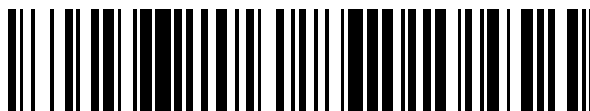


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 099**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60	(2007.01)
C07D 213/80	(2006.01)
C07D 239/28	(2006.01)
C07D 213/30	(2006.01)
C07D 213/46	(2006.01)
C07D 213/55	(2006.01)
C07D 213/38	(2006.01)
C07H 15/26	(2006.01)
C07K 1/13	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009** **E 15151649 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018** **EP 2886132**

54 Título: **Reactivos con funcionalidad tiol y sus usos**

30 Prioridad:

19.12.2008 US 139014 P
19.12.2008 GB 0823309

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2018

73 Titular/es:

GLYTHERA LIMITED (100.0%)
Herschel Annex Kings Road
Newcastle upon Tyne NE1 7RU, GB

72 Inventor/es:

WATTS, ANDREW GRAHAM;
KANTNER, TERRENCE y
MACKENZIE, AMANDA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 674 099 T3

Aviso:En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Reactivos con funcionalidad tiol y sus usos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a reactivos funcionalizantes y a métodos para usarlos para la modificación de proteínas y polipéptidos. La presente invención relaciona además los usos de polipéptidos funcionalizados producidos mediante los métodos de la presente invención. Más específicamente, la presente invención emplea reactivos funcionalizantes que comprenden un anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno el cual tiene un sustituyente vinílico y el cual está covalentemente unido a un socio de condensación. Típicamente, el socio de condensación es capaz de alterar las propiedades del polipéptido tal como una molécula de polialquilenglicol o un grupo glicano.

Antecedentes de la invención

15 Es sabido en la técnica que es posible enlazar covalentemente polímeros tipo polietilenglicol (PEG) a polipéptidos terapéuticos, un procedimiento llamado pegilación. Normalmente, la pegilación se lleva a cabo haciendo reaccionar el polipéptido con un derivado reactivo de la molécula de PEG, típicamente usando un derivado que incluya un grupo funcional tal como un grupo hidroxilo, tiol, amina o ácido carboxílico. En las reacciones de pegilación, el grupo funcional reactivo de la molécula de PEG forma enlaces covalentes estables con grupos amino, carboxi o tiol de aminoácidos presentes en el polipéptido, o con los terminales N- o C- reactivos del polipéptido. En general, las reacciones de pegilación requieren el uso de un reactivo de reticulación reactivo tal como maleimida.

20 Sin embargo, también se sabe que la pegilación es una reacción relativamente incontrolada, principalmente como resultado del uso del agente reticulante reactivo y porque las moléculas de PEG pueden reaccionar de varias maneras diferentes con los múltiples grupos funcionales presentes en los polipéptidos, produciendo de esta forma productos heterogéneos. Esto quiere decir que los polipéptidos pegilados resultantes pueden tener estructuras lineales o ramificadas y/o tener un número variable de moléculas de PEG condensadas a cada polipéptido. La reacción también está influenciada por factores tales como el tipo y la concentración de proteína, el tiempo de reacción, la temperatura y el valor de pH, todos los cuales tienen un efecto sobre los productos finales de la reacción.

25 En general, la pegilación se lleva a cabo para influir en las propiedades farmacocinéticas o inmunológicas de los polipéptidos, especialmente en los que son administrados intravenosamente. En particular, los polipéptidos pueden ser alterados para mejorar su estabilidad, vida media biológica, solubilidad en agua y características inmunológicas. Se piensa que pegilando un polipéptido para aumentar su masa (por ej., en 20-50 kDa) significa que es excretado con menos facilidad a través de los riñones y por lo tanto persiste en el cuerpo durante más tiempo. Además, se piensa que los polipéptidos pegilados están protegidos de ser degradados por enzimas endógenas, lo cual ayuda a aumentar su vida media *in vivo*. Además, se piensa que el aumento de la vida media *in vivo* y la mejora de la eficacia de los fármacos tipo polipéptidos puede conducir a una reducción de la frecuencia o de la dosis del polipéptido que requiere un paciente, y por tanto ayudar a reducir las reacciones inmunes contra el polipéptido. La pegilación también puede ayudar a mejorar la solubilidad en agua de los polipéptidos hidrófobos.

30 Sin embargo, aunque las propiedades de los polipéptidos pegilados son deseables, especialmente en polipéptidos terapéuticos, la falta de control en las reacciones de pegilación sigue siendo un problema ya que con frecuencia conduce a una gama de productos que tienen una gama de propiedades diferentes. Por otra parte, puesto que los polipéptidos son moléculas complejas, es difícil usar grupos protectores para controlar el sitio y/o la extensión de la reacción, como por ejemplo sería posible en la química de las moléculas pequeñas.

35 La glicosilación de polipéptidos es una forma natural de modificación postraslacional que altera la estructura y función de los polipéptidos. En la naturaleza, la glicosilación es introducida mediante un procedimiento enzimático que lleva a la modificación específica del sitio de diferentes tipos de polipéptidos glicosilados. En la glicosilación ligada al átomo de N, los glicanos se unen al átomo de nitrógeno del grupo amida de cadenas laterales de asparagina y en la glicosilación ligada al átomo de O, los glicanos se unen al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de cadenas laterales de serina y treonina. Otras formas de glicosilación incluyen glicosaminoglicanos los cuales están unidos al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina, glicolípidos en los cuales los glicanos están unidos a ceramida, hialuronano el cual está unido a un proteína o a un lípido, y anclajes GPI que unen proteínas a lípidos a través de enlaces con glicanos.

40 Hay un problema general en la técnica por qué con frecuencia la glicosilación se añade a polipéptidos en células eucariotas, pero raramente se añade a polipéptidos expresados en huéspedes procariontes con frecuencia usados para la expresión recombinante de polipéptidos terapéuticos. Esta ausencia de glicosilación en polipéptidos producidos en huéspedes procariontes puede llevar a que los polipéptidos sean reconocidos como extraños o significar que ellos tengan propiedades que por lo demás difieren de sus formas naturales. También hay un problema porque es difícil diseñar la glicosilación en polipéptidos en sitios en los que no hay glicosilación natural, en un intento de usar esto para modular las propiedades de los polipéptidos.

El documento WO 88/05433 describe reactivos de reticulación para producir conjugados de polipéptidos y entidades químicas citotóxicas o que producen señales. Los reactivos de reticulación consisten en una gama de compuestos heterocíclicos aromáticos que contienen nitrógeno, en particular 2-, 3- o 4-vinil piridinas y vinil pirimidinas, a las cuales pueden unirse las entidades químicas citotóxicas o que producen señales vía sustituyentes éster activados presentes en el reactivo de reticulación. La reacción de conjugación descansa en los grupos vinilo de los reactivos que reaccionan con los grupos tiol presentes en los polipéptidos. Los compuestos descritos en el documento WO 88/05433 incluyen todos un sustituyente aceptor de electrones como un grupo funcional del anillo heterocíclico aromático que contiene nitrógeno. También es de destacar que el documento WO 88/05433 no proporcione ningún ejemplo que muestre la unión de entidades químicas citotóxicas o que producen señales a un polipéptido usando los reactivos de reticulación.

El documento WO 2005/024041 describe un método para marcar las proteínas con masas en dos o más poblaciones de células para usar en métodos proteómicos. El marcado implica hacer reaccionar residuos de cisteína en una de las poblaciones con 2-vinilpiridina, y en la otra población con una 2-vinilpiridina sustituida con alquilo de C₁₋₄, produciendo de este modo proteínas marcadas con masas que son distinguibles por espectroscopía de masas.

Banas et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 957(2): 178-84, 1988) estudiaron la reactividad de residuos de cisteína de fosfofructo-1-quinasa de *E. coli*, usando vinil piridina, bromopiruvato y ácido ditionitrobenzoico para determinar la reactividad relativa de seis residuos de cisteína presentes en el polipéptido.

Fullmer (Analytical Biochemistry, 142(2): 336-9, 1984) describe un método para mejorar el análisis de la composición de aminoácidos de péptidos, en particular la identificación de cisteína y triptófano. Una de las mejoras usa 4-vinil piridina para proteger la mitad de los residuos de cisteína presentes en un péptido después de la escisión reductora de los enlaces disulfuro, ya que los derivados de cisteína producidos son estables en la hidrólisis ácida.

Sigue existiendo un problema en la técnica para mejorar la derivatización de polipéptidos con socios de condensación tales como moléculas de PEG y grupos glicano.

Sumario de la invención

Ampliamente, la presente descripción se refiere a compuestos y métodos para usarlos para funcionalizar polipéptidos con restos, tales como moléculas de polialquilenglicol y grupos glicano. Esta química está basada en un reactivo funcionalizante el cual comprende un anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno que tiene un sustituyente vinílico que es capaz de reaccionar con uno o más grupos tiol que están presentes de manera natural, o que han sido introducidos en el polipéptido, por ejemplo empleando un grupo tiol de uno o más residuos de cisteína. En general, el reactivo funcionalizante está covalentemente enlazado a una molécula de polialquilenglicol, tal como una molécula de polietilenglicol (PEG), o a un grupo glicano para que la reacción entre el grupo vinilo y el grupo tiol del polipéptido una covalentemente enlace el polipéptido a la molécula de polialquilenglicol y/o al grupo glicano.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para modificar un polipéptido según se reivindica en la reivindicación 1.

En un aspecto, se proporciona un método que comprende poner en contacto un polipéptido que al menos tiene un grupo tiol reactivo con un reactivo funcionalizante que comprende un anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno que tiene un sustituyente vinílico capaz de reaccionar con el al menos un grupo tiol del polipéptido, donde el reactivo funcionalizante está covalentemente enlazado a una molécula de poli(alquilen glicol), de modo que el sustituyente vinílico del reactivo funcionalizante reaccione con el grupo tiol del polipéptido, para de este modo enlazar covalentemente la molécula de poli(alquilen glicol) al polipéptido.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para modificar, por ej. pegilando o glicosilando, un polipéptido que al menos tiene un grupo tiol reactivo, método que comprende poner en contacto el polipéptido con un reactivo funcionalizante el cual comprende un anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno que tiene un sustituyente vinílico capaz de reaccionar con el al menos un grupo tiol del polipéptido, donde el reactivo funcionalizante está covalentemente enlazado a una molécula de poli(alquilen glicol), por ejemplo una molécula de polietilén glicol (PEG), de modo que el sustituyente vinílico del reactivo funcionalizante reaccione con el grupo tiol del polipéptido, para de este modo enlazar covalentemente la molécula de poli(alquilen glicol) al polipéptido.

Los métodos de la presente invención pueden implicar una o más etapas además de la etapa de hacer reaccionar el reactivo funcionalizante y el polipéptido para unirlos conjuntamente. A modo de ejemplo, los métodos pueden incluir una etapa inicial de hacer reaccionar un reactivo funcionalizante precursor, que comprende un anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno que tiene un sustituyente vinílico, con la molécula de poli(alquilen glicol) para producir el reactivo funcionalizante. Alternativa o adicionalmente, el método puede comprender las etapas iniciales de determinar la localización de grupos tiol reactivos en el polipéptido, seleccionando uno o más grupos tiol para que reaccionen con un reactivo funcionalizante según la presente invención, y opcionalmente proteger algunos de los grupos tiol restantes. El polipéptido puede entonces hacerse reaccionar con el reactivo funcionalizante como se describe en la presente memoria. A partir de lo anterior se apreciará que la reacción del grupo vinilo y un grupo tiol del polipéptido en general producía un grupo -CH₂CH₂-S-, que enlaza covalentemente el reactivo funcionalizante y el polipéptido. El enlace tioéter producido en esta reacción es en general muy estable en condiciones biológicas. Esta

estabilidad puede contrastarse con el uso de maleimida como agente de reticulación en la técnica anterior que cuando se usa para derivatizar un polipéptido tiene la desventaja potencial de que experimenta reacciones tales como apertura del anillo durante el almacenamiento.

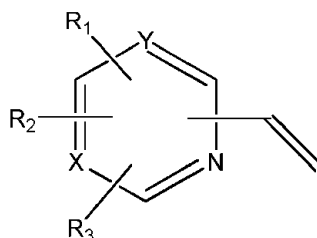
5 En realizaciones de la presente invención en las que el polipéptido no incluye un grupo tiol adecuado, o no incluye un grupo tiol adecuado en una posición deseada en la cadena del polipéptido, la presente invención puede comprender la etapa inicial de modificar un polipéptido padre, por ej., por reacción química o mutagénesis dirigida al sitio, para producir un polipéptido variante que tiene un grupo tiol en una o más posiciones deseadas del polipéptido. Preferiblemente, esto se hace reemplazando uno o más de los aminoácidos en el polipéptido con un residuo de cisteína. En realizaciones, que no forman parte de la presente invención que relacionan la glicosilación de polipéptidos, el polipéptido padre puede modificarse en un sitio natural de glicosilación, por ejemplo en un residuo de asparagina, treonina o serina, para introducir un grupo tiol que entonces puede reaccionar con un reactivo funcionalizante que comprenda uno o más grupos glicano. Esto puede hacerse, por ejemplo, cuando el polipéptido padre no está glicosilado en la posición, por ejemplo como resultado de la forma en la cual se ha producido, o cuando la glicosilación se ha eliminado.

