacción enfriada por dodecilsulfato sódico-electroforesis de gel de poli(acrilamida)- (SDS-PAGE). El experimento de SDS-PAGE era consistente con la reacción de ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico pegilado.

Ejemplo 5

Conjugación de polímero a fragmento Fab de anticuerpo IgG de ratón

55 A 240 μ l de una solución de 0,4 mg/ml de fragmentos Fab de anticuerpo IgG de ratón (catálogo de Abcam n°. AB6668) en tampón de fosfato sódico 0,02 M, pH 6, purgada con argón, que contenía cloruro sódico 0,15 M y EDTA

0,005 M se añadieron 4 μ l de una solución acuosa 1 mM de dihidrocloruro de selenocisteína purgada con argón y seguidamente 12 μ l de una solución acuosa purgada con argón de hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó por rotación inmediatamente durante varios segundos y luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 6 min. Se separaron para posteriores análisis dos muestras de la solución que contenía fragmentos Fab y la solución restante se dejó en reposo en baño de hielo-agua durante 4 min. A la solución de Fab se añadió inmediatamente una solución enfriada en baño de hielo-agua de α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzamida derivada de polietilenglicol (20.000 g/mol) (1,6 μ l, 50 mg/ml, tampón de fosfato sódico 0,02 M purgado con argón, pH 6, que contenía cloruro sódico 0,15 M, EDTA 0,005 M e hidroquinona 0,23 mM); la solución se agitó por rotación durante varios segundos y luego se volvió a poner en el baño de hielo-agua. Cada dos minutos se añadieron de manera análoga 1,6 μ l de la solución del reactivo de conjugación hasta añadir 6,4 μ l en total. Terminada la adición total, la solución se puso en una nevera (<5 °C) durante 2 horas. Se tomó luego una muestra de la mezcla de reacción para análisis por SDS PAGE.

La mezcla de reacción se analizó por SEC-HPLC (inyección de 100 μ l, columna de 12-24 ml superpuesta, Amersham biosciences; eluyente fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,15 M; pH 7,0; elución isocrática durante 100 min a un caudal de 0,25 ml/min; detección por luz UV, 210 nm), presentándose el conjugado de Fab-polietilenglicol, que no estaba presente en la mezcla de reacción idéntica. Las fracciones aisladas por SEC-cromatografía HPLC se analizaron por SDS-PAGE y se observó el conjugado de mono-polietilenglicol.

Ejemplo 6

Conjugación de polímero a asparaginasa

Una muestra de 100 μ l de una solución de 5 mg/ml de asparaginasa a pH 6,5 (Sigma) se diluyó con 900 μ l de tampón de fosfato 20 mM (pH 6 y que también contenía NaCl 0,15 M y EDTA 5 mM). Luego se añadió DL-ditiotreitol (DTT, 15,4 mg) y la solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente. Después de 2 horas en reposo, la solución se purificó en una columna PD-10 (Sephadex®G-25 M, Pharmacia Biotech) que se había equilibrado con tampón de fosfato 20 mM (pH 6 y que también contenía NaCl 0,15 M y EDTA 5 mM). La columna es eluyó con porciones de 1 ml de tampón recientemente preparado. Mediante espectroscopía de UV a 280 nm se identificaron dos fracciones que contenían proteína reducida. Estas fracciones se concentraron usando dispositivos centrífugos de filtración (MWCO 3.000; Microcon) a un volumen de aproximadamente 270 μ l y luego se diluyeron a 1 ml con tampón de fosfato fresco, pH 6 (que adicionalmente contenía hidroquinona 0,23 mM). Para análisis posterior por SDS PAGE se tomaron dos muestras de 5 μ l. Separadamente, en el mismo tampón de fosfato se preparó una solución de 50 mg/ml de la solución del reactivo para conjugación de α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzamida derivada de polietilenglicol (20.000 g/mol) y se puso en un baño de hielo-agua junto con la solución de proteína durante 5 min. A la solución de proteína se añadieron luego 58 μ l de solución del reactivo de conjugación y, después de varios minutos de agitación por rotación, la solución de reacción se puso en una nevera (<5 °C). Se realizó también una reacción de control en las mismas condiciones y a la misma escala pero usando asparaginasa no reducida. Se confirmó por SDS PAGE (4-12 % de gel bis-Tris con tinción coloidal azul) una conjugación con éxito de polietilenglicol a asparaginasa, realizada con muestras tomadas de la solución de reacción después de 2 horas. No se observó por SDS PAGE banda de conjugación para una muestra tomada de una reacción de control en la que no se dejó que la asparaginasa reaccionara con DTT.

