

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 801**

51 Int. Cl.:

A61K 38/31 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 51/06 (2006.01)
C08L 71/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2003 E 15203017 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3025726**

54 Título: **Compuestos de polímero de polialquileno y usos de los mismos**

30 Prioridad:

18.01.2002 US 349917 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.07.2020

73 Titular/es:

**BIOGEN MA INC. (100.0%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**LIN, KOCHUNG;
PEPINSKY, R. BLAKE;
CHEN, LING LING;
HESS, DONNA M.;
LIN, EDWARD Y.;
PETTER, RUSSELL C. y
BAKER, DARREN P.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 774 801 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

Compuestos de polímero de polialquileno y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

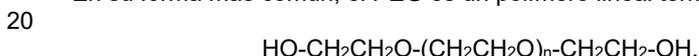
La invención se refiere a nuevos compuestos de polialquilenglicol, a conjugados de los polímeros y proteínas y a usos de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

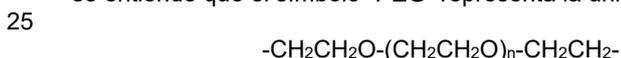
La unión covalente de polímeros hidrófilos, tales como polímeros de polialquilenglicol, también conocidos como óxidos de polialquileno, a moléculas y superficies biológicamente activas es interesante en biotecnología y medicina.

15 En particular, gran parte de la investigación se ha centrado en el uso de conjugados de poli(etilenglicol) (PEG), también conocido como poli (óxido de etileno) (PEO), para aumentar la solubilidad y estabilidad y para prolongar la vida media en la circulación sanguínea de moléculas.

En su forma más común, el PEG es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo:



El polímero anterior, alfa-, omega-dihidroxi poli(etilenglicol), también puede representarse como HO-PEG-OH, donde se entiende que el símbolo -PEG- representa la unidad estructural siguiente:



en donde n varía típicamente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10.000. PEG se usa comúnmente como metoxi-PEG-OH, o mPEG, en donde un extremo es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras el otro extremo es un grupo hidroxilo que se somete a modificación química terminal fácil. Además, los copolímeros aleatorios o en bloque de diferentes óxidos de alquileno (por ejemplo, óxido de etileno y óxido de propileno) que están muy relacionados con PEG en su química pueden ser sustituidos por PEG en muchas de sus aplicaciones.

30

Para acoplar PEG a una molécula de interés, frecuentemente es necesario activar el PEG preparando un derivado del PEG que tiene un grupo funcional reactivo al menos en un extremo. El grupo funcional se elige tomando como base el tipo de grupo reactivo disponible en la molécula que se va a acoplar al PEG.

35

El PEG es un polímero que tiene las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, ausencia de toxicidad, y ausencia de inmunogenicidad. Un uso de PEG es unir covalentemente el polímero a moléculas insolubles para hacer que el "conjugado" PEG-molécula resultante sea soluble. Por ejemplo, se ha mostrado que el fármaco insoluble en agua paclitaxel, cuando se acopla a PEG, se vuelve soluble en agua. Greenwald, *et al.*, *J. Org. Chem.*, 60: 331-336 (1995).

40

El enfoque de profármaco, en donde los fármacos se liberan por degradación de moléculas más complejas (profármacos) en condiciones fisiológicas, es un componente poderoso de la administración de fármacos. Los profármacos pueden formarse, por ejemplo, uniendo PEG a fármacos mediante uniones que son degradables en condiciones fisiológicas. La vida útil de los profármacos PEG *in vivo* depende del tipo de grupo o grupos funcionales que forman las uniones entre PEG y el fármaco. En general, las uniones éster, formadas por la reacción de PEG ácidos carboxílicos o PEG ácidos carboxílicos activados con grupos alcohol en el fármaco se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el fármaco, mientras las uniones amida y carbamato, formadas a partir de grupos amino en el fármaco, son estables y no se hidrolizan para liberar el fármaco libre. Se ha mostrado que la administración hidrolítica de fármacos de PEG ésteres puede controlarse favorablemente hasta un determinado grado controlando el número de grupos metileno de unión en un espaciador entre el oxígeno de PEG terminal y el grupo carbonilo del ácido carboxílico o derivado de ácido carboxílico unido. Por ejemplo, Harris *et al.*, en la Patente de EE.UU. N.º 5.672.662, describen PEG ácido butanoico y PEG ácido propanoico, y derivados activados de los mismos, como alternativas a PEG carboximetilo para compuestos en donde es deseable una reactividad hidrolítica menor en los derivados éster correspondientes. Véase, generalmente, la publicación PCT WO 01/46291.

50

Un factor que limita la utilidad de las sustancias proteicas para aplicaciones en el tratamiento médico es que, cuando de administran parenteralmente, se eliminan del cuerpo en poco tiempo. Esta eliminación puede ocurrir como un resultado de la degradación por proteasas o por aclaramiento usando rutas normales para la eliminación de proteínas tales como por filtración en los riñones. La administración oral de estas sustancias es incluso más problemática ya que, además de la proteólisis en el estómago, la alta acidez del estómago destruye estas sustancias antes de que alcancen su tejido diana pretendido. Los problemas asociados con estas rutas de administración de proteínas son muy conocidos en la industria farmacéutica, y se están empleando varias estrategias con el intento de solventarlos. Se ha publicado un gran volumen de trabajo relativo a la estabilización de proteínas. Se conocen varias rutas de

60

65

conjugación de proteínas con materiales poliméricos, incluyendo el uso de dextranos, polivinil pirrolidonas, glicopéptidos, polietilenglicol, y poliaminoácidos. Se reporta que los polipéptidos conjugados resultantes retienen sus actividades biológicas y solubilidad en agua para aplicaciones parenterales.

5 Es particularmente interesante aumentar la actividad biológica de los interferones a la vez que se reduce la toxicidad implicada con el uso de estas proteínas para tratar a pacientes humanos. Los interferones son una familia de proteínas y glicoproteínas pequeñas naturales producidas y secretadas por la mayor parte de las células nucleadas en respuesta a infección vírica así como a otros estímulos antigénicos. Los interferones vuelven a las células resistentes a la infección vírica y presentan una amplia variedad de acciones en las células. Ejercen sus actividades celulares uniéndose a receptores de membrana específicos en la superficie celular. Una vez unidos a la membrana celular, los interferones inician una secuencia compleja de eventos intracelulares. Los estudios *in vitro* han demostrado que éstos incluyen la inducción de determinadas enzimas; supresión de la proliferación celular, actividades de inmunomodulación tales como aumento de la actividad fagocítica de macrófagos; aumento de la citotoxicidad específica de linfocitos para células diana; e inhibición de la replicación de virus en células infectadas con virus.