15 Alternativa o adicionalmente, los métodos de la presente invención pueden implicar modificar residuos aminoácidos espacialmente próximos al grupo tiol reactivo para mejorar la reactividad del grupo tiol hacia el reactivo funcionalizante. A modo de ejemplo, pueden realizarse modificaciones de residuos aminoácidos espacialmente próximos para alterar el pH local, interacciones por puentes de hidrógeno, aguas de hidratación o la accesibilidad estérica alrededor del grupo reactivo tiol.

20 Preferiblemente, el grupo reactivo tiol, tanto si está presente en el polipéptido de forma natural como si ha sido introducido, es parte de un residuo aminoácido cisteína.

Después de que se haya llevado a cabo el método que se definió anteriormente, el polipéptido pegilado o glicosilado puede a continuación purificarse o aislarse en una o más etapas adicionales.

25 En un aspecto adicional, se proporciona un compuesto para funcionalizar un polipéptido con un poli(alquilen glicol) representado por la fórmula:



en donde:

X e Y se seleccionan independientemente de CH o N;

en donde al menos R₁, y opcionalmente R₂, están covalentemente unidos a una molécula de poli(alquilen glicol);

30 en donde:

R₁ y opcionalmente R₂, se seleccionan independientemente de:

-(CH₂)_n-Z-(CH₂)_o-R, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

-C(O)-Z-(CH₂)_o-R, Z es O, S o NH, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

35 -(CH₂)_n-Z-C(O)-(CH₂)_o-R, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

-Y-(CH₂)_n-Z-C(O)-(CH₂)_o-R, donde Y es un grupo arilo, O, S o NH, Z es O o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

-Y-R, donde Y es O o S, R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol), arilo o alquilo de C₁₋₁₀;

40 con la condición de que cuando R₂ no esté unido a una molécula de poli(alquilen glicol), puede adicionalmente seleccionarse de hidrógeno o un grupo aceptor de electrones, tal como halógeno (F, Cl, o Br), -NO₂, -CO₂H, -CO₂R₄, COR₄, -CHO, -CN, -CF₃, -SO₂NR₄R₅, alquilo o fenilo, en los que R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de hidrógeno o alquilo de C₁₋₁₀;

o R₂ y R₃ juntos forman un sustituyente tipo anillo (hetero)aromático condensado el cual puede incluir, pero no está limitado a, un indol, indazol, bencimidazol, quinolina, isoquinolina, aziradina o una purina;

5 o R₃ se selecciona de hidrógeno o un sustituyente seleccionado de halo; hidroxi; éter (por ej., alcoxi de C₁₋₇); formilo; acilo (por ej., alquilacilo de C₁₋₇, arilacilo de C₅₋₂₀); carboxi; éster; aciloxi; amido; acilamido; tioamido; tetrazolilo; amino; nitro; nitroso; azido; ciano; isociano; cianato; isocianato; tiociano; isotiociano; tioéter (por ej., alquilo de C₁₋₇-tio); ácido sulfónico; sulfonato; sulfona; sulfoniloxi; sulfiniloxi; sulfamino; sulfonamino; sulfinamino; sulfamilo; sulfonamido; alquilo de C₁₋₇ (incluyendo, por ej., alquilo de C₁₋₇ no sustituido, haloalquilo de C₁₋₇ o hidroxialquilo de C₁₋₇, carboxialquilo de C₁₋₇, aminoalquilo de C₁₋₇).

10 En algunas realizaciones, para los agentes enlazantes anteriormente descritos, Y es O o NH, con los otros grupos como se definieron anteriormente. Adicional o alternativamente, el grupo aceptor de electrones no es un grupo alquilo.

Preferiblemente, el anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno es un anillo de piridina sustituido (X e Y son ambos CH) o un anillo de pirimidina sustituido (uno de x e Y es CH y el otro es N).

15 Preferiblemente, los grupos R₁ y/o R₂ para enlazar la molécula de poli(alquilen glicol) al anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno se seleccionan independientemente de -(CH₂)_n-Z-(CH₂)_o-R o -C(O)-Z-(CH₂)_o-R, con los sustituyentes como se definieron anteriormente. Más preferiblemente, en los grupos R₁ y R₂, o es cero y los grupos pueden ser representados como -(CH₂)_n-Z-R o -C(O)-Z-R, con los sustituyentes como se definieron anteriormente.

20 Incluyendo la posibilidad de que uno o dos de los grupos enlazados al anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno pueda ser una molécula de polialquilenglicol y/o grupos glicano, la presente invención permite que tanto R₁ como R₂ sean moléculas de polialquilenglicol o grupos glicano o uno sea una molécula de polialquilenglicol y uno un grupo glicano, produciendo de este modo reactivos funcionalizantes mixtos.

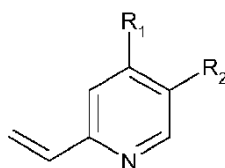
25 Preferiblemente, el anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno es un anillo de piridina, pirimidina o azidina. Más preferiblemente, el anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno es un anillo de piridina o un anillo de pirimidina y lo más preferiblemente es un anillo de piridina. Cuando se emplean los anillos de piridina o pirimidina, preferiblemente el grupo vinilo está en la posición 2 relativa a un heteroátomo de nitrógeno.

Sin embargo, en algunas realizaciones es posible emplear sistemas de anillos heterocíclicos condensados más extendidos tales como un indol, indazol, bencimidazol, quinolina, isoquinolina, aziradina o una purina.

30 En general, la molécula de poli(alquilen glicol) está directamente enlazada covalentemente a los grupos R₁ y/o R₂ como se muestra en la fórmula anterior. Los grupos enlazantes pueden tener diferentes longitudes para mantener la molécula de poli(alquilen glicol) más próxima o más alejada del polipéptido. La longitud del agente enlazante puede escogerse.

Sin embargo, en algunas realizaciones podría ser deseable incluir un agente enlazante extendido entre el grupo R₁ y la molécula de poli(alquilen glicol). Tal agente enlazante puede ser necesario para alterar la solubilidad o las propiedades inmunógenas del grupo funcionalizante.

35 La clase de reactivos funcionalizantes según la presente invención se representa mediante la siguiente fórmula general:



en donde:

al menos R₁, y opcionalmente R₂, están covalentemente enlazados a una molécula de poli(alquilen glicol);

40 y además donde:

R₁, y opcionalmente R₂, se seleccionan independientemente de:

-(CH₂)_n-Z-(CH₂)_o-C(O)R, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

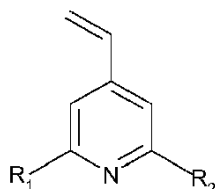
45 -(CH₂)_n-Z-(CH₂)_o-R, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

-(CO)-Z-(CH₂)_o-R, donde Z es O, S o NH, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-(\text{CH}_2)_n\text{-Z-C(O)-}(\text{CH}_2)_o\text{-R}$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n\text{-Z-C(O)-}(\text{CH}_2)_o\text{-R}$, donde Y es un grupo arilo, O, S o NH, Z es O o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol) o un grupo glicano; o

5 $-\text{Y-R}$, donde Y es O o S, R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol), arilo o alquilo de C_{1-10} ;
o



en donde:

10 al menos R₁, y opcionalmente R₂, están covalentemente enlazados a una molécula de poli(alquilen glicol) y/o un grupo glicano;

y además donde:

R₁, y opcionalmente R₂, se seleccionan independientemente de:

$-(\text{CH}_2)_n\text{-Z-(CH}_2)_o\text{-C(O)R}$, donde Z es S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

15 $-(\text{CH}_2)_n\text{-Z-(CH}_2)_o\text{-R}$, donde Z es S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-(\text{CO})\text{-Z-(CH}_2)_o\text{-R}$, donde Z es S o NH, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol);
o

20 $-(\text{CH}_2)_n\text{-Z-C(O)-}(\text{CH}_2)_o\text{-R}$, donde Z es S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n\text{-Z-C(O)-}(\text{CH}_2)_o\text{-R}$, donde Y es un grupo arilo, S o NH, Z es O o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-\text{Y-R}$, donde Y es S, R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol), arilo o alquilo de C_{1-10} ;

25 con la condición de que cuando R₂ no esté unido a una molécula de polialquilenglicol, puede adicionalmente seleccionarse de hidrógeno o un grupo aceptor de electrones, tal como halógeno (F, Cl, o Br), -NO₂, -CO₂H, -CO₂R₄, COR₄, -CHO, -CN, -CF₃, -SO₂NR₄R₅, alquilo o fenilo, en los que R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de hidrógeno o alquilo de C_{1-10} ;

En una clase preferida de reactivos funcionalizantes,

30 R₁ es $-(\text{CH}_2)_n\text{-Z-(CH}_2)_o\text{-C(O)-R}$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es una o más moléculas de polialquilenglicol; y/o

R₂ es un hidrógeno, alquilo o $-(\text{CH}_2)_n\text{-Z-(CH}_2)_o\text{-C(O)-R}$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es una o más moléculas de polialquilenglicol.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polipéptido conjugado que comprende una o más moléculas de poli(alquilen glicol), donde el polipéptido es un polipéptido terapéutico el cual está covalentemente enlazado a la molécula de poli(alquilen glicol) vía un grupo tiol presente en el polipéptido y un reactivo funcionalizante como se definió anteriormente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polipéptido conjugado como se definió anteriormente para usar en terapia.

40 Ahora se describirán las realizaciones de la presente invención como ejemplo y no como limitación con referencia a las figuras que se acompañan.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Velocidades de reacción relativas de una gama de agente enlazantes con glutatión.

Figura 2. Marcado de interferón-beta recombinante de ser humano con un derivado vinilpiridina-PEG frente a maleimida-PEG.

Figura 3. Efecto de pH sobre la tasa de marcado de BSA con vinilpiridina-5k-PEG.

5 **Figura 4.** Dependencia de la temperatura de la reacción de PEG 5kDa/piridina con IFN beta recombinante (C17S, D80N).

Figura 5. Funcionalización de una proteína modelo con PermaLink.

Figura 6. Especificidad de agente enlazante por residuos de cisteína.

Descripción detallada

Polipéptidos

10 Los métodos de la presente invención son en general aplicables a una gama de aplicaciones basadas en la reacción que es capaz de introducir específica y directamente grupos funcionales, en particular moléculas de polialquilenglicol y grupos glicano, en polipéptidos. Los métodos descritos son aplicables a cualquier tamaño o tipo de polipéptido desde aminoácidos únicos y péptidos a polipéptidos y proteínas que tienen pesos moleculares de hasta o por encima de 100 kDa. Por consiguiente, aunque por conveniencia en la presente memoria los métodos son en general

15 descritos por referencia a "polipéptidos", debe tenerse en cuenta que incluyen secuencias más cortas de aminoácidos (por ej., de 2, 3, 4, 5 ó 10 aminoácidos de longitud a 30, 40 ó 50 aminoácidos de longitud), algunas veces denominados en la técnica como péptidos. También debe tenerse en cuenta que el término incluye polipéptidos que tienen una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria en general denominados proteínas, así como proteínas multidominio.

20 Los métodos y reactivos descritos en la presente memoria son particularmente útiles para funcionalizar polipéptidos terapéuticos, por ejemplo para modificar sus propiedades farmacológicas tales como estabilidad, vida media biológica o solubilidad en agua, o las características inmunológicas del polipéptido.

Ejemplo de clases adecuadas de polipéptidos que pueden ser modificadas de acuerdo con la presente invención incluyen eritropoyetinas (EPO), interferones, interleuquinas, quimioquinas, linfoquinas, citoquinas, insulina, fragmentos y anticuerpos monoclonales, fragmentos y anticuerpos recombinantes, factores coagulantes de la sangre, factores estimulantes de colonias (CSFs), hormonas del crecimiento, activadores del plasminógeno, péptidos derivados víricamente, hormonas reproductoras, enzimas terapéuticos y proteínas portadoras (por ej., que se usan para fabricar vacunas conjugadas). Ejemplos específicos de polipéptidos que pueden emplearse incluyen el factor estimulante de colonias (CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, hormona del crecimiento humano (hGH), DNasa, insulina, glucagón, VEGF, receptor de VEGF, TNF, receptor de TNF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador tisular del plasminógeno (tPA), eritropoyetina (EPO), enfurvirtida, factor del crecimiento semejante a la insulina (IGF), factor del crecimiento de los nervios (NGF), IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-24, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa, o interferón gamma.