Ejemplo 7

Conjugación de polímero a interferón

Una solución de 100 μ l de interferón α -2b (Santha Biotechnics) (1 mg/ml) diluida con 150 μ l de una solución tampón (fosfato sódico 0,02 M; NaCl 0,15 M; EDTA 0,005 M; pH 6,0 en agua desionizada purgada con argón) se redujo parcialmente añadiendo selenocistamina (1 mM en agua desionizada purgada con argón, 2 equiv) y TCEP (1 mM en agua desionizada purgada con argón, 5 equiv). La solución de proteína se enfrió a 4 °C. Se disolvió el reactivo de conjugación α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzamida derivada de polietilenglicol (20.000 g/mol) en la misma solución tampón, se enfrió a 4 °C y se añadieron 16 μ l a la solución de proteína. La mezcla de reacción se agitó por rotación y se incubó a 4 °C durante 2 h. Los componentes no iónicos de la mezcla de reacción se eliminaron por cromatografía de intercambio catiónico (columna Hitrap SP FF1 de 1 ml, Amersham biosciences) usando dos tampones: (A) acetato sódico 25 mM, pH 4,0 y (B) acetato sódico 25 mM más NaCl 0,7 M, pH 4,0. La columna se lavó (1 ml/min) con tampón (A) (5,0 ml), luego con tampón (B) (5,0 ml) y luego se equilibró con 10 ml de tampón (A). Se cargó el conjugado en la columna (200 μ l) y seguidamente con el tampón (A) (500 μ l) y se recogió una fracción de carga (0,5 ml). La columna se lavó con 5 ml de tampón A y se recogieron fracciones. La muestra se eluyó de la columna con el tampón (B) (10 ml) y se recogieron fracciones. Se usó espectroscopia (UV, 280 nm) para determinar las fracciones que contenían proteína y estas fracciones se purificaron luego en fracciones separadas por cromatografía de exclusión de tamaños (inyecciones de 100 μ l, columna superose 12-24 ml, Amersham biosciences; eluyente fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,15 M, NaCl, pH 7,0; elución isocrática durante 100 min a un caudal de 0,25 ml/min; detección por UV, 210 nm). Estas condiciones de purificación dieron una resolución de la línea de base para la separación del conjugado de polietilenglicol-interferón de interferón nativo. La reacción de conjugación y la purificación del conjugado de polietilenglicol fueron confirmadas por SDS-PAGE; gel bis-tris al 12 % (SilverQuest

Silver Staining; Colloidal Blue Staining y ácido perclórico 0,1 M/5 % de BaCl₂ y tinción con I₂ 0,1 M). No se observó conjugación cuando una solución de 40 µl de interferón (1 mg/ml) en 60 µl de fosfato sódico 0,02 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,005 M, pH 6,0, en agua purgada con argón, se mezcló con el reactivo de conjugación α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil-acetil]-benzamida derivada de polietilenglicol (20.000 g/mol), se disolvió en la solución tampón (50 mg/ml) se enfrió a 4 °C y se añadieron 16 µl a la solución de proteína. La mezcla de reacción se agitó en un Vórtex y se incubó a 4 °C durante 2 h.