15 Los interferones se han ensayado en el tratamiento de una diversidad de estados patológicos clínicos. El uso de interferón beta humano se ha establecido en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Dos formas de interferón beta recombinante se han aprobado recientemente en Europa y los EE.UU. para el tratamiento de esta enfermedad: interferón-beta-1a (AVONEX®, Biogen Inc., Cambridge MA y REBIF®, Serono, Ginebra, Suiza) e interferón-beta-1b (BETASERON®, Berlex, Richmond, CA). El interferón beta-1a se produce en células de mamífero usando la secuencia génica humana natural y está glicosilado, mientras el interferón beta-1b se produce en bacterias *E. coli* usando una secuencia génica humana modificada que contiene una sustitución cisteína a serina preparada por ingeniería genética en la posición de aminoácido 17 y no está glicosilado.

25 Se sabe que los interferones no inmunológicos, que incluyen tanto interferones alfa como beta, suprimen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tanto en células infectadas de forma aguda como crónica. Véase, Poli y Fauci, 1992, AIDS Research and Human Retroviruses 8(2):191-197. Debido a su actividad antivírica, los interferones, en particular interferones alfa, han recibido una atención considerable como agentes terapéuticos en el tratamiento de la enfermedad relacionada con el virus de la hepatitis C (VHC). Véase Hoofnagle et al., en: Viral Hepatitis 1981 International Symposium, 1982, Filadelfia, Franklin Institute Press; Hoofnagle et al., 1986, New Eng. J. Med. 315:1575-1578; Thomson, 1987, Lancet 1:539-541 Kiyosawa et al., 1983, en: Zuckerman, ed., Viral Hepatitis and Liver Disease, Allen K. Liss, Nueva York p. 895-897; Hoofnagle et al., 1985, Sem. Liv. Dis., 1985, 9:259-263.

35 Los conjugados interferón-polímero se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N.º 4.766.106, Pat. de EE.UU. N.º 4.917.888, Solicitud de Patente Europea N.º 0 236 987, Solicitud de Patente Europea N.º 0 510 356 y Publicación de Solicitud Internacional N.º WO 95/13090. El documento WO 00/23114 describe conjugados de polímero de interferón beta-1a y usos de los mismos.

40 La hepatitis C crónica es una enfermedad insidiosa y de progresión lenta que tiene un impacto significativo en la calidad de vida. A pesar de la mejora en la calidad de la reserva de donantes de sangre y la reciente implementación de ensayo de sangre donada para VHC, la incidencia estimada de infección agua entre las personas que reciben transfusiones es del 5 al 10 %. Véase Alter et al., en: Zuckerman, ed., Viral Hepatitis and Liver Disease, Allen K. Liss, Nueva York, 1988, p. 537-542. Así, de los aproximadamente 3 millones de personas que reciben transfusiones en los Estados Unidos cada año, la hepatitis C aguda se desarrollará en aproximadamente 150.000. Aunque muchos pacientes que contraen hepatitis C tendrán enfermedad subclínica o suave, aproximadamente el 50 % progresarán a un estado de enfermedad crónica caracterizado por anomalías en transaminasa séricas fluctuantes y lesiones inflamatorias en biopsia hepática. Se estima que la cirrosis se desarrollará en hasta aproximadamente el 20 % de este grupo. Véase Koretz et al., 1985, Gastroenterology 88:1251-1254.

50 Se sabe que los interferones afectan a una diversidad de funciones celulares, incluyendo replicación de ADN, y síntesis de ARN y proteínas, tanto en células normales como anormales. Así, los efectos citotóxicos del interferón no están restringidos a células tumorales o infectadas por virus sino que también se manifiestan en células normales, sanas. Como resultado, durante la terapia con interferón pueden surgir efectos secundarios indeseables, particularmente cuando se requieren altas dosis. La administración de interferón puede dar lugar a mielosupresión, resultando de esta manera en un recuento reducido de las células sanguíneas rojas, y niveles reducidos de células sanguíneas blancas y plaquetas. Los interferones dan lugar comúnmente a síntomas semejantes a la gripe (por ejemplo, fiebre, fatiga, dolores de cabeza y tironas), trastornos gastrointestinales (por ejemplo, anorexia, náusea y diarrea), mareo y tos. Frecuentemente, la respuesta sostenida de los pacientes con VHC a tratamiento con interferón no PEGilado es baja y el tratamiento puede inducir efectos secundarios graves, incluyendo, pero no limitado a, retinopatía, tiroiditis, pancreatitis aguda, y depresión.

60 Los efectos secundarios indeseables que acompañan a la terapia con interferón limitan frecuentemente la utilidad terapéutica de los regímenes de tratamiento con interferón. Así, existe una necesidad de mantener o mejorar los beneficios terapéuticos de dicha terapia mientras se reducen o eliminan los efectos secundarios indeseables.

65

Sumario de la invención

La divulgación se refiere a nuevos compuestos de polialquilenglicol, a conjugados de estos compuestos y a usos de los mismos.

- 5 Tomando como base la divulgación que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado y un vehículo, adyuvante, diluyente, conservante y/o solubilizante farmacéuticamente aceptables,

10 en donde el conjugado comprende el producto de la reacción de un polímero de polialquilenglicol activado y B, en donde

B es un interferón beta (IFN β); y
dicho polímero de polialquilenglicol activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa, mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa o mPEG-O-*m*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un proceso para fabricar la composición farmacéutica de la invención que comprende las siguientes etapas:

20 (a) añadir un polímero de polialquilenglicol activado a una solución de IFN β para formar una mezcla, en donde dicho polímero de polialquilenglicol activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa, mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa o mPEG-O-*m*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa;

25 (b) hacer reaccionar dicho polímero de polialquilenglicol activado con dicho IFN β en presencia de cianoborohidruro sódico a través de alquilación reductora para formar un conjugado; y

(c) combinar dicho conjugado con un vehículo, adyuvante, diluyente, conservante y/o solubilizante farmacéuticamente aceptables.

