

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 515**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2004** **E 09167191 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2133099**

54 Título: **Moléculas biológicas conjugadas y su preparación**

30 Prioridad:

11.07.2003 GB 0316294

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

13.09.2017

73 Titular/es:

**POLYETHERICS 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;
BROCCHINI, STEPHEN JAMES y
SHAUNAK, SUNIL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 632 515 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

Moléculas biológicas conjugadas y su preparación

La presente invención se refiere a moléculas biológicas conjugadas y a su preparación a partir de 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 la industria farmacéutica y por la ingeniería genética. Por ejemplo, ahora se están descubriendo y produciendo proteínas y polipéptidos terapéuticamente activos. Aunque en la actualidad se comercializan en Estados Unidos al menos 80 medicinas basadas en proteínas con al menos 350 medicinas basadas en proteínas más sometidas a ensayos clínicos (Harris J, Chess R: Effect of Pegylation on pharmaceuticals. Nature Review Drug
10 Discovery, 2003, 2, 214-221), la mayoría de las proteínas naturales no son medicinas buenas porque después de administración a pacientes hay varios inconvenientes inherentes que incluyen: (1) las proteínas son digeridas por muchas endopeptidasas y exopeptidasas presentes en la sangre o en tejidos, (2) muchas proteínas son inmunogénicas en cierta medida y (3) las proteínas pueden excretarse rápidamente mediante ultrafiltración en el riñón. Otras moléculas usadas como agentes terapéuticos activos en medicinas que son sistémicamente tóxicas o
15 carecen de biodisponibilidad y farmacocinética óptimas incluyen 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 enfermedades autoinmunes.

Se usan polímeros sintéticos, solubles en agua, en particular polialquilenglicoles, para conjugar moléculas terapéuticamente activas tales como proteínas. Estos conjugados terapéuticos han mostrado que alteran
20 favorablemente la farmacocinética prolongando el tiempo de circulación y disminuyendo las velocidades de aclaración, disminuyen la toxicidad sistémica y en varios casos, presentan una eficacia clínica mayor, Este procedimiento de conjugar covalentemente polietilenglicol, PEG, a proteínas se conoce habitualmente como "PEGilación" aunque se han examinado muchos polímeros diferentes como polímeros de conjugación.

Muchos reactivos polímeros para conjugación comprenden conjugar funcionalidad química que es hidrolíticamente inestable. Son ejemplos de reactivos de conjugación poliméricos hidrolíticamente inestables ésteres activos que
25 incluyen, por ejemplo, carbonatos de óxido de polialqueno-N-succinimida (Zalipsky, patente de EE.UU. N.º 122.614). Estos reactivos tienen semivididas relativamente cortas en medios acuosos, que incluyen sangre o plasma. Esto da como resultado la necesidad de añadir excesos estequiométricos grandes del reactivo de conjugación polimérico. La estabilidad hidrolítica del reactivo es importante porque el requisito de añadir excesos estequiométricos para la conjugación de proteínas requiere un esfuerzo y un coste significativos para purificar el
30 conjugado de polímero-proteína de la mezcla de reacción. Además, estos reactivos hidrolíticamente inestables tienden a reaccionar preferentemente con la funcionalidad química amina de la proteína, en particular con la ε-amina 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, entonces 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
35 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 inespecífica da como resultado una función proteínica alterada. Por ejemplo los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con unión de poli(óxido de etileno) al azar mediante restos de lisina dan como resultado anticuerpos modificados (o fragmentos de anticuerpo modificados) capaces de unirse al antígeno diana con afinidad, avidez o especificidad reducida. Además, los reactivos de conjugación de polímero específicos requieren condiciones de la reacción de conjugación que deben seleccionarse para asegurar que las aminas de la
40 proteína no están protonadas. Estas condiciones requieren un medio con un pH moderadamente alto (8-10), esto permite que los restos amina sean lo suficientemente reactivos como 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. Estos procesos dan como resultado la alteración de la función proteínica. Los reactivos de conjugación de polímero específicos de amina tienden a unirse a sitios accesibles de la amina en la proteína. Estos reactivos se pueden llamar reactivos cinéticos. Son lábiles y experimentan una reacción con la mayoría de los sitios nucleofílicos amino evaluables de la proteína. Los reactivos de conjugación de polímero
45 específicos de amina que se conjugan mediante acilación de amina dan como resultado la pérdida de carga positiva en el grupo amina del resto de aminoácido en la proteína que normalmente estaría presente en condiciones fisiológicas para la proteína no conjugada. Estos rasgos de los reactivos de conjugación de polímero específicos de amina frecuentemente conducen a una alteración parcial de la función de la proteína. Otros grupos funcionales de conjugación incorporados en los polímeros para la conjugación a proteínas y que son específicos de aminas y con frecuencia hidrolíticamente lábiles incluyen los isocianatos (documento WO 94/04193) y los carbonatos (documento
50 WO 90/13540).

Particularmente relevante para una eficacia optimizada y para asegurar la consistencia de dosis a dosis es 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
60 conjugación inespecífica en sitios a lo largo de una molécula de proteína da como 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 polímero específicos de tiol para proteínas con el fin abordar 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 de polímero específicos de tiol se pueden utilizar a valores de pH próximos a la neutralidad en los que los restos funcionales amina en los restos de aminoácidos de la proteína están protonados y por tanto no pueden competir eficazmente en la reacción de conjugación con el reactivo de conjugación de polímero. Los reactivos de conjugación de polímero específicos de tiol que son relativamente más estables hidrolíticamente que los reactivos específicos a amina mencionados anteriormente se pueden utilizar en un exceso estequiométrico menor de modo que se reducen los costes durante la purificación del conjugado polímero-proteína. Entre los restos funcionales de conjugación que son ampliamente selectivos para los grupos tiol se incluyen 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 de conjugación selectivos de tiol dan un único tioéter que conjuga el enlace entre el polímero.

La mayoría de las proteínas no tienen sulfhidrales libres porque estos sulfhidrales experimentan reacciones de reorganización y confusión con los puentes disulfuro dentro de la proteína, dando como resultado una función proteínica empeorada. Para las proteínas que sí tienen sulfhidrales libres, con frecuencia estos sulfhidrales son críticos para la función de la proteína. 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 en los grupos tiol y puesto que las proteínas típicamente no tienen grupos tiol libres, hay ejemplos de modificación específica del sitio de la proteína mediante mutagénesis para introducir sitios de tiol para la unión de PEG. No obstante, dichas modificaciones aumentan los costes significativamente. El sulfhidral libre introducido puede tener limitaciones similares a las mencionadas antes en la proteína diseñada por ingeniería para confusión y dimerización de la proteína. Asimismo el proceso de mutagénesis y la producción de la proteína modificada de fuentes bacterianas frecuentemente causa que el sulfhidral libre se una en un enlace disulfuro con glutatión, por ejemplo. La interleucina 2, por ejemplo, se ha modificado mediante 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 de 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 del polímero sobre la actividad y la estabilidad de la proteína es de vital importancia para el comportamiento. Las variables de conjugación relacionadas con la localización y la cantidad de conjugación y las características del polímero se deben correlacionar óptimamente con las propiedades biológicas y fisicoquímicas.

La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula general I como se define en la reivindicación 1.

Un polímero X o X' puede por ejemplo ser un polialquilenglicol, una polivinilpirrolidona, un poliácilato, por ejemplo poliácilolmorfolina, una polioxazolina, un polivinilalcohol, una poliácilamida o polimetacrilamida, por ejemplo policarboximetacrilamida, un copolímero HPMA. Adicionalmente, X o X' puede ser un polímero que es susceptible de degradación enzimática o hidrolítica, incluyendo poliésteres, poliacetales, poli(ortoésteres), policarbonatos y poli(iminocarbonatos). Un polímero X o X' puede ser un homopolímero, copolímero aleatorio o un copolímero estructuralmente definido tal como un copolímero en bloque. Por ejemplo X o X' puede ser un copolímero en bloque derivado de dos o más óxidos de alquileo, o de poli(óxido de alquileo) y bien un poliéster, poliactal, poli(ortoéster). Polímeros polifuncionales que se pueden usar incluyen copolímeros de éter divinílico-anhídrido maleico y estireno-anhídrido maleico. Se pueden usar también los polímeros que se dan en la naturaleza, por ejemplo polisacáridos tales como quitina, dextrano, dextrina, quitosano, almidón, celulosa, glucógeno, poli(ácido siálico) y derivados de los mismos. Se pueden usar también polímeros tales como ácido poliglutámico, como también se pueden usar polímeros híbridos derivados de monómeros naturales tales como sacáridos o aminoácidos y monómeros sintéticos tales como óxido de etileno o ácido metacrílico.