La concentración de cada fracción purificada del conjugado de polietilenglicol-interferón se determinó mediante inmunoensayo de enzimas. Se utilizó el mismo ensayo para determinar la concentración del interferón nativo que se conjugó y una muestra de interferón patrón internacional NIBSC (RU). En la Figura 1 se muestra la curva patrón reproducible y precisa obtenida para todas las formas del interferón antes mencionado. Se cultivaron células A549 (fibroblasto de pulmón humano) a 15.000 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos. A las células por triplicado se añadieron separadamente interferón de NIBSC (RU), el interferón nativo que se conjugó y el conjugado de polietilenglicol interferón y la placa se incubó a 37 °C (5 % de CO₂) durante 24 h. Al día siguiente se preparó una solución de trabajo de E MCV (virus de encefalomiocarditis) en D ME M/2 % de FCS de virus de acopio almacenado a menos 80 °C. Se eliminó el medio que contenía el interferón o el conjugado de polietilenglicol interferón y se reemplazó con medio que contenía EMCV. La placa de cultivo de tejidos se incubó luego durante 1 h a 37 °C y después se eliminó el virus. Se añadieron 100 microlitros del medio D ME M/10 % de FCS y la placa se incubó a 27 °C durante 16-24 horas. Después de 16 horas, se empezó a leer la placa con regularidad para ver cuándo empezaba la muerte de células. Luego se aspiró el medio y las células se lavaron con 100 µl de solución de tampón de fosfato. A esto siguió la adición de 50 µl de solución de violeta de metilo [esto es, violeta de metilo (4 % de formaldehído, 0,05 % de violeta de metilo 2B (Sigma- Aldrich)] durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se lavó la placa con 100 µl de agua y se secó al aire. Se determinó la absorbancia espectrofotométrica a 570 nm usando un lector de placas. La Figura 2 confirma que el interferón usado para la conjugación tenía una actividad equivalente a la del interferón patrón internacional NIBSC (RU). La Figura 3 confirma que el interferón nativo usado para la conjugación mantenía una actividad biológica equivalente después de ser sometido a todos los procesos químicos y de purificación excepto la exposición con el reactivo de conjugación de polietilenglicol. La Figura 4 confirma que el interferón nativo usado para la conjugación y el conjugado de polietilenglicol interferón purificado mantenían una actividad biológica equivalente.

Se determinó la inducción de la 2'5'-sintetasa oligoadenilada (2'5'-OAS) y ARNm de proteínaquinasa R (PRKR) por interferón α 2b. Se evaluaron el conjugado polietilenglicol-interferón purificado y una muestra del interferón α 2b. Se incubaron 2 millones de células MOLT 4/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos con 5000 pg de cada muestra de interferón midiendo según un inmunoensayo de 24 h a 37 °C. Se extrajo el ARN total (kit de aislamiento de ARN II, Macheray-Nagel) y se sometieron 200 ng a transcripción inversa en un volumen final de 20 µl (Sigma, kit de transcripción inversa A MV). Se diluyeron las muestras 1 a 4 en agua y se amplificaron 2 µl de cada muestra en una mezcla de cuantificación de 20 µl RCP en tiempo real (Sigma SybGreen Ready Mix). Los cebadores usados fueron:

2'5'-OAS directo GGC TAT AAA CCT AAC CCC CAA ATC

2'5'-OAS inverso AGC TTC CCA AGC TTC TTC TTA CAA

PKR directo ACT CTT TAG TGA CCA GCA CAC TCG
PRKR inverso TTT AAA ATC CAT GCC AAA CCT CTT

Para una amplificación de 2'5'-OAS, a la activación de la enzima a 94 °C durante 5 min siguieron 48 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 s, condensación a 60 °C durante 2 s y extensión a 72 °C durante 8 s. Para la amplificación de PRKR, las muestras se activaron a 94 °C durante 5 min y se sometieron a 48 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 s, condensación a 59 °C durante 2 s y extensión a 72 °C durante 8 s. Al final de las amplificaciones se hizo un análisis de la curva de fusión de los productos. La cuantificación de los niveles inducidos de ARNm se hizo en relación a las células de control no tratadas usando la fórmula siguiente:

$$\text{Aumento relativo} = 2^{-(Ct \text{ de la muestra} - Ct \text{ de control})}$$

en la que Ct es el valor umbral de entrecruzamiento.