30 La presente invención y las realizaciones de la misma se muestran en las reivindicaciones adjuntas.

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, más adelante se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, será la que controle. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

40 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la divulgación detallada siguiente, y a partir de las reivindicaciones.

Breve divulgación de los dibujos

45 La presente divulgación, que incluye la presente invención, se entenderá mejor a partir de la divulgación siguiente con referencia a las tablas, en donde:

La FIG. 1 es un gel de SDS-PAGE reductora que muestra la pureza de IFN- β -1a no modificado e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa: Carril A: marcadores de peso molecular (desde la parte superior a la inferior; 100 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 27 kDa, y 18 kDa, respectivamente); Carril B: 4 μ g de IFN- β -1a no modificado; Carril C: 4 μ g de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa.

La FIG. 2 representa trazas de la cromatografía de exclusión por tamaño de IFN- β -1a no modificado e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa: Panel A: estándares de peso molecular; Panel B: IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa; Panel C, IFN- β -1a no modificado.

La FIG. 3 es una traza de la cromatografía de exclusión por tamaño de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa.

La FIG. 4 es un gel de SDS-PAGE reductora que muestra la pureza de IFN- β -1a no modificado e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa: Carril A: 2,5 μ g de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa; Carril B: 2,5 μ g de IFN- β -1a no modificado; Carril C: marcadores de peso molecular (desde la parte superior a la inferior; 100 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 27 kDa, y 18 kDa, respectivamente).

La FIG. 5 representa trazas de la cromatografía de exclusión por tamaño de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa; Panel A: estándares de peso molecular; Panel B: IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa.

La Fig. 6 es un gel de SDS-PAGE reductora que muestra la estabilidad de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa: Carril A: marcadores de peso molecular (desde la parte superior a la inferior; 100 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 27 kDa, 18 kDa y 15kDa, respectivamente); Carriles B, C, D, y E: 2 μ g de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhidó de 20 kDa tomados para ensayo en el día 0, 2, 5, y 7, respectivamente.

Las FIGS. 7A-B muestran la actividad antivírica de varias muestras de IFN-β-1a humano PEGilado como una función de la concentración de proteína: FIG. 7A; IFN-β-1a no modificado (O), IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (□), IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (Δ), e IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (◇). FIG. 7B; IFN-β-1a no modificado (O), IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhid de 20 kDa (□), IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa (Δ), e IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-fenilacetaldéhid de 20 kDa (◇).

Las FIGS. 8A-B son gráficos que representan las farmacocinéticas de muestras no modificadas y varios IFN-β-1a humanos PEGilados: FIG. 8A: IFN-β-1a no modificado (panel superior) e IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (panel inferior); FIG. 8B: IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (panel superior) y mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhid de 20 kDa (panel inferior).

Las FIGS 9 A-B son gráficos que representan las farmacocinéticas de muestras no modificadas y varios IFN-β-1a humanos PEGilados: FIG. 9A: IFN-β-1a no modificado (panel superior) e IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa (panel inferior); FIG. 9B: IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-fenilacetaldéhid de 20 kDa (panel superior) y mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (panel inferior).

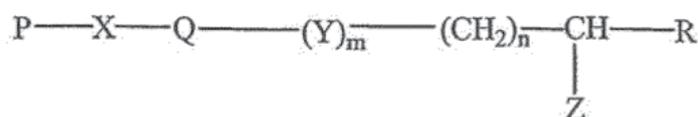
La FIG. 10 es un gráfico de barras que compara una única administración de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, con la administración diaria de IFN-β-1a no modificado en la reducción del número de neovasos orientados radialmente en ratones *nu/nu* que portan células de melanoma maligno humano SK-MEL-1: tratamiento con vehículo control una vez solo en el día 1 (barra A); tratamiento con 1 MU (5 μg) de IFN-β-1a no modificado diariamente en los días 1-9 inclusive (barra B); tratamiento con 1 MU (10 μg) de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa una vez solo en el día 1 (barra C); y tratamiento con vehículo control diariamente en los días 1-9 inclusive (barra D).

Divulgación detallada

La divulgación se dirige a compuestos y métodos útiles en el tratamiento de varias enfermedades y trastornos. Como se explica con detalle más adelante, dichas enfermedades y trastornos incluyen, en particular, aquellos que son susceptibles de tratamiento con terapia de interferón, incluyendo pero no limitado a infecciones víricas tales como infecciones de hepatitis y enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple.

Los compuestos de la divulgación incluyen compuestos nuevos de polialquilenglicol activados según la Fórmula I:

Fórmula I:



en donde P es un polímero soluble en agua tal como un polímero de polialquilenglicol. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye otros homopolímeros de óxido de polialquileo tales como polipropilenglicoles, polioles polioxi-etilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros en bloque de los mismos. Otros ejemplos de núcleos de polímero solubles en agua y no peptídicos adecuados incluyen poli(poliol oxietilenado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxi-propilmetacrilamida), poli(α-hidroxi ácido), poli(vinil alcohol), polifosfazeno, polioxazolona, poli(N-acriloil-morfolina) y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos. En un caso, el núcleo de polímero es poli(etilen glicol) o monometoxi polietilen glicol (mPEG) que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 400.000 Da. Debe entenderse que otros polímeros relacionados también son adecuados para uso en la práctica de esta divulgación y que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) se pretende que sea inclusivo y no exclusivo a este respecto. El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo alcoxi PEG, PEG difuncional, PEG multi-armado, PEG en horquilla, PEG ramificado, PEG colgante, o PEG con uniones degradables en el mismo.

En la clase de compuestos representados por la Fórmula I, hay entre cero y cinco grupos metileno entre Y y el carbono que contiene Z (por ejemplo, n es cero o un número entero de uno a cinco) y m es cero o uno, por ejemplo, Y está presente o ausente.

X e Y son, independientemente, O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR', o NR'. En algunos casos, X e Y son oxígeno.