Si el polímero es un polialquilenglicol, éste es preferentemente uno que contiene unidades de C₂ y/o de C₃ y es especialmente un polietilenglicol. Un polímero, en particular un polialquilenglicol, puede contener una única cadena lineal, o puede tener una morfología ramificada compuesta por muchas cadenas pequeñas o grandes. Los así llamados Plurónicos son una clase importante de copolímeros en bloque de PEG. Éstos se derivan de bloques de óxido de etileno y de bloques de óxido de propileno. Se pueden usar polialquilenglicoles sustituidos, por ejemplo metoxipolietilenglicol. En una realización preferida de la invención, se inicia un polietilenglicol de cadena lineal mediante un grupo adecuado, por ejemplo, un grupo alcoxi, por ejemplo un grupo metoxi, ariloxi, carboxi o hidroxilo y se conecta en el otro extremo de la cadena al grupo enlazador Q.

El polímero X o X' opcionalmente se puede derivatizar o funcionalizar de cualquier manera que se desee. Por ejemplo, los polímeros con dos o más restos químicos para conjugación que son el objeto de la presente invención

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 enlazadores pendientes; en tal caso, el polímero es por ejemplo una poli(acrilamida), una polimetacrilamida, un poli(acrilato), un polimetacrilato, o un copolímero de anhídrido maleico. Los conjugados multímeros que contienen más de una molécula biológica, típicamente un polipéptido o fármaco biológicamente activo pueden dar como resultado beneficios sinérgicos y aditivos. Si se desea, el polímero se puede acoplar a un soporte sólido usando procedimientos convencionales.

El peso molecular óptimo del polímero dependerá obviamente de la aplicación prevista. Preferentemente, el peso molecular promedio en número 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 su uso en el tratamiento de una inflamación causada por una neoplasia maligna, infección o enfermedad autoinmune, o por traumatismo, 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.

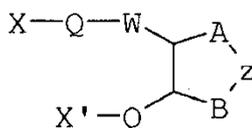
El polímero que se va a usar se debe seleccionar de modo que el conjugado sea soluble en el medio disolvente para su uso previsto. Para aplicaciones biológicas, en particular para aplicaciones de diagnóstico y aplicaciones terapéuticas para administración terapéutica clínica a un mamífero, el conjugado será soluble en medios acuosos. Muchas proteínas tales como las enzimas tienen utilidad en la industria, por ejemplo para catalizar reacciones químicas. Para los conjugados destinados para uso en tales aplicaciones, puede ser necesario que el conjugado sea soluble en uno o ambos de medios acuosos y orgánicos. El polímero no debe alterar la función prevista de la(s) molécula(s) biológica(s).

Un grupo enlazador Q puede ser por ejemplo un enlace directo, un grupo alquileo (preferentemente 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-. Los grupos arilo adecuados incluyen grupos fenilo y naftilo, mientras que los grupos heteroarilo adecuados incluyen 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 por un enlace no lábil.

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

W representa un grupo ceto CO, un grupo éster -O-CO-, o un grupo sulfona -SO₂-, 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.

En la siguiente parte de esta especificación, Z¹ y Z² se denominarán colectivamente Z. Es una realización preferida de la invención que Z¹ y Z² juntos deban representar una única molécula biológica:



Z puede derivarse de cualquier molécula biológica deseada, por ejemplo una proteína. La proteína puede ser por ejemplo un polipéptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una enzima, una citocina, una quimiocina o un receptor. También se pueden usar polipéptidos constreñidos o cíclicos, que usualmente se ciclan a través de un puente disulfuro y epítopos. Más adelante se proporciona una lista de ejemplos específicos de moléculas biológicas adecuadas.

Los grupos amina que unen A o B al/a los grupo(s) Z pueden ser por ejemplo residuos de lisina.

La invención también proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula general I, según se define en la reivindicación 6.

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 grupo fenilo, 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 anteriormente.

La Patente Europea EP 1648518, del solicitante, a partir de la cual se divide la presente solicitud, contiene la siguiente divulgación.

"Se puede preparar un compuesto de la fórmula general (IV) en el que cada Nu es un grupo tiol por reducción parcial de una proteína que contiene un enlace cisteína, es decir



(V)

Adecuadamente, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo reduciendo parcialmente un puente disulfuro derivado de dos aminoácidos de cisteína en la proteína in situ tras lo que el producto reducido reacciona con el compuesto de fórmula (II) o (III). Los disulfuros se pueden reducir, por ejemplo, con ditioneol, mercaptoetanol, o tris-carboxietilfosfina usando procedimientos convencionales. El procedimiento se puede llevar a cabo en un disolvente o mezcla de disolventes en el/la que todos los reactivos son solubles. La molécula biológica que contiene grupos nucleofílicos (por ejemplo proteína) se puede dejar reaccionar directamente con el compuesto de la fórmula general II o III en un medio de reacción acuoso. Este medio de reacción puede también tamponarse, dependiendo de los requerimientos de pH del nucleófilo. El pH óptimo para la reacción está generalmente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8, por ejemplo aproximadamente 7,4, preferentemente aproximadamente 6,0-6,5. Las temperaturas de reacción entre 3-37 °C son generalmente adecuadas: proteínas y otras moléculas biológicas pueden descomponerse o desnaturizarse alterando su función si la reacción de conjugación se efectúa a una temperatura donde estos procesos puedan ocurrir. Las reacciones efectuadas en medios inorgánicos (por ejemplo, THF, acetato de etilo, acetona) se efectúan típicamente a temperaturas hasta la temperatura ambiente, por ejemplo temperaturas por debajo de 0 °C.

Una proteína puede contener uno o una multiplicidad de puentes disulfuro. La reducción para dar restos sulfhidral libres se puede efectuar una de una multiplicidad de moléculas poliméricas para reducir uno de una multiplicidad de puentes disulfuro en una proteína. Dependiendo del grado de reducción de disulfuros y de la estequiometría del reactivo de conjugación polimérica que se use, es posible conjugar una de una multiplicidad de moléculas poliméricas a la proteína. Los agentes reductores inmovilizados se pueden usar si se desea para reducir menos que el número total de disulfuros, así como reducción usando diferentes condiciones de reacción o la adición de desnaturizantes".

La molécula biológica se puede conjugar de forma efectiva con reactivos anteriores 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 de la presente invención no experimentan reacciones competitivas con medios acuosos utilizados para solvatar proteínas, es posible efectuar la reacción de conjugación con un exceso estequiométrico de reactivo. El reactivo en exceso puede eliminarse fácilmente mediante cromatografía de intercambio iónico durante la purificación rutinaria de proteínas.

Los compuestos de fórmulas (II) y (III) son novedosos y son el objeto del documento de los autores de la presente invención EP 1648518. Estos reactivos novedosos proporcionan un avance en la tecnología de conjugados, comprendiendo el resto funcional químico en el polímero que comprende un resto bis-alkilante de funcionalidad cruzada, conjugado de forma cruzada implícitamente que es selectivo para dos nucleófilos.

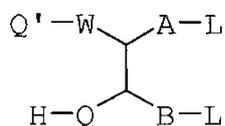
El producto inmediato del procedimiento de acuerdo con la invención es un compuesto de la fórmula general I en la que W es un grupo aceptor de electrones. Dichos compuestos tienen utilidad en sí mismos; porque el proceso de la invención es reversible en condiciones adecuadas, además, los compuestos de fórmula (I) en la que W es un resto aceptor de electrones tienen utilidad en aplicaciones en las que se requiere la liberación de la proteína libre, por ejemplo en aplicaciones clínicas directas. No obstante, un resto aceptor de electrones W puede reducirse para dar un resto que impide la liberación de la proteína y tales compuestos también tendrán utilidad en muchas aplicaciones clínicas, industriales y de diagnóstico.

Por tanto, por ejemplo, un resto W que contiene un grupo ceto puede reducirse a un resto W que contiene un grupo $CH(OH)$; se puede obtener un grupo éter $CH.OR$ mediante reacción de un grupo hidroxilo con un agente de eterificación; se puede obtener un grupo éster $CH.O.C(O)R$ mediante reacción de un grupo hidroxilo con un agente acetilante; se puede preparar un grupo amina $CH.NH_2$, $CH.NHR$ o $CH.NR_2$ a partir de una cetona o aldehído (por

aminación reductora); o se puede formar una amida CH.NHC(O)R o CH.N(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.