La Figura 5, en la que la Figura 5(a) muestra el análisis cuantitativo en tiempo real por TR-RCP (dos etapas) de genes de 2'5'-sintetasa oligoadenilada (2'5'-OAS) inducible por interferón, y la Figura 5(b) muestra el análisis cuantitativo en tiempo real por TR-RCP (dos etapas) del gen de proteína quinasa R (PRKR) inducible por interferón. Los resultados confirman que el conjugado polietilenglicol-interferón- α 2b estimulaba la síntesis de 2'5'-sintetasa oligoadenilada (2'5'-OAS) y ARNm de proteínaquinasa (PRKR) a niveles que eran similares a los del interferón- α 2b nativo no pegilado.

LISTADO DE SECUENCIAS

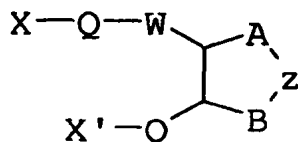
<110> Polytherics Limited
 <120> Moléculas Biológicas conjugadas y su Preparación
 <130> 9381 EP1 SMS
 5 <140> EP 09167191.7
 <141> 12/07/2004
 <150> GB 0316294.8
 <151> 11/07/2003
 <160> 4
 10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador directo de 2'5'-OAS
 <400> 1
 ggctataaac ctaaccccca aatc
 24
 <210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso de 2'5'-OAS
 25 <400> 2
 agcttcccaa gcttcttctt acaa
 24
 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo de PKR
 <400> 3
 actctttagt gaccagcaca ctcg
 24
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso de PRKR
 <400> 4

ES 2 542 531 T3

tttaaaatcc atgccaacc tctt
24

REIVINDICACIONES

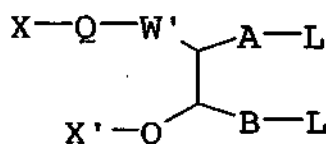
1. Un procedimiento de preparación de un compuesto de la fórmula general:



(I)

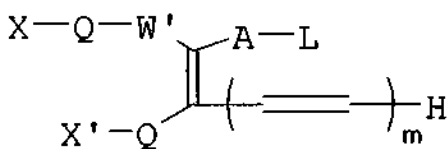
- 5 en la que cada uno de X e X' representa polietilenglicol, y el otro representa un átomo de hidrógeno; cada Q representa independientemente un grupo de unión; W representa un grupo ceto CO, un grupo éster -O-CO- o un grupo sulfona -SO₂-, o un grupo obtenido por reducción de tal grupo; o, si X' representa polietilenglicol, X-Q-W- juntos representan un grupo ciano; Z representa una proteína que está unida a A y B por medio de dos grupos tiol que se han obtenido de un puente disulfuro de la proteína;
- 10 A es una cadena de alquileo o alquenilo C₁₋₅; y B es un enlace o una cadena de alquileo o alquenilo C₁₋₄;

que comprenden la reducción de un puente disulfuro en una proteína, y hacer reaccionar el producto resultante en un medio de reacción acuoso bien con (i) un compuesto de la fórmula general



(II)

- 15 en la que X, X', Q, A, B y L tienen los significados dados anteriormente, W' representa un grupo ceto o aldehído CO, un grupo éster -O-CO- o un grupo sulfona -SO₂-, y cada L representa independientemente un grupo saliente; o (ii) un compuesto de la fórmula general



(III)

- 20 en la que X, X', Q, A, y L tienen los significados dados para la fórmula general II, y m representa un número entero de 1 a 4.

2. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 1, llevado a cabo a un pH entre 5,5 y 8.

3. Un procedimiento según se reivindica en cualquier reivindicación 1 o reivindicación 2, llevado a cabo a una temperatura entre 3 y 37 °C.

- 25 4. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo de unión Q representa independientemente un enlace directo, un grupo alquileo, o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, cualquiera de los cuales se puede determinar o interrumpir por uno o más átomos de oxígeno o más, átomos de azufre, grupos -NR en los que R representa un grupo alquilo o arilo, grupos ceto, grupos -O-CO- y/o grupos -CO-O-.