35

En la presente invención, las referencias a polipéptidos que son anticuerpos incluyen inmunoglobulinas, ya sean naturales o producidas parcial o completamente sintéticamente. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprenda un dominio enlazante de antígenos. Los fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio enlazante de antígenos incluyen Fab, scFv, Fv, qAb, fragmentos Fd, diacuerpos, triacuerpos o nanocuerpos. Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de DNA recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quimera que retengan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir DNA que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones que determinan la complementariedad (CDRs), de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0 184 187 A, GB 2.188.638 A o EP 0 239 400 A. Los anticuerpos pueden modificarse de varias formas y el término debe interpretarse que cubre cualquier miembro o sustancia enlazante específico que tenga un dominio anticuerpo enlazante de antígenos con la requerida especificidad. Así, este término cubre fragmentos de anticuerpos y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio enlazante de inmunoglobulinas, ya sea natural o completa o parcialmente sintético. Por lo tanto, están incluidas moléculas quimera que comprenden un dominio enlazante de inmunoglobulinas, o equivalente, condensado con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quimera se describen en los documentos EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A.

45

50

Se ha mostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos enlazantes. Ejemplos de fragmentos enlazantes son (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo único; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena única (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están

55

enlazados por un agente enlazante péptido el cual permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio enlazante de antígenos (Bird et al, Science, 242: 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85: 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv biespecíficos de cadena única (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos por fusión de genes (documento WO 94/13804; Holliger et al, P.N.A.S. USA, 90: 6444-6448, 1993).
 5 Fv, scFv o moléculas diacuerpos pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Reiter et al, Nature Biotech, 14: 1239-1245, 1996). También pueden fabricarse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu et al, Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996).

Métodos de modificar o funcionalizar proteínas

10 La presente invención proporciona un método conveniente para modificar o funcionalizar una proteína de interés usando grupos tiol que están presentes en, o que han sido previamente introducidos en, el polipéptido, por ej., en uno o más residuos de cisteína. En realizaciones preferidas, los métodos descritos en la presente memoria emplean reactivos y condiciones que están bien adaptadas para modificar proteínas y otros materiales biológicos. En particular, las condiciones de reacción que se usan en el presente método ayudan a evitar los problemas que tienden a ocurrir cuando se usan reactivos de la técnica anterior tales como maleimida, los cuales tienen una
 15 tendencia para producir una mezcla de diferentes productos con una gama de diferentes propiedades.

Como se mencionó anteriormente, el polipéptido de interés puede modificarse usando grupos tiol existentes o introduciendo grupos tiol en una etapa inicial del método, por ejemplo haciendo reaccionar uno o más grupos funcionales del polipéptido para producir un grupo tiol, o introduciendo un grupo tiol o un precursor del mismo en el polipéptido. A modo de ejemplo, esto puede implicar la etapa de introducir un residuo de cisteína en el polipéptido en un sitio donde se desee funcionalizar el polipéptido. Esto puede ser útil en situaciones en las que un residuo de cisteína conveniente para reaccionar según la presente invención no esté presente en un polipéptido de partida o de tipo natural. Convenientemente, esto puede lograrse usando mutagénesis dirigida al sitio del polipéptido, el uso de la cual está bien establecido en la técnica.

20 Los presentes métodos son particularmente apropiados para usar en la funcionalización de polipéptidos con moléculas de polialquilenglicol o grupos glicano. Un uso preferido de los métodos y reactivos, que no forman parte de la presente invención es para glicosilar un polipéptido de interés con uno o más grupos glicano. El grupo carbohidrato puede ser un monosacárido, oligosacárido o polisacárido sintético o que se encuentre en la naturaleza. Este enfoque puede usarse para añadir glicosilación a una proteína de interés, o para introducir glicosilación donde se desea la glicosilación pero no se introduce en el curso de la producción de la proteína, por ej., en virtud del hecho de que la proteína ha sido producida en células bacterianas o, particularmente para péptidos, cuando han sido
 25 producidos por síntesis química.

La capacidad para controlar la glicosilación en sitios definidos usando la presente invención representa una herramienta útil para proteínas recombinantes diseñadas por ingeniería genética, por ejemplo proteínas y anticuerpos terapéuticos, y sus fragmentos, en su fabricación y en el control de su inmunogenia y propiedades farmacológicas tales como la vida media. Actualmente, la fabricación de proteínas recombinantes terapéuticas es cara y lenta ya que las líneas de células de mamíferos son con frecuencia usadas en la fabricación para asegurar que las proteínas son glicosiladas. Los métodos descritos en la presente memoria pueden ser usados para añadir glicosilación a un polipéptido después de la producción en líneas de células bacterianas, en las cuales la expresión es en general más eficiente, ayudando de este modo a mejorar la velocidad y/o la economía de la producción de proteínas, a la vez que se retiene la glicosilación. Alternativamente, para polipéptidos expresados en líneas de células que glicosilan productos de expresión, la presente invención puede ser usada para modificar o añadir glicosilación.

35 En realizaciones preferidas, los carbohidratos empleados pueden comprender derivados químicamente modificados de oligosacáridos ramificados que se encuentran en la naturaleza, comúnmente mostrados en glicoproteínas *N*- u *O*-enlazadas, o en sus productos de degradación. Los grupos carbohidratos que pueden ser usados en la presente invención son bien conocidos en la técnica e incluyen grupo carbohidratos encontrados en la glicosilación *N*- y *O*-enlazada de grupos carbohidratos de proteínas eucariotas y sintetizadas por el hombre, véase, por ej., los grupos carbohidratos y los métodos de producirlos e identificarlos descritos en los documentos WO 03/025133 y W02004/083807.

40 Los glicanos *N*-enlazados se encuentran unidos al nitrógeno del grupo R (N) de la asparagina en el secucón. El secucón es una secuencia de Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que x es cualquier aminoácido excepto prolina y puede estar compuesta de N-acetilgalactosamina, galactosa, ácido neuramínico, N-acetilglucosamina, fructosa, manosa, fucosa y otros monosacáridos.

45 En eucariotas, Los glicanos *N*-enlazados se derivan de un núcleo de 14 unidades de azúcar ensamblado en el citoplasma y en el retículo endoplasmático. En primer lugar, dos residuos de N-acetilglucosamina están unidos a fosfato de dolicol, un lípido, en el lado externo de la membrana del retículo endoplasmático. A continuación, a esta estructura se añaden cinco residuos de manosa. En este punto, el núcleo de glicano parcialmente acabado es volteado a lo largo de la membrana del retículo endoplasmático, de modo que ahora está localizado dentro del lúmen reticular. A continuación, el ensamblaje continúa dentro del retículo endoplasmático con la adición de cuatro
 50 residuos más de manosa. Finalmente, se añaden tres residuos de glucosa a esta estructura. Tras el ensamblaje

total, el glicano es transferido en bloque mediante la glicosiltransferasa oligosacariltransferasa a una cadena de péptido naciente, dentro del lumen reticular. Esta estructura núcleo de glicanos N-enlazados consiste de este modo en 14 residuos (3 glucosa, 9 manosa, y 2 N-acetilglucosamina).

5 En eucariotas, glicanos O-enlazados, se ensambla un azúcar a la vez en un residuo de serina o treonina de una cadena de péptido en el aparato de Golgi. A diferencia de con los glicanos N-enlazados, no existe hasta el momento ninguna secuencia de consenso conocida. Sin embargo, la colocación de un residuo de prolina en -1 ó +3 relativa a la serina o la treonina es favorable para la glicosilación O-enlazada.

10 El primer monosacárido unido en la síntesis de glicanos O-enlazados es N-acetil-galactosamina. Después de esto, son posibles varias rutas diferentes. Se genera una estructura núcleo 1 por la adición de galactosa. Se genera una estructura núcleo 2 por la adición de N-acetil-glucosamina a la N-acetil-galactosamina de la estructura núcleo 1. Se generan estructuras núcleo 3 mediante la adición de una única N-acetil-glucosamina a la N-acetil-galactosamina original. Se generan estructuras núcleo 4 mediante la adición de una segunda N-acetil-glucosamina a la estructura núcleo 3. Son posibles otras estructuras núcleo, aunque son menos comunes.

15 Un tema estructural común en glicanos O-enlazados es la adición de unidades de polilactosamina a las diversas estructuras núcleo. Éstas se forman mediante la adición repetitiva de galactosa y unidades de N-acetilglucosamina. Con frecuencia, las cadenas de polilactosamina en glicanos O-enlazados están rematadas mediante la adición de un residuo de ácido siálico (similar al ácido neuramínico). Si también se añade un residuo de fucosa, al residuo siguiente al penúltimo se forma una estructura sialil-lewis-X (SLe^x).

20 Los métodos de la presente invención también pueden usarse para fabricar vacunas conjugadas, por ej., vacunas conjugadas formadas enlazando una o más moléculas de antígeno a una proteína portadora, confiriendo de este modo las características inmunológicas a la proteína vehículo sobre la molécula de antígeno. Este enfoque se usa con frecuencia cuando la molécula de antígeno es un grupo glicano (por ej., un polisacárido antigénico) ya que comparativamente tienden a ser peores antígenos. Los métodos descritos en la presente memoria permiten que se unan múltiples moléculas de antígeno a la proteína portadora, preferiblemente en una posición de la proteína portadora, mediante el uso de los reactivos funcionalizantes de la presente invención. Ejemplos de vacunas conjugadas incluyen: vacunas de Haemophilus influenzae tipo B ("vacuna Hib"), en las cuales un polisacárido Hib está conjugado a una proteína portadora tal como tetanospasmina, una proteína mutante de la difteria o una proteína de la membrana externa de los meningococos del grupo B; vacunas de conjugados de meningococos en las cuales están conjugados uno o más polisacáridos del serogrupo de la meningitis meningocócica (por ej., A, C, Y o W-135) a una proteína portadora; vacunas pneumocócicas de polisacáridos (PPSV) en las cuales los polisacáridos son azúcares de membranas celulares de los diferentes serotipos de neumococos (por ej. 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F) conjugados con una proteína portadora tal como una proteína de la difteria. Los componentes proteína y polisacárido de cualquiera de las vacunas anteriormente descritas pueden unirse usando los reactivos funcionalizantes de la presente invención.

35 Los métodos descritos en la presente memoria también pueden emplearse para diseñar proteínas que contengan otros restos útiles para modificar las propiedades farmacológicas de proteínas terapéuticas. Un ejemplo preferido es la conjugación de polipéptidos a moléculas de polialquilenglicol, en particular moléculas de polietilenglicol (PEG), que pueden ser usadas para aumentar la vida media u otras propiedades farmacológicas de la terapéutica con polipéptidos.

40 Los métodos presentes proporcionan la oportunidad de pegar proteínas de interés de una forma selectiva dependiendo de donde están presentes los grupos en la proteína. Las moléculas de polialquilenglicol se denominan intercambiamente en la técnica como moléculas de poli(óxido de alqueno) y son poliéteres. Las moléculas de polialquilenglicol pueden tener estructuras lineales, ramificadas, peine o en estrella y en general son muy solubles en agua.

45 Además, a la estructura básica de un polialquilenglicol pueden incorporarse uno o más grupos funcionales reactivos tales como grupos hidroxilo, amina, ácido carboxílico, haluro de alquilo o tiol para facilitar la reacción de la molécula de polialquilenglicol con otras especies tales como polipéptidos. Las moléculas preferidas de polialquilenglicol incluyen las sustituidas en una o más posiciones hidroxilo con un grupo químico, tal como un grupo alquilo que tiene entre uno y cuatro átomos de carbono. Las moléculas de polialquilenglicol más preferidas para usar de acuerdo con la presente invención son moléculas de polietilenglicol ("PEG"), aunque el experto sería capaz de usar las técnicas descritas en la presente memoria junto con otras moléculas de polialquilenglicol, tales como propilenglicol o copolímeros de polietileno-propilenglicol. Moléculas de polialquilenglicol, incluyendo PEGs, tienen típicamente pesos moleculares entre aproximadamente 400Da y aproximadamente 80kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 1kDa y aproximadamente 60kDa, y más preferiblemente entre aproximadamente 5kDa y aproximadamente 50kDa, por ej., pesos moleculares de 10kDa, 20kDa, 30kDa ó 40kDa. Moléculas de polialquilenglicol que pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención son bien conocidas en la técnica y están públicamente disponibles, por ejemplo a partir de fuentes comercialmente disponibles tales como SigmaAldrich.