Q es un grupo alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado (incluyendo estructuras de anillo bicíclicas fusionadas y bicíclicas con puente), un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonamido, sulfonilo, heterocíclico, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sulfamoilo, sulfonato, sililo, éter, o alquiltio.

El sustituyente Z es hidrógeno, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sulfamoilo, sulfonato, sililo, éter, o alquiltio.

Cuando X o Y es NR', R' puede ser hidrógeno, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido o un alcarilo sustituido o no sustituido, en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sulfamoilo, sulfonato, sililo, éter, o alquiltio.

R es un grupo funcional reactivo, es decir, un resto activador capaz de reaccionar para formar un enlace o una unión entre el compuesto de Fórmula I y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo. Así, R representa el "grupo activador" de los compuestos de polialquilenglicol activados (PGC) representados por la Fórmula I. R puede ser, por ejemplo, un ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxilo, hidroxilo protegido, carbonato, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, o glioxal. En casos particulares, R es un hidrato de aldehído.

Los ejemplos específicos de R en la bibliografía incluyen carbonato de N-succinimidilo (véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 5.281.698, 5.468.478), amina (véanse, por ejemplo, Buckmann *et al. Makromol. Chem.* 182:1379 (1981), Zaplisky *et al. Eur. Polym. J.* 19:1177 (1983)), hidrazida (véanse, por ejemplo, Andresz *et al. Makromol. Chem.* 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Olson *et al. en Poly (ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications*, p 170-181, Harris y Zaplisky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; véase también la Pat. de EE.UU. N.º 5.672.662), succinato de succinimidilo (véanse, por ejemplo, Abuchowski *et al. Cancer Biochem. Biophys.* 7:175 (1984) y Joppich *et al. Macromol. Chem.* 180:1381(1979), éster de succinimidilo (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 5.650.234), éter de glicidilo (véanse, por ejemplo, Pitha *et al. Eur. J. Biochem.* 94:11(1979), Elling *et al., Biotech. Appl. Biochem.* 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (véanse, por ejemplo, Beauchamp, *et al., Anal. Biochem.* 131:25 (1983), Tondelli *et al. J. Controlled Release* 1:251 (1985)), carbonato de *p*-nitrofenilo (véanse, por ejemplo, Veronese, *et al., Appl. Biochem. Biotech.*, 11:141 (1985); y Sartore *et al., Appl. Biochem. Biotech.* 27:45 10 (1991)), aldehído (véanse, por ejemplo, Harris *et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed.* 22:341 (1984), Pat. de EE.UU. N.º 5.824.784, Pat. de EE.UU. N.º 5.252.714), maleimida (véanse, por ejemplo, Goodson *et al. Bio/Technology* 8:343 (1990), Romani *et al. en Chemistry of Peptides and Proteins* 2:29 (1984)), y Kogan, *Synthetic Comm.* 22:2417 (1992)), ortopiridil-disulfuro (véase, por ejemplo, Woghiren, *et al. Bioconj. Chem.* 4:314 (1993)), acrilol (véase, por ejemplo, Sawhney 15 *et al., Macromolecules*, 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 5.900.461). Además, dos moléculas del polímero de esta divulgación también pueden unirse al aminoácido lisina para formar una lisina disustituida, que puede activarse adicionalmente con N-hidroxisuccinimida para formar un resto N-succinimidilo activo (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 5.932.462).

Los términos "grupo funcional", "resto activo", "grupo activo", "grupo activador", "resto activador", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo", y "resto químicamente reactivo" se usan en la técnica y en el presente documento para hacer referencia a partes o unidades distintas, definibles, de una molécula. Los términos son de alguna manera sinónimos en las técnicas químicas y se usan en el presente documento para indicar las partes de moléculas que tienen una actividad química característica y que son típicamente reactivas con otras moléculas. El término "activo", cuando se usa conjuntamente con grupos funcionales, se pretende que incluya aquellos grupos funcionales que reaccionan fácilmente con grupos electrofílicos o nucleofílicos en otras moléculas, a diferencia de aquellos grupos que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción altamente poco prácticas con el fin de reaccionar. Por ejemplo, como se entenderá en la técnica, el término "éster activo" incluirá aquellos ésteres que reaccionan fácilmente con grupos nucleofílicos tales como aminas. Típicamente, un éster activo reaccionará con una amina en medio acuoso en cuestión de minutos, mientras determinados ésteres, tales como ésteres de metilo o de etilo, requieren un catalizador fuerte con el fin de reaccionar con un grupo nucleofílico.

En los compuestos de la divulgación como se han definido anteriormente, el grupo funcional R se convierte en un resto de unión, R*, después de haber reaccionado con una molécula biológicamente activa para formar un enlace o unión entre el compuesto de polialquilenglicol (PGC) activado y el compuesto biológicamente activo. Así, B es un compuesto biológicamente activo después de conjugarse con el PGC y R* es un resto formado por la reacción de R en el PGC activado con uno o más grupos funcionales reactivos en el compuesto biológicamente activo, B, de manera que resulta una única unión covalente entre el PGC y el compuesto biológicamente activo. En un caso preferido, R*

es un resto formado por la reacción de R en el PGC activado con un único grupo funcional reactivo en el compuesto biológicamente activo, de manera que resulta una unión covalente entre el compuesto de polialquilenglicol (PGC) activado y el compuesto biológicamente activo.

- 5 El compuesto biológicamente activo o precursor del mismo (B) preferentemente no se ve afectado de manera adversa por la presencia del PGC. Además, B tiene naturalmente un grupo funcional que es capaz de reaccionar con y formar una unión con el PGC activado, o se modifica para contener dicho grupo reactivo.

10 Tal y como se usa en el presente documento, un precursor de B es una forma inactiva o menos activa de B que cambia a la forma activa o más activa, respectivamente, después de ponerse en contacto con condiciones fisiológicas, por ejemplo, administración a un sujeto. Dichos cambios pueden ser cambios conformacionales o estructurales, incluyendo, pero no limitado a, cambio de una forma protegida a una forma no protegida de B. Tal y como se usa en el presente documento, dicho cambio no incluye la liberación de los PGC conjugados de esta divulgación.

15 Como se entenderá en la técnica, el término "protegido" se refiere a la presencia de un grupo o resto protector que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en determinadas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se está protegiendo. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse del grupo de terc-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo o etilo. También pueden usarse en la divulgación otros grupos protectores conocidos en la técnica.

25 Los términos "resto de unión", "unión" o "conector" se usan en el presente documento para hacer referencia a restos o enlaces que se forman como resultado de una reacción química y típicamente son uniones covalentes. Así, la unión representada por enlace R*-B en las fórmulas anteriores resulta de la reacción entre un resto activado, R, en el PGC con un compuesto biológicamente activo, es decir, B'. R* es el resto de unión formado a partir de R después de reacción con B', y B es el compuesto biológicamente activo como se conjuga con el PGC por reacción de un grupo funcional en B' con R.

30 Tal y como se usa en el presente documento, el término "compuesto biológicamente activo" se refiere a aquellos compuestos que presentan una o más respuestas o acciones biológicas cuando se administran a un sujeto y contienen grupos reactivos que contienen restos reactivos que son capaces de reaccionar con y conjugarse con al menos un PGC activado de la divulgación. El término "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo" o "agente biológicamente activo" cuando se usa en el presente documento significa cualquier sustancia que puede afectar cualesquiera propiedades físicas o bioquímicas de cualquier sujeto, incluyendo pero no limitado a virus, bacterias, hongos, plantas, animales, y seres humanos. En particular, tal y como se usa en el presente documento, las moléculas biológicamente activas incluyen cualquier sustancia pretendida para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad en seres humanos u otros animales, o para aumentar de otra manera el bienestar físico o mental de seres humanos o animales.

45 Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no están limitados a, péptidos, análogos peptídicos, proteínas, enzimas, moléculas pequeñas, agentes de tinción, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos, azúcares, oligosacáridos, células, virus, liposomas, micropartículas, superficies y micelas.

50 Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para uso con la divulgación incluyen, pero no están limitados a, quimiocinas, linfoquinas, anticuerpos, receptores solubles, agentes anti-tumorales, agentes anti-ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, antibióticos, fungicidas, agentes fungiestáticos, agentes anti-víricos, agentes esteroideos, agentes antimicrobianos, agentes germicidas, agentes antipiréticos, agentes antidiabéticos, broncodilatadores, agentes antidiarreicos, agentes de dilatación coronaria, glicósidos, espasmolíticos, agentes antihipertensores, antidepresivos, agentes anti-ansiedad, otros agentes psicoterapéuticos, corticosteroides, analgésicos, anticonceptivos, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, agentes que disminuyen la glucosa en sangre, agentes que disminuyen el colesterol, agentes anticonvulsivos, otros agentes antiepilépticos, inmunomoduladores, anticolinérgicos, simpato líticos, simpaticomiméticos, agentes vasodilatadores, anticoagulantes, antiarrítmicos, prostaglandinas que tienen varias actividades farmacológicas, diuréticos, auxiliares de sueño, agentes antihistamínicos, agentes antineoplásicos, agentes oncolíticos, antiandrógenos, agentes antimalaria, agentes antilepra, y varios otros tipos de fármacos. Véase Goodman and Gilman's The Basis of Therapeutics (Novena Edición, Pergamon Press Inc., EEUU, 1996) y el Índice Merck (Decimotercera Edición, Merck & Co., Inc., EEUU, 2001).

60 Los compuestos biológicamente activos incluyen cualquier compuesto que presenta una respuesta biológica en su forma presente, o cualquier compuesto que presenta una respuesta biológica como resultado de una conversión química de su estructura de su forma presente. Por ejemplo, los compuestos biológicamente activos incluirán cualquier compuesto que contiene un grupo protector que, cuando se escinde, resulta en un compuesto que presenta una respuesta biológica. Dicha escisión puede ser el resultado, por ejemplo, de una reacción *in vivo* del compuesto con enzimas endógenas o una reacción de pre-administración del compuesto, incluyendo su reacción con los PGC activados de esta divulgación. Como ejemplo adicional, los compuestos biológicamente activos también incluirán

cualquier compuesto que experimenta estereotransformación, *in vivo* o *ex vivo*, para formar un compuesto que presenta una respuesta o acción biológica.

5 Los compuestos biológicamente activos contienen típicamente varios sitios reactivos en donde es factible la unión covalente del PGC activado. Por ejemplo, los grupos amino pueden experimentar acilaciones, los grupos sulfhidrilo pueden experimentar reacciones de adición y alquilaciones, los grupos carbonilo y carboxilo pueden experimentar acilaciones, y los grupos aldehído e hidroxilo pueden experimentar aminación y aminación reductora. Una o más de estas reacciones puede usarse en la preparación de los compuestos biológicamente activos modificados con polialquilenglicol de la divulgación. Además, los compuestos biológicamente activos pueden modificarse para formar
10 restos reactivos en el compuesto que facilitan dichas reacciones y la conjugación resultante al PGC activado.

Los expertos en la materia reconocerán numerosos mecanismos de reacción disponibles para facilitar la conjugación del PGC activado a un compuesto biológicamente activo. Por ejemplo, cuando el resto activador, R, es un grupo hidrazida, puede acoplarse covalentemente a restos sulfhidrilo, azúcar, y carbonilo en los compuestos biológicamente
15 hidrazida (después de que estos restos hayan experimentado oxidación para producir aldehídos). La reacción de restos activadores de hidrazida (R) con aldehídos en los compuestos biológicamente activos (B') crea una unión hidrazona (R*-B). Cuando R es un grupo maleimida, puede hacerse reaccionar con un grupo sulfhidrilo para formar una unión tioéter estable. Si no están presentes sulfhidrilos en el compuesto biológicamente activo, pueden crearse mediante reducción de disulfuro o a través de la tiolación con 2-iminotiolano o SATA. Cuando R es un imidoéster reaccionará
20 con aminas primarias en B' para formar una unión imidoamida. La conjugación imidoéster se realiza habitualmente entre pH 8,5-9,0. Cuando se conectan los PGC activados a proteínas biológicamente activas, los imidoésteres proporcionan una ventaja sobre otros grupos R ya que no afectan la carga global de la proteína. Portan una carga positiva a pH fisiológico, como las aminas primarias que reemplazan. Las reacciones imidoéster se llevan a cabo entre 0 °C y la temperatura ambiente (por ejemplo, a 4 °C), o a temperaturas elevadas en condiciones anhidras. Cuando R
25 es un NHS-éster, su diana principal son las aminas primarias. Los grupos α-amino accesibles, por ejemplo aquellos presentes en el extremo N de péptidos y proteínas, reaccionan con los NHS-ésteres para formar un enlace amida covalente.

En algunos casos, R*-B es una unión hidrolíticamente estable. Una unión hidrolíticamente estable significa que la
30 unión es sustancialmente estable en agua y que no reacciona con agua a pH útiles, por ejemplo, la unión es estable en condiciones fisiológicas durante un periodo de tiempo prolongado, quizá incluso indefinidamente. En otros casos, R*-B es una unión hidrolíticamente inestable o degradable. Una unión hidrolíticamente inestable significa que la unión es degradable en agua o en disoluciones acuosas, incluyendo por ejemplo, la sangre. Las uniones enzimáticamente inestables o degradables también significa que la unión puede degradarse por una o más enzimas.
35

Como se entiende en la técnica, los polímeros de polialquileo y relacionados pueden incluir uniones degradables en el núcleo del polímero o en el grupo conector entre el núcleo del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula de PGC. Por ejemplo, las uniones éster formadas por la reacción, por ejemplo, de PGC ácidos carboxílicos o PGC activado ácidos carboxílicos con grupos alcohol en un compuesto biológicamente activo se
40 hidrolizan generalmente en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otras uniones hidrolíticamente degradables incluyen uniones carbonato; uniones imina que resultan de la reacción de una amina y un aldehído (Véase, por ejemplo, Ouchi *et al.*, *Polymer Preprints*, 38(1): 582-3 (1997)); uniones éster fosfato formadas por la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; uniones acetal que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; uniones ortoéster que son el producto de reacción de un formiato y un alcohol; uniones peptídicas formadas por un grupo amino, por ejemplo, en un extremo del PGC, y un grupo carboxilo de un péptido; y uniones oligonucleotídicas formadas por un grupo fósforamidita, por ejemplo, en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.
45

El polialquilenglicol P, puede ser polietilen glicol, que tiene la estructura de Fórmula II:

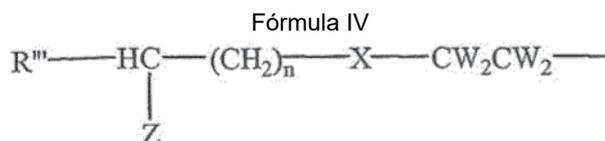
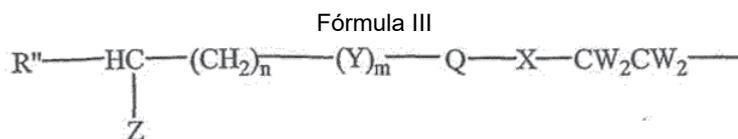
50 Fórmula II: $E-(O-CH_2CH_2)_a-$,

en donde a es un número entero de 4 a 10.000 y E es hidrógeno o un grupo alquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, un marcador detectable, o un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula I y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.
55

Así, cuando E es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula I y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, E puede ser un ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxilo, hidroxilo protegido, carbonato, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, o glioxal. Debe entenderse que E debe ser compatible con R de manera que no ocurra la reacción entre E y R.
60

Por "marcador detectable" se quiere decir cualquier marcador capaz de detección. Los ejemplos no limitantes incluyen isótopos radiactivos, restos fluorescentes, restos fosforescentes, restos quimioluminiscentes, y puntos cuánticos. Otros marcadores detectables incluyen etiquetas de biotina, cisteína, histidina, hemaglutinina, myc o flag.
65

En algunos casos, E tiene la estructura según la Fórmula III o Fórmula IV:



5

10 Cada Q, X, Y, Z, m, y n son como se han definido anteriormente, y cada W es, independientemente, hidrógeno o un alquilo C₁ a C₇.

15 En esta clase de compuestos, R'' es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula III y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo; y R''' es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula IV y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

20 R'' y R''' pueden ser de ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxilo, hidroxilo protegido, carbonato, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, o glicoxal. Debe entenderse que R'' y R''' deben ser compatibles con R de manera que no ocurra la reacción con R.

25 Tal y como se usa en el presente documento, R'' y R''', después de conjugación con un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, forman restos de unión como se ha definido anteriormente. Así, R''* es un resto de unión formado por la reacción del grupo R'' o R''' en el PGC activado con un grupo funcional reactivo en el compuesto biológicamente activo, de manera que resulta una unión covalente entre el PGC y el compuesto biológicamente activo. R'' y R''' o R''* pueden ser el mismo resto o restos diferentes, y el compuesto biológicamente activo unido a cada uno puede ser el mismo o diferente.

30 Tal y como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alicíclico), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo, y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En casos preferidos, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene 30 o menos átomos de carbono en su núcleo (por ejemplo, C₁-C₃₀ para cadena lineal, C₃-C₃₀ para cadena ramificada), y más preferentemente 20 o menos. Asimismo, los cicloalquilos preferidos tienen de 3-10 átomos de carbono en su estructura de anillo, y más preferentemente tienen 5, 6, o 7 carbonos en la estructura de anillo.

40 Además, el término "alquilo" (o "alquilo inferior") se pretende que incluya tanto "alquilos no sustituidos" como "alquilos sustituidos", refiriéndose los últimos a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos del núcleo hidrocarbonado. Dichos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo, o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato, o un tioformiato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los expertos en la materia entenderán que los restos sustituidos en la cadena hidrocarbonada pueden estar ellos mismos sustituidos, si es apropiado. Por ejemplo, los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir formas sustituidas y no sustituidas de grupos amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo, y sulfonato), y sililo, así como éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos, y ésteres), -CF₃, -CN. Los cicloalquilos pueden estar sustituidos además con alquilos, alqueno, alcoxis, alquiltios, aminoalquilos, alquilos sustituidos con carbonilo, -CF₃, -CN.

55 El término "aralquilo", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo (por ejemplo, un grupo aromático o heteroaromático). Los grupos aralquilo ejemplares incluyen, pero no están limitados a, bencilo y más generalmente (CH₂)_nPh, en donde Ph es un fenilo o fenilo sustituido, y n es 1, 2, o 3.