- 30 5. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el o cada grupo saliente L representa -SR, -SO₂R, -OSO₂R, -N+R₃, -N+HR₂, -N+H₂R, halógeno, o -OØ, en los que R representa un grupo alquilo o arilo y Ø representa un grupo arilo sustituido que contiene al menos un sustituyente aceptor de electrones.

6. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular en el intervalo de 2.000 a 75.000 g/mol.
7. α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonyl)metil]-acetil]benzamida poli(etilenglicol).
8. El compuesto de la reivindicación 7, derivado de poli(etilenglicol) de peso molecular de 2.000 g/mol a 20.000 g/mol.
9. El compuesto de la reivindicación 8, derivado de poli(etilenglicol) de peso molecular de 2.000 g/mol a 20.000 g/mol.

Figura 1

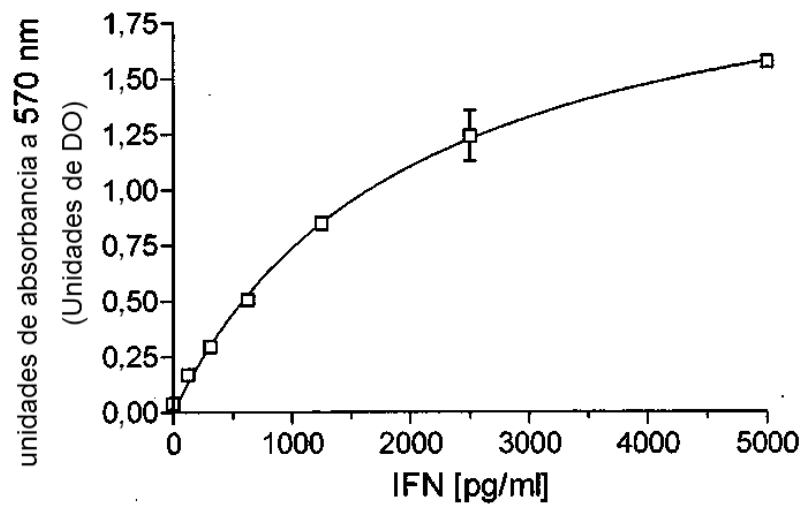
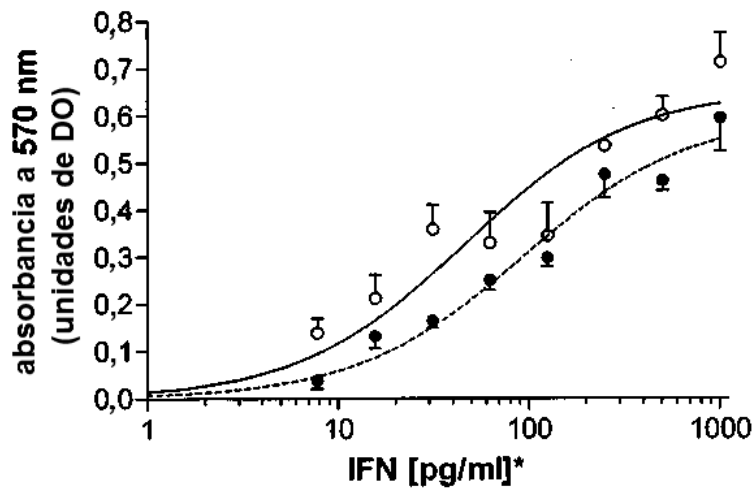


Figura 2

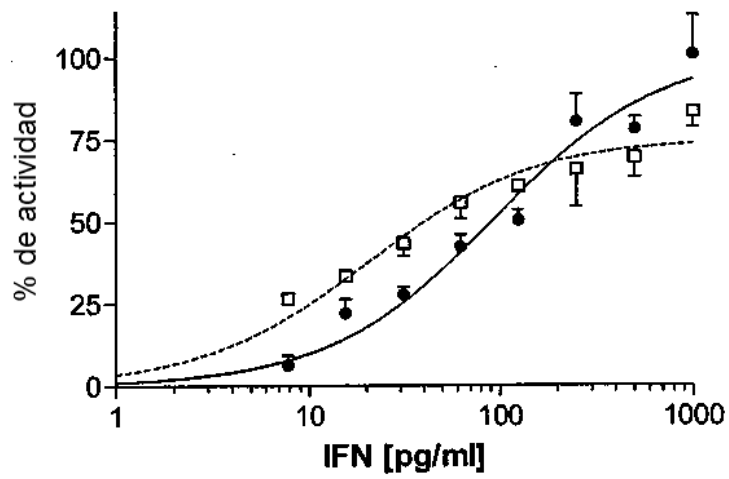


—○— NIBSC(UK) patrón de Interferón- α 2b:-DE₅₀ = 38 pg/ml

--●-- Interferón- α 2b nativo propio :- DE₅₀ = 90 pg/ml

* 3-5 pg/ml es equivalente a 1 UI/ml.

Figura 3



- Interferón- α 2b nativo propio :- DE₅₀ = 90 pg/ml
- ◻ Interferón- α 2b nativo propio tratado químicamente pero no pegilado :- DE₅₀ = 40 pg/ml

Figura 4

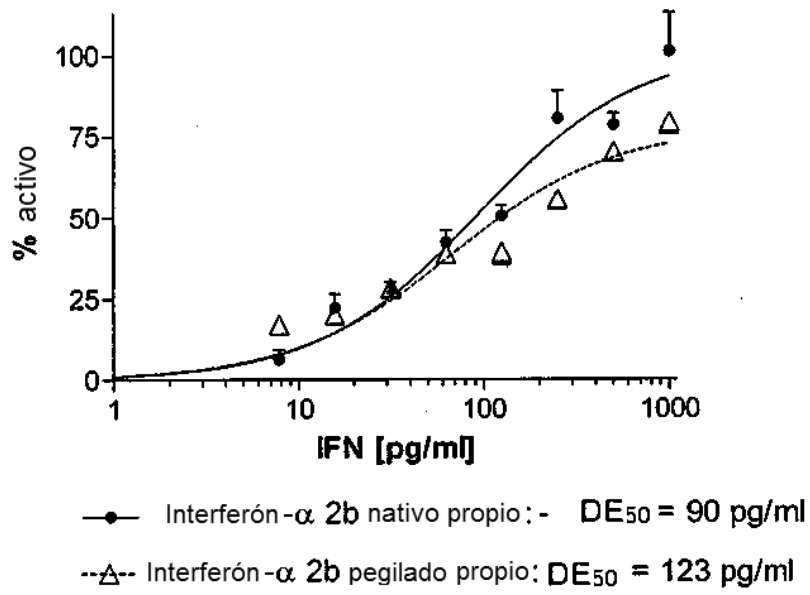


Figura 5(a)

Análisis de RT-PCR cuantitativa a tiempo real (de dos etapas) del del gen de la 2',5'- Oligoadenilato sintetasa (2',5'-OAS) inducible por IFN

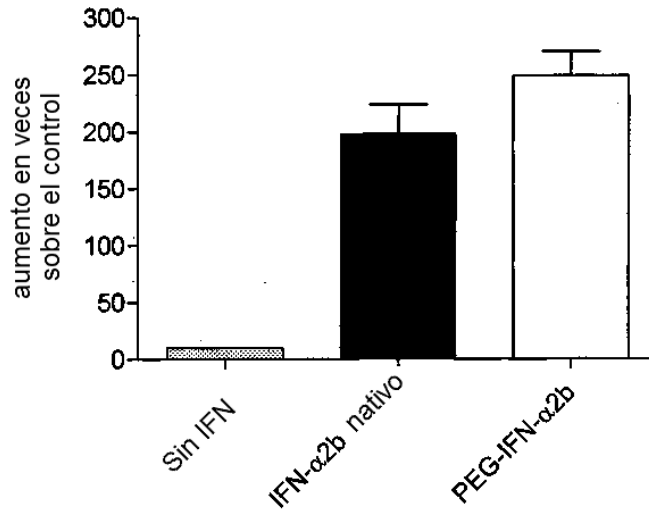


Figura 5(b)

Análisis de RT-PCR cuantitativa a tiempo real (de dos etapas) del del gen de la Proteína Quinasa R (PRKR) inducible por IFN