60 La pegilación es una estrategia conocida para modificar las propiedades de polipéptidos terapéuticos, tales como péptidos, proteínas y anticuerpos. En general, la fijación de moléculas de PEG a polipéptidos se usa para alterar su

conformación, propiedades electrostáticas o hidrófobas, y conducir a mejoras de sus propiedades biológicas y farmacológicas, tales como aumentar la solubilidad de los fármacos, reducir la frecuencia de dosificación, modular (especialmente aumentar) la vida media en circulación, aumentar la estabilidad de los fármacos y aumentar la resistencia a la degradación proteolítica. La pegilación trabaja aumentando el peso molecular del polipéptido terapéutico conjugando el polipéptido a uno o más moléculas de polímeros PEG. Los métodos de la presente invención tienen la ventaja de que el sitio de introducción de las moléculas de PEG en un polipéptido está definido por la presencia de grupos tiol.

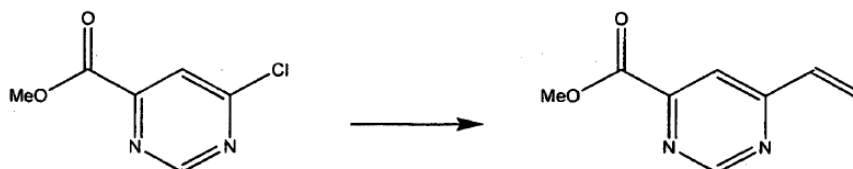
Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de ilustrar la descripción pero no caen necesariamente dentro del alcance de las reivindicaciones anejas.

Experimental



Se añadió tetrakis-(trifenilfosfina)paladio(0) (5% en moles, 62,3 mg) a una disolución de acetato de (6-cloropiridin-3-il)metilo (200 mg) en DME (10 mL) y la disolución se dejó agitar a temperatura ambiente (20 min). A continuación, se añadieron a la disolución K_2CO_3 (0,16 g, 1,1 eq.), agua (3 mL) y complejo de 2,4,6-trivinilciclotriboroxano-piridina (0,29 g, 1,1 eq.) y la mezcla resultante se calentó a reflujo (24 h). A continuación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con éter dietílico (100 mL) y el extracto se lavó con agua (30 mL). El extracto de éter dietílico se secó sobre $MgSO_4$ y a continuación se diluyó con hexano (100 mL). La disolución se filtró a través de óxido de aluminio (2 g) y el eluyente se concentró a vacío para dar un aceite amarillo. El aceite se purificó por cromatografía de gel de sílice (EtOAc 10→80%/éter de petróleo) para dar acetato de (6-vinilpiridin-3-il)metilo como un aceite incoloro (172 mg, 90%). 1H RMN, 400 MHz ($CDCl_3$): 9,16 (d, 1H, H-6, $J = 2,3$ Hz), 8,24 (dd, 1H, H-4, $J = 2,3$ y 8 Hz), 7,39 (d, 1H, H-3, $J = 8$ Hz), 6,85 (dd, 1H, H-A, $J = 11$ y 17,6 Hz), 6,33 (dd, 1H, H-C, $J = 1,2$ y 17,6 Hz), 5,61 (1H, H-B, $J = 1,2$ y 11 Hz), 4,40 (m, 2H, $-CH_2$), 1,40 (m, 3H, $-OCH_3$). ^{13}C RMN, 100 MHz ($CDCl_3$): 165,23, 159,07, 150,79, 137,56, 136,18, 124,72, 120,91, 120,62, 61,28, 14,25. ESI-HRMS, esperado para $C_{10}H_{11}NO_2 = 177,0790$. Encontrado $M+H = 178,0868$.

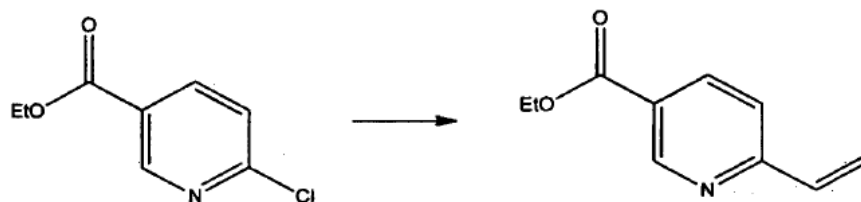


Se añadió tetrakis-(trifenilfosfina)paladio(0) (0,40 g, 5% en moles) a una disolución de 6-cloropirimidina-4-carboxilato de metilo (1,24 g) en DME (35 mL) y la disolución se dejó agitar a temperatura ambiente (20 min). A continuación, se añadieron a la disolución K_2CO_3 (1,11 g, 1,2 eq.), agua (10 mL) y complejo de 2,4,6-trivinilciclotriboroxano-piridina (1,93 g, 1,2 eq.) y la mezcla resultante se calentó a reflujo (24 h). A continuación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con éter dietílico (200 mL) y el extracto se lavó con agua (30 mL). El extracto de éter dietílico se secó sobre $MgSO_4$ y a continuación se diluyó con hexano (200 mL). La disolución se filtró a través de óxido de aluminio (6 g) y el eluyente se concentró a vacío para dar un aceite amarillo. A continuación el aceite se sometió a cromatografía de gel de sílice (EtOAc 10→100%/éter de petróleo) seguido por cromatografía en fase inversa (C18) (MeCN 40%/agua) para dar 6-vinilpirimidina-4-carboxilato de metilo como un sólido blanco (0,40 g, rendimiento 34%). 1H RMN, 270 MHz ($CDCl_3$): 9,29 (d, 1H, H-2, $J = 1,1$ Hz), 7,99 (d, 1H, H-5, $J = 1,1$ Hz), dd, 1H, H-A, $J = 10,4$ y 17,3 Hz), 6,61 (dd, 1H, H-C, $J = 1,0$ y 17,3 Hz), 5,81 (dd, 1H, H-B, $J = 1,0$ y 10,4 Hz), 4,02 (s, 3H, $-CH_3$). ^{13}C RMN, 67,5 MHz ($CDCl_3$): 164,79 (2C), 159,22 (2C), 134,71, 124,92, 117,71, 53,52. ESI-MS, esperado para ion molecular de $C_8H_8N_2O_2 = 164,0586$. Encontrado $M+H = 165,0664$.

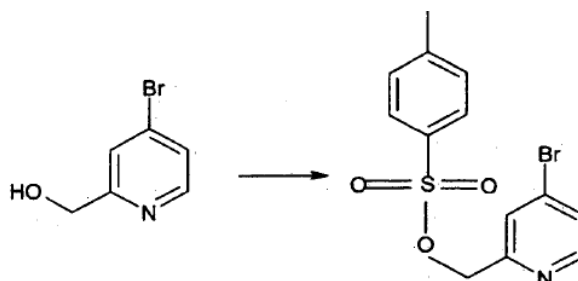


El haluro de arilo anterior (130 mg) se disolvió en 10 mL de DME, se trató con tetrakis-(trifenilfosfina)paladio (0) (10% en moles, 81,38 mg). La disolución se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió

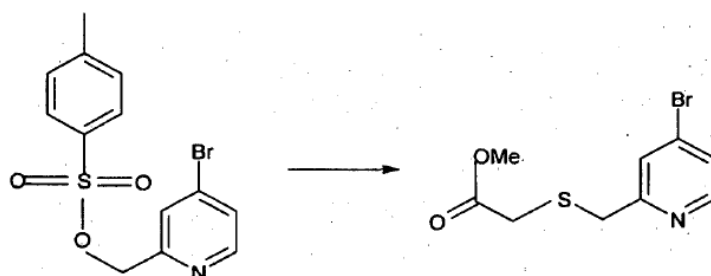
5 K_2CO_3 (1,5 eq., 146 mg) junto con agua (3 mL) y complejo de 2,4,6-trivinilciclotriboroxano-piridina (1,5 eq., 254,24 mg). La reacción se mantuvo a reflujo durante 24 horas. Se dejó que la reacción se enfriara a temperatura ambiente y se diluyó con éter dietílico (100 mL). Éste se lavó con agua (30 mL). El éter dietílico se secó sobre $MgSO_4$ y se diluyó con éter de petróleo (100 mL). La disolución se pasó a través de una columna corta de óxido de aluminio. La disolución se evaporó a sequedad y el producto bruto se purificó inicialmente por cromatografía de gel de sílice: éter de petróleo 100% a MeOH 10%/EtOAc para dar el compuesto de vinilpiridina anterior como un aceite amarillo (89 mg, rendimiento 72%). 1H RMN, 270 MHz ($CDCl_3$): 8,43 (s, 1H, H-6), 7,58 (dd, 1H, H-4, $J = 2,3$ y 8Hz), 7,29 (d, 1H, H-3, $J = 8$ Hz), 6,78 (dd, 1H, H-A, $J = 10,7$ y 17,4 Hz), 6,15 (dd, 1H, H-C, $J = 1,1$ y 17,4 Hz), 6,06 (br s, 1H, -NH), 5,46 (dd, 1H, H-B, $J = 1,1$ y 10,7 Hz), 4,37 (d, 2H, $-CH_2$, $J = 5,8$ Hz), 2,00 (s, 3H, $-CH_3$). ^{13}C RMN, 67,5 MHz ($CDCl_3$): 170,16, 155,21, 148,96, 136,54, 136,34, 121,12, 118,45, 41,02, 23,29. ESI-MS, esperado para ion molecular de $C_{10}H_{12}N_2O = 176,0950$. Encontrado $M+H = 177,1028$.



15 Se disolvieron 100 mg del haluro de arilo anterior en 5 mL de tolueno seco desgasificado. Se añadieron tributil(vinil)estaño (1,5 eq., 0,25 mL) y tetrakis-(trifenilfosfina)paladio (0) (5% en moles, 34 mg). La reacción se mantuvo a reflujo en nitrógeno 1 hora. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con 50 mL de tolueno. La reacción se filtró a través de una mezcla 1:1 de celite y KF en polvo. El filtrado se concentró. El producto bruto se resuspendió en 50 mL de EtOAc y se lavó con (1) agua y (2) disolución saturada de NaCl. El EtOAc se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se secó. El producto bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice/KF (10% en peso): EtOAc 10%/éter de petróleo a EtOAc 60%/éter de petróleo para dar el compuesto de vinil piridina anterior como cristales blancos puros (31 mg, rendimiento 33%). 1H RMN, 270 MHz ($CDCl_3$): 8,56 (d, 1H, H-6, $J = 2$ Hz), 7,65 (dd, 1H, H-4, $J = 2$ y 8 Hz), 7,34 (d, 1H, H-3, $J = 8$ Hz), 6,81 (dd, 1H, H-A, $J = 11$ y 17,3 Hz), 6,20 (dd, 1H, H-C, $J = 1,4$ y 17,3 Hz), 5,50 (dd, 1H, H-B, $J = 1,4$ y 11Hz), 5,10 (s, 2H, $-CH_2$), 2,10 (s, 3H, $-OCH_3$). ^{13}C RMN, 67,5 MHz ($CDCl_3$): 167,9, 149,62, 136,77, 136,56, 130,30, 120,96, 118,83, 63,70, 21,00. ESI-HR MS, esperado para $C_{10}H_{11}NO_2 = 177,0790$; encontrado $M+H = 178,0859$.

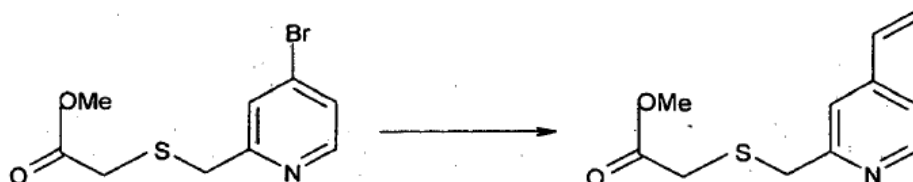


25 Se disolvió (4-bromopiridin-2-il)metanol (100 mg, 0,53 mmol) en THF seco (10 mL) y se enfrió a $0^\circ C$. Se añadieron cloruro de tosilo (2 eq., 202,8 mg, 1,06 mmol) y NaOH 1M (0,7 mL) y la reacción se agitó rápidamente durante 2 horas mientras se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se concentró, a continuación se resuspendió en 100 mL de diclorometano. Éste se extrajo con agua y salmuera. El diclorometano se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se secó. El producto bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice: acetato de etilo 10% - 50%/éter de petróleo para dar un aceite amarillo (171 mg, 94%). 1H RMN, 270 MHz ($CDCl_3$): 8,30 (d, 1 H, $J = 5,5$ Hz), 7,81 (aparentemente d, 2 H), 7,53 (dd, 1 H, $J = 0,5$ y 1,9 Hz), 7,35 -7,31 (m, 3 H), 5,10 15 (s, 2 H), 2,43 (s, 3 H). ^{13}C RMN, 67,5 MHz ($CDCl_3$): 155,4, 150,0, 145,4, 133,9, 130,1, 128,2, 126,8, 125,2, 70,9, 21,8. ESI-MS: esperado para $C_{13}H_{12}BrN_1O_3S_1 = 340,9721$ y $342,9701$. Encontrado $M+H = 341,9790$ y $343,9770$.

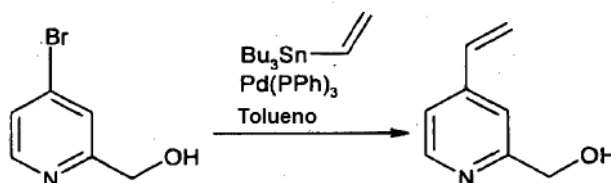


35

Se disolvió 4-metilbencensulfonato de (4-bromopiridin-2-il)metilo (170 mg, 0,50 mmol) en DMF seco (10 mL). Se añadieron carbonato de cesio (2 eq., 325,7 mg, 1,00 mmol) y tioglicolato de metilo (5 eq., 2,50 mmol, $v = 0,23$ mL) y la reacción se agitó rápidamente en nitrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se concentró, a continuación se resuspendió en diclorometano. Éste se extrajo con agua y salmuera. El diclorometano se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se secó. El producto bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice: acetato de etilo 10% - 50%/éter de petróleo para dar un aceite amarillo (99,4 mg, 72%) ^1H RMN, 270 MHz (CDCl_3): 8,35 (d, 1 H, $J = 5,2$ Hz), 7,54 (d, 1 H, $J = 2,0$ Hz), 7,34 (dd, 1 H, $J = 1,9$ y 5,2 Hz), 3,90 (s, 2 H), 3,70 (s, 3 H), 3,22 (s, 2 H). ^{13}C RMN, 67,5 MHz (CDCl_3): 170,6, 159,4, 150,3, 133,5, 126,6, 125,7, 52,6, 37,9, 32,8. ESI-MS: esperado para $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Br}_1\text{N}_1\text{O}_2\text{S}_1 = 274,9616$ y $276,9595$. Encontrado $\text{M}+\text{H} = 275,9691$ y $277,9667$.



Se disolvió 2-((4-bromopiridin-2-il)metil)tioglicolato de metilo (0,62 g, 2,25 mmol) en tolueno seco desoxygenado. Se añadieron paladio tetrakis (10% en moles, 259,6 mg, 0,22 mmol) y tributil(vinil)estaño (1,8 eq., $v = 1,18$ mL) y la reacción se mantuvo a reflujo en nitrógeno 2 horas. La reacción se dejó enfriar, a continuación se purificó por cromatografía de gel de sílice (que contenía 10% en peso de fluoruro de potasio): acetato de etilo 10% - 50%/éter de petróleo para dar un aceite amarillo (416 mg, 83%). ^1H RMN, 270 MHz (CDCl_3): 8,47 (d, 1 H, $J = 5,3$ Hz), 7,31 (s, 1 H), 7,15 (dd, 1 H, $J = 1,6$ y 5,3 Hz), 6,63 (dd, 1 H, $J = 10,7$ y 17,6 Hz), 5,96 (d, 1 H, $J = 17,6$ Hz), 5,48 (d, 1 H, $J = 10,7$ Hz), 3,92 (s, 2 H), 3,69 (s, 3 H), 3,21 (s, 2 H). ESI-MS: esperado para $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_1\text{O}_2\text{S}_1 = 223,0667$. Encontrado $\text{M}+\text{H} = 224,0720$.

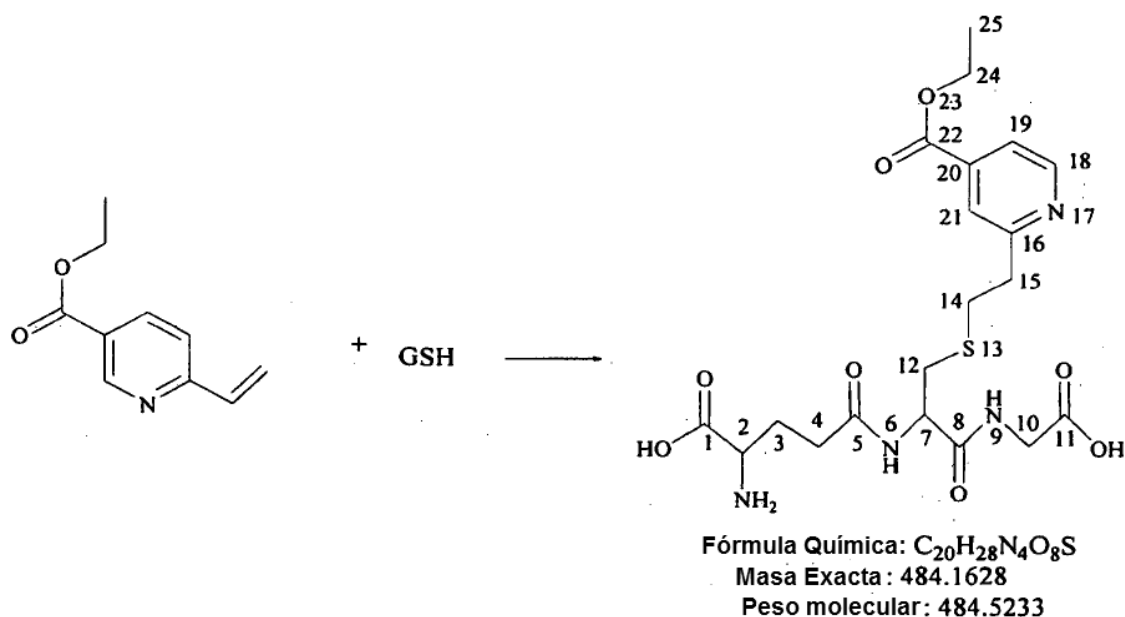


Se desoxygenó bajo argón una disolución agitada del compuesto 1 (59 mg, 0,32 mmol), tributil(vinil)estaño (0,187 mL, 0,64 mmol) y paladio tetrakis (37 mg, 0,032 mmol) en tolueno seco a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas en argón antes de dejar que se enfriara a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través celite y se concentró a vacío antes de la purificación vía cromatografía rápida (EtOAc 50%/éter de petróleo a EtOAc 100%) para dar 37 mg de producto como un aceite transparente (rendimiento 85%). ^1H RMN, 270 MHz (CDCl_3): 8,46 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz), 7,19 (dd, 2H, $J = 4,5$ y 16,6 Hz), 6,65 (dd, 1H, $J = 10,7$ y 17,6 Hz), 5,96 (d, 1H, $J = 17,6$), 5,48 (d, 1H, $J = 10,7$), 4,74 (s, 2H). ESI-MS: esperado para $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_1\text{N}_1 = 135,0684$. Encontrado $\text{M}+\text{H} = 136,0760$.

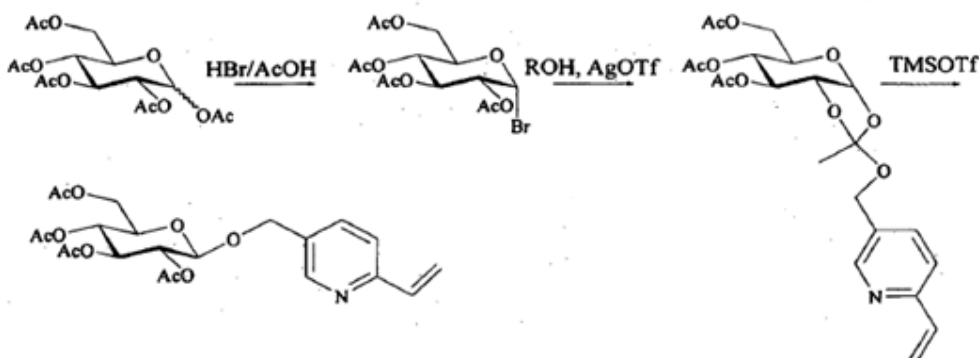
Se disolvieron 20 mg de glutatión (forma reducida) en 2 mL de agua. Se añadió 2-vinil piridina (1,2 eq., 6,3 μL). La reacción se sonicó durante un minuto, a continuación se dejó agitar durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, la disolución turbia se tornó transparente. La reacción se concentró a sequedad, se resuspendió en MeOH (10 mL) y se secó con gel de sílice. Éste se cargó en una columna de gel de sílice para purificación; EtOAc 100% a (NH_3 10%/MeOH)/EtOAc 50% para dar el producto como un polvo blanco (23 mg, rendimiento 86%). ^1H RMN, 400 MHz (D_2O): 8,29 (dd, 1H, H-18, $J = 0,8$ y 5,1 Hz), 7,66 (ddd, H-20, $J = 2,0$, 7,8 y 15,7 Hz), 7,23 (d, 1H, H-21, $J = 7,8$ Hz), 7,18 (ddd, 1H, H-19, $J = 0,8$, 5,1 y 7,8 Hz), 4,37 dd, 1H, H-7, $J = 4,7$ y 9,0 Hz), 3,60 (m, 3H, H-2 y H-10), 2,87 (m, 5-H, H-12_A, H-14_A y H-14_B, H-15_A y H-15_B), 2,65 (dd, 1H, H-12_B, $J = 9,0$ y 14,1 Hz), 2,34 (m, 2H, H-4_A y H-8), 1,92 (m, 2H, H-3_A y H-3_B). ^{13}C RMN, 100 MHz (D_2O): 176,29, 174,96, 174,20, 172,01, 159,09, 148,36, 138,23, 124,26, 122,48, 54,21, 53,10, 43,43, 36,57, 32,98, 31,50, 31,48, 26,40. ESI-MS, esperado para ion molecular de $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6\text{S} = 412,1417$. Encontrado $\text{M}+\text{H} = 413,1447$.

Se disolvieron 20 mg de glutatión (forma reducida) en 2 mL de agua. Se añadió 2-vinil piridina (1,2 eq., 6,3 μL). La reacción se sonicó durante un minuto, a continuación se dejó agitar durante dos horas a temperatura ambiente. La disolución turbia finalmente se tornó transparente. La reacción se concentró a sequedad, se resuspendió en MeOH (10 mL) y se secó con gel de sílice. Éste se cargó en una columna de gel de sílice para purificación; EtOAc 100% a (NH_3 10%/MeOH)/EtOAc 50% para dar el producto como un polvo blanco (21 mg, rendimiento 78%). ^1H RMN, 400 MHz (D_2O) 7,65 (dd, 2H, H-18 y H-20, $J = 1,6$ y 5,1 Hz), 6,63 (d, 2H, H-17 y H-21, $J = 6,3$ Hz), 3,74 (dd, 1H, H-7, $J = 4,7$ y 9,0 Hz), 2,94 (m, 3H, H-2, H-10_A y H-10_B), 2,29-2,01 (m, 6H, H-12_A, H-12_B, H-14_A y H-14_B, H15_A y H-15_B), 1,69 (t, 2H, H-4_A y H-4_B), 1,32 (q, 2H, H-3_A y H-3_B). ^{13}C RMN, 100 MHz (D_2O): 175,67, 174,35, 173,44, 171,39, 152,15, 146,75, 124,62, 53,56, 52,47, 42,81, 33,69, 32,35, 30,88, 25,70. ESI-MS, esperado para ion molecular de $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6\text{S} = 412,1417$. Encontrado $\text{M}+\text{H} = 413,1495$.

Resultados: a menos que se especifique otra cosa todas las reacciones se realizaron en tampón basado en TRIS a pH 7,5.

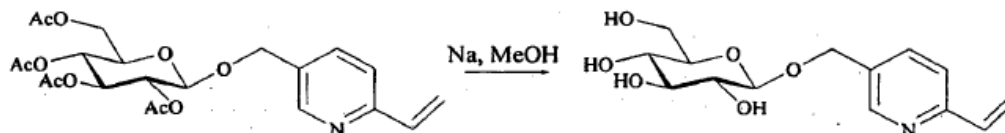


Se añadió el éster de etilo (43,2 mg) a una disolución de glutatión reducido (15 mg) y TCEP (10 mM) en agua desoxigenada (2 mL). La reacción se dejó en agitación bajo N₂ durante 48 horas. La reacción se concentró, se secó sobre sílica, y se cargó sobre una columna de gel de sílice. El producto se purificó usando (NH₃ 10%/MeOH)/EtOAc 1:4 (16 mg, rendimiento 68%). ¹H RMN, 400 MHz (D₂O): 9,00 (d, 1H, H-18, J = 2,0 Hz), 8,45 (dd, 1H, H-20, J = 2,0 y 8,2 Hz), 7,60 (d, 1H, H-21, J = 8,2 Hz), 4,43 (dd, 1H, H-7, J = 5,1 y 8,6 Hz), 4,35 (q, 2H, H-24_A y H-24_B, J = 7,0 Hz), 3,78 (s, 2H, H-10), 3,67 (aparentemente t, 1H, H-2, J = 6,7 Hz), 3,16 (m, 2H, H-15_A y H-15_B), 2,93 (m, 3H, H-12_A, H-14_A y H-14_B), 2,75 (dd, 1H, H-12_B, J = 8,6 y 13,6 Hz), 2,40 (aparentemente t, 2H, H-4), 2,03 (m, 2H, H-3), 1,30 (t, 3H, H-25, J = 7,0 Hz). ¹³C RMN, 100 MHz (D₂O): 174,76, 174,41, 173,74, 172,28, 165,94, 162,25, 147,21, 141,02, 125,74, 125,22, 62,88, 53,91, 52,95, 42,13, 35,57, 32,77, 31,14, 30,66, 26,05, 13,28. ESI-MS, esperado para ion molecular de C₂₀H₂₉N₄O₈S = 484,1628. Encontrado M-H = 483,2047.

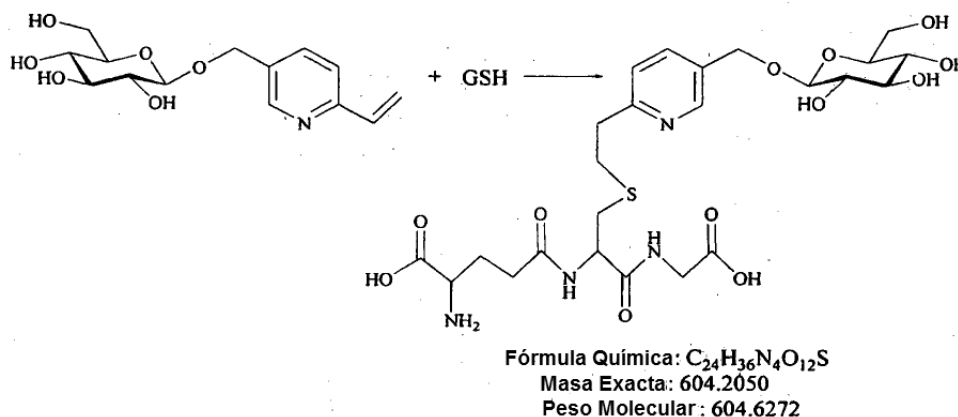


Se disolvió glucosa penta-acetato (1 g) en CH₂Cl₂ anhidro (10 mL). Se añadió lentamente HBr [(33% en ácido acético); 5 mL]. La reacción fue equipada con un tubo de secado de CaCl₂ y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante tres horas. La reacción se monitorizó por TLC. Una vez terminada, la reacción se diluyó con 100 mL de CH₂Cl₂ frío y se lavó con 1) agua fría (100 mL), 2) disolución saturada de NaHCO₃ fría y 3) disolución saturada de NaCl fría. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se secó para dejar un producto puro como una espuma blanca con rendimiento cuantitativo. El α-bromuro (100 mg) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (5 mL) y se mantuvo bajo gas N₂. A ésta se añadieron 2-vinil-5-hidroximetilpiridina (49,2 mg, 1,5 eq.), AgOTf (93,5 mg, 1,5 eq.) y tamices moleculares de 4 Å. La reacción se dejó en agitación en la oscuridad bajo N₂ durante toda la noche. La reacción se diluyó con 100 mL de CH₂Cl₂, se filtró a través de celite, a continuación se lavó con 1) disolución saturada de NaHCO₃ y 2) disolución saturada de NaCl. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se secó. El producto bruto material se purificó por cromatografía de gel de sílice (EtOAc 10%/éter de petróleo a EtOAc 100%, para dar el orto éster (82 mg, 73%). El orto éster (73 mg) se disolvió en 5 mL de CH₂Cl₂ anhidro y se enfrió a -20°C, mientras se mantenía bajo gas N₂. Se añadió lentamente TMSOTf (5 μL, 0,2 eq.) y la reacción se monitorizó cuidadosamente durante una hora por análisis de TLC. Tras finalizar, la reacción se inactivó mediante la adición de

dos gotas de Et₃N. La reacción se concentró y se purificó por cromatografía de gel de sílice para dar el glicoconjugado (23 mg, rendimiento 32%). ESI-MS: esperado para ion molecular C₂₂H₂₇NO₁₀ = 465,1635. Encontrado M+H = 466,1718.



- 5 Se añadió el glico-conjugado acetilado (20 mg) a 4 mL de metanol anhidro, bajo gas N₂. Se añadió una viruta reciente de sodio metal y la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una hora. La finalización se confirmó por análisis de TLC. La reacción se neutralizó mediante la adición de Amberlite IR 120, seguido por filtración y concentración. El producto bruto se secó sobre gel de sílice y se purificó por cromatografía de gel de sílice (MeOH 10%/EtOAc) para dar un sólido transparente (7 mg, rendimiento 55%). ESI-MS: esperado para ion molecular de C₁₄H₁₉NO₆ = 297,1212. Encontrado M+H = 298,1277.

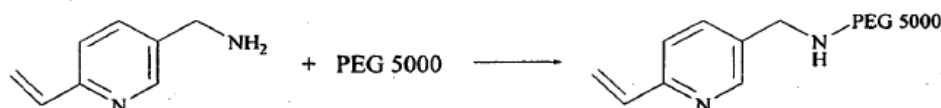


- 15 El glico-conjugado (2 mg) se disolvió en 180 uL of agua desoxigenada, que contenía TCEP 10 mM. Se añadió glutatión (forma reducida, 3,1 mg, 1,2 eq) y la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante toda la noche. La espectroscopía de masas confirmó la presencia de producto. ESI-MS: esperado para ion molecular de C₂₄H₃₆N₄O₁₂S = 604,2050. Encontrado M-H = 603,1955.

Este ejemplo confirma que los compuestos y métodos de la presente invención pueden emplearse para conjugar covalentemente un polipéptido a un grupo glicano. El ejemplo también muestra que la reacción es específica para el grupo tiol presente en glutatión y que no se producen reacciones secundarias con otros grupos funcionales tales como aminas y ácido carboxílicos.

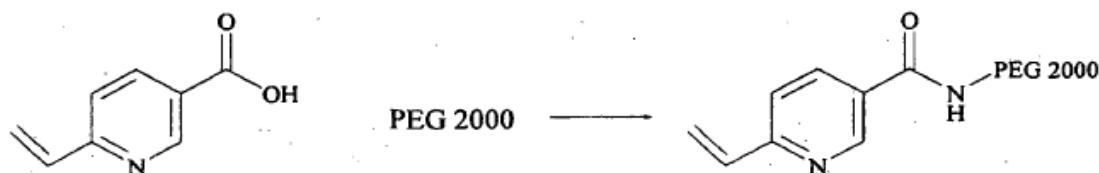


- 20 El haluro de arilo anterior (0,5 g) se disolvió en 12 mL de DME y se trató con tetrakis-(trifenilfosfina)paladio (0) (10% en moles, 0,41 g). La disolución se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió K₂CO₃ (1,5 eq., 0,73 g) junto con agua (3 mL) y complejo de 2,4,6-trivinilciclotrioxano-piridina (1,5 eq., 1,27 g). La reacción se mantuvo a reflujo durante 24 horas. Se dejó que la reacción se enfriara a temperatura ambiente, a continuación se filtró a través de celite. La mezcla de reacción se concentró, a continuación se resuspendió en 200 mL de EtOAc. Éste se lavó con agua (2 x 100 mL). Los lavados con agua se juntaron y concentraron hasta 5 mL. El concentrado se cargó en una columna C-18 de fase inversa y se eluyó con MeOH/H₂O 1/10. Las fracciones relevantes se juntaron y se liofilizaron para dar el producto como un sólido blanco (188 mg, rendimiento 40%). ESI -MS: esperado para ion molecular de C₈H₁₀N₂ = 134,0844. Encontrado M+H = 135,0922.



30

5 El mPEG-SK-COOH (100 mg) se co-evaporó con tolueno anhidro (3 x 25 mL), a continuación se dejó que se seque con la bomba de alto vacío funcionando durante 2 horas. Subsecuentemente, el PEG se disolvió en 5 mL de DMF anhidro en condiciones inertes. Se añadieron la amina aromática (13,4 mg, 5 eq.), PyBOP (52,1 mg, 5 eq.) y DIPEA (0,05 mL). La reacción se dejó en agitación bajo N₂ gas a 30°C durante toda la noche. La reacción se concentró y co-evaporó a continuación con tolueno (4 x 25 mL). El material bruto se suspendió en etanol caliente, a continuación se dejó en el congelador a -20°C durante una hora lo cual dio lugar a la precipitación del PEG-conjugado. La mezcla se filtró y lavó con etanol frío. El producto blanco céreo (31 mg) se dejó secar en la bomba de alto vacío durante dos horas.



10 El mPEG-2K-NH₂ (100 mg) se co-evaporó con tolueno anhidro (3 x 25 mL) y se dejó a continuación que se seque con la bomba de alto vacío funcionando durante 2 horas. Subsecuentemente, el PEG se disolvió en 5 mL de DMF anhidro en condiciones inertes. Se añadieron la amina aromática (37,3 mg, 5 eq.), PyBOP (130,1 mg, 5 eq.) y DIPEA (0,05 mL). La reacción se dejó en agitación bajo N₂ gas a 30°C durante toda la noche. La reacción se concentró y co-evaporó a continuación con tolueno (4 x 25 mL). El material bruto se suspendió en CH₂Cl₂ y se purificó por cromatografía de gel de sílice (CH₂Cl₂ 100% a MeOH 15%/CH₂Cl₂). Las fracciones relevantes se juntaron y concentraron para dar el producto como un sólido transparente (52 mg).

Estos ejemplos confirman que los compuestos y métodos de la presente invención pueden emplearse para conjugar covalentemente un polipéptido a moléculas de PEG de una manera específica.

Velocidades relativas de reacción de una gama de agentes enlazantes con glutatión.

20 Se añadió una disolución de la vinil piridina o de la vinil pirimidina (1,2 eq.) en 200 uL de DMSO deuterado a una disolución de glutatión reducido (6-10 mg) en D₂O (800 uL) a pH 7,0 en un tubo de RMN. Una vez mezclados, el tubo se transfirió rápidamente al espectrómetro de RMN. Se reajustaron el cierre y las cuñas (1-2 min). Se adquirieron espectros continuamente durante el tiempo de reacción designado (16-32) barridos por punto de datos, con un espectrómetro Varian Mercury (400MHz). Las velocidades de reacción relativas fueron determinadas midiendo la pérdida de intensidad de la señal de los protones vinílicos (δ 6,6-6,9 ppm) en el tiempo.

Marcado de IFN-beta recombinante de ser humano con derivado vinilpiridina-PEG frente a maleimida-PEG

30 Se llevó a cabo una reacción para comparar el marcado del polipéptido interferón beta con un conjugado PEG-piridina según la presente invención y el uso de PEG y del agente de reticulación de la técnica anterior maleimida. Se hizo reaccionar interferón beta recombinante (C17S, D80N) con PEG-piridina o PEG-maleimida. Interferón beta-1 de ser humano, fibroblastos (Origene Technologies) mutados en C17S para separar la cisteína libre endógena y D80C para reemplazar el sitio endógeno de glicosilación por mutagénesis dirigida al sitio (Stragene Quickchange). El interferón beta recombinante se redujo con TECP 0,1 mM durante 12 h seguido por reacción con PEG/piridina o PEG/maleimida en el momento especificado en el diagrama a pH 7,5, 37°C. Las proteínas se resolvieron usando SDS-PAGE y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se sondearon con anticuerpo anti-interferón b para determinar el IFN β sin reaccionar y el pegilado. La reacción secundaria del anticuerpo se detectó usando un sistema de detección ECL (Amershan, GE Healthcare). En ambos casos, la molécula de PEG tuvo un peso molecular de 5kD. Los resultados se muestran en la Figura 2 y muestran que el uso del conjugado de la presente invención condensó una media de un PEG conjugado al interferón beta, aumentando el peso molecular de aproximadamente 20kD a 25kD, que aumentó con el tiempo de reacción. En contraste, la reacción con maleimida fue significativamente menos específica y condujo a la conjugación de múltiples moléculas de PEG al interferón beta.

Efecto del pH sobre la tasa de marcado de BSA con vinilpiridina-SkPEG

45 Se investigó la dependencia del pH de albúmina de suero bovino (Sigma) funcionalizada con PEG 5kD/piridina. Se redujo BSA con DTT 1 mM a 4°C durante 12 h seguido por reacción con PEG 5kD/piridina a temperatura ambiente en el momento indicado. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Commassie para verlas.

50 Los resultados de la Figura 3 se obtuvieron a pH 5,5 y 7,5 y muestran que la reacción de conjugación transcurre a ambos pHs, pero es más rápida a pH 7,5. Esto se ha confirmado en otros experimentos que muestran que la reacción puede usarse en un amplio intervalo de pH, incluyendo el intervalo de pH fisiológico relevante para la bioquímica de las proteínas. Los resultados también muestran que el pH puede ser usado para controlar la velocidad de la reacción de conjugación.

