

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 083**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C08G 65/329 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2013** **PCT/GB2013/051567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013** **WO13190272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2013** **E 13731436 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 2861260**

54 Título: **Reactivos de conjugación**

30 Prioridad:

18.06.2012 GB 201210770

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GODWIN, ANTONY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 602 083 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

Reactivos de conjugación

La presente invención se refiere a reactivos de conjugación innovadores para conjugar polímeros a proteínas y péptidos, y a un procedimiento innovador para producir nuevos conjugados.

Numerosas moléculas terapéuticamente activas, por ejemplo, proteínas, no poseen las propiedades requeridas para conseguir eficacia en el uso médico clínico. Por ejemplo, numerosas proteínas nativas no son buenos medicamentos puesto que tras la administración a pacientes, existen varios inconvenientes intrínsecos que incluyen: (1) las proteínas son digeridas por numerosas endo- y exopeptidasas presentes en sangre o tejidos; (2) casi todas las proteínas son inmunogénicas en cierta medida; y (3) las proteínas pueden excretarse rápidamente por ultrafiltración renal y por endocitosis. Algunas moléculas que podrían encontrar utilidad como agentes terapéuticos activos en medicamentos son sistémicamente tóxicas o carecen de biodisponibilidad y farmacocinética óptimas. Cuando las proteínas se depuran de la circulación sanguínea, por lo general, estas tienen que administrarse con frecuencia rápidamente al paciente. La administración frecuente aumenta aún más el riesgo de toxicidad, en especial toxicidades inmunológicamente derivadas. A menudo, resulta difícil conseguir una dosis terapéuticamente eficaz, por lo que la eficacia se ve comprometida. Por lo tanto, la rápida depuración es un problema de eficacia y un problema de seguridad.

Los polímeros sintéticos solubles en agua, en particular, polialquilenglicoles, son ampliamente utilizados para conjugar moléculas terapéuticamente activas, tales como proteínas. Estos conjugados terapéuticos han demostrado que alteran la farmacocinética favorable al prolongar el tiempo de circulación y disminuir la velocidad de depuración, disminuir la toxicidad sistémica, y en varios casos, muestran una mayor eficacia clínica. El procedimiento para conjugar covalentemente polietilenglicol, PEG, a proteínas se conoce comúnmente como "PEGilación".

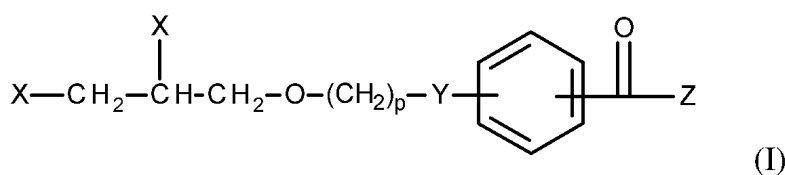
Es importante para la eficacia optimizada y para asegurar la consistencia dosis a dosis que el número de moléculas poliméricas conjugadas por proteína sea idéntico para cada molécula, y que cada molécula polimérica se conjugue específicamente de modo covalente al mismo resto de aminoácido en cada molécula de proteína. La conjugación no específica en sitios en una molécula de proteína da como resultado una distribución de productos de conjugación y, frecuentemente, una proteína no conjugada, que produce una mezcla compleja que resulta difícil y costosa de purificar.

El documento WO 2005/007197 describe una serie de reactivos de conjugación innovadores que pueden utilizarse para reaccionar con grupos nucleófilos en una proteína produciendo un conjugado de proteína-polímero. Estos reactivos encuentran utilidad particular por su capacidad para conjugarse con átomos de azufre obtenidos a partir de un enlace disulfuro en una proteína proporcionando conjugados de tioéter, y asimismo pueden utilizarse para conjugarse con otros nucleófilos, por ejemplo, con dos residuos de histidina, por ejemplo, dos residuos de histidina presentes en una etiqueta de polihistidina unida a una proteína, según se describe en el documento WO 2009/047500.

Para algunos usos, es deseable conjugar dos cadenas poliméricas a una proteína, ya que las propiedades estéricas de un conjugado que contiene una cadena sencilla de un peso molecular dado pueden ser significativamente diferentes de las propiedades de un conjugado que contiene, por ejemplo, dos cadenas, teniendo cada una de estas la mitad de su peso molecular. Se conocen reactivos capaces de dicha conjugación. En consecuencia, por ejemplo, el documento US 5.932.462 (Harris) divulga reactivos capaces de conjugar dos cadenas de PEG a proteínas. Cong y col., *Bioconjugate Chemistry* 23 (2012), págs. 248-263, divulgan asimismo un reactivo capaz de conjugar dos cadenas de PEG a proteínas, específicamente, el reactivo PEG-bis-sulfona se muestra como reactivo 3 de la Fig. 1, pág. 249. En el reactivo de Cong, dos cadenas de PEG se unen a posiciones diferentes en un grupo fenilo que actúa como enlazador al grupo que reacciona con la proteína funcional del reactivo. El reactivo de Cong es capaz de conjugar dos cadenas de PEG, por ejemplo, a dos átomos de azufre obtenidos a partir de un enlace disulfuro en una proteína, o dos residuos de histidina presentes en una etiqueta de polihistidina unida a una proteína, que proporciona conjugación mejorada en comparación con los reactivos de Harris.

Los inventores han descubierto un reactivo innovador capaz de conjugar dos cadenas poliméricas a una proteína, que muestra propiedades mejoradas sobre el reactivo conocido de Cong.

En conformidad, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula general:



en la que cada X representa independientemente una cadena polimérica; p representa un número entero de 1 a 6; Y representa un grupo amida; y Z representa o bien $-CH.(CH_2L)_2$ o $-C(CH_2L)(=CH_2)$, en el que cada L representa

independientemente un grupo saliente.

Los reactivos de fórmula I contienen dos cadenas poliméricas X. Cada polímero X puede ser, por ejemplo un poli(alquilenglicol), una polivinilpirrolidona, un poliacrilato, por ejemplo poli(acrililoil morfolina), un polimetacrilato, una polioxazolina, un alcohol polivinílico, una poliacrilamida o polimetacrilamida, por ejemplo, policarboximetacrilamida, o un copolímero de HPMA. Adicionalmente, el polímero puede ser uno que es susceptible a la degradación enzimática o hidrolítica. Dichos polímeros, por ejemplo, incluyen poliésteres, poliacetales, poli(ortoésteres), policarbonatos, poli(iminocarbonatos), y poliamidas, tales como poli(aminoácidos). Un polímero puede ser un homopolímero, un copolímero aleatorio o un copolímero estructuralmente definido como un copolímero en bloque. Por ejemplo, puede ser un copolímero, por ejemplo un copolímero en bloque, obtenido a partir de dos o más óxidos de alquileo, o de poli(óxido de alquileo) y, o bien un poliéster, poliacetal, poli(ortoéster), o un poli(aminoácido). Los denominados Pluronic son una clase importante de copolímeros en bloque de PEG. Estos se obtienen a partir de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno. Los polímeros polifuncionales que pueden utilizarse incluyen copolímeros de diviniléter anhídrido maleico y estireno anhídrido maleico.