60 Los términos "alqueno" y "alquino" se refieren a grupos alifáticos insaturados análogos en longitud y posible sustitución a los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un enlace doble o triple, respectivamente.

A no ser que el número de carbonos se especifique de otra forma, "alquilo inferior" tal y como se usa en el presente documento significa un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, pero que tiene de uno a diez carbonos, más preferentemente de uno a seis átomos de carbono en su estructura de núcleo. Asimismo, "alqueno inferior" y "alquino inferior" tienen longitudes de cadena similares. Los grupos alquilo preferidos son alquilos inferiores. En realizaciones preferidas, un sustituyente designado en el presente documento como alquilo es un alquilo inferior.

El término "arilo" tal y como se usa en el presente documento incluye grupos aromáticos de un único anillo de 5, 6, y 7 miembros que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina. Aquellos grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura de anillo también pueden referirse como "heterociclos arilo" o "heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con los sustituyentes que se han descrito anteriormente, por ejemplo, halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, restos aromáticos o heteroaromáticos, -CF₃, -CN, o semejantes. El término "arilo" también incluye sistemas de anillo policíclicos que tiene dos o más anillos cíclicos en donde dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos son "anillos fusionados") en donde al menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, y/o heterociclicos.

Los términos *orto*, *meta* y *para* se aplican a bencenos disustituídos en 1,2, 1,3, y 1,4, respectivamente. Por ejemplo, los nombres 1,2-dimetilbenceno y *orto*-dimetilbenceno son sinónimos.

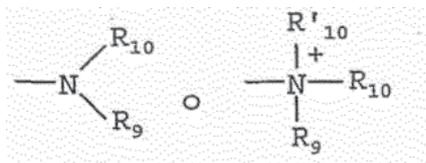
Los términos "heterociclilo" o "grupo heterocíclico" se refieren a estructuras de anillo de 3 a 10 miembros, más preferentemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policiclos. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, tiofeno, tiantreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatiina, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenarsazina, fenotiazina, furazán, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como azetidionas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas. El anillo heterocíclico puede estar sustituido en una o más posiciones con sustituyentes como se ha descrito anteriormente, tales como, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un resto aromático o heteroaromático. -CF₃, -CN.

El término "carbociclo", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo aromático o no aromático en donde cada átomo del anillo es carbono.

Los heterociclos y carbociclos incluyen estructuras de anillo bicíclicas fusionadas y bicíclicas con puente.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "nitro" significa -NO₂; el término "halógeno" designa -F, -Cl, -Br o -I; el término "sulfhidrilo" significa -SH; el término "hidroxilo" significa -OH; y el término "sulfonilo" significa -SO₂.

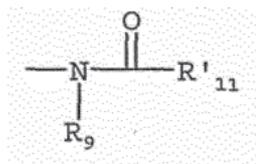
Los términos "amina" y "amino" son reconocidos en la técnica y se refieren tanto a aminas no sustituidas como sustituidas, por ejemplo, un resto que puede representarse por la fórmula general:



en donde R₉, R₁₀ y R'₁₀ representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alqueno, -(CH₂)_m-R₈, o R₉ y R₁₀ tomados conjuntamente con el átomo de N al que están unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo; R₈ representa un arilo, un cicloalquilo, un cicloalqueno, un heterociclo o un policiclo; y m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8.

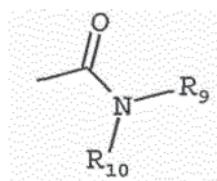
El término "alquilamina" tal y como se usa en el presente documento significa un grupo amina, como se ha definido anteriormente, que tiene un alquilo sustituido o no sustituido unido a él, es decir, al menos uno de R₉ y R₁₀ es un grupo alquilo.

El término "acilamino" se reconoce en la técnica y se refiere a un resto que puede representarse por la fórmula general:



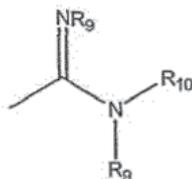
en donde R_9 es como se ha definido anteriormente, y R'_{11} representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(CH_2)_m-R_8$, en donde m y R_8 son como se han definido anteriormente.

5 El término "amido" se reconoce en la técnica como un carbonilo sustituido con amino e incluye un resto que puede representarse por la fórmula general:



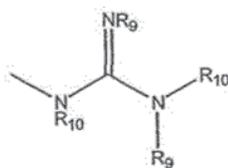
10 en donde R_9 , R_{10} son como se han definido anteriormente. Las realizaciones preferidas de la amida no incluirán imidas que pueden ser inestables.

15 El término "amidina" se reconoce en la técnica como un grupo que puede representarse por la fórmula general:



en donde R_9 , R_{10} son como se han definido anteriormente.

20 El término "guanidina" se reconoce en la técnica como un grupo que puede representarse por la fórmula general:



en donde R_9 , R_{10} son como se han definido anteriormente.

25 El término "alquilitio" se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que tiene un radical azufre unido a él. En realizaciones preferidas, el resto "alquilitio" se representa por uno de -S-alquilo, -S-alquenilo, -S-alquinilo, y -S- $(CH_2)_m-R_8$, en donde m y R_8 son como se han definido anteriormente. Los grupos alquilitio representativos incluyen metiltio, etiltio.

30 El término "carbonilo" se reconoce en la técnica e incluye restos que pueden representarse por la fórmula general:

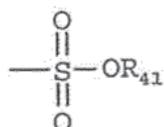


35 en donde X es un enlace o representa un oxígeno o un azufre, y R_{11} representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(CH_2)_m-R_8$ o una sal farmacéuticamente aceptable, R'_{11} representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, o $-(CH_2)_m-R_8$, en donde m y R_8 son como se han definido anteriormente. Cuando X es un oxígeno, y R_{11} o R'_{11} no es hidrógeno, la fórmula representa un "éster". Cuando X es un oxígeno, y R_{11} es como se ha definido anteriormente, el resto se refiere en el presente documento como un grupo carboxilo, y particularmente cuando R_{11} es un hidrógeno, la fórmula representa un "ácido carboxílico". Cuando X es un oxígeno, y R'_{11} es hidrógeno, la fórmula representa un "formiato".
 40 En general, cuando el átomo de oxígeno de la fórmula anterior se reemplaza por azufre, la fórmula representa un grupo "tioalcarbonilo". Cuando X es un azufre y R_{11} o R'_{11} no es hidrógeno, la fórmula representa un "tioéster". Cuando X es un azufre y R_{11} es hidrógeno, la fórmula representa un "ácido tiorcarboxílico". Cuando X es un azufre y R'_{11} es

hidrógeno, la fórmula representa un "tioformiato". Por otra parte, cuando X es un enlace, y R₁₁ no es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "cetona". Cuando X es un enlace, y R₁₁ es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "aldehído".