Dependencia con la temperatura de la reacción de PEG 5kD/piridina con IFN beta recombinante (C17S, N80C).

Se trató IFN beta mutante con reactivo 5mM PEG 5kDa - vinil piridina a pH 7, a las temperaturas indicadas. Se tomaron partes alícuotas en momentos indicados y la reacción se inactivó por adición de DTT. Las proteínas se resolvieron usando SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se sondearon con anticuerpo anti-interferón beta para determinar el IFN-beta sin reaccionar y el pegilado. La reacción secundaria del anticuerpo se detectó usando un sistema de detección ECL (Amershan, GE Healthcare). Los resultados se presentan en la Figura 4.

Reacciones de funcionalización de proteínas

Condiciones de reacción

La proteína se diluyó (5 mg/mL) en tampón de reacción desoxigenado ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$, 20 mM, pH 5,5) y se redujo en nitrógeno 3 horas con hidrocloreuro de tris-(carboxietil)-fosfina (TCEP, 5 mM) o β -mercaptoetilamina (BMEA, 5 mM). El agente reductor en exceso se separó subsecuentemente mediante tres rondas de ultrafiltración (Milipore centricons, peso molecular de corte 10 kDa) o dos rondas de diálisis (membrana de acetato de celulosa, peso molecular de corte 6 - 8 kDa). Se preparó una disolución 10 veces concentrada de PEG en el tampón de reacción y se añadió a la disolución de proteína para dar la mezcla de reacción que contenía la proteína (1 mg/mL) más 1,5 a 5 equivalentes molares de PEG cuando se requirió. La mezcla se incubó en un tubo sellado durante toda la noche (37°C).

FPLC

La mezcla de reacción se diluyó 5 a 10 veces con $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$ 10 mM, pH 4,5. La muestra se cargó en una columna de intercambio de iones SP-sefarosa pre-equilibrada con 3 volúmenes de columna de tampón enlazante ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$ 1,0 mM, pH 4,5). Después de lavarse para eliminar las fracciones no enlazadas (3 volúmenes de columna de tampón enlazante) la proteína se eluyó con un gradiente salino lineal (NaCl 50-200 mM, $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$ 10 mM, pH 4,5) y se recogieron fracciones de 1,5 mL. Las fracciones que contenían la proteína se analizaron por electroforesis de gel.

Análisis SDS PAGE

El grado de PEGilación de la proteína se evaluó por electroforesis de gel. Típicamente, se diluyeron muestras de proteína (1-10 ug) con colorante de carga que contenía ditiotreitól (DTT) 1 mM y se hirvieron durante 3 minutos para desnaturalizar antes de la carga en un gel NUPAGE BisTris 4-12% (Invitrogen). Para detectar la proteína se usó tinción con azul de Coomassie (azul) y Dragendorm (yodobismutato) para visualizar los polietilenglicoles (naranja-marrón).

Funcionalización de una proteína modelo con PermaLink

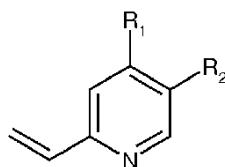
Se escogió una proteína modelo, mutante (BcxS22C) de xilanas de *Bacillus circulans* (S22C), para ilustrar cómo los polipéptidos pueden ser funcionalizados con moléculas de glicano o de PEG de acuerdo con la presente invención usando los reactivos funcionalizantes Permalink. En la Figura 5 se dan detalles de los experimentos, en la cual se muestra: (A) La estructura de PL-LK-07. (B) Una disolución de BcxS22C (5 mg/mL) en tampón de acetato de sodio desoxigenado (20 mM, pH 5,5) se redujo durante 3 horas con hidrocloreuro de tris-(carboxietil)fosfina (TCEP, 5 mM). El agente reductor en exceso se separó subsecuentemente mediante tres rondas de ultrafiltración (Milipore centricons, peso molecular de corte 10 kDa). El PEG (1,5 eq) se añadió a la disolución de proteína (1 mg/mL) y se incubó durante toda la noche (37°C). La proteína pegilada se recuperó de la mezcla de reacción vía cromatografía de líquidos usando una columna de intercambio de cationes Sepharose SP. La muestra se diluyó cinco veces y se cargó en la columna pre-equilibrada en tampón enlazante (acetato de sodio 1,0 mM, pH 4,5). El producto se eluyó con un gradiente salino lineal (NaCl 50-200 mM en tampón enlazante) y se recogieron fracciones de 1,5 mL. (C) Las fracciones que contenían la proteína según mostró la absorbancia UV a 280 nm se analizaron por SDS PAGE. Ésta muestra que los compuestos de vinilpiridina son reactivos efectivos para la fijación de polietilenglicol (PEG) a residuos de cisteína de proteínas, y que pueden obtenerse los productos de tales reacciones con alta pureza.

Especificidad del reactivo funcionalizante por los grupos tiol de residuos de cisteína

Ya que una de las desventajas de la química de los agentes enlazantes basados en maleimida es la falta de especificidad en la reacción, los reactivos funcionalizantes de la presente invención se ensayaron para determinar su especificidad por los residuos de cisteína y los resultados se dan en la Figura 6. Para calibrar la especificidad del agente enlazante por los residuos de cisteína se usó una muestra de Bcx tipo natural que no tenía ningún residuo de cisteína. En primer lugar, esta proteína se redujo con hidrocloreuro de tris-(carboxietil)-fosfina (TCEP, 5 mM) en tampón de acetato de sodio (20 mM, pH 5,5) durante 3 horas. Después de este tiempo el agente reductor residual se eliminó mediante tres rondas de ultrafiltración (Milipore centricons peso molecular de corte 10 kDa). La disolución de proteína concentrada resultante se diluyó a 1,2 mg/mL en el tampón relevante (50 mM, tampón de citrato pH 3, tampón de acetato pH 6, tampón tris pH 9). Se añadió una disolución de PEG (5 eq) a la proteína para dar una concentración final de proteína de 1 mg/mL. Las reacciones se incubaron durante toda la noche (16 horas, 37°C). La cantidad de producto PEGilado se calculó tratando muestras de reacción en un sistema SDS PAGE 4 - 12%. Esto muestra que, en comparación con los reactivos de maleimida, los reactivos de vinilpiridina muestran una mayor especificidad hacia el grupo sulfidril de residuos de cisteína respecto a los otros aminoácidos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para modificar un polipéptido que al menos tiene un grupo tiol reactivo, método que comprende poner en contacto el polipéptido con un reactivo funcionalizante el cual comprende un anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno que tiene un sustituyente vinílico capaz de reaccionar con el al menos un grupo tiol del polipéptido, donde el reactivo funcionalizante está covalentemente enlazado a una molécula de poli(etilen glicol), de modo que el sustituyente vinílico del reactivo funcionalizante reaccione con el grupo tiol del polipéptido, para de este modo enlazar covalentemente la molécula de poli(etilen glicol) al polipéptido, en donde el reactivo funcionalizante está representado por una de las fórmulas generales:



10 en donde:

al menos R_1 , y opcionalmente R_2 , están covalentemente enlazados a una molécula de poli(alquilen glicol);

y además donde:

R_1 , y opcionalmente R_2 , se seleccionan independientemente de:

15 $-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-C(O)R$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-R$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

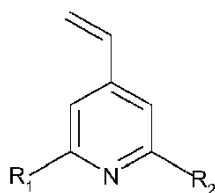
$-(CO)-Z-(CH_2)_o-R$, donde Z es O, S o NH, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

20 $-(CH_2)_n-Z-C(O)-(CH_2)_o-R$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-Y-(CH_2)_n-Z-C(O)-(CH_2)_o-R$, donde Y es un grupo arilo, O, S o NH, Z es O o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-Y-R$, donde Y es O o S, R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol), arilo o alquilo de C_{1-10} ;

25 o



en donde:

al menos R_1 , y opcionalmente R_2 , están covalentemente enlazados a una molécula de poli(alquilen glicol);

y además donde:

30 R_1 , y opcionalmente R_2 , se seleccionan independientemente de:

$-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-C(O)R$, donde Z es S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-R$, donde Z es S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

35 $-(CO)-Z-(CH_2)_o-R$, donde Z es S o NH, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-(CH_2)_n-Z-C(O)-(CH_2)_o-R$, donde Z es S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

-Y-(CH₂)_n-Z-C(O)-(CH₂)_o-R, donde Y es un grupo arilo, S o NH, Z es O o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol); o

-Y-R, donde Y es S, R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol), arilo o alquilo de C₁₋₁₀;

5 con la condición de que cuando R₂ no esté unido a una molécula de polialquilenglicol, puede adicionalmente seleccionarse de hidrógeno o un grupo aceptor de electrones, tal como halógeno (F, Cl, o Br), -NO₂, -CO₂H, -CO₂R₄, COR₄, -CHO, -CN, -CF₃, -SO₂NR₄R₅, alquilo o fenilo, en los que R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de hidrógeno o alquilo de C₁₋₁₀;

10 2. El método de la reivindicación 1, que además comprende la etapa inicial de hacer reaccionar un reactivo funcionalizante precursor que comprende un anilolo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno que tiene un sustituyente vinílico con la molécula de poli(alquilen glicol) para producir el reactivo funcionalizante, en donde la estructura de poli(alquilen glicol) comprende un grupo funcional amino o ácido carboxílico.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que además comprende:

(a) determinar la localización del grupo reactivo tiol en el polipéptido, y proteger opcionalmente algunos de ellos; y/o

15 (b) la etapa inicial de modificar un polipéptido padre mediante reacción química o mediante mutagénesis dirigida al sitio para producir un polipéptido variante que comprende un grupo tiol en una o más posiciones deseadas del polipéptido.

4. El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el hgrupo tiol está presente en un resto de cisteína.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

20 (a) uno de R₁ o R₂ comprende una molécula de poli(alquilen glicol) o ambos de R₁ y R₂ comprenden una molécula de poli(alquilen glicol); y/o

(b) los grupos R₁ y/o R₂ para unir la molécula de poli(alquilen glicol) al anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno se seleccionan independientemente de -(CH₂)_n-Z-(CH₂)_o-R o -C(O)-Z-(CH₂)_o-R; y/o

(c) en los grupos R₁ y R₂, o escero y los grupor se pueden representar como -(CH₂)_n-Z-R o -C(O)-Z-R.

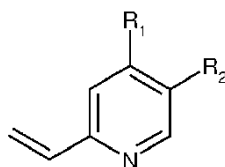
25 6. El método de unacualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(a) el grupo de molécula de poli(alquilen glicol) tiene un peso molecular entre 400Da y 80kDa y/o

(b) la molécula de poli(alquilen glicol) está conjugada al polipéptido para modificar una propiedad farmacológica del polipéptido, tal como la estabilidad, la vida media biológica, la solubilidad en agua y/o las características inmunológicas del polipéptido.

30 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el polipéptido es una eritropoyetina, un interferón, una interleuquina, una quimioquina, una linfoquina, una citoquina, insulina, un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo, un factor coagulante de la sangre, un factor estimulante de colonias, una hormona del crecimiento, un activador del plasminógeno, un péptido producido víricamente, una hormona reproductiva, una enzima terapéutica o una proteína portadora para una vacuna conjugada.

35 8. Un compuesto para funcionalizar un polipéptido con una molécula de poli(etilen glicol) representada por una de las fórmulas generales:



en donde:

40 al menos R₁, y opcionalmente R₂, están covalentemente enlazados a una molécula de poli(alquilen glicol);

y además donde:

R₁, y opcionalmente R₂, se seleccionan independientemente de:

$-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-C(O)R$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-R$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

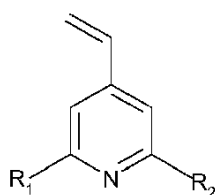
5 $-(CO)-Z-(CH_2)_o-R$, donde Z es O, S o NH, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-(CH_2)_n-Z-C(O)-(CH_2)_o-R$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

10 $-Y-(CH_2)_n-Z-C(O)-(CH_2)_o-R$, donde Y es un grupo arilo, O, S o NH, Z es O o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-Y-R$, donde Y es O o S, R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol), arilo o alquilo de C_{1-10} ;

o



en donde:

15 al menos R₁, y opcionalmente R₂, están covalentemente enlazados a una molécula de poli(alquilen glicol);

y además donde:

R₁, y opcionalmente R₂, se seleccionan independientemente de:

$-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-C(O)R$, donde Z es O, S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

20 $-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-R$, donde Z es S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-(CO)-Z-(CH_2)_o-R$, donde Z es S o NH, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

25 $-(CH_2)_n-Z-C(O)-(CH_2)_o-R$, donde Z es S o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno o una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-Y-(CH_2)_n-Z-C(O)-(CH_2)_o-R$, donde Y es un grupo arilo, S o NH, Z es O o NH, n es 0 a 10, o es 0 a 10 y donde R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol); o

$-Y-R$, donde Y es S, R es un hidrógeno, una molécula de poli(alquilen glicol), arilo o alquilo de C_{1-10} ;

30 con la condición de que cuando R₂ no esté unido a una molécula de poli(alquilen glicol), puede adicionalmente seleccionarse de hidrógeno o un grupo aceptor de electrones, tal como halógeno (F, Cl, o Br), -NO₂, -CO₂H, -CO₂R₄, COR₄, -CHO, -CN, -CF₃, -SO₂NR₄R₅, alquilo o fenilo, en los que R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de hidrógeno o alquilo de C_{1-10} ;

9. El compuesto de la reivindicación 8, en donde:

35 (a) uno de R₁ o R₂ comprende una molécula de poli(alquilen glicol) o ambos R₁ y R₂ comprenden una molécula de poli(alquilen glicol); y/o

(b) los grupos R₁ y/o R₂ para unir la molécula de poli(alquilen glicol) al anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno se seleccionan independientemente de $-(CH_2)_n-Z-(CH_2)_o-R$ o $-C(O)-Z-(CH_2)_o-R$; y/o

(c) en los grupos R₁ y R₂, o es cero y el grupo puede representarse como $-(CH_2)_n-Z-R$ o $-C(O)-Z-R$.

40 10. Un conjugado, formado por la reacción de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 y uno o más grupos tiol de un polipéptido.

11. Un conjugado, formado por la reacción de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 y uno o más grupos tiol de un polipéptido, para uso en un método de tratamiento médico.
12. El conjugado para uso en un método de tratamiento según la reivindicación 11, en donde el tratamiento es terapia o diagnóstico.
- 5 13. El conjugado para uso en un método de tratamiento según la reivindicación 11, en donde el conjugado es una vacuna.

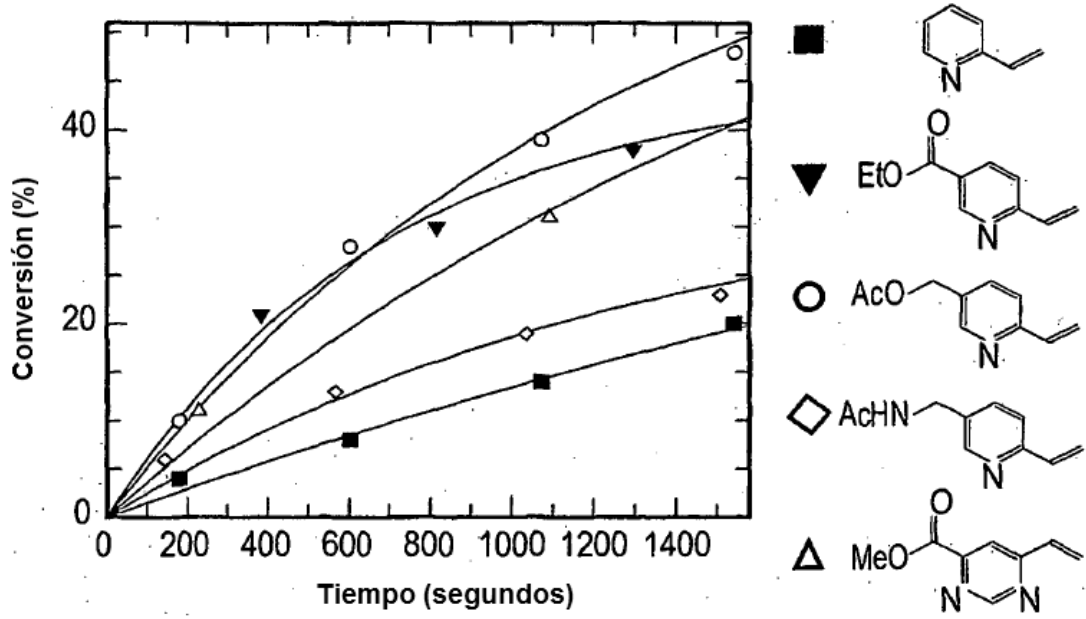


FIG. 1

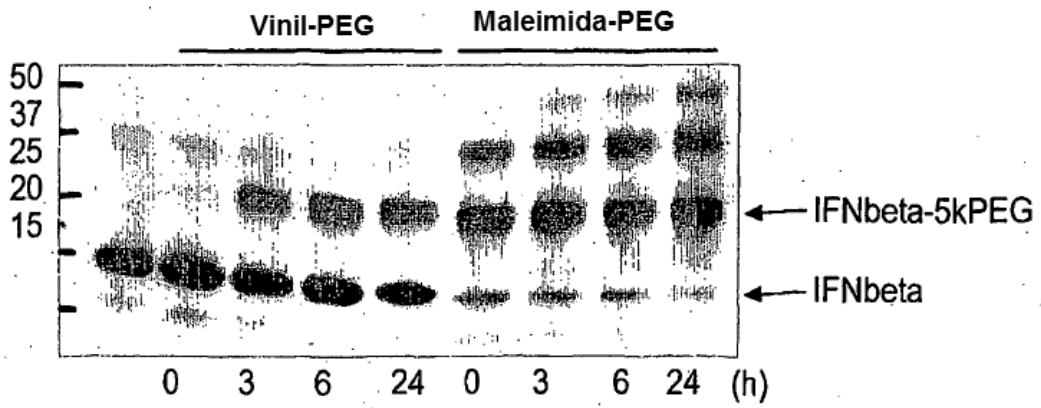


FIG. 2

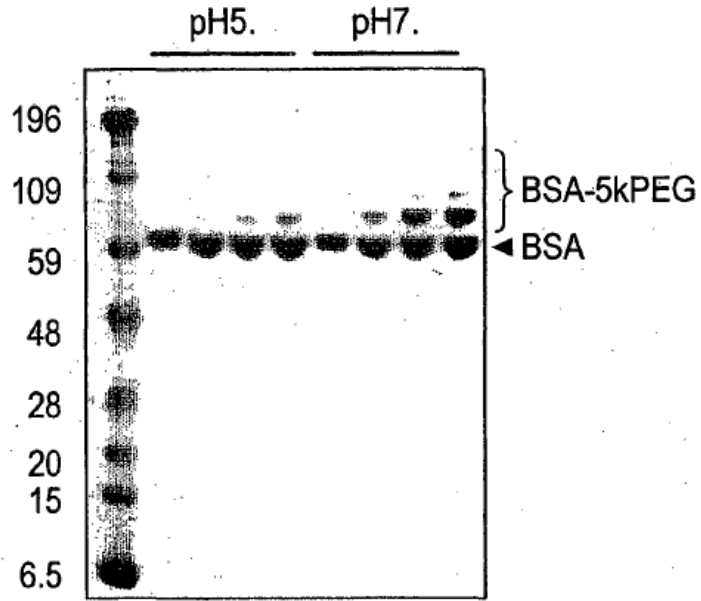


FIG. 3

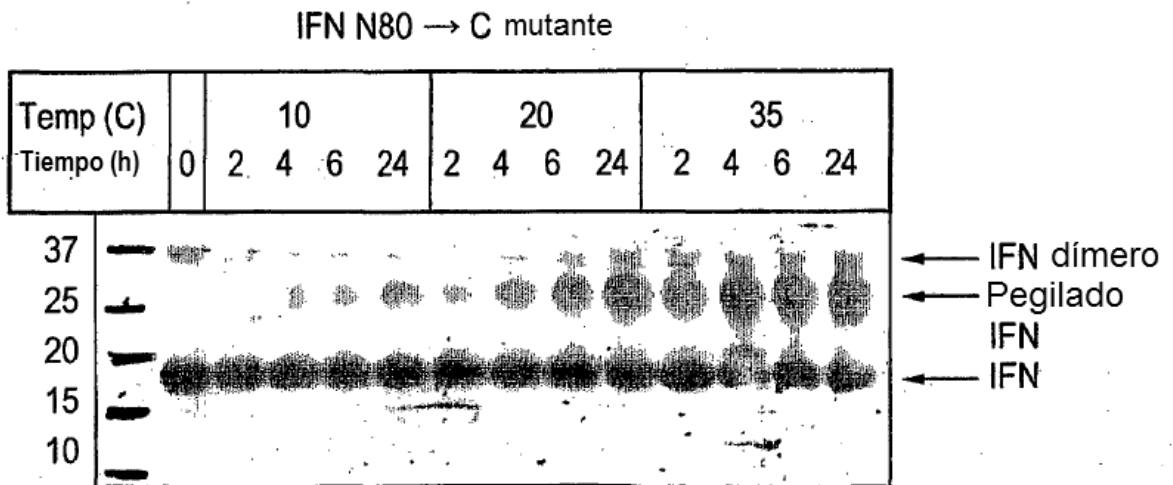


FIG. 4

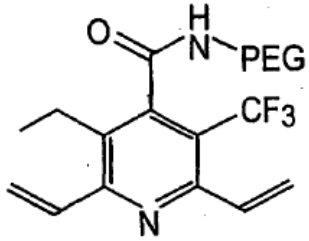


FIG. 5A

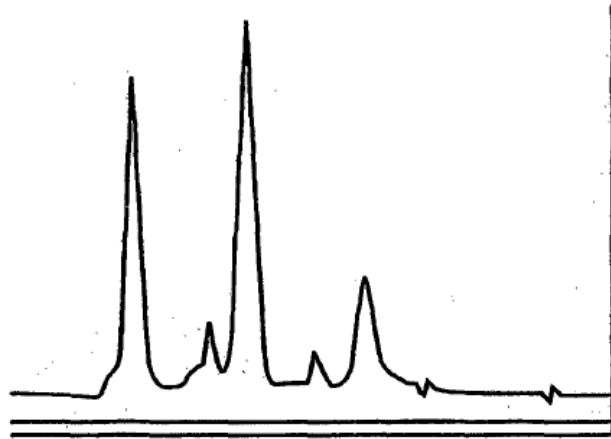


FIG. 5B

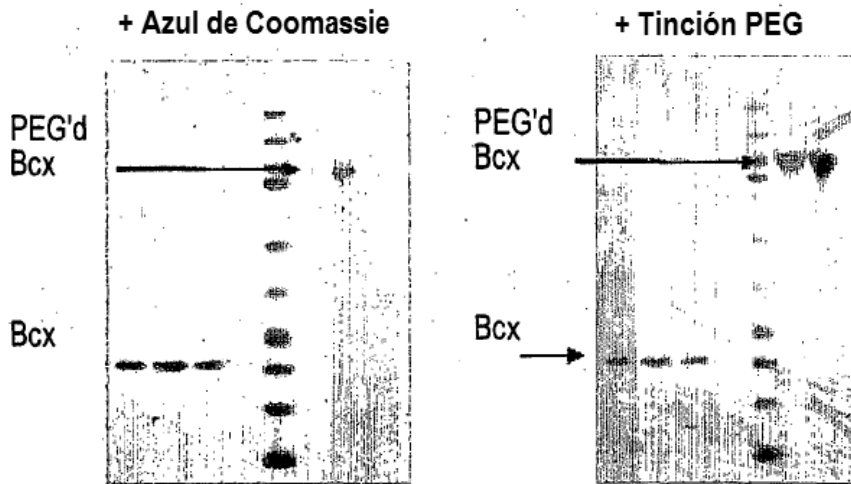


FIG. 5C

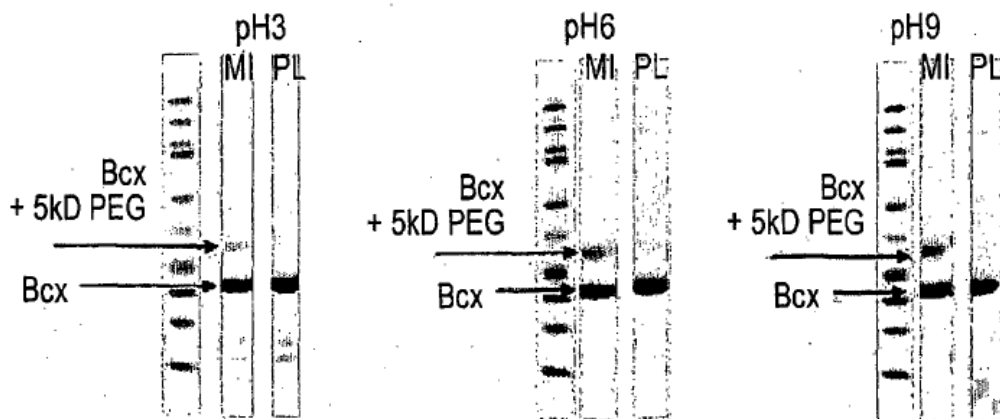


FIG. 6