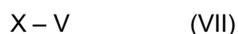
Un compuesto de fórmula general (II) en la que X representa un polímero se puede preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula general

5



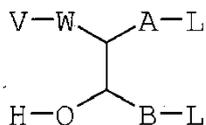
(VI)

en la que Q, W, A, B y L tienen los significados indicados en lo que antecede, con un polímero de fórmula general



10

en la que X representa un polímero; siendo Q' y V grupos seleccionados de manera tal que los compuestos de fórmula (VI) y (VII) reaccionen juntos para dar el compuesto deseado de fórmula (II). Como alternativa, un compuesto de fórmula



(VIII)

15

se puede hacer reaccionar con un polímero de fórmula general

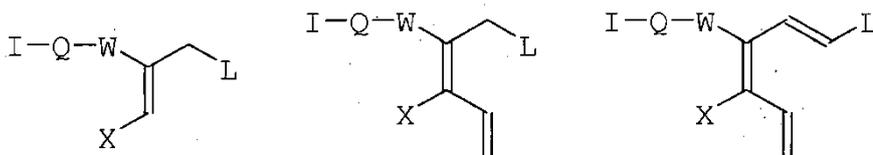


20

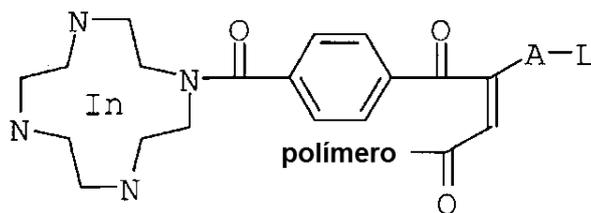
Se puede preparar un compuesto de la fórmula general (III) mediante eliminación mediada por una base de un grupo saliente L de un compuesto de la fórmula general (II).

Los compuestos de la fórmula general I pueden incluir un agente de obtención de imágenes, por ejemplo, un radionucleótido, para poder rastrear el compuesto *in vivo*. Adecuadamente el radionucleótido o el agente de obtención de imágenes I se pueden unir a través del grupo W, como en reactivos del tipo

25



por ejemplo



Los compuestos de fórmula general I tienen varias aplicaciones. Se pueden usar, por ejemplo, para aplicación clínica directa a un paciente y de acuerdo con ello, la presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general I junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona además un compuesto de fórmula general I para su uso como un medicamento y un procedimiento de tratamiento de un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Eligiendo adecuadamente la molécula biológica se puede obtener cualquier efecto farmacéutico deseado, por ejemplo tratamiento de un traumatismo, reemplazo de enzimas, eliminación de toxinas, antiinflamatorio, antiinfeccioso, inmunomodulador, vacunación o anticanceroso.

Los compuestos de 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. Adicionalmente se pueden usar compuestos de fórmula general I como herramientas diagnósticas.

A continuación se dan algunas moléculas biológicas específicas que pueden tener utilidad en la presente invención dependiendo de la aplicación deseada. Las enzimas incluyen enzimas específicas de carbohidratos, enzimas proteolíticas y similares. Las enzimas de interés, tanto para aplicaciones industriales (reacciones orgánicas) y biológicas en general como para aplicaciones terapéuticas en particular incluyen las oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas divulgadas en el documento US 4.179.337. Las enzimas específicas de interés incluyen asparaginasa, arginasa, adenosina desaminasa, superóxido dismutasa, catalasa, quimotripsina, lipasa, uricasa, bilirrubina oxidasa, glucosa oxidasa, glucuronidasa, galactosidasa, glucocerebrosidasa, glucuronidasa, glutaminasa.

Las moléculas biológicamente activas usadas en compuestos de fórmula general I de la presente invención incluyen, por ejemplo factor 8, insulina, ACTH, glucagén, somatostatina, somatotropinas, timosina, hormona paratiroidea, hormonas pigmentarias, somatomedinas, eritropoyetina, hormona luteinizante, factores de liberación hipotalámica, hormonas antidiuréticas, prolactina, interleucinas, interferones, factores estimulantes de colonias, hemoglobina, citocinas, anticuerpos, gonadotropina coriónica, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante del tiroides y activador de plasminógeno tisular.

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

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

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 alquileo) y en consecuencia son adecuadas para su uso como inductores de tolerancia. Entre los alérgenos divulgados se encuentran el antígeno de ambrosía E, el veneno de abeja melífera, el alérgeno del ácaro y similares.

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

Son de interés particular los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se usan en medicina clínica con fines diagnósticos y terapéuticos. El anticuerpo se puede usar solo o se puede estar conjugado covalentemente ("cargado") 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 se realiza conjugación cruzada entre un grupo saliente de α -metileno y un doble enlace con una función aceptora de electrones que actúa como un resto activador de Michael. Si el grupo saliente es propenso a la eliminación en el reactivo de funcionalidad cruzada en lugar que a dirigir el

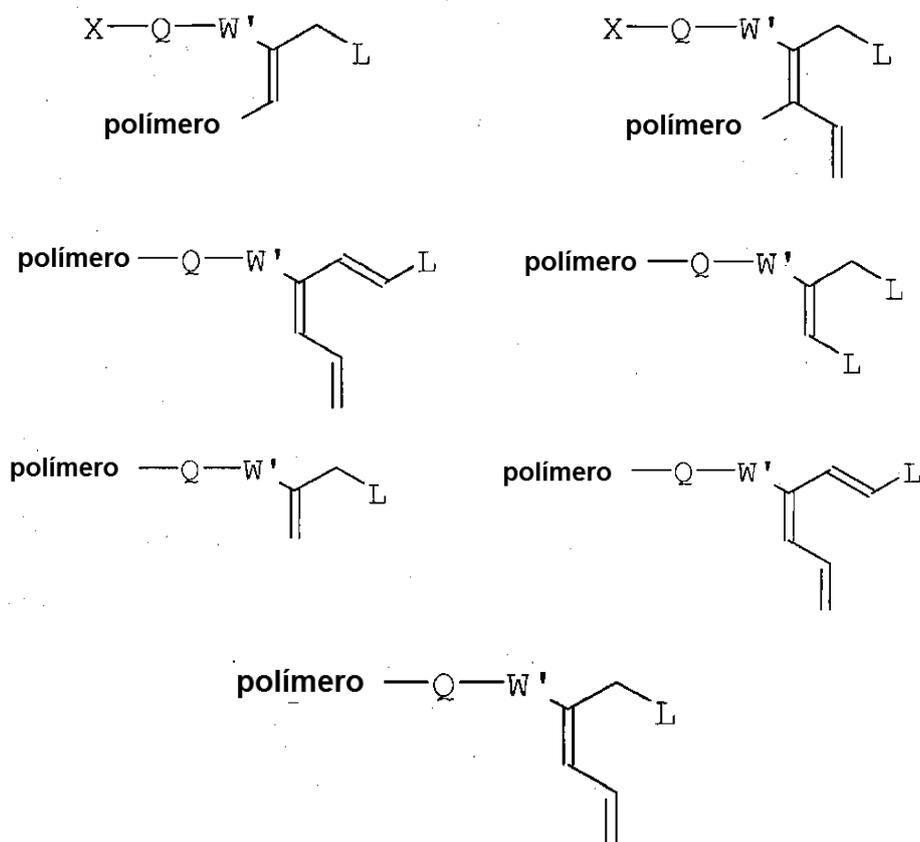
desplazamiento y el grupo aceptor de electrones es un resto activador adecuado para la reacción de Michael entonces la bisalquilación intramolecular secuencial se puede producir mediante reacciones consecutivas de Michael y de retro-Michael. El resto saliente sirve para enmascarar un doble enlace conjugado latente que no esté expuesto hasta después de que se ha producido la primera alquilación y se produce bis-alquilación por las reacciones

5 secuenciales e interactivas de Michael y de retro-Michael como se describe en J. Am. Chem. Soc. 1979, 101, 3098 – 3110 y en J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5211 – 5212). El grupo aceptor de electrones y el grupo saliente se seleccionan óptimamente de forma que se pueda producir bisalquilación mediante reacciones de Michael y de retro-Michael secuenciales.

10 También es posible preparar agentes de alquilación de funcionalidad cruzada con múltiples enlaces adicionales conjugados con el 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.

Se apreciará que la presente invención permite la producción de reactivos poliméricos que poseen funcionalidad de bisalquilación funcionalizada cruzada en cualquiera de los extremos o cadenas pendientes a lo largo de la cadena principal de un polímero.