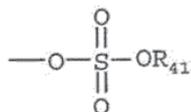
- 5 Los términos "alcoxilo" o "alcoxi" tal y como se usan en el presente documento se refieren a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que tiene un radical oxígeno unido a él. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terc-butoxi. Un "éter" es dos hidrocarburos unidos covalentemente por un oxígeno. De acuerdo con esto, el sustituyente de un alquilo que convierte al alquilo en éter es o se parece a un alcoxilo, de manera que puede representarse por uno de -O-alquilo, -O-alquenilo, -O-alquinilo, -O-(CH₂)_m-R₈, en donde m y R₈ son como se han descrito anteriormente.

El término "sulfonato" se reconoce en la técnica e incluye un resto que puede representarse por la fórmula general:



- 15 en donde R₄₁ es un par de electrones, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, o arilo.

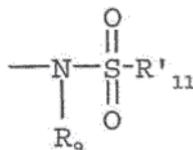
El término "sulfato" se reconoce en la técnica e incluye un resto que puede representarse por la fórmula general:



- 20 en donde R₄₁ es como se ha definido anteriormente.

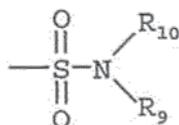
El término "sulfonamido" se reconoce en la técnica e incluye un resto que puede representarse por la fórmula general:

25



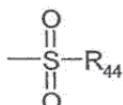
en donde R₉ y R'₁₁ son como se han definido anteriormente.

- 30 El término "sulfamoilo" se reconoce en la técnica e incluye un resto que puede representarse por la fórmula general:



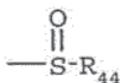
- 35 en donde R₉ y R₁₀ son como se han definido anteriormente.

El término "sulfonilo", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que puede representarse por la fórmula general:



- 40 en donde R₄₄ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, o heteroarilo.

- 45 El término "sulfóxido" tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que puede representarse por la fórmula general:



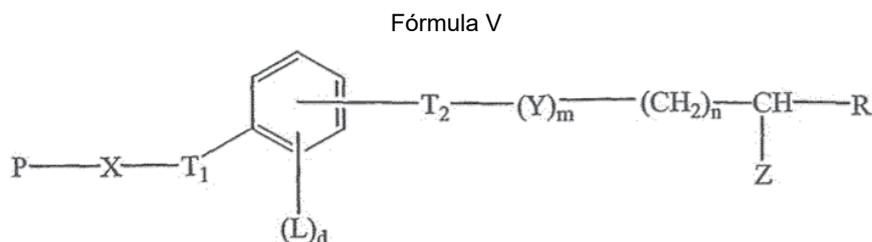
en donde R₄₄ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, aralquilo, o arilo.

Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente y que la sustitución resulta en un compuesto estable, por ejemplo, que no experimenta espontáneamente una transformación tal como por reorganización, ciclación, eliminación, etc.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "sustituido" se contempla que incluya todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos anteriormente en el presente documento. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y el mismo o diferente para compuestos orgánicos apropiados. Para los fines de esta invención, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualesquiera sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos descritos en el presente documento que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Esta invención no se pretende que esté limitada de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos.

Una lista completa de las abreviaturas utilizadas por los químicos orgánicos con experiencia en la técnica aparece en el primer número de cada volumen del *Journal of Organic Chemistry*; esta lista se presenta típicamente en una tabla titulada Standard List of Abbreviations.

En algunos casos, los compuestos de la divulgación tienen la estructura según la Fórmula V:



X, Y, m, n, Z, y R' son como se han definido anteriormente, y R es un resto activador como se ha definido anteriormente, adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula V y un compuesto biológicamente activo o precursor. En casos particulares, R es un hidrato de aldehído.

P es como se ha definido anteriormente, y puede representarse por la Fórmula II



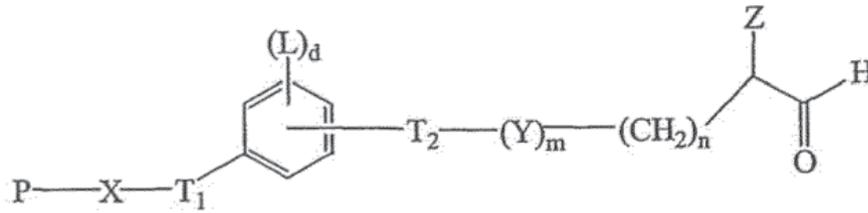
en donde E es como se ha descrito anteriormente, y en algunos casos, puede representarse por la Fórmula III o IV.

T₁ y T₂ son, independientemente, ausente, o un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

Cuando d es cero, no hay sustituyentes adicionales (L) en el anillo aromático. Cuando d es un número entero de 1 a 4, los sustituyentes (L) pueden ser un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

Cuando R es un aldehído, los compuestos se encuentran en los representados por la Fórmula VI:

Fórmula VI

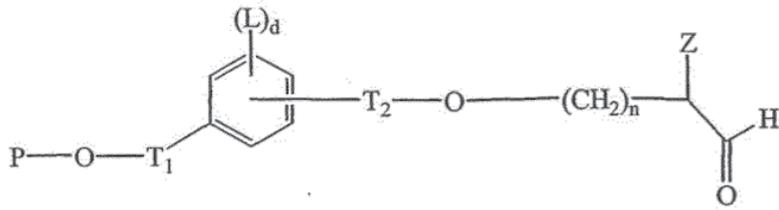


5 en donde todas las demás variables son como se han definido anteriormente.

Por ejemplo, cuando X e Y son oxígeno y R es un aldehído, los compuestos de la divulