

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 461**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2006 PCT/CU2006/000014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2007 WO07062610**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2006 E 06817995 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 1967212**

54 Título: **Dendrímero-PEG de cuatro ramas para la conjugación con proteínas y peptidos**

30 Prioridad:

30.11.2005 CU 2412005

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2017

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA (CIGB) (100.0%)
AVENIDA 31 ENTRE 158 Y 190, CUBANACAN
PLAYA
CIUDAD DE LA HABANA 10600, CU**

72 Inventor/es:

**RAMÓN HERNÁNDEZ, JOSÉ, ÁNGEL;
CASTRO ODIO, FIDEL, RAÚL;
SÁEZ MARTÍNEZ, VIVIAN, MARÍA;
PÁEZ MEIRELES, ROLANDO y
FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, EDUARDO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 604 461 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

Dendrímtero-PEG de cuatro ramas para la conjugación con proteínas y peptidos.

5 Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con una estructura polimérica semejante a dendrímtero con cuatro ramas de polietilenglicol (PEG), para la obtención de conjugados de interés farmacéutico.

10 Técnica anterior

Los beneficios de la conjugación de proteínas terapéuticas con polietilenglicol en varias propiedades farmacológicas son bien conocidos. Por ejemplo, el tiempo de vida media en sangre aumenta por varias causas, entre ellas: el residuo polimérico puede impedir el ataque de proteasas y el reconocimiento del fármaco por el sistema inmune y el volumen hidrodinámico significativamente superior del conjugado respecto a la proteína nativa disminuye sensiblemente la filtración por riñón. A pesar de que en muchos casos la PEGilación afecta la actividad biológica in vitro de una proteína, el aumento substancial del tiempo de vida en sangre hace que su acción terapéutica sea más efectiva (Harris J. M. y Chess R. B. (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:214-21).

La PEGilación también bloquea estéricamente las vías de degradación inducidas por interacciones hidrofóbicas y genera obstáculos estéricos no específicos que disminuyen las interacciones intermoleculares involucradas en la inestabilidad térmica de las proteínas. Todo esto hace que las proteínas PEGiladas tengan una mayor estabilidad física que las moléculas sin modificar, lo cual es muy útil para el desarrollo de una preparación farmacéutica final (Harris J. M. y Chess R. B. (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:214-21).

El reactivo comúnmente usado para la conjugación de proteínas es el polietilenglicol metilado en uno de sus extremos, conocido como monometoxipolietilenglicol (mPEG). El hecho de que un grupo metilo proteja uno de los extremos de la cadena de PEG, permite su activación sólo por el otro extremo, un reactivo monofuncional. Esto es muy importante para la conjugación de proteínas terapéuticas porque la conjugación de éstas con reactivos bifuncionales, o polifuncionales en general, provoca un entrecruzamiento que da al traste con la función biológica de la proteína. Siempre las moléculas de mPEG tienen una pequeña fracción contaminante de polímero no metilado, fracción diol. En los mPEG de mayor masa molecular la fracción diol es más grande debido a que es más difícil controlar el proceso de polimerización para cadenas muy largas (Roberts M. J., Bentley M. D., Harris J. M. (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Reviews* 54:459-76).

Una de las primeras moléculas derivadas de PEG fue la sintetizada por la reacción con cloruro de cianógeno. Pero la conjugación con éste provocaba una PEGilación extensiva. Esto no es deseable para las proteínas terapéuticas pues la PEGilación en alto grado provoca una brusca disminución de la actividad biológica, ya sea por bloquear directamente los centros activos o por cambios topológicos que desaparecen a éstos de la superficie accesible de la proteína. Usualmente el conjugado deseado es aquel donde hay sólo un residuo de PEG por cada molécula de proteína, éste es conocido como el mono PEGilado.

A partir de finales de los años 80 comienzan a usarse grupos activos más "suaves". Estos son fundamentalmente ésteres de la N-hidroxisuccinimida aunque también se usaron otros grupos. Tres de los más comunes son: el succinimidil succinato, el tresilato y succinimidil carbonato. Esta generación de PEG activados se conoce como Primera Generación (Roberts M. J., Bentley M. D., Harris J. M. (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Reviews* 54:459-76).

En la segunda mitad de los años 90, surge la Segunda Generación de los PEG activados. Hubo dos adelantos importantes: los grupos que permitían una PEGilación más selectiva (por ejemplo: el grupo aldehído que se conjuga preferentemente por el N-terminal de las proteínas) y estructuras ramificadas (Roberts M. J., Bentley M. D., Harris J. M. (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Reviews* 54:459-76). Los ejemplos de PEG ramificados son los monofuncionales de dos ramas (US 5,932,462), los tetrafuncionales de cuatro ramas y los octafuncionales de ocho ramas. Para la conjugación de proteínas terapéuticas, los PEG activados más útiles son los monofuncionales porque evitan el entrecruzamiento entre la proteína y el polímero. Los PEG ramificados también tienen una estructura tipo sombrilla que permite una mejor protección de la superficie de la proteína.

El PEG monofuncional de dos ramas ha permitido la obtención de un conjugado con interferón alfa 2a que ha demostrado tener mejores resultados en la clínica que la proteína nativa (Rajender Reddy K., Modi M.W., Pedder S. (2002) Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C. *Adv. Drug Deliv. Reviews* 54:571-86).

La patente EP1479711 describe un polietilenglicol funcional con ramificación dendrítica multiterminal con grupo terminal activo usado en la modificación de medicamentos de moléculas pequeñas, medicamentos de proteínas y polipéptidos y usado en el mejoramiento de la solubilidad, estabilidad y competencia inmunológica para prolongar el período de vida media de los medicamentos, aumentar el efecto curativo.

La publicación de patente WO2005/000360 describe que los reactivos poliméricos comprenden una porción de átomos dispuestos en un orden específico, en donde la porción se coloca entre un polímero soluble en agua y un grupo reactivo. Los reactivos polimérico son útiles para la formación de conjugados de polímero-agente activo.

5 Con la tecnología actual para la síntesis de mPEG solamente se pueden obtener cadenas de hasta 30 kDa por lo que reactivos con sólo dos ramas sólo permiten alcanzar masas moleculares de hasta 60 kDa. Se desea contar con estructuras con PEG monofuncionales de mayor masa molecular que permitan explorar un mayor rango de conjugados para obtener el valor óptimo en determinadas proteínas. Sin embargo, en ninguno de los informes descritos anteriormente se ha usado, caracterizado o mencionado un reactivo para la PEGilación que fuese monofuncional y con
10 más de dos cadenas de PEG. En caso de obtención de un reactivo con más de dos cadenas de PEG podrían obtenerse conjugados de mayor masa molecular y, además de la ventaja antes mencionada, permitirían el uso de ramas lineales de mPEG más cortas para generar reactivos para PEGilar de semejante masa molecular que la de estructuras de dos ramas. Estas ramas de menor tamaño tendrían una menor fracción diol lo que hace más fácil los procesos de síntesis.

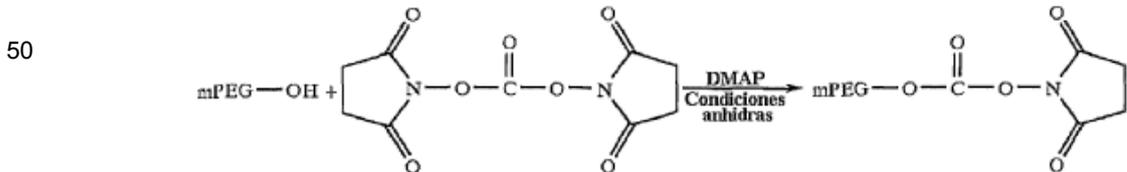
15 Explicación de la invención

La presente invención resuelve el problema antes mencionado, mediante el suministro de una estructura monofuncional semejante a un dendrímero que tiene cuatro ramas de mPEG. Esta estructura permite la obtención de conjugados con residuos poliméricos de hasta 120 kDa. Este hecho permite explorar conjugados de una gran variedad de masas
20 moleculares, que incluyen los de alta masa molecular. Además, con el uso de este enfoque pueden obtenerse moléculas de PEG con una masa molecular semejante a las de otros reactivos ramificados monofuncionales, pero con cadenas lineales de menor masa molecular.

En una modalidad preferida de la presente invención se obtiene una estructura polimérica, donde la masa molecular de la cadena de PEG está entre 5 000 y 30 000 Da y la masa molecular total está entre 20 000 y 120 000.

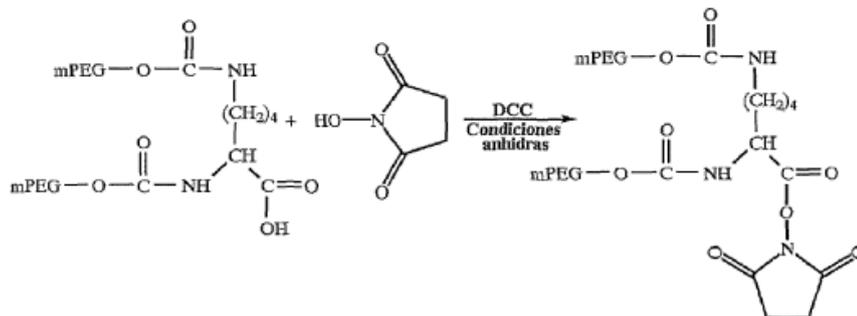
El uso de cadenas lineales pequeñas casi permitió la eliminación de la contaminación diol típica en PEG lineales más grandes. Inesperadamente, conjugados con nuestra estructura tuvieron una estabilidad físico-química (resistencia a
30 altas temperaturas y a la degradación por proteasas) mucho mayor que conjugados de masa molecular semejante pero preparados con las estructuras de sólo dos ramas. Además inesperadamente, tuvieron un tiempo de vida media en sangre mayor. Otro resultado inesperado fue que los conjugados con nuestra estructura semejante a dendrímero fueron más homogéneos, menos isómeros de posición, que los obtenidos con conjugados de masa molecular semejante pero con sólo dos ramas.

El PEG monofuncional de cuatro ramas semejante a dendrímero se obtiene en dos etapas fundamentales. La primera etapa es la síntesis de derivados de dos ramas por unión de dos cadenas lineales de PEG a un núcleo que puede ser, por ejemplo, lisina. Un proceso semejante se ha usado por otros autores con buenos resultados (US 5,932,462). La segunda etapa es la unión de dos moléculas de derivados de dos ramas a un núcleo semejante al anterior para obtener el derivado de cuatro ramas. Para poder unir las dos cadenas lineales de PEG a un núcleo en la primera etapa se necesita que estas tengan un grupo activo. Este grupo puede elegirse de varios conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo: succinimidil succinato, succinimidil carbonato, *p*-nitrofenilcarbonato, succinimidil propionato, succinimidil butanoato, entre otros. Un PEG lineal activado preferido en esta invención es el succinimidil carbonato. Esto se debe a varias razones fundamentales: el buen rendimiento de la reacción entre este reactivo y los núcleos con grupos aminos libres y la facilidad del proceso de producción de este PEG funcionalizado. Este proceso de síntesis (Miron T., Wilchek M. (1993) A Simplified Method for the Preparation of Succinimidyl Carbonate Polyethylene Glycol for Coupling to Proteins. *Bioconjugate Chem.* 4:568-69) se conoce por aquellos que trabajan en el tema:



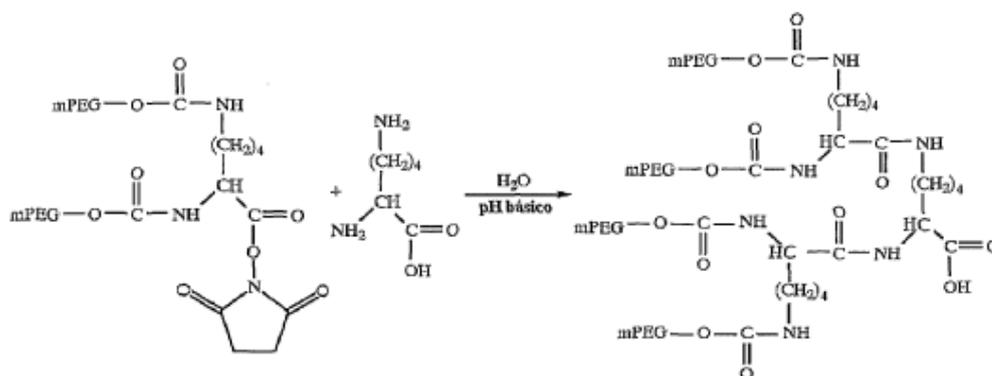
Una vez que está listo el PEG lineal activado, la primera etapa se completa fácilmente por reacción de éste con la molécula seleccionada como núcleo. En una modalidad preferida de esta invención el núcleo es L-lisina debido a su naturaleza biocompatible, con dos grupos aminos libres y un grupo carboxílico que puede usarse para ser
60 posteriormente activado.

El derivado de dos ramas se purifica fácilmente de la mezcla de reacción por métodos cromatográficos. Este derivado de dos ramas se activa para la reacción posterior con una molécula núcleo y la síntesis del derivado de cuatro ramas. Este producto puede activarse de diversas formas, pero una forma preferida por su eficiencia y facilidad es la formación de un éster de *N*-hidroxisuccinimida.
65



Este procedimiento ha sido usado con éxito para la activación de grupos carboxílicos con estructuras que contienen cadenas de PEG, como éster de *N*-hidroxisuccinimida (patentes de Estados Unidos núms.US 4,732,863 y US 5,932,462).

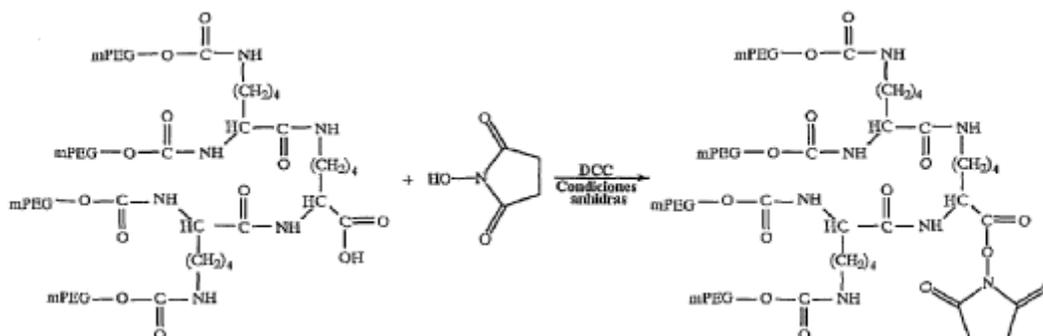
La segunda etapa de la preparación del derivado de cuatro ramas consiste en la reacción del derivado de dos ramas con una molécula núcleo, que igualmente al primer paso una modalidad preferida de esta invención es que el núcleo sea L-lisina.



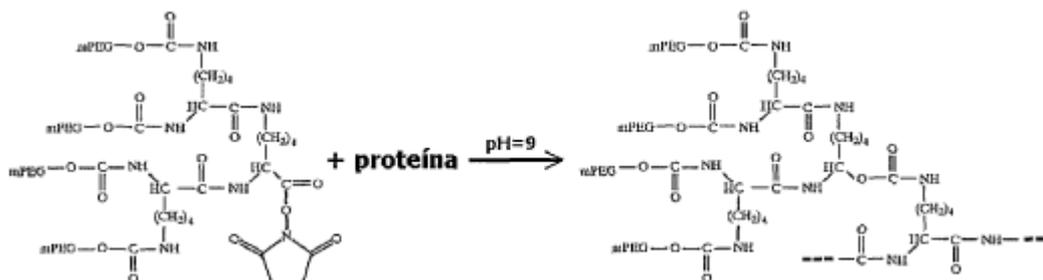
El derivado de interés se purifica fácilmente de la mezcla de reacción por métodos cromatográficos.

Esta molécula de PEG semejante a dendrímero puede activarse mediante el uso de diferentes grupos reactivos para su conjugación con proteínas. Cualquiera de los grupos funcionales usados para la activación de otras estructuras de PEG pueden usarse para el PEG semejante a dendrímero descrito en esta patente. Algunos ejemplos de estos grupos son: ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, succinimidil carbonato, diferentes tipos de aldehídos, maleimidias, entre otros. Otros tipos de grupos que permiten la unión de esta estructura a proteínas son los grupos quelantes como el nitriloacetato (NTA), que por mediación de un metal de transición puede conjugar las histidinas presentes en el esqueleto peptídico. La selección del grupo reactivo dependerá del residuo de proteína al que se quiere unir la molécula de PEG.

Por ejemplo, si existe la preferencia por la unión con grupos amino libres el polímero semejante a dendrímero puede activarse como un éster de *N*-hidroxisuccinimida. Como una materialización de esta invención se obtiene, por tanto, el éster de *N*-hidroxisuccinimida siguiendo el mismo procedimiento descrito para la activación de la estructura de dos ramas de la etapa 1.



La conjugación de la proteína con el PEG activado se realiza en una solución tampón adecuada. Las características de la solución tampón dependen, entre otros factores, del grupo funcional del polímero y del objetivo de la conjugación. Por ejemplo si se desea conjugar por los grupos aminos libres con un PEG funcionalizado como éster de *N*-hidroxisuccinimida, los sitios de conjugación pueden predecirse, hasta cierto grado, mediante el uso de un pH determinado. Un valor de pH de aproximadamente 9 favorecerá la conjugación por el grupo ε-amino de las lisinas.

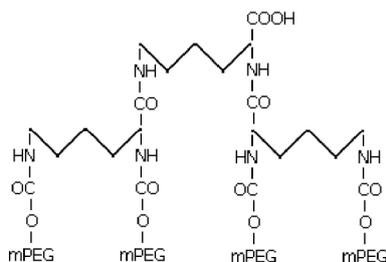


Otro ejemplo es que en la conjugación con la función aldehído, un pH ligeramente ácido permitirá que la PEGilación ocurra preferentemente por el extremo N-terminal de la proteína.

La purificación posterior del conjugado de interés puede realizarse por diversas técnicas cromatográficas.

Se deben analizar varias propiedades químicas, físicas y biológicas de los conjugados para lograr una caracterización lo más completa posible del conjugado purificado. Por ejemplo, la concentración del conjugado puede determinarse usualmente por espectroscopía ultravioleta (absorbancia a 280 nm) pues el residuo de PEG casi no afecta el coeficiente de extinción de la proteína. La pureza del producto purificado debe determinarse preferentemente por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) ya que los métodos cromatográficos como la filtración en gel pueden resolver pobremente las señales correspondientes al conjugado de interés y a los contaminantes. Otras propiedades químico-físicas pueden estudiarse por los procedimientos usuales.

La invención describe que un conjugado comprende una estructura polimérica semejante a dendrímero, que incluye cuatro ramas de monometoxipoli-etilenglicol que puede representarse como:



y un grupo nucleofílico que está comprendido en el interferón alfa 2-b.

40 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Protección contra la degradación por proteasas. El eje X representa el tiempo en horas y en el eje Y la cantidad de proteína sin degradar expresado en por ciento de la cantidad en el tiempo cero.

45 Figura 2. Resistencia térmica. El eje X representa el tiempo en días y en el eje Y la cantidad de proteína sin degradar expresado en por ciento de la cantidad en el tiempo cero.

Exposición detallada de los modos de preparación / Ejemplos

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

50 Obtención de la estructura y activación.

Obtención del succinimidilcarbonato de monometoxipoli-etilenglicol (SC-PEG).

55 Quince gramos de monometoxipoli-etilenglicol de masa molecular 12 000 (mPEG_{12k}) se disolvieron en 500 mL de tolueno y se secaron azeotrópicamente durante 3 horas. Pasado este tiempo el volumen se llevó a 250 mL y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Los siguientes reactivos se añadieron a esta solución: 60 mL de diclorometano (DCM)

5 seco, 2 g de disuccinimidil carbonato (DSC) disuelto en 15 mL de acetona seca y 1 g de dimetilaminopiridina disuelto en 10 mL de una mezcla 3:1 de tolueno:DCM. La reacción tuvo lugar durante toda la noche (16 h) con agitación. La mezcla de reacción se precipitó con 1 L de éter dietílico frío y el precipitado se recogió por filtración. Este producto se
 10 recristalizó tres veces mediante disolución en acetona y precipitación con éter dietílico. El producto final se secó con alto vacío y se almacenó bajo nitrógeno a -20 °C. El rendimiento total del proceso fue superior a 90 %. La fracción de PEG activado se determinó por reacción con glicil-glicina y cuantificación de los grupos aminos libres por reacción con TNBS.

10 Obtención de Lisina biPEGilada (Lis-2PEG).

10 Doce gramos de SC-PEG_{12K} reaccionaron con 46 mg de L-(+)-lisina disuelta en una concentración de 0,2 mg/ml en solución tampón borato 100 mM, pH 8,5. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente con agitación durante 16 horas. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó 5 veces con agua bidestilada y se ajustó el pH con ácido clorhídrico. El PEG se extrajo tres veces con un volumen de DCM. La unión de las tres fracciones de extracción se secó
 15 con sulfato de sodio anhidro y se filtró. La solución de PEG en DCM se concentró hasta 20 mL en un rotoevaporador. El concentrado se precipitó con 120 mL de éter dietílico frío, se separó por filtración y se secó a alto vacío. La Lis-2PEG se separó del resto de los componentes de la mezcla de reacción por cromatografía de intercambio iónico con DEAE sefarosa.

20 Una columna que contenía 1 litro de la matriz cromatográfica se equilibró con 3 volúmenes de solución tampón borato 100 mM pH 7,5 y después se lavó con 5 volúmenes de agua bidestilada. 10 gramos de la mezcla de reacción se aplicaron disueltos en agua bidestilada a 5 mg/ml. El PEG sin reaccionar se eliminó mediante lavado de la columna con dos volúmenes de agua bidestilada y la Lis-2PEG se eluyó con una solución de cloruro de sodio 1 mM. El pH de esta fracción se ajustó a 3 con ácido clorhídrico y se extrajo tres veces con un volumen de DCM. La unión de las tres
 25 fracciones de extracción se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. La solución de PEG en DCM se concentró hasta 10 mL en un rotoevaporador. El concentrado se precipitó con 60 mL de éter dietílico frío, se separó por filtración y se secó a alto vacío. El grado de pureza se determinó por SDS-PAGE mediante tinción del gel con una solución de cloruro de bario al 5 % y yodo 100 mM. La masa molecular determinada por MALDI-TOF fue de 23-24,5 kDa. El rendimiento total del proceso fue superior a 40 %.

30 Activación de la Lisina biPEGilada como éster de U-hidroxisuccinimida (PEG_{2,12K}-NHS).

35 Seis gramos de Lis-2PEG se disolvieron en 20 mL de DCM seco y se añadieron 60 mg de *N*-hidroxisuccinimida y 250 mg de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida. La reacción se mantuvo bajo agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y se concentró por rotoevaporación hasta 5 mL. El producto se precipitó con 20 mL de éter dietílico frío, se recristalizó tres veces mediante disolución en acetona y precipitación con éter dietílico. El producto final se secó con alto vacío y se almacenó bajo nitrógeno a -20 °C. El rendimiento total del proceso fue superior a 95 %. La fracción de PEG activado se determinó por reacción con glicil-glicina y el número de grupos aminos libres se cuantificó por
 40 reacción con TNBS.

40 Obtención del PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero.

45 Cinco gramos de PEG_{2,12K}-NHS se pusieron en reacción con 7 mg de L-(+)-lisina disuelta a 0.1 mg/ml de solución tampón borato 100 mM, pH 8,5. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente con agitación durante 16 horas. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó 5 veces con agua bidestilada y se ajustó el pH a 3 con ácido clorhídrico. El PEG se extrajo tres veces con un volumen de DCM. La unión de las tres fracciones de extracción se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. La solución de PEG en DCM se concentró hasta 5 mL en un rotoevaporador. El concentrado se precipitó con 30 mL de éter dietílico frío, se separó por filtración y se secó a alto vacío. El PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero se purificó por cromatografía de exclusión de tamaño en una columna G3000PW. La fracción
 50 que contenía la estructura deseada se le ajustó el pH a 3 con ácido clorhídrico y se extrajo tres veces con un volumen de DCM. La unión de las tres fracciones de extracción se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. La solución de PEG en DCM se concentró hasta 5 mL en un rotoevaporador. El concentrado se precipitó con 30 mL de éter dietílico frío, se separó por filtración y se secó a alto vacío. El grado de pureza se determinó por SDS-PAGE mediante tinción del gel con una solución de cloruro de bario al 5 % y yodo 100 mM y fue superior a 98 %. La masa molecular determinada por MALDI-TOF fue de 45,5-50 kDa. El rendimiento total del proceso fue superior a 30 %.

55 Funcionalización del PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero como éster de H-hidroxisuccinimida (PEG_{4,12K}-NHS).

60 Un gramo y medio del PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero se disolvieron en 5 mL de DCM seco y se añadieron 9 mg de *N*-hidroxisuccinimida y 37 mg de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida. La reacción se mantuvo bajo agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se filtró y después se precipitó con 20 mL de éter dietílico frío. El precipitado se recristalizó tres veces mediante disolución en acetona y precipitación con éter dietílico. El producto final se secó con alto vacío y se almacenó bajo nitrógeno a -20 °C. El rendimiento total del proceso fue superior a 95 %. La
 65 fracción de PEG activado se determinó por reacción con glicil-glicina y la cantidad de grupos aminos libres se determinó por reacción con TNBS.

Ejemplo 2. Obtención de IFN- α 2b conjugado con PEG_{4, 12K}-NHS.

Reacción de conjugación.

5 Cuatro gramos del PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero activado como éster de N-hidroxisuccinimida (PEG_{4,12K}-NHS) se añadieron a una solución que contenía 1 gramo de IFN- α 2b a 6 mg/ml en solución tampón borato 120 mM, pH 8,5. La reacción se mantuvo durante 1 hora a 4 °C con agitación suave, y después se detuvo mediante dilución 50 veces con solución tampón acetato de sodio 10 mM, pH 4. El rendimiento de la reacción se determinó por análisis de densitometría de unatinción de SDS-PAGE con Azul Brillante Coomasie R-250. La fracción de IFN- α 2b monoPEGilado con el PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero fue superior a 40 %.

Purificación del IFN- α 2b monoPEGilado con el PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero.

15 Una columna XK 50/60 (Pharmacia) que contenía 500 mL de Fractogel® EMD 650 (M) COO- se equilibró con 3 volúmenes de solución tampón acetato de sodio 10 mM, pH 4, con un flujo de 40 mL/min. La solución que contenía la mezcla de reacción se aplicó en la columna al mismo flujo. El PEG sin reaccionar y los conjugados con más de un residuo de PEG se eliminaron con un lavado de 2 horas con solución tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4 con 25 mM de cloruro de sodio. El conjugado monoPEGilado se eluyó con solución tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4 con 150 mM de cloruro de sodio. La pureza fue superior a 96 % y los contaminantes principales fueron interferón sin modificar y el conjugado biPEGilado. La fracción de interés se concentró hasta 200 mL y se aplicó en una columna XK 50/60 (Pharmacia) que contenía 1 L de SEPHADEX® G-25 equilibrada con solución tampón fosfato 50 mM, pH 7, con 100 mM de cloruro de sodio. El interferón monoPEGilado con el PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0,2 μ m y se almacenó a 4 °C.

25 Ejemplo 3. Caracterización químico-física del PEG_{4,12K}-IFN- α 2b.

Determinación de la concentración del conjugado.

30 La concentración del conjugado en función del residuo proteico se determinó por absorbancia con UV a 280 nm. Se consideró una unidad de absorbancia equivalente a una concentración de 1 mg/ml.

Determinación de la masa molecular del conjugado.

35 La masa molecular del conjugado se determinó por MALDI-TOF. La masa molecular promedio esperada del PEG de cuatro ramas semejante a dendrímerofue 48,000 Da y la del IFN- α 2b fue 19,200 Da, por tanto la masa teórica del conjugado fue 67,200 Da. La masa calculada del PEG_{4,12K}-IFN- α 2b fue de 64,000-70,000 Da.

Ejemplo 4. Caracterización biológica del conjugado de PEG_{4,12K}-IFN- α 2b.

40 Identificación inmunológica del conjugado en un ensayo tipo ELISA.

45 En una placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo monoclonal contra IFN- α 2b se aplicaron muestras del conjugado a distintas concentraciones y de control negativo. Posteriormente se añadió otro anticuerpo monoclonal contra IFN- α 2b, que reconoce otro epítipo, conjugado a peróxidasa de rábano picante. Se consideró que las muestras se reconocieron inmunológicamente cuando la absorbancia de las muestras de conjugado fue superior al promedio de las absorbancias de las muestras negativas más tres veces la desviación estándar de estos valores. Las muestras se reconocieron en todos los casos.

50 Actividad antiviral *in vitro*.

55 La actividad antiviral *in vitro* se determinó por la inhibición del efecto citopático producido por el virus Mengo en células Hep-2 (ATCC núm. CCL23). Se mezclaron diluciones seriadas (1:2) del conjugado en medio mínimo esencial con 2 % de suero fetal bovino y 40 μ g/ml de gentamicina con monocapas celulares en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas bajo 3 % de dióxido de carbono y 95 % de humedad relativa. El virus (10^7 TCID) se añadió y las placas se incubaron hasta que el efecto citopático (90 % de lisis celular) fue evidente. El grado de destrucción celular se midió por tinción de las células con violeta cristal. La actividad de cada muestra se expresó en unidades internacionales (UI) mediante evaluación con el estándar internacional 69/19 de IFN- α 2b de la Organización Mundial de la Salud, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

60 Tabla 1. Actividad antiviral *in vitro* del IFN- α 2b natural y conjugado al PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero.

Muestra	Preparación	Actividad antiviral UI/mg
Interferón nativo	-	2,0 X 10 ⁸
Interferón modificado con el PEG de 4 ramas semejante a dendrímero	1	1,1 X 10 ⁷
	2	0,9 X 10 ⁷
	3	1,2 X 10 ⁷

Actividad antiproliferativa *in vitro*.

5 La actividad antiproliferativa *in vitro* se midió por la capacidad del IFN- α 2b conjugado de inhibir el crecimiento de células Daudi (Linfoma Burkitt). Los resultados demostraron que la actividad *in vitro* del PEG_{4,12K}-IFN- α 2b fue un 5% de la actividad del IFN- α 2b sin modificar.

10 Ejemplo 5. Estabilidad químico-física del PEG_{4,12K}-IFN- α 2b.

Resistencia a la degradación por proteasas

15 Cuarenta microlitros de una solución de bicarbonato de sodio al 4 %, pH 8, que contiene 400 μ g/mL de IFN- α 2b natural, conjugado conl PEG de cuatro ramas o conjugado a un PEG de dos ramas de masas moleculares semejantes se mezclaron con 10 μ L de una solución de tripsina a 160 μ g/ml. La mezcla se dejó incubar a 37 °C durante un tiempo determinado. La reacción se detuvo con 10 μ L de ácido trifluoracético. La cantidad residual de proteína (conjugada o no) se estimó por la desaparición de la banda en un análisis por SDS-PAGE teñido con Azul Brillante Coomassie. Los resultados (Figura 1) demuestran que la protección que brinda la estructura de cuatro ramas (\blacktriangle) a la degradación del conjugado de IFN- α 2b es superior a la producida por la estructura de dos ramas de semejante masa molecular (\bullet).

20 Estabilidad térmica.

25 Para determinar el efecto sobre la estabilidad de la conjugación de IFN- α 2b con PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero, muestras de la proteína nativa y conjugada, se incubaron en tampón fosfato salino a 60 °C. Como control se usó el IFN- α 2b conjugado a un PEG de dos ramas de masa molecular semejante. Las muestras se retiraron a tiempos determinados y se estimó la cantidad residual de proteína (conjugada o no) por la desaparición de la banda en un análisis por SDS-PAGE teñida con Azul Brillante Coomassie. Los resultados (Figura 2) demuestran que la estabilidad térmica del conjugado con la estructura de cuatro ramas (\blacktriangle) es superior a los otros dos casos (IFN natural (\blacksquare), IFN conjugado con la estructura de dos ramas (\bullet)).

30 Ejemplo 6. Farmacocinética del PEG_{4,12K}-IFN- α 2b.

35 El estudio farmacocinético comparativo entre el interferón sin modificar y el conjugado con PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero se realizó en conejos de la cepa Nueva Zelandia con un peso promedio de 2 kg. Como control se usó el IFN- α 2b conjugado con un PEG de dos ramas. Las biomoléculas se inyectaron por vía subcutánea a 150 μ g de proteína por kilogramo de peso. Se tomaron muestras de sangre durante un intervalo de 144 horas a tiempos preestablecidos. Las muestras se centrifugaron y el suero extraído se almacenó a -20 °C hasta su análisis. La concentración de IFN- α 2b (conjugado o no) se determinó por un ensayo tipo ELISA con anticuerpos monoclonales específicos para esta citocina. La interpretación se basó en el modelo mamilar compartimentado clásico. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Farmacocinética comparada del IFN- α 2b natural y conjugado con PEG de dos ramas y PEG_{4,12K}-IFN- α 2b.

45 Parámetro	IFN- α 2b nativo	IFN-PEG de dos ramas	PEG _{4,12K} -IFN- α 2b
AUC, μ g,h/mL	339,12	74907,38	88952,15
$t_{1/2}$, h	2,38	50,48	63,58
50 MRT , h	4,33	90,68	105,23

Ejemplo 7. Conjugación de otras proteínas terapéuticas con PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero.

55 Otras proteínas terapéuticas como la estreptoquinasa recombinante (r-SK), eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF); se conjugaron con la estructura de cuatro ramas semejante a dendrímero. Se evaluó el efecto de la conjugación sobre la velocidad de degradación por proteasas.

60 Conjugación con el PEG semejante a dendrímero activado como éster de N-hidroxisuccinimida.

65 100 miligramos del PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero activado como éster de N-hidroxisuccinimida (PEG_{4,12K}-NHS) se añadieron a una solución que contenía 25 mg de la proteína terapéutica a 6 mg/mL en solución tampón borato 120 mM, pH 8,5. La reacción se mantuvo durante 1 hora a 4 °C con agitación suave. La reacción se detuvo mediante dilución 50 veces con solución tampón acetato de sodio 10 mM, pH 4. El rendimiento de la reacción se determinó por análisis de densitometría de la SDS-PAGE de muestras teñidas con Azul Brillante Coomassie R-250. La

fracción de proteína monoPEGilada con el PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero fue superior a 30 % en todos los casos.

Conjugación con el PEG semejante adendrímero activado como aldehído.

100 miligramos del PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero activado como aldehído (PEG_{4,12K}-ALD) se añadieron a una solución que contenía 15 mg de la proteína terapéutica a 4 mg/mL en solución tampón acetato 100 mM, pH 5 que contenía 20 mM de cianoborohidruro de sodio. La reacción se mantuvo durante 24 horas a 4 °C con agitación suave, y se detuvo mediante dilución 20 veces con solución HC1 1 mM. El rendimiento de la reacción se determinó por análisis de densitometría de la SDS-PAGE de muestras teñidas con Azul Brillante Coomassie R-250. La fracción de proteína monoPEGilada con el PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero fue superior a 30 % en todos los casos.

Efecto de la conjugación con PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero sobre la degradación de proteínas por proteasas.

Cuarenta microlitros de una solución de bicarbonato de sodio al 4 %, pH 8, que contenía 400 µg/mL de la proteína nativa o conjugada con PEG de cuatro ramas se mezclaron con 10 µL de una solución de tripsina a 160 µg/mL. La mezcla se incubó a 37 °C durante 4 horas con agitación suave. Pasado este tiempo la reacción se detuvo con 10 µL de ácido trifluoroacético. La cantidad residual de proteína (conjugada o no) se estimó por la desaparición de la banda en un análisis de SDS-PAGE teñida con Azul Brillante Coomassie. Los resultados (Tabla 3) indican que la conjugación con PEG de cuatro ramas semejante a dendrímero protege las proteínas conjugadas de la degradación por tripsina. En todos los casos, independientemente del método de conjugación química empleado, más de 35 % de la proteína no se había digerido transcurridas 4 horas de reacción con tripsina. Sin embargo, pasado ese tiempo de reacción no pudo detectarse señal en el caso de las proteínas nativas.

Tabla 3: Fracción (%) de proteína sin digerir con tripsina respecto a la cantidad de proteínas antes de reaccionar.

Proteína	Nativa	Conjugada con PEG _{4,12K} -NHS	Conjugado con PEG _{4,12K} -ALD
r-SK	0 %	38,2±1,5 %	41,5±0,9 %
EPO	0 %	39,8±2,3 %	37,5 ±1,7 %
G-CSF	0 %	45,6±3,4 %	42,1±2,9 %
EGF	0 %	35,1±4,4 %	37,6±4,8 %

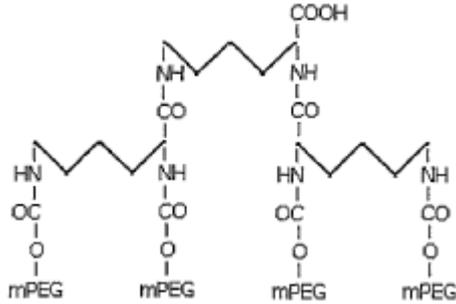
Reivindicaciones

1. Un conjugado que comprende una estructura polimérica semejante a dendrímero que incluye cuatro ramas de monometoxipoli(etilén glicol), que puede representarse como:

5

10

15



y un grupo nucleofílico que está comprendido en el interferón alfa-2b.

20

2. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la masa molecular de cada cadena de PEG de dicha estructura polimérica está entre 5,000 y 3,0000 Da y la masa molecular total de dicha estructura polimérica está entre 20,000 y 12,0000 Da.

25

3. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha estructura polimérica se activa por conjugación con grupo nucleofílico, obtenido por funcionalización del grupo carboxílico.

Figura 1

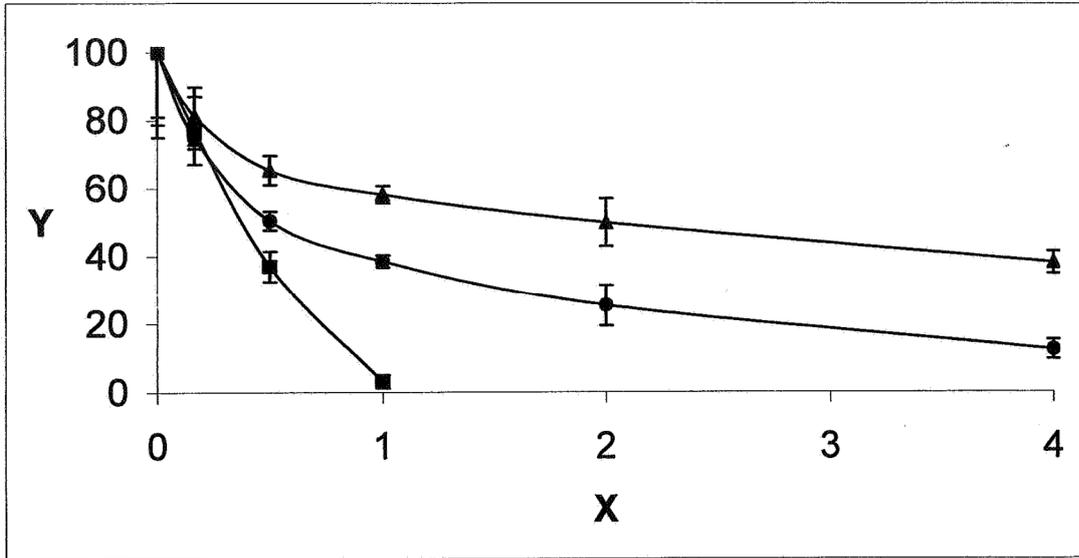


Figura 2