Igualmente pueden utilizarse polímeros presentes de forma natural, por ejemplo polisacáridos, tales como quitina, dextrano, dextrina, quitosano, almidón, celulosa, glicógeno, poli(ácido sialílico) y derivados de los mismos. Una proteína puede utilizarse como el polímero. Esto permite la conjugación de una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, a una segunda proteína, por ejemplo una enzima u otra proteína activa. Además, si se utiliza un péptido que contiene una secuencia catalítica, por ejemplo, un sitio aceptor de O-glicano para glicosiltransferasa, se permite la incorporación de un sustrato o una diana para la reacción enzimática posterior. Poli(aminoácido)s, tales como ácido poliglutámico o poliglicina también puede utilizarse, al igual que polímeros híbridos obtenidos a partir de monómeros naturales, tales como sacáridos o aminoácidos y monómeros sintéticos, tales como óxido de etileno o ácido metacrílico.

Preferentemente, cada polímero utilizado en la presente invención es un polímero sintético hidrófilo o soluble en agua. Si un polímero es un poli(alquilenglicol), este es preferentemente uno que contiene unidades C₂ y/o C₃, y es en concreto un poli(etilenglicol) (PEG). Excepto cuando el contexto requiera lo contrario, cualquier referencia a un polímero en la presente memoria descriptiva ha de entenderse como la inclusión de una referencia específica a PEG.

Un polímero puede estar opcionalmente derivatizado o funcionalizado en cualquier forma deseada. Los grupos reactivos pueden estar vinculados al extremo terminal del polímero o al grupo terminal, o en la cadena polimérica por enlazadores colgantes; en tales casos, el polímero es, por ejemplo, una poliacrilamida, polimetacrilamida, poliacrilato, polimetacrilato, o un copolímero de anhídrido maleico. Tales polímeros funcionalizados ofrecen una oportunidad adicional para preparar conjugados multiméricos (es decir, conjugados en los que el polímero se conjuga a más de una molécula). Por ejemplo, un polímero puede llevar una o más moléculas de fármaco a cualquier punto a lo largo de su longitud, por ejemplo a su extremo terminal. Si se desea, el polímero puede acoplarse a un soporte sólido utilizando procedimientos convencionales.

Las dos cadenas poliméricas X pueden ser idénticas o diferentes. Específicamente, cada X puede representar el mismo polímero químico, o un polímero químico diferente. Por ejemplo, cada X puede representar una cadena de PEG, o una X puede representar una cadena de PEG y la otra X puede representar un polímero diferente, por ejemplo un PVP o una cadena proteica.

Cada polímero X puede contener una cadena lineal simple, o puede poseer morfología ramificada compuesta por numerosas cadenas pequeñas o grandes. En general, una cadena polimérica se inicia o termina por medio de un grupo terminal adecuado, y se conecta al otro extremo de la cadena en el resto de la molécula de fórmula I. Por ejemplo, una cadena de PEG puede poseer un grupo terminal seleccionado entre alcoxi, por ejemplo, metoxi, ariloxi, carboxi o hidroxilo. Cuando se ramifica la cadena, cada extremo terminal de rama libre contendrá el grupo terminal.

Cada cadena polimérica X puede poseer cualquier peso molecular adecuado, y cada cadena polimérica X puede poseer un peso molecular idéntico o diferente al igual que la otra. Por ejemplo, cada cadena puede poseer un peso molecular de al menos 5, 10, 15, 20, 30, o 40 kDa. Generalmente, el peso molecular máximo preferente de cada cadena es 60 kDa. Cuando un conjugado tiene por objeto dejar la circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de la inflamación causada por cáncer, infección o enfermedad autoinmunitaria, o por traumatismo, puede resultar ventajoso utilizar un conjugado en el que el peso molecular total de los polímeros (X + X) se encuentre en el intervalo de 2.000-30.000 g/mol. Para aplicaciones en las que el conjugado tiene por objeto permanecer en la circulación puede resultar ventajoso utilizar un peso molecular total mayor de polímero, por ejemplo en el intervalo de 20.000-75.000 g/mol.

P representa un número entero de 1 a 6, por ejemplo 1, 2 o, especialmente, 3.

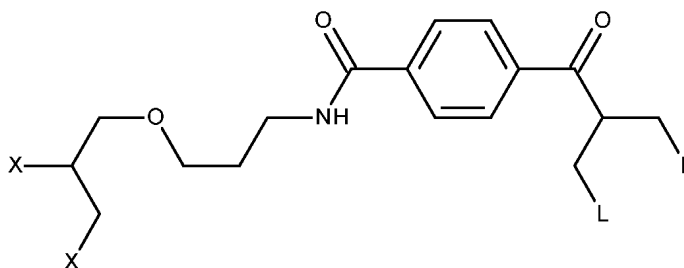
Los reactivos de la presente invención contienen un grupo amida, Y, conforme se dibuja en la fórmula I, puede ser -CO-NR'- o, preferentemente, -NR'-CO-, en el que R' representa un grupo alquilo C₁₋₄, por ejemplo un grupo metilo, o, especialmente, un átomo de hidrógeno. Este grupo puede vincularse al grupo fenilo mostrado en la fórmula I en cualquier posición, pero se halla preferentemente en la posición para con respecto al grupo -CO.Z. El grupo fenilo de

fórmula I puede llevar, si se desea, sustituyentes adicionales, aunque no está sustituido preferentemente.

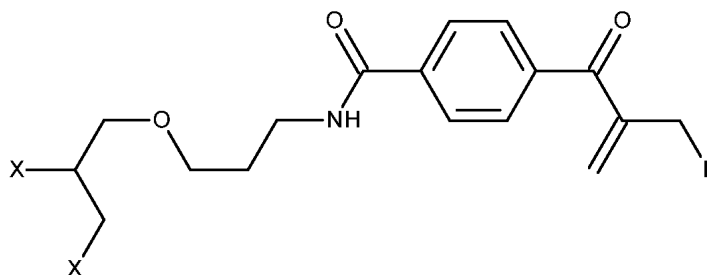
Un grupo saliente L puede representar, por ejemplo -SR, -SO₂R, -OSO₂R, -N⁺R₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, halógeno, o -OØ, en el que R posee el significado dado anteriormente, y Ø representa un arilo sustituido, especialmente un grupo fenilo que contiene al menos un sustituyente aceptor de electrones, por ejemplo -CN, -NO₂, -CO₂R, -COH, -CH₂OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO₂R, -SR, -SOR, -SO₂R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO₂R, -NRCO₂R, -NO, -NHOH, -NROH, -C=N-NHCOR, -C=N-NRCOR, -N⁺R₃, -N⁺HR₂, -N⁺H₂R, halógeno, por ejemplo cloro o, especialmente, bromo o yodo, -C≡CR, -C=CR₂ y -C=CHR, en el que cada R posee independientemente uno de los significados dados anteriormente. Los grupos alquilo o aril sulfonilo son particularmente grupos salientes preferentes, con fenilsulfonilo o, en especial, tosilo, siendo especialmente preferente. Cuando dos Ls están presentes, estas pueden ser grupos diferentes, pero preferentemente forman parte del mismo grupo.

Excepto cuando se indique lo contrario, los sustituyentes que pueden estar presentes en cualquier arilo opcionalmente sustituido, por ejemplo grupo fenilo o heteroarilo presente en un compuesto de fórmula I incluyen, por ejemplo, uno o más de los sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados entre 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 el que cada R posee independientemente uno de los significados dados anteriormente. Los sustituyentes preferentes, si están presentes, incluyen, por ejemplo CN, NO₂, -OR, -OCOR, -SR, -NHCOR, -NR.COR, -NHOH y -NR.COR.

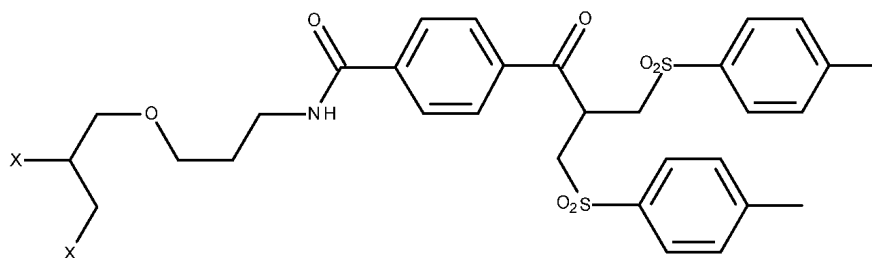
Reactivos especialmente preferentes según la invención poseen las fórmulas:



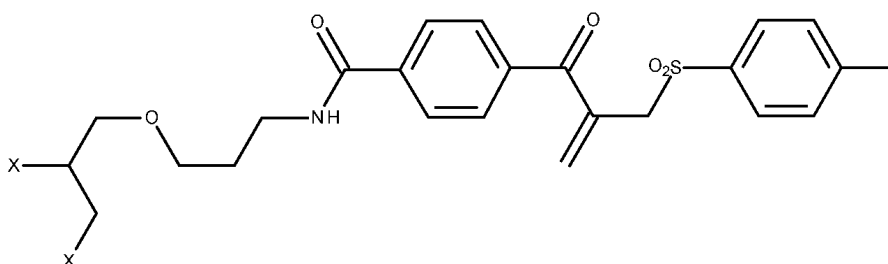
o



En estos reactivos, X es preferentemente polietilenglicol, especialmente polietilenglicol terminado en metoxi, es decir, CH₃O-(CH₂CH₂O)_m - en el que m es el número de unidades de óxido de etileno en el PEG. Además, en estos reactivos, cada L es preferentemente un grupo tosilo, en consecuencia:

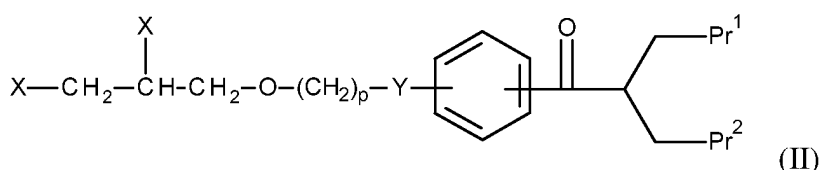


o

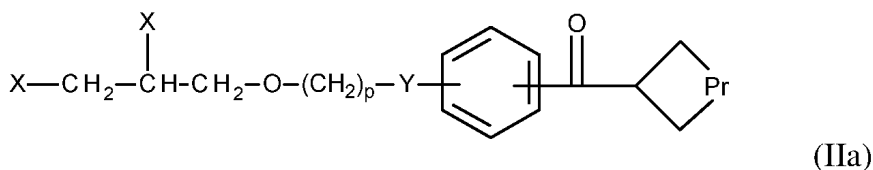


Los compuestos de fórmula I pueden utilizarse para la conjugación a una proteína o péptido. Para mayor comodidad, el término "proteína" se utilizará en toda la presente memoria descriptiva, y salvo que el contexto requiera lo contrario, el uso del término "proteína" ha de entenderse como inclusive de una referencia al péptido.

- 5 Por consiguiente, la invención proporciona además un procedimiento de preparación de un conjugado polímero, que comprende reaccionar un compuesto de fórmula general I con una proteína o un péptido. Los conjugados resultantes poseen la fórmula general:

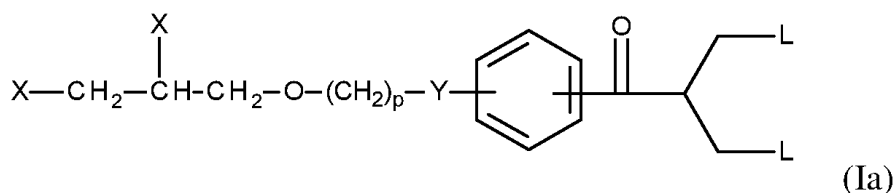


- 10 en la que X, p e Y poseen los significados dados anteriormente, y, o bien cada Pr¹ y Pr² representa una molécula de proteína o un péptido distinta, o bien Pr¹ y Pr² representan conjuntamente una única proteína o un péptido único Pr unido en dos puntos distintos, en consecuencia:

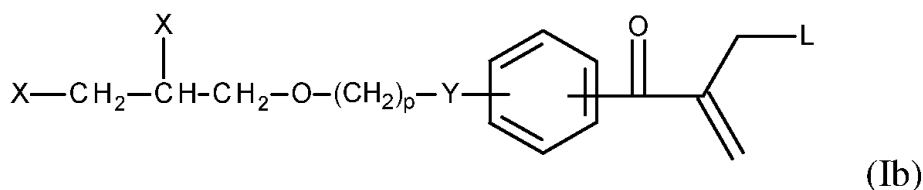


- 15 Preferentemente Pr¹ y Pr² representan conjuntamente una única proteína unida a dos átomos de azufre obtenidos a partir de un enlace disulfuro en una proteína, o a dos residuos de histidina presentes en una etiqueta de polihistidina unida a una proteína (es decir, los conjugados resultantes poseen la fórmula general IV (a)).

En el reactivo de fórmula I, Z representa o bien -CH.(CH₂L)₂ o -C(CH₂L)(=CH₂). Estos dos grupos son químicamente equivalentes entre sí. Si un reactivo de fórmula I en la que Z representa -CH.(CH₂L)₂, es decir, un reactivo de fórmula Ia:



- 20 se utiliza para reaccionar con una proteína en un procedimiento de acuerdo con la invención, la reacción continúa por la pérdida de un grupo saliente L, y la formación resultante de un reactivo de fórmula I en la que Z representa -C(CH₂L)(=CH₂), es decir, un reactivo de fórmula Ib:



- 25 Este reactivo reacciona con un nucleófilo, por ejemplo un residuo de cisteína, histidina o lisina, en la proteína. Posteriormente, el grupo saliente L restante se pierde, y la reacción con un segundo nucleófilo (ya sea en una segunda molécula de proteína o en la misma molécula de proteína al igual que el primer nucleófilo) se produce para formar el conjugado deseado. Por lo tanto, el procedimiento de la invención puede llevarse a cabo utilizando un

compuesto de fórmula Ia como material de partida, en cuyo caso se forma *in situ* un compuesto de fórmula Ib, o puede utilizarse un compuesto preformado de fórmula Ib como material de partida.

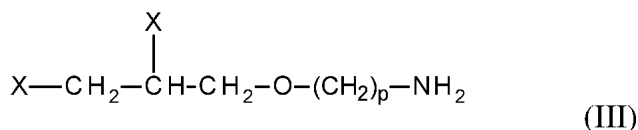
La reacción de conjugación de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en las condiciones de reacción descritas en los documentos WO 2005/007197 y WO 2009/047500. El procedimiento puede llevarse a cabo por ejemplo en un disolvente o mezcla de disolvente en la cual todos los reactivos son solubles. Por ejemplo, la proteína puede dejarse reaccionar directamente con el reactivo de conjugación polimérica en un medio de reacción acuoso. Este medio de reacción también puede ser tamponado, dependiendo de los requisitos de pH del nucleófilo. El pH óptimo para la reacción será generalmente de al menos 4,5, generalmente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,5, de manera preferente aproximadamente 6,0 a 7,5. Las condiciones de reacción óptimas dependerán por supuesto de los reactivos específicos empleados.

Las temperaturas de reacción comprendidas entre 3-37 °C son generalmente adecuadas cuando se utiliza un medio de reacción acuoso. Las reacciones llevadas a cabo en medios orgánicos (por ejemplo, THF, acetato de etilo, acetona), se llevan a cabo, en general, a temperaturas que oscilan hasta temperatura ambiente.

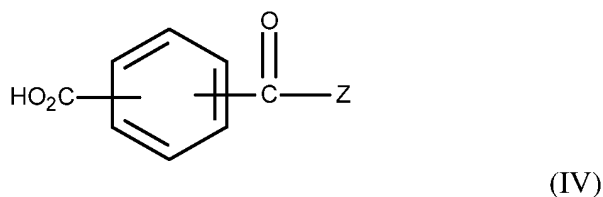
Cuando la unión a la proteína se realiza a través de dos átomos de azufre obtenidos a partir de un enlace disulfuro en la proteína, el procedimiento puede llevarse a cabo reduciendo el siguiente enlace disulfuro *in situ* en el cual el producto reducido reacciona con el reactivo de fórmula I. Preferentemente, el enlace disulfuro se reduce y se elimina cualquier exceso de agente reductor, por ejemplo por cambio del tampón, antes de introducir el reactivo de conjugación. El disulfuro puede reducirse, por ejemplo, con ditioneitol, mercaptoetanol o tris-carboxietilfosfina utilizando procedimientos convencionales.

La proteína puede conjugarse eficazmente utilizando un equivalente estequiométrico o un ligero exceso de reactivo de conjugación I. No obstante, también es posible llevar a cabo la reacción de conjugación con un exceso de estequiometría del reactivo de conjugación, y esto puede ser deseable para algunas proteínas. El exceso de reactivo puede eliminarse fácilmente, por ejemplo por cromatografía de intercambio iónico, durante la purificación posterior del conjugado.

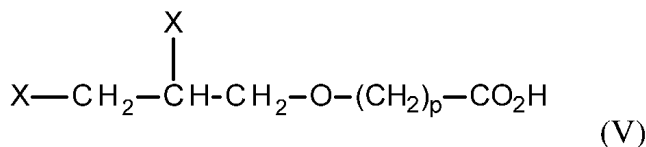
Los compuestos de fórmula general I, en la que Z representa -CH.(CH₂L)₂ pueden prepararse por cualquier reacción de un compuesto de fórmula general I



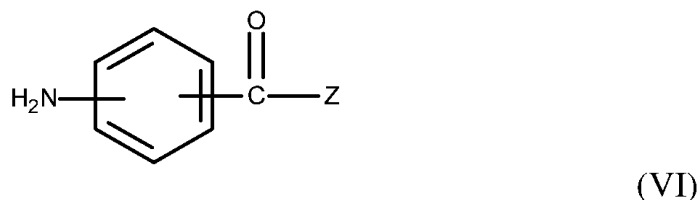
con un compuesto de fórmula general



o reaccionando un compuesto de fórmula general



con un compuesto de fórmula general

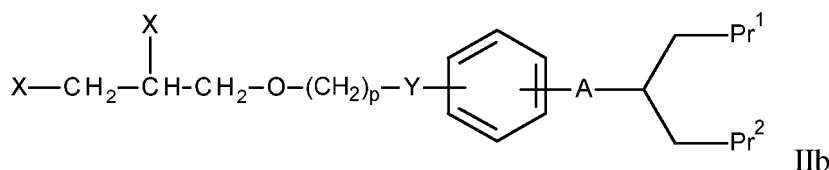


En ambos casos, se forma un grupo amida. Como se conoce adecuadamente en la materia, el grupo CO_2H que se hace reaccionar para formar el grupo amida, se activa adecuadamente para facilitar la reacción, por ejemplo por formación de un éster activo, un cloruro de acilo, o un anhídrido, o directamente con amina mediante un agente de activación, tal como una carbodiimida.

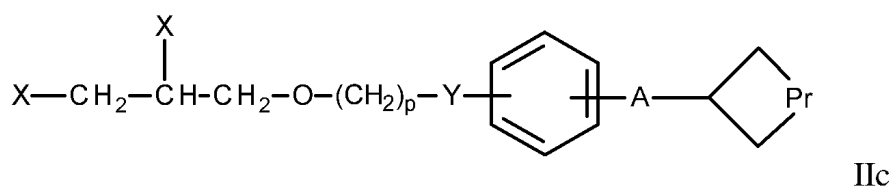
- 5 Como se ha explicado previamente, los compuestos de fórmula general I en la que Z representa $-\text{C}(\text{CH}_2\text{L})(=\text{CH}_2)$ pueden prepararse eliminando un grupo saliente L a partir del compuesto correspondiente de fórmula general I en la que Z representa un grupo $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{L})_2$.

El producto inmediato del procedimiento de acuerdo con la invención es un conjugado que aún contiene el grupo ceto CO unido al anillo fenilo en la fórmula I, es decir, un conjugado de fórmula II, especialmente IIa, anterior. Sin embargo, el procedimiento de la invención es reversible en condiciones adecuadas. Esto puede ser deseable en algunas aplicaciones, por ejemplo, en aquellas en las que se requiere una rápida liberación de la proteína, pero en otras aplicaciones, la liberación rápida de la proteína puede no ser deseable. Por lo tanto, puede ser deseable estabilizar los conjugados reduciendo el grupo ceto para dar un resto que previene la liberación de la proteína, generalmente un grupo hidroxilo OH, aunque la aminación reductora también es una posibilidad, al dar un grupo amina CH.NH_2 , CH.NHR o CH.NR_2 , en el que cada R posee independientemente el significado dado anteriormente. Si se desea, estos grupos pueden reaccionar adicionalmente, por ejemplo un grupo hidroxilo puede convertirse en un grupo éter CH.OR por reacción con un agente de eterificación; un grupo éster CH.O.C(O)R puede obtenerse por la reacción de un grupo hidroxilo con un agente de acilación; o una amida CH.NHC(O)R o CH.N(C(O)R)_2 puede formarse por acilación de una amina. Por consiguiente, el procedimiento según la invención puede comprender la etapa adicional de reducir el grupo ceto en el conjugado. Se prefiere particularmente el uso de un borohidruro, por ejemplo borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, borohidruro de potasio o triacetoxiborohidruro de sodio, como agente reductor. Otros agentes reductores que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo cloruro de estaño (II), alcóxidos, tales como alcóxido de aluminio, e hidruro de litio y aluminio.

Los conjugados que pueden prepararse por el procedimiento de la presente invención son innovadores, y por lo tanto forman parte de la presente invención *per se*. Los conjugados innovadores de acuerdo con la presente invención poseen la fórmula general:



en la que X, p e Y poseen los significados dados anteriormente, A representa un grupo CO, CHOH, CH.NH_2 , CH.NHR , CH.NR_2 , CH.OR , CH.O.C(O)R , CH.NHC(O)R , o CH.N(C(O)R)_2 , en el que cada R posee el significado dado anteriormente, y, o bien cada Pr^1 y Pr^2 representa una molécula de proteína o péptido distinta o bien tanto Pr^1 como Pr^2 representan conjuntamente una única proteína o un péptido único unido a dos puntos distintos. Los conjugados preferentes poseen la fórmula general:



en la que X, p, Y y A poseen los significados dados anteriormente, y Pr representa una proteína única o un péptido único unido a dos puntos distintos.

Por supuesto, es posible conjugar más de un reactivo de conjugación de fórmula I a una proteína, en la que la proteína contiene suficientes puntos de fijación adecuados. Por ejemplo, en una proteína que contiene dos enlaces disulfuro diferentes, o en una proteína que contiene un enlace disulfuro y también lleva una etiqueta de polihistidina, es posible conjugar dos moléculas del reactivo de fórmula I por molécula de proteína.

Las proteínas adecuadas que pueden conjugarse con el procedimiento de la invención incluyen, por ejemplo péptidos, polipéptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, enzimas, citoquinas, quimiocinas, receptores, factores sanguíneos, hormonas peptídicas, toxinas, proteínas de transcripción, o proteínas multiméricas.

A continuación se detallan algunas proteínas específicas que pueden conjugarse utilizando la presente invención. Las enzimas incluyen enzimas específicas de carbohidratos, enzimas proteolíticas y similares, por ejemplo, las oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas divulgadas en el documento US 4.179.337. Enzimas específicas de interés incluyen asparaginasa, arginasa, adenosina desaminasa, superóxido dismutasa, catalasa, quimotripsina, lipasa, uricasa, bilirrubina oxidasa, glucosa oxidasa, glucuronidasa, galactosidasa,

glucocerebrosidasa, glucuronidasa, y glutaminasa.

Las proteínas sanguíneas incluyen albúmina, transferrina, Factor VII, Factor VIII o Factor IX, factor de von Willebrand, insulina, HACT, glucagén, somatostatina, somatotropinas, timosina, hormona paratiroidea, hormonas pigmentarias, somatomedinas, eritropoyetina, hormona luteinizante, factores de liberación hipotalámicos, hormonas antidiuréticas, prolactina, interleucinas, interferones, por ejemplo IFN- α o IFN- β , factores estimulantes de colonias, hemoglobina, citoquinas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del folículo, hormona estimulante del tiroides y activador del plasminógeno tisular.

Otras proteínas de interés son las proteínas alérgicas divulgadas por Dreborg y col. *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* (1990) 6 315-365 ya que tienen una alergenidad reducida cuando se conjugan con un polímero, tal como poli(óxido de alquileño) y por ello, son adecuadas para su uso como inductores de tolerancia. Entre los alérgenos divulgados se encuentran el antígeno E de ambrosia, veneno de abeja, alérgenos de ácaros y similares.

Son de interés glicopolipéptidos, tales como inmunoglobulinas, ovoalbúmina, lipasa, glucocerebrosidasa, lectinas, activador del plasminógeno tisular e interleucinas glicosiladas, interferones y factores estimulantes de colonias, así como inmunoglobulinas, como IgG, IgE, IgM, IgA, IgD y fragmentos de las mismas.

Son de particular interés proteínas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión al receptor y al ligando utilizados en medicina clínica con fines de diagnóstico y terapéuticos. El anticuerpo puede utilizarse solo o puede conjugarse ("cargarse") covalentemente con otro átomo o molécula, tal como un radioisótopo o un fármaco citotóxico/antiinfeccioso. Para la vacunación pueden utilizarse epítopos para producir un conjugado de polímero inmunogénico-proteína.

Proteínas particularmente preferentes incluyen fragmentos de anticuerpos, por ejemplo fragmento Fab de IgG, e interferones, tales como IFN- α , IFN- β e IFN de consenso.

La proteína puede derivatizarse o funcionalizarse, si se desea. En particular, antes de la conjugación, la proteína, por ejemplo, una proteína nativa, puede haberse hecho reaccionar con varios grupos de bloqueo para proteger grupos sensibles al respecto; o puede haberse conjugado previamente con uno o más polímeros u otras moléculas, bien mediante el procedimiento de la presente invención o bien utilizando un procedimiento alternativo. En una realización preferente de la invención, se contiene una etiqueta de polihistidina, que puede orientarse selectivamente por el reactivo de conjugación de acuerdo con la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un conjugado de acuerdo con la invención junto con un transportador farmacéuticamente aceptable, y también contiene opcionalmente un principio activo adicional además del conjugado de acuerdo con la invención; un conjugado de acuerdo con la invención para su uso en terapia; y el uso de un conjugado de acuerdo con la invención en un procedimiento para la fabricación de un medicamento. La invención encuentra utilidad en un procedimiento para tratar un paciente, que comprende administrar a un paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

Se ha descubierto que los reactivos de conjugación de la presente invención son extremadamente útiles, son capaces de una conjugación específica muy eficiente en el sitio con respecto a las proteínas, los conjugados resultantes innovadores demuestran un alto nivel de estabilidad. Como se ilustra en los ejemplos siguientes, se obtiene eficacia mejorada de manera espectacular en el reactivo conocido comparable de Cong y col, *Bioconjugate Chemistry* 23 (2012), págs. 248-263.

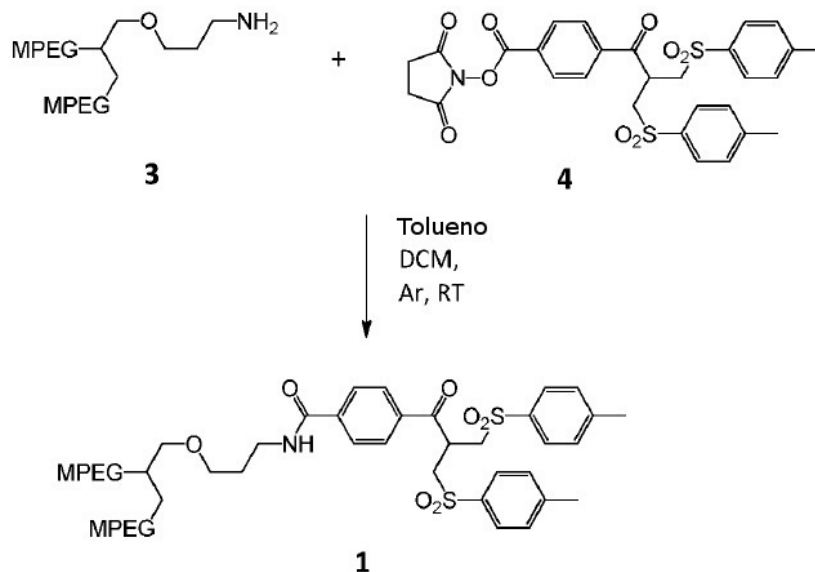
Los dibujos adjuntos ilustran los resultados obtenidos en los siguientes Ejemplos:

La Figura 1 ilustra el gel de SDS-PAGE obtenido en el Ejemplo 2.

Las Figuras 2, 3 y 4 ilustran los geles de SDS-PAGE obtenidos en el Ejemplo 3.

La Figura 5 ilustra el gel SDS-PAGE obtenido en el Ejemplo 4.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

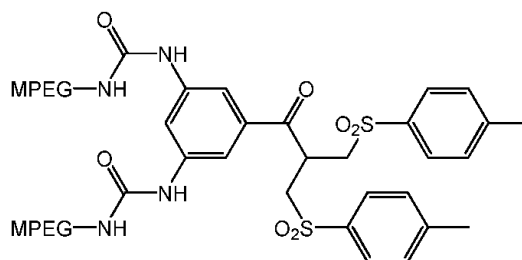
Ejemplo 1: Preparación del reactivo de PEG 1

La amina de PEG bifurcado **3** de 40 (2x20) kDa (MPEG es $\text{CH}_3\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)_m-) se adquirió en NOF CORPORATION (SUNBRIGHT GL2-400 PA, lote: M7D902). El éster NHS del ácido 4-[2,2-bis(p-tolilsulfonil)metil] acetil]benzoico, **4** se preparó de acuerdo con Brocchini y col. *Nat. Protoc.* 2006, 1(4), 2241-2252.

A un matraz de fondo redondo de una boca que contiene una barra de agitación magnética, se añadió la amina de PEG bifurcado **3** (300 mg) y tolueno (8 ml). La solución homogénea resultante se evaporó a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio durante 2 h para formar un residuo sólido. El residuo se disolvió en diclorometano (15 ml), el matraz se selló con un septum y la mezcla se agitó en atmósfera de argón. A la solución se añadió un enlazador activado **4** (27 mg), el matraz se volvió a sellar con un septum y la reacción se agitó a ta durante la noche. El septum se eliminó y la porción volátil se eliminó por evaporación a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio. Se añadió acetona (20 ml) al residuo y el sólido se disolvió con calentamiento moderado (30 °C). La solución resultante se filtró a través de un algodón hidrófilo no absorbente en un tubo Falcon de 50 ml. El enfriamiento de la solución en un baño de hielo seco dio como resultado un precipitado denso. La centrifugación (-9 °C, 4.000 rpm) durante 30 min sedimentó el precipitado. El sobrenadante se decantó y el sedimento se disolvió de nuevo en acetona (20 ml) a 30 °C. La precipitación, sedimentación y decantación se realizaron como se ha descrito previamente. Un tercer ciclo de precipitación y sedimentación con acetona se llevó a cabo y tras haber decantado el sobrenadante, el sedimento se congeló a -80 °C y a continuación se secó hasta una masa constante a alto vacío para dar el reactivo de PEG **1** como un sólido blanquecino (227 mg). RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 2,49 (s, 6H), 3,38 (s, 6H), 3,45-3,86 (m), 4,33 (m, 1H), 7,36 (AA'BB', 4H), 7,64 (AA'BB', 2H), 7,68 (AA'BB', 4H), 7,83 (AA'BB', 2H).

Ejemplo 2: Comparación de la reactividad de los reactivos de PEG 1 y 2 con un fragmento Fab de IgG humana

En este ejemplo, el reactivo de PEG 1 del Ejemplo 1 se comparó con el siguiente reactivo, el reactivo de PEG 2, en el cual MPEG es $\text{CH}_3\text{O} \cdot (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{m-1} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2 \cdot$, de Cong y col, *supra* .:



Una solución de fragmento Fab de IgG humana, (4,0 mg, 0,909 ml), Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Cat. n.º 009-000-007)) se diluyó en 4,95 ml con 50 mM de fosfato de sodio, pH 7,4 (que contiene 150 mM de NaCl y 20 mM de EDTA). A la solución del fragmento Fab, se añadió DTT 1,0 M (50 µl) para dar una concentración final de DTT de 10 mM con el fin de reducir el enlace disulfuro intercatenario para que se produzca de este modo la PEGilación. La solución resultante se mezcló moderadamente y a continuación se dejó a 4 °C durante 1 h. La solución de Fab reducida era el tampón cambiado en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7,4 (que contiene 150 mM de

NaCl y 20 mM de EDTA) que utiliza columnas de desalación PD-10. La solución Fab reducida se dividirá en partes iguales en dos porciones (3,5 ml, ~2 mg). Dos reactivos de PEG: el reactivo de PEG 1 y el reactivo de PEG 2, se disolvieron en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7,4 (que contiene 150 mM de NaCl y 20 mM de EDTA) en 20 mg/ml. A la primera porción de la solución Fab, se añadió reactivo de PEG 1 (75 µl, 1,5 mg) y a la segunda porción de la solución Fab, se añadió el reactivo de PEG 2 (75 µl, 1,5 mg). Ambas reacciones se mezclaron moderadamente y después se dejaron a 4 °C durante 20 h. Tras un periodo de 20 h, las mezclas de reacción cruda se analizaron por SDS-PAGE. El gel se tiñó con InstantBlue™ y la imagen se captó empleando un aparato IMAGEQUANT™ LAS 4010. El resultado se muestra en la Figura 1. En la Figura 1, el carril M indica niveles proteicos de Novex; el carril 1 indica el fragmento Fab de IgG humana, el carril 2 indica el producto PEGilado del reactivo de PEG 2 a las 20 h; y el carril 3 indica el producto PEGilado del reactivo de PEG 1 a las 20 h. A partir del análisis por SDS-PAGE, se puede observar que, mientras los dos reactivos de PEG 1 y 2 se conjugaron con éxito al fragmento Fab, la eficacia de la conjugación para el reactivo de PEG 1 era del 26 %, más del doble de la del reactivo de PEG 2 (10 %).

Ejemplo 3: Comparaciones de estabilidad de conjugados de IFN α-2a preparados con reactivos de PEG 1 y 2.

Preparación de conjugados: Una solución de IFN α-2a (6,5 mg, 0,845 mg/ml) se preparó en 50 mM de tampón fosfato de sodio, pH 7,4 (que contiene 150 mM de NaCl y 20 mM de EDTA). La solución de proteína se diluyó con tampón (313 µl) y después se añadió 1,0 mM de una solución de DTT en agua (187,5 ml) para dar una concentración de DTT final de 25 mM y un volumen de reacción de 7,5 ml. Una vez realizado el mezclado suave, la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. La proteína reducida era tampón cambiado en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7,4 (que contiene 150 mM de NaCl y 20 mM de EDTA) que utiliza columnas PD-10. La solución de proteína eluida se centrifugó (3.000 g, 4 °C, 5 min) y luego el sobrenadante se cuantificó por mediciones de absorbancia de rayos UV a 280 nm (0,532 mg/ml). La solución de proteína se diluyó a 0,10 mg/ml con tampón. PEGs 1 y 2 se disolvieron en 20 mg/ml en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7,4 (que contiene 150 mM de NaCl y 20 mM de EDTA). Dos viales se cargaron cada uno con IFN α-2a reducido (2,5 mg, 24,8 ml); se añadió al primer vial el reactivo de PEG 1 (4,9 mg, 0,245 ml), y se añadió al segundo vial el reactivo de PEG 2 (4,9 mg, 0,245 ml). Las reacciones se mezclaron moderadamente y luego se dejaron a 4 °C durante 18 h. Cualquier proteína reducida en las mezclas de reacción final se oxidó mediante la adición secuencial de 5 mg/ml de sulfato de cobre (12,18 µl) y a continuación 50:50 (mM) de GSH/GSSG (0,25 ml). La reacción de reoxidación se llevó a cabo a 4 °C durante la noche. Las mezclas de reacción se diluyeron x4 con 100 mM de acetato de sodio, pH 4 y después se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico (Macrocap™ SP) utilizando una elución en gradiente escalonado de 100 mM de acetato de sodio, pH 4 (NaCl 1,0 M) con los conjugados deseados eluyéndose a NaCl 0,60-0,65 M.

Comparación de estabilidad 1. Pruebas de resistencia para conjugados de IFN α-2a preparados con reactivos de PEG 1 y 2: Para cada una de las muestras de IFN α-2a PEGiladas con 1 y 2 (TFS esterilizado por filtración), se prepararon cuatro viales. Cada vial se cargó con 20 µl de conjugado en una concentración de 200 µg/ml. Dos viales de cada una de las muestras de ensayo contenían 10 mM de DTT. Un vial con DTT y un vial sin DTT se calentaron a 50 °C durante 1 h. Los viales restantes se calentaron a 90 °C durante 10 min. Las muestras (junto con la proteína no conjugada y el conjugado sin resistencia) se analizaron por SDS-PAGE - los geles se tiñeron con InstantBlue™, la imagen se captó utilizando un aparato IMAGEQUANT™ LAS 4010 y los resultados se muestran en las Figuras 2 y 3 para PEG 1-IFN α-2a y PEG 2-IFN α-2a, respectivamente. En las Figuras 2 y 3, el carril M indica niveles de proteína de Novex; el carril 1 indica un IFN α-2a; el carril 2 indica PEG-IFN α-2a; el carril 3 indica PEG-IFN α-2a, - 50 °C, 1 h; el carril 4 indica PEG-IFN α-2a, - 50 °C, DTT, 1 h; el carril 5 indica PEG-IFN α-2a, - 90 °C, DTT, 10 min; y el carril 6 indica PEG-IFN α-2a, - 90 °C, DTT, 10 min.

Las Figuras 2 y 3 muestran que los dos conjugados ensayados eran estables a 50 °C durante 1 h. Sin embargo, tras calentarlos a 50 °C durante 1 h en presencia de 10 mM de DTT, se observa mucha más proteína libre y agregación para el conjugado preparado con el reactivo de PEG 2. La tensión térmica a 90 °C durante 10 minutos dio lugar a la liberación de la proteína libre para el conjugado PEGilado con 2, pero no para el conjugado PEGilado con 1.

Comparación de estabilidad 2. Estudios de estabilidad acelerada, día 28, 40 °C, para conjugados de IFN α-2a PEGilados con reactivos de PEG 1 y 2. Las soluciones de las dos muestras de ensayo se prepararon en TFS esterilizado por filtración (que contiene NaN₃ al 0,01 % (p/v)) en una concentración de proteína de 200 µg/ml. Para cada PEG 1-IFN α-2a y PEG 2-IFN α-2a, se cargaron cuatro viales con 100 µl de muestra de ensayo. Un vial de cada muestra se congeló inmediatamente a -80 °C (t = 0 días). Los tres restantes se sellaron con parafilm® y a continuación se almacenaron a 40 °C. A los 7, 14 y 28 días se retiró una muestra de almacenamiento y se congeló a -80 °C hasta la compleción del estudio. Las muestras de ensayo se descongelaron rápidamente en un baño de agua regulado por un termostato a 37 °C y se analizaron por SDS-PAGE (teñidas con InstantBlue™ e imágenes captadas utilizando un aparato IMAGEQUANT™ LAS 4010) y el resultado se muestra en la Figura 4, en la cual el carril M indica niveles de proteína de Novex; el carril 1 indica IFN α-2a (1 µg); el carril 2 indica PEG 2-IFN α-2a, día 0; el carril 3 indica PEG 2-IFN α-2a, día 7; el carril 4 indica PEG 2-IFN α-2a, día 14; el carril 5 indica PEG 2-IFN α-2a, día 28; el carril 6 indica PEG 1-IFN α-2a, día 0; el carril 7 indica PEG 1-IFN α-2a, día 7; el carril 8 indica PEG 1-IFN α-2a, día 14; el carril 9 indica PEG 1-IFN α-2a, día 28. En la Figura 4, puede apreciarse claramente que PEG 2-IFN α-2a es menos estable que PEG 1-IFN α-2a con más proteína libre y menos conjugado restante en cada intervalo de tiempo.

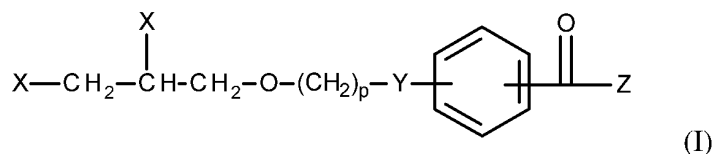
Ejemplo 4: Conjugación de IFN- β -1b con el reactivo de PEG 1.

5 Al IFN- β -1b reducido con disulfuro (9,5 mg, 0,3 mg/ml), en pH 7,3, se añadió una solución de reactivo de PEG 1 (1,7 ml, 20 mg/ml) en pH 7,3. La solución resultante se dejó incubar a 22 °C durante 4 h, con lo cual la mezcla de reacción cruda se analizó por SDS-PAGE. El gel se tiñó con InstantBlue™ y la imagen se captó utilizando un aparato IMAGEQUANT™ LAS 4010. El resultado se muestra en la Figura 5. En la Figura 5, en el carril M se encuentran los niveles de proteína de Novex; el carril 1 es el IFN- β -1b de partida; el carril 2 es el IFN- β -1b reducido y el carril 3 es la mezcla de reacción del reactivo de PEG 1 con IFN- β -1b. A partir del análisis por SDS-PAGE, puede apreciarse que la PEGilación de IFN- β -1b se produjo con éxito con un nivel visible de la banda del producto con el nivel de proteína de 110 kDa.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general:



en la que cada X representa independientemente una cadena polimérica; p representa un número entero de 1 a 6; Y representa un grupo amida; y Z representa o bien $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{L})_2$ o $-\text{C}(\text{CH}_2\text{L})(=\text{CH}_2)$, en la que cada L representa independientemente un grupo saliente.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que cada X representa un poli(alquilenglicol), polivinilpirrolidona, poliacrilato, polimetacrilato, polioxazolina, alcohol polivinílico, poliacrilamida, polimetacrilamida, copolímero de HPMA, poliéster, poliacetal, poli(ortoéster), policarbonato, poli(iminocarbonato), poliamida, o polisacárido.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que cada X representa poli(etilenglicol).

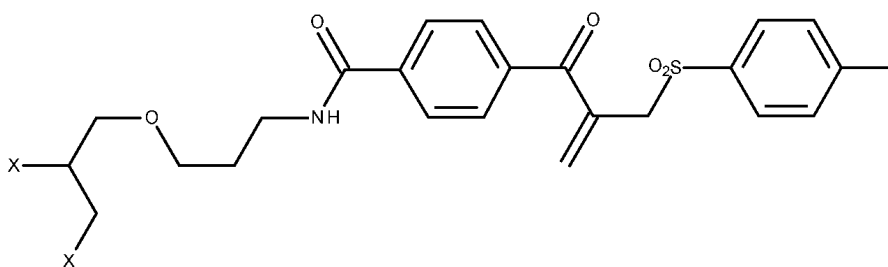
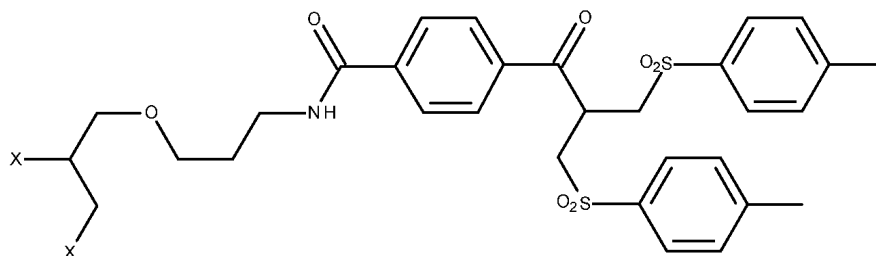
4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Y representa $-\text{NH}-\text{CO}-$.

5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que p es 3.

6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada L representa independientemente $-\text{SR}$, $-\text{SO}_2\text{R}$, $-\text{OSO}_2\text{R}$, $-\text{N}^+\text{R}_3$, $-\text{N}^+\text{HR}_2$, $-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}$, halógeno, o $-\text{O}\varnothing$, en los que R representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquilarilo, y $\varnothing$ representa un grupo arilo sustituido que contiene al menos un sustituyente aceptor de electrones.

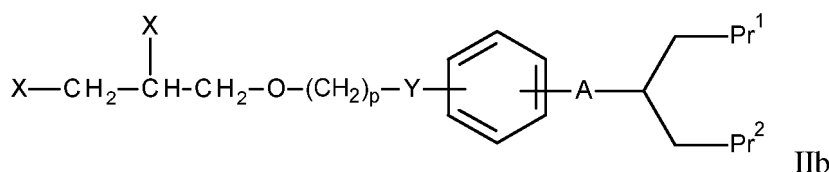
7. Un compuesto según la reivindicación 6, en el que cada L representa independientemente fenilsulfonilo o tosilo.

8. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



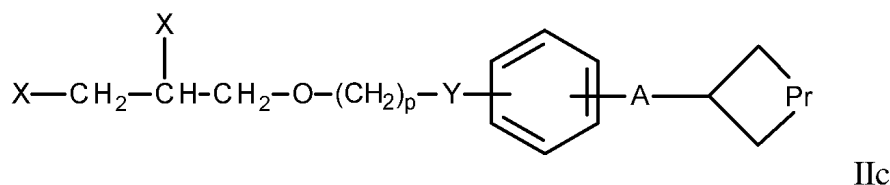
9. Un compuesto según la reivindicación 8, en el que cada X representa independientemente polietilenglicol de fórmula $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ en la que m es el número de unidades de óxido de etileno en X.

10. Un compuesto de fórmula general:



en la que X, p e Y tienen los significados dados en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, A representa un grupo CO, CHOH, CH.NH₂, CH.NHR, CH.NR₂, CH.OR, CH.O.C(O)R, CH.NHC(O)R, o CH.N(C(O)R)₂, en los que cada R representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquilarilo, y cada uno de Pr¹ y Pr² representa una molécula de proteína o de péptido separada o ambos Pr¹ y Pr² representan conjuntamente una única proteína o un péptido unido a dos puntos separados.

11. Un compuesto según la reivindicación 10, que tiene la fórmula general:



en la que X, p, Y y A tienen los significados dados en la reivindicación 10, y Pr representa una proteína única o péptido único unido a dos puntos separados.

12. Un compuesto según la reivindicación 11, en el que Pr representa una proteína única o un péptido único unido a dos átomos de azufre obtenidos a partir de un enlace disulfuro en dicha proteína o péptido, o a dos residuos de histidina presentes en una etiqueta de polihistidina unida a dicha proteína o péptido.

13. Un compuesto según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que Pr representa un fragmento Fab de IgG, INF-α, IFN-β, o IFN de consenso.

14. Un procedimiento de preparación de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende la reacción de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 con una proteína o un péptido; y opcionalmente, la reducción del grupo ceto en el conjugado resultante.

15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y que contiene asimismo opcionalmente un principio activo adicional.

16. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición según la reivindicación 15, para su uso en terapia.

Figura 1

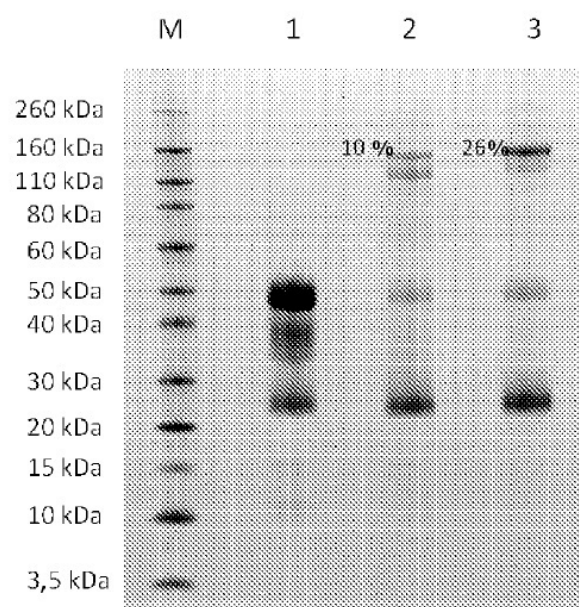


Figura 2.

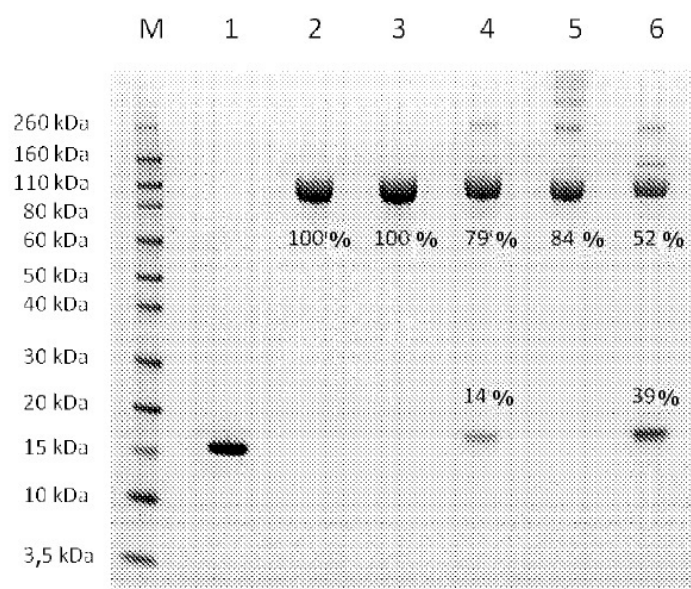


Figura 3

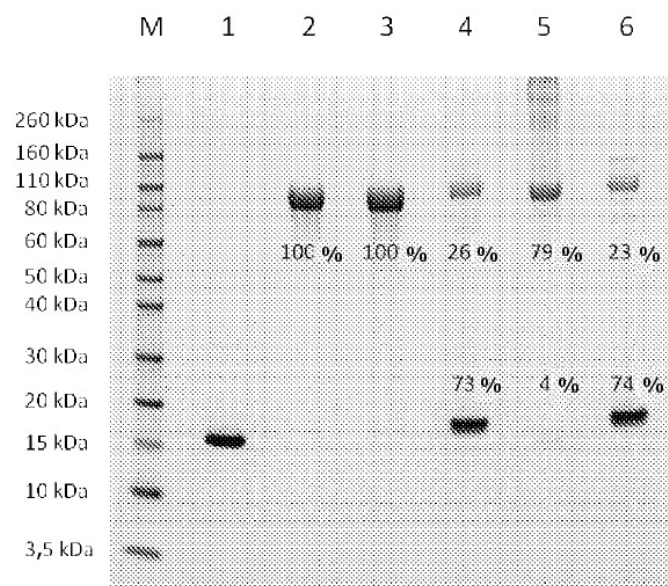


Figura 4

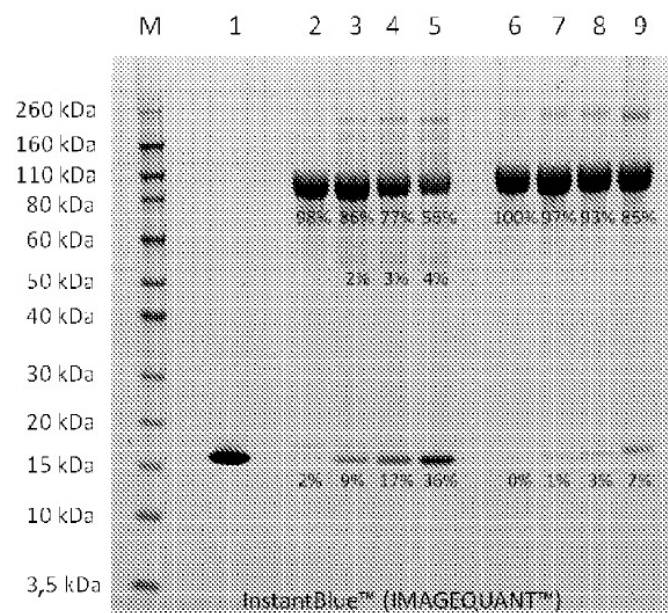


Figura 5