15 Algunos ejemplos de reactivos novedosos objeto del documento EP 1648518 incluyen los siguientes:



20 Los Ejemplos siguientes ilustran la invención reivindicada en la patente principal EP 1.648.518B1 y están incluidos aquí para propósitos informativos solamente. Las Figuras 1 a 5 muestran los resultados obtenidos del Ejemplo 7.

Ejemplo 1

25 **Síntesis de un reactivo de conjugación de polímero. Clorhidrato de *p*-nitro-3-piperidinpropiofenona: $C_{14}H_{19}ClN_2O_3$**

Un matraz de fondo redondo de una sola boca de 250 ml, se añadió *p*-nitroacetofenona (16,5 g), paraformaldehído (4,5 g), clorhidrato de piperidina (12,1 g), etanol absoluto (100 ml) y una barra de agitación magnética. A la mezcla heterogénea agitada se añadió ácido clorhídrico (al 37 % en agua, 1 ml) y la solución se calentó a reflujo en 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 horas, tiempo durante el cual se añadió más paraformaldehído (3,0 g). Después

de dejar que la solución de reacción se enfriara sedimentó un sólido cristalino que no se disolvería con reflujo adicional. Se aisló el sólido mediante filtración y se recrystalizó usando metanol muy caliente obteniéndose cristales amarillos grandes (10,9 g). RMN de ^1H (DMSO- d_6) 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 (c, 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-hidroxietiltiliol)-*p*-nitropropiofenona:

Una solución agitada de clorhidrato de *p*-nitro-3-piperidinpropiofenona (30 g, 0,1 mol) y mercaptoetanol (9,5 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 hasta reflujo durante 2 horas. Después de enfriar la mayoría del disolvente se sometió a evaporación rotatoria y se añadió acetato de etilo (200 ml) y se separó el sólido mediante filtración. La solución de acetato de etilo se extrajo secuencialmente con solución acuosa al 10 % de HCl, NaHCO_3 al 5 % y salmuera y después se secó sobre Na_2SO_4 y a continuación el acetato de etilo se evaporó hasta un aceite que cristalizó, para dar 23,2 g del producto deseado que recrystalizó en acetato de etilo-éter etílico.

2,2-bis(*p*-toliltiliolmetil)-*p*-nitroacetofenona: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{S}_2$

A un matraz de fondo redondo de una boca de 100 ml se añadió clorhidrato de *p*-nitro-3-piperidinpropiofenona (10,0 g), 4-metilbencenotiol (8,2 g), formaldehído (solución acuosa al 37 % en p/p, 10 ml, en exceso), metanol (40 ml) y una barra de agitación magnética. La mezcla heterogénea agitada se calentó hasta que se formó una solución homogénea de color amarillo (un par de minutos a 50-60 °C). Después se añadieron 5 gotas de piperidina y la solución de reacción se calentó a reflujo. En 15 minutos la reacción se hizo heterogénea debido a la presencia de algún sólido de color blanco/amarillo y después de 2 horas este sólido llegaba a tener un color naranja fuerte. Al cabo de este tiempo se paró el reflujo y se dejó que la reacción se enfriara durante la noche a temperatura ambiente. Después la mezcla de reacción se calentó de nuevo a reflujo con formaldehído adicional (solución acuosa al 37 % en p/p, 10 ml, en exceso). Después de someter a reflujo durante aproximadamente 30 minutos se podía ver un aceite de color naranja y ningún sólido. Al parar la agitación el aceite sedimentaría en el fondo del matraz. Después de otras 7 horas de reflujo, se dejó que la mezcla se enfriara durante la noche, lo que dio como resultado la cristalización del aceite sedimentado. Se aisló el sólido cristalino y se purificó mediante recrystalización en metanol muy caliente con varias gotas de acetona añadidas para dar cristales amarillos (10,0 g). RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 2,31 (s, 6H), 3,31 – 3,33 (m, 4H), 3,97 (quintete, 1H), 7,14 (c, 8H), 7,80 (d, 2H), 8,24 (d, 2H).

2,2-bis(*p*-tolilsulfonilmetil)-*p*-nitroacetofenona: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{S}_2$

En un matraz de fondo redondo de 250 ml se agitó una suspensión de 2,2-bis(*p*-toliltiliolmetil)-*p*-nitroacetofenona (2,5 g) y oxona (18,4 g) en metanol:agua a 1:1 (100 ml) durante 16 horas. 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 para dejar 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 después se lavó de nuevo con cloroformo (100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con salmuera (50 ml x 2), se secaron con sulfato magnésico y se eliminó el disolvente obteniéndose un producto sólido en bruto blanquecino después de secar al vacío (2,5 g). El producto se recrystalizó en acetona obteniéndose cristales blancos. RMN de ^1H (CDCl_3) 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 $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{S}_2$ (hallado): C, 57,47 (57,27); H, 4,62 (4,74); N 2,79 (2,58); EM (FAB) m/z 502 ($[\text{M}+1]^+$).

2-(2-hidroxietilsulfonilmetil)-*p*-nitro-2(Z), 4-penta-dienofenona:

A un matraz de fondo redondo secado a la llama, purgado con argón y preparado con un termómetro y embudo de adición se añadió 3-(2-hidroxietiltiliol)-*p*-nitropropiofenona (0,5 g, 2,0 mmol) y tetrahidrofurano anhidro (50,0 ml). La solución se agitó y se enfrió en baño de hielo seco-acetona, después se añadió TiCl_4 (0,23 ml, 2,1 mmol) con jeringa. Se retiró el baño de hielo y se dejó que la solución se calentara hasta la temperatura ambiente, después la solución se enfrió a -40 °C y se añadió diisopropiletilamina (1,1 ml) con jeringa. El baño de enfriamiento se retiró y se dejó que la mezcla de reacción se calentara a entre -15 °C y 0 °C adquiriendo un color rojo. Después la mezcla de reacción se calentó a 25 °C en un tiempo de 3-5 minutos y se añadió una solución de acroleína (0,14 g, 2,1 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (20 ml) mediante un embudo de adición en un periodo de 30-40 minutos. La reacción exotérmica hizo que la temperatura de la mezcla de reacción aumentara a 30-40 °C y la solución se agitó durante 20 minutos adicionales tras 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-hidroxietiltiliol)-*p*-nitropropiofenona de partida y la formación de la 2-(2-hidroxietiltiliometil)-*p*-nitro-2(Z), 4-penta-dienofenona deseada ($R_f \sim 0,38-0,45$). El producto minoritario (isómero E) se pudo observar a R_f menor, en el intervalo de 0,29-0,34. La mezcla de reacción en acetato de etilo se extrajo con HCl acuoso al 10 % y salmuera. Las capas acuosas se combinaron y se extrajeron dos veces con acetato de etilo y todas las fracciones de acetato de etilo se combinaron y se lavaron dos veces con HCl acuoso al 10 %, NaHCO_3 acuoso al 5 % y salmuera, después se secaron sobre Na_2SO_4 sólido. El acetato de etilo se sometió a evaporación rotatoria para dar la 2-(2-hidroxietiltiliometil)-*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 dando 2-(2-hidroxietilsulfonilmetil)-*p*-nitro-2(Z), 4-pentadienofenona como un sólido que se purificó mediante cromatografía en

columna o se recrystalizó en acetato de etilo o metanol y después se unió covalentemente a polietilenglicol terminado en amino como se ha descrito en otro lugar en la presente memoria.

La secuencia de reacciones anterior se realizó con muchos aldehídos, entre los que se incluyen 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 derivatizados de arilceto incluidos 3-(p-toliltiometil)-*m*-nitroacetofenona, 3-(2-hidroxi-etiltio)-*m*-nitropropiofenona, 3-(etiltiometil)-*m*-nitropropiofenona, 3-(dimetilaminoetiltio)-*m*-nitropropiofenona, 3-(2-hidroxi-etiltio)-3-fenilpropiofenona, 3(2-hidroxi-etiltio)-5-fenil-4(E)-penteno-fenona, 3(etiltiometil)-*o*-nitropropiofenona, 3-(etiltio)-propiofenona, 3-(2-hidroxi-etilsulfonil)propiofenona, 2-(3-(2-hidroxi-etiltio)-1-propenil)-*m*-2(E)-4-pentadieno-fenona. Esta secuencia de reacciones se efectuó también con derivados ceto alifáticos incluidos 4-(etiltio)-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 anteriormente mencionadas para estos precursores se pueden unir covalentemente a polietilenglicol como se ha descrito en otro lugar en esta memoria.

15 **Clorhidrato de 2,2-Bis[(p-tolilsulfonil)metil]p-aminoacetofenona C₂₄H₂₆ClNO₅S₂**

A un matraz de fondo redondo de 100 ml se añadió 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. Después a la mezcla heterogénea resultante se añadió cloruro de estaño (II) dihidrato y la mezcla se calentó a 45 °C en baño de aceite durante 2 horas. A continuación a la solución homogénea amarilla que se había formado se añadió agua hasta que se observó que podía haber precipitación si se añadía más agua. Se dejó enfriar la solución homogénea a temperatura ambiente lo que tuvo como resultado un compuesto amarillo que precipitó aparte/cristalizó, que se aisló mediante filtración al vacío. Después el producto aislado se mezcló luego con una mezcla caliente de acetona y metanol (aproximadamente 90:10 v/v). Mediante filtración al vacío se aisló un sólido insoluble y se secó hasta una masa constante en un horno de vacío (1,4 g). RMN de ¹H (DMSO-*d*₆) δ 2,50 (s, 6H), 3,57 – 3,73 (m solapantes, 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)metil]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), clorhidrato de 2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]p-aminoacetofenona (125 mg), tolueno anhidro (2,5 ml) y una barra de agitación magnética en atmósfera de nitrógeno. El embudo de adición se cargó por separado con trietilamina anhidra (68 μl) y tolueno anhidro (2,5 ml). Se colocó un baño de acetona/hielo seco debajo del matraz de fondo redondo y se dejó que se enfriara el contenido. Después se añadió gota a gota la solución de trietilamina a la solución de trifosgeno agitando durante 5-10 minutos. Se dejó que el matraz y el baño de hielo seco se calentaran hasta la temperatura ambiente lo que tardó varias horas y una vez que estaban a temperatura ambiente la mezcla de reacción se dejó en agitación durante aproximadamente 2 horas, aún en atmósfera de nitrógeno. A continuación, a la mezcla de reacción a temperatura ambiente se añadió gota a gota 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 (aproximadamente 20 horas en total). Después 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 después se lavó dos veces con agua desionizada (30 ml y después 10 ml). Se combinaron las fases acuosas y después se lavaron con éter dietílico (aproximadamente 25 ml). A continuación la fase acuosa se liofilizó obteniéndose un producto sólido blanquecino (160 mg). Se encontró producto también en las fases de éter dietílico y tolueno. RMN de ¹H (CDCl₃) δ 2,5 (s), 3,39 (s), 3,41 – 3,53 (m solapantes), 3,53 – 3,76 (m), 3,82 (t), 4,17 (quintete), 7,35 – 7,39 (m, 1,39), 7,46 (d), 7,68 (d).

45 **Ejemplo 2**

Síntesis de reactivo de conjugación de polímero

Clorhidrato de p-carboxi-3-piperidinpropiofenona

A un matraz de fondo redondo de una sola boca de 250 ml se añadió ácido p-acetilbenzoico (10 g) y clorhidrato de piperidina (7,4 g), 100 ml de etanol absoluto y una barra de agitación magnética. A la mezcla heterogénea agitada se añadió ácido clorhídrico concentrado (1 ml) y a continuación la solución se calentó a reflujo en 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). La solución de reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se dejó durante una semana. Mediante filtración de la mezcla de reacción enfriada se aisló un sólido blanco. Se intentó cristalizar el sólido después de disolverlo en metanol muy caliente. Mediante filtración se aisló un producto insoluble (1,96 g) y en el filtrado cristalizó un segundo producto (0,88 g). Ambos productos aparecían idénticos mediante análisis de espectroscopia de infrarrojos y cromatografía en capa fina después de secar al vacío por lo que se combinaron para usarlos en posteriores reacciones. ATR-FT-IR

1704, 1691, 1235, 760.

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

A un matraz de fondo redondo de una boca de 50 ml se añadió clorhidrato de *p*-carboxi-3-piperidinpropiofenona (2,5 g), 4-metilbencenotiol (2,1 g), formaldehído (solución acuosa al 37 % en p/p, solución, 2,5 ml), etanol (10 ml) y una barra de agitación magnética y piperidina (aproximadamente 10 gotas). Después se acopló al matraz un condensador y la solución de reacción se calentó a reflujo. Después se añadió metanol (5 ml). Después de aproximadamente 2 horas, se añadió más formaldehído (2,5 ml) y se continuó calentando durante otras 2 horas. Después se dejó enfriar el matraz de reacción hasta la temperatura ambiente tras lo que se diluyó la solución de reacción con éter dietílico (aproximadamente 150 ml). La fase orgánica resultante se lavó después con agua (acidificada con ácido clorhídrico 1 N a pH 2-3, 50 ml x 2), agua (50 ml) y salmuera (75 ml) y después 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 con calentamiento. La solución homogénea se introdujo después en un congelador durante la noche, obteniéndose cristales blanquecinos, que se aislaron mediante filtración al vacío, se lavaron con acetona fresca y después se secaron hasta masa constante en horno de vacío (2,5 g): RMN de 1H ($CDCl_3$) 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 $C_{25}H_{24}O_3S_2$ (hallado): C, 68,78 (68,84); H, 5,54 (5,77).

Ácido 4-12,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico $C_{25}H_{24}O_7S_2$

En un matraz de fondo redondo de 250 ml se agitó una suspensión de 4-[2,2-bis[(p-tolilitio)metil]acetil]benzoico (2 g) y oxona (16,9 g) en metanol:agua 1:1 v/v (100 ml) durante 16 horas. Esto dio como resultado 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 para dar una suspensión de un sólido blanco con la fase acuosa. A la fase acuosa heterogénea se añadió más agua hasta homogeneidad (aproximadamente 170 ml) y después la fase acuosa se lavó con cloroformo (75 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron 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 para dar un producto sólido blanquecino en bruto (2,2 g). La purificación adicional (en 1 g de producto) se realizó mediante recristalización en acetato de etilo muy caliente, acetona y hexano obteniéndose 0,6 g de producto. RMN de 1H ($CDCl_3$) δ 2,51 (s, 6H), 3,49 – 3,72 (m, 4H), 4,44 (quintete, 1H), 7,40 (d, 4H), 7,73 – 7,78 (m, 6H), 8,13 (d, 2H); análisis calculado para $C_{25}H_{24}O_7S_2$ (hallado): C, 59,98 (59,88); H, 4,83 (4,78).

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

Un matraz Schlenk 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 minutos. Se introdujo en el matraz atmósfera de argón y se añadió con jeringa cloruro de tionilo (1 ml) en agitación. La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 2 horas. Después se eliminaron al vacío los líquidos volátiles obteniéndose una espuma amarilla. Se introdujo de nuevo una atmósfera de argón en el matraz y se añadió diclorometano anhidro (5 ml) con jeringa obteniéndose una solución homogénea. De nuevo se eliminaron al vacío los líquidos volátiles. Se repitió el proceso de adición/eliminación de disolvente hasta que quedó un residuo blanco. Al matraz Schlenk se añadió de nuevo 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 μ l) en diclorometano anhidro (5 ml) en atmósfera de argón. La solución de reacción con ácido bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico se inyectó 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 tras lo que se añadió más trietilamina (28 μ l). Tras 1 hora adicional, la solución de reacción se añadió gota a gota mediante una pipeta de vidrio a éter dietílico sometido a una rápida agitación. Para conseguir la precipitación fue necesario añadir hexano a la solución de éter dietílico y poner el matraz en un baño de hielo. El precipitado obtenido se aisló por centrifugación y se secó en horno de vacío hasta peso constante, obteniéndose un producto sólido blanquecino (230 mg). Se logró una pureza mayor mediante precipitación disolviendo primero el producto en diclorometano y añadiéndolo a una solución de éter dietílico enfriada. RMN de 1H ($CDCl_3$) δ 2,51 (s), 3,40 (s), 3,60 – 3,75 (m), 3,84 (t), 4,36 (quintete), 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 Schlenk 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 minutos. Se introdujo en el matraz una atmósfera de argón y se añadió con jeringa cloruro de tionilo (1 ml) en agitación. La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 2 horas. Después de dejar enfriar el matraz hasta la temperatura ambiente, se eliminaron los líquidos volátiles al vacío, obteniéndose una espuma amarilla. Se introdujo de nuevo atmósfera de argón en el matraz y se añadió diclorometano anhidro (5 ml) con jeringa obteniéndose una solución homogénea. De nuevo se eliminaron al vacío los líquidos volátiles. Se repitió el proceso de

adición/eliminación de disolvente hasta que quedó un residuo blanco. Por último, al matraz se añadió diclorometano anhidro (5 ml) para formar una solución homogénea.

5 En un matraz Schlenk 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 una atmósfera de argón y después la solución se evaporó a sequedad al vacío. El residuo blanco obtenido se mantuvo al vacío durante 3 horas y después se disolvió en diclorometano anhidro (5 ml) en una atmósfera de argón.

10 La solución de reacción de ácido bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico se añadió lentamente gota a gota a la solución de poli(etilenglicol), que estaba en agitación y enfriada en baño de hielo. Después de la adición completa se añadieron gota a gota a la solución resultante 40 µl de trietilamina secada. Una vez añadida la trietilamina se dejó la solución resultante en agitación durante la noche y que se calentara hasta la temperatura ambiente.

15 La solución de reacción se filtró después a través de un filtro de 0,45 µm 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 colocó en un baño de hielo-agua y con agitación tuvo lugar una precipitación. El precipitado blanco se aisló en un embudo de vidrio sinterizado n.º 3 y se lavó con acetona fresca enfriada (aproximadamente 30 ml). El sólido aislado se dejó secar al vacío, obteniéndose 0,4 g de sólido blanco. RMN de ¹H (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).

20 El reactivo de conjugación α-metoxi-ω-4-[2, 2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]-benzamida polietilenglicol (20.000 g/mol) (0,4 g) se disolvió en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo-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 µm. El eluyente se colocó en argón en un matraz de fondo redondo y se añadió trietilamina (50 µl) en agitación. El matraz se colocó después en un baño de aceite a 30 °C durante 20 horas en agitación y al cabo de este tiempo el matraz se enfrió hasta la temperatura ambiente y los líquidos volátiles se eliminaron al vacío. El residuo obtenido se disolvió en acetona caliente (10 ml) y una vez que la solución se hizo homogénea se colocó en un baño de hielo-agua tras lo que se produjo precipitación con la solución en agitación. El precipitado blanco se aisló en un embudo de vidrio sinterizado n.º 3 y se lavó con acetona recién preparada enfriada (aproximadamente 30 ml). El sólido aislado se dejó secar al vacío obteniéndose 0,3 g de sólido blanco. RMN de ¹H (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

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

35 El reactivo de conjugación de polímero, α-metoxi-ω-4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]-benzamida poli(etilenglicol) (2.000 g/mol) (30 mg, 12,1 µmol, 1 eq.) y 4-metilbencenotiol (3 mg, 24,2 mmol, 2 eq.) se disolvieron en cloroformo deuterado (aproximadamente 0,75 ml). Después, a la solución homogénea se añadió trietilamina (1,7 µl, 12,1 µmol, 1 eq.). Se agitó la mezcla de reacción y se obtuvo un espectro de RMN H. El espectro obtenido confirmó que había tenido la adición de 4-metilbencenotiol al reactivo de conjugación del polímero. Se realizó una reacción similar con propanotriol.

Ejemplo 4

Conjugación de polímero a ribonucleasa A

40 A un tubo de centrifuga de 15 ml que contenía ribonucleasa A (30 mg) se añadieron 3 ml de una solución acuosa 8 M de urea, seguidos por 2-mercaptoetanol (60 µl). El pH de la solución resultante se ajustó a 8,5 usando una solución acuosa de metilamina al 10 %. Después la solución de reacción se hizo burbujear con nitrógeno durante aproximadamente 30 minutos. Todavía purgando con nitrógeno se calentó el tubo a 37 °C durante 5 horas. A continuación la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo-agua salada y a la solución de reacción se añadieron 10 ml de una solución enfriada, purgada con argón de HCl 1 N:etanol absoluto (1:39 v/v). Se produjo una precipitación y el precipitado se aisló mediante centrifugación y después se lavó tres veces con más porciones de 10 ml de la mezcla de HCl:etanol absoluto y dos veces con éter dietílico enfriado purgado con nitrógeno (2 x 10 ml). Después de cada lavado el precipitado se aisló mediante centrifugación. El precipitado lavado se disolvió después 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.

55 En un tubo eppendorf, la ribonucleasa A parcialmente reducida (10,9 mg) se disolvió en solución de amoniaco a pH 8 (500 µl) purgada con argón. En un tubo eppendorf separado, el reactivo de conjugación a polímero, α-metoxi-ω-4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzamida derivada de poli(etilenglicol) (2000 g/mol) (5 mg) se disolvió también en solución de amoniaco (250 µl) y la solución resultante se añadió a la solución de ribonucleasa A. El tubo eppendorf con PEG se lavó con 250 µl de solución de amoniaco preparada recientemente y esta se añadió también al tubo eppendorf de reacción principal. Después se cerró en argón el tubo eppendorf de reacción principal y se calentó a 37 °C durante aproximadamente 24 horas y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después la solución de

reacción enfriada se analizó mediante electroforesis de gel de poli(acrilamida)-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El experimento de SDS-PAGE fue consistente con la reacción de ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil) metil]acetil]benzoico pegilado con ribonucleasa A.

Ejemplo 5

5 Conjugación de polímero al fragmento Fab de anticuerpo IgG de ratón

A 240 μ l de una solución de 0,4 mg/ml de fragmentos Fab de anticuerpo IgG de ratón (catálogo de Abcam n.º AB6668) en un tampón de pH 6 de fosfato sódico 0,02 M purgado con argón que contenía cloruro sódico 0,15 M y EDTA 0,005 M se añadieron 4 μ l de una solución acuosa purgada con argón de diclorhidrato de selenocisteína 1 mM, seguido de 12 μ l de una solución acuosa purgada con argón de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó en vórtex inmediatamente durante varios segundos y después se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 6 minutos. Dos muestras de 5 μ l de la solución que contenía fragmentos Fab reducidos se retiraron para análisis futuros y la solución restante se dejó en reposo en baño de hielo-agua durante 4 minutos. 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 pH 6 defosfato sódico 0,02 M purgado con argón que contenía cloruro sódico 0,15 M, EDTA 0,005 M e hidroquinona 0,23 mM); la solución se agitó en vórtex durante varios segundos y después se volvió a colocar en el baño de hielo-agua. Cada dos minutos se añadieron de manera análoga 1,6 μ l adicionales de la solución del reactivo de conjugación hasta añadirse 6,4 μ l en total. Después de la adición total la solución de reacción se colocó en una nevera (< 5 °C) durante 2 horas. Se tomó después una muestra de la solución de reacción para análisis mediante SDS PAGE.

La mezcla de reacción se analizó mediante 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 minutos a un caudal de 0,25 ml/min; detección por luz UV, 210 nm), presentando el conjugado de Fab-poli(etilenglicol), que no estaba presente en la mezcla de reacción de control idéntica. Las fracciones aisladas mediante SEC-cromatografía HPLC se analizaron mediante SDS-PAGE y se observó el conjugado de mono-poli(etilenglicol).

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 fosfato 20 mM (de pH 6 y que también contenía NaCl 0,15 M y EDTA 5 mM). Después se añadió DL-ditioreitol (DTT, 15,4 mg) y la solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente. Después de dejar en reposo durante 2 horas la solución se purificó en una columna PD-10 (Sephadex®G-25M, Pharmacia Biotech) que se había equilibrado con tampón fosfato 20 mM (de pH 6 y que también contenía NaCl 0,15 M y EDTA 5 mM). La columna se eluyó con porciones de 1 ml de tampón recién preparado. Usando espectroscopia 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 después se diluyeron a 1 ml con tampón fosfato fresco a pH 6 (que adicionalmente contenía hidroquinona 0,23 mM). Para análisis posterior mediante SDS PAGE se tomaron dos muestras de 5 μ l. Separadamente en el mismo tampón 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 poli(etilenglicol) (20.000 g/mol) y se puso en un baño de hielo-agua junto con la solución de proteína durante 5 minutos. A la solución de proteína se añadieron después 58 μ l de la solución del reactivo de conjugación y después de varios segundos de agitación en vórtex, la solución de reacción se colocó 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 mediante 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. Mediante SDS PAGE no se observó ninguna 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 equivalentes) y TCEP (1 mM en agua desionizada purgada con argón, 5 equivalentes). La solución de proteína se enfrió a 4 °C. El reactivo de conjugación α -metoxi- ω -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil) metil]acetil]benzamida derivado de polietilenglicol (20.000 g/mol) se disolvió en la solución tampón (50 mg/ml), se enfrió a 4 °C y se añadieron 16 μ l a la solución de proteína. La mezcla de reacción se agitó en vórtex y se incubó a 4 °C durante 2 horas. Los componentes no iónicos de la mezcla de reacción se eliminaron mediante 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), después con tampón (B) (5,0 ml) y después se equilibró con 10 ml de tampón A (10 ml). Se cargó el conjugado en la columna (200 µl) y seguidamente con el tampón (A) (500 µl) 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 después en fracciones separadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño (inyecciones de 100 µl, columna Superosa 12-24 ml, Amersham biosciences; eluyente: fosfato sódico 20 mM, NaCl, NaCl 0,15 M, pH 7,0; elución isocrática durante 100 minutos a un caudal de 0,25 ml/min; detección por UV, 210 nm). Estas condiciones de purificación proporcionaron una resolución de la línea de base para la separación del conjugado de poli(etilenglicol)-interferón de interferón nativo. La reacción de conjugación y la purificación del conjugado de poli(etilenglicol) se confirmaron mediante SDS-PAGE; gel bis-Tris al 12 % (tinción de plata SilverQuest; tinción con azul coloidal y ácido perclórico 0,1 M/BaCl₂ al 5 % 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 poli(etilenglicol) (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. Esta mezcla de reacción se agitó en vórtex y se incubó a 4 °C durante 2 horas.

La concentración de cada fracción purificada del conjugado de poli(etilenglicol)-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 patrón internacional NIBSC (RU) de interferón. En la Figura 1 se muestra la curva patrón reproducible y precisa obtenida para todas las formas del interferón antes mencionado. Se plaquearon células A549 (fibroblasto de pulmón humano) a 15.000 células/pocillo en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. A continuación el interferón de NIBSC (RU), el interferón nativo que estaba conjugado y el conjugado de interferón-poli(etilenglicol) se añadieron por separado a las células por triplicado y la placa se incubó a 37 °C (CO₂ al 5 %) durante 24 horas. Al día siguiente, se preparó una solución de trabajo de EMCV (virus de encefalomiocarditis) en DMEM/FCS al 2 % de virus madre almacenado a -80 °C. Se eliminaron los medios que contenían el interferón o el conjugado de polietilenglicol-interferón y se reemplazaron con medios que contenían EMCV. La placa de cultivo tisular se incubó después durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se eliminó el virus. Se añadieron 100 microlitros de medios DMEM/FCS al 10 % y la placa se incubó durante 16-24 horas a 27 °C. A partir de 16 horas en adelante, se empezó a leer la placa con regularidad para ver cuándo empezaba la muerte de las células. Después se aspiraron los medios y las células se lavaron con 100 µl de solución de tampón fosfato. A esto le siguió la adición de 50 µl de solución de violeta de metilo [esto es, violeta de metilo (formaldehído al 4 %, violeta de metilo 2B al 0,05 % (Sigma-Aldrich)] durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después 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 de patrón internacional NIBSC (RU). La Figura 3 confirma que el interferón nativo usado para la conjugación mantenía una actividad biológica equivalente después de someterse a todos los procesos químicos y de purificación excepto la exposición con el reactivo de conjugación de poli(etilenglicol). La Figura 4 confirma que el interferón nativo usado para la conjugación y el conjugado de poli(etilenglicol)-interferón purificado mantenían una actividad biológica equivalente.

Se determinó la inducción del ARNm de la 2'5'-oligoadenilato sintetasa (2'5'-OAS) y del ARNm de la proteína cinasa R (PRKR) por interferón-α 2b. Se evaluaron el conjugado poli(etilenglicol)-interferón purificado y una muestra del interferón-α 2b nativo. Se incubaron 2 millones de células MOLT 4/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos con 5.000 pg de cada muestra de interferón medidos usando un inmunoensayo enzimático durante 24 horas 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 AMV). Las muestras se diluyeron a 1 a 4 en agua y se amplificaron 2 µl de cada muestra en una mezcla de cuantificación de PCR en tiempo real de 20 µl (Sigma SybGreen ReadyMix). 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 minutos siguieron 48 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 segundos, hibridación a 60 °C durante 2 segundos y extensión a 72 °C durante 8 segundos. Para la amplificación de PRKR, las muestras se activaron a 94 °C durante 5 minutos y se sometieron a 48 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 segundos, hibridación a 59 °C durante 2 segundos y extensión a 72 °C durante 8 segundos. Al final de las amplificaciones se realizó un análisis de la curva de fusión de los productos. La cuantificación de los niveles de ARNm inducidos se realizó en relación a las células no tratadas de control usando

la fórmula siguiente:

$$\text{Incremento relativo} = 2^{-(Ct \text{ muestra} - Ct \text{ control})}$$

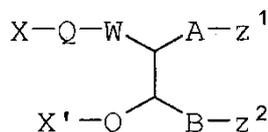
en la que Ct es el valor umbral de entrecruzamiento.

5 La Figura 5, en la que la Figura 5(a) muestra el análisis cuantitativo mediante RT-PCR (dos etapas) en tiempo real del gen de 2'5'-oligoadenilato sintetasa (2'5'-OAS) inducible por interferón y la Figura 5(b) muestra el análisis cuantitativo mediante RT-PCR en tiempo real (dos etapas) del gen de proteína cinasa R (PRKR) inducible por interferón. Los resultados confirman que el conjugado poli(etilenglicol)-interferón- α 2b estimulaba la síntesis de ARNm de 2'5'-oligoadenilato sintetasa (2'5'-OAS) y del ARNm de la proteína cinasa R (PRKR) a niveles que eran similares a los del interferón- α 2b no pegilado nativo.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula general



(I)

5

en la que uno de X y X' representa un homo o co-polímero seleccionado del grupo que consiste en polialquilenglicoles, polivinilpirrolidonas, poliacrilatos, polimetacrilatos, polioxazolinas, polivinilalcoholes, poliacrilamidas, polimetacrilamidas, copolímeros de HPMA, poliésteres, poliacetales, poli(ortoésteres), policarbonatos, poli(imidocarbonatos), copolímeros de diviniléter-anhídrido maleico o de estireno-anhídrido maleico, polisacáridos, o ácidos poliglutámicos, estando cualquiera de dichos homo- o copolímeros opcionalmente derivatizado o funcionalizado y el otro representa un átomo de hidrógeno;

10

cada Q representa independientemente un grupo enlazador;

15

W representa un grupo ceto CO, un grupo éster -O-CO-, o un grupo sulfona -SO₂-, o un resto que se puede preparar mediante reducción de dicho grupo; o, si X' representa un polietilenglicol, X-Q-W- juntos pueden representar un grupo ciano;

cada uno de Z¹ y Z² representa de forma independiente una proteína, cada una de las cuales está unida a A y B por medio de un grupo amino;

o Z¹ y Z² juntos representan una proteína individual que está unida a A y B por medio de dos grupos amino;

A es una cadena alquileo o alquenileno C₁₋₅; y

20

B es un enlace o una cadena alquileo o alquenileno C₁₋₄.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero es un polietilenglicol.

25

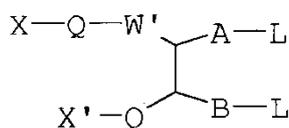
3. Un compuesto de acuerdo bien con la reivindicación 1 o bien con la reivindicación 2, en el que cada grupo enlazador Q representa independientemente un enlace directo, un grupo alquileo, o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, cualquiera de los cuales puede estar finalizado o interrumpido por uno o más átomos de oxígeno, 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-.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada uno de Z¹ y Z² representa independientemente una proteína.

30

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada uno de dichos grupos amino es parte de un residuo de lisina.

6. Un procedimiento de preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende hacer reaccionar bien (i) un compuesto de la fórmula general



(II)

Figura 1

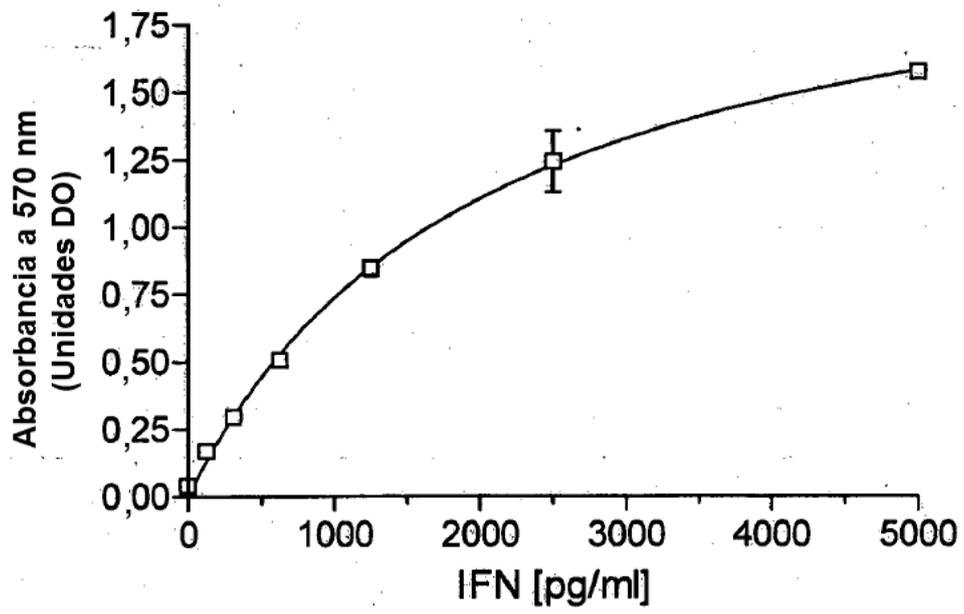
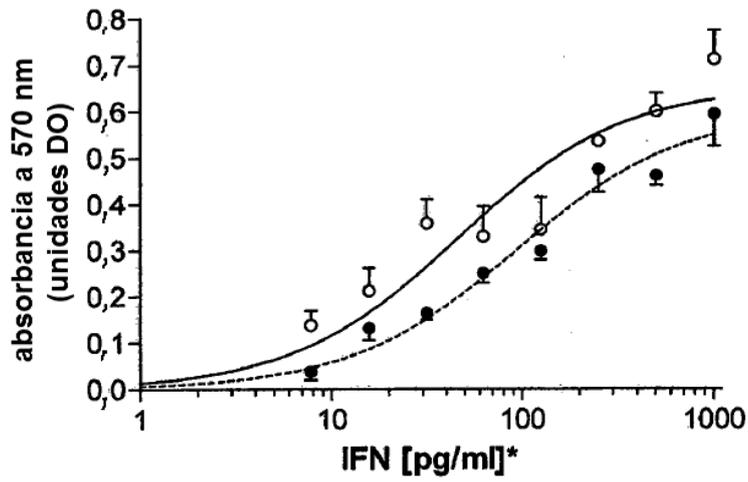


Figura 2

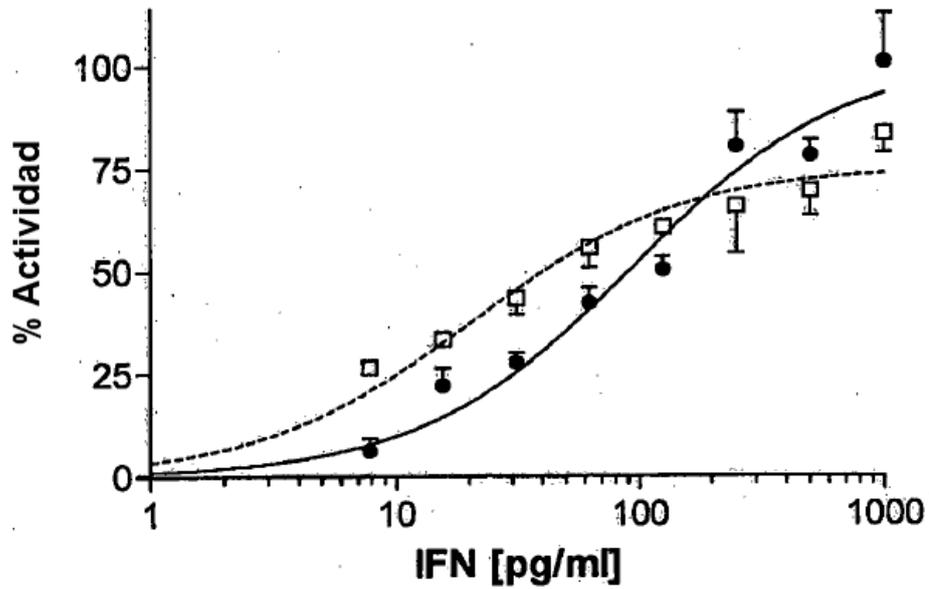


—○— NIBSC(UK) patrón Interferón - α 2b :- DE₅₀ = 38 pg/ml

--●-- Nuestro interferón - α 2b b: nativo DE₅₀ = 90 pg/ml

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

Figura 3



- Nuestro interferón - α 2b b nativo: DE₅₀ = 90 pg/ml
- Nuestro interferón - α 2b b nativo tratado pero sin pegilar :- DE₅₀ = 40 pg/ml

Figura 4

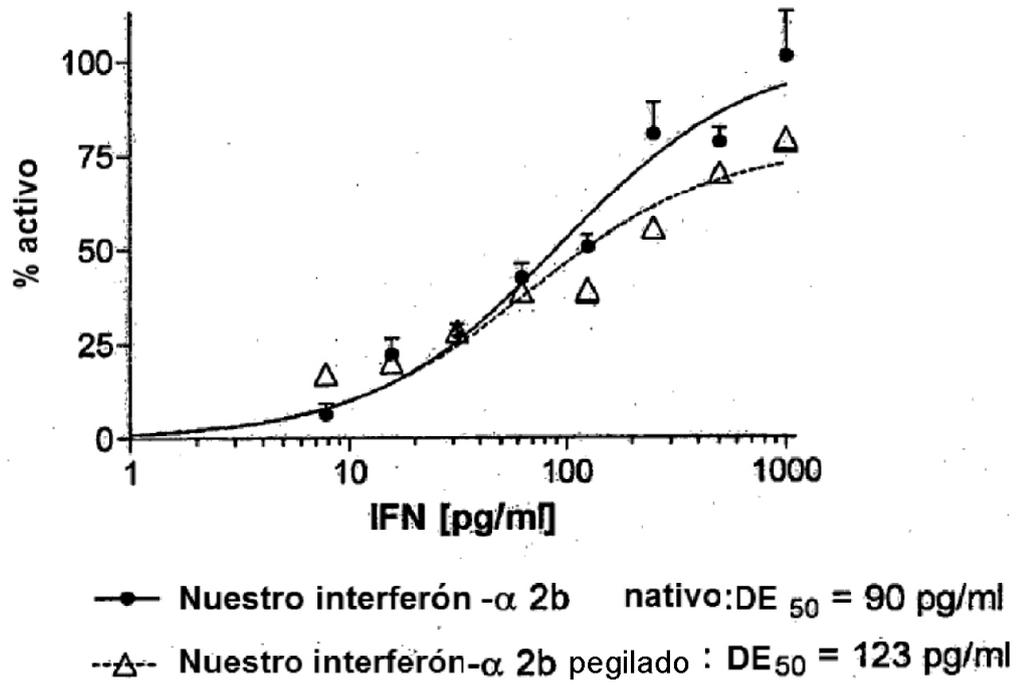


Figura 5(a)

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

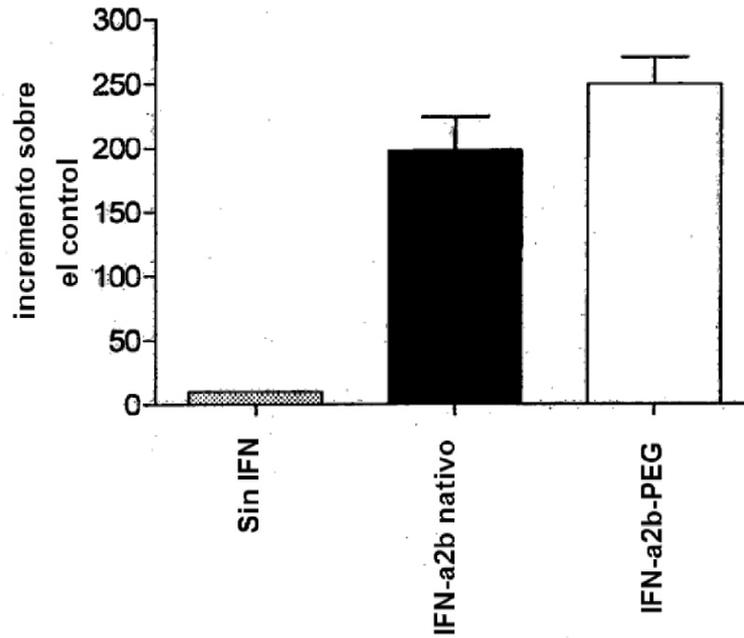


Figura 5(b)

Análisis por
RT-PCR cuantitativa en tiempo real (dos etapas) del gen de la
proteína cinasa R (PRKR) inducible por IFN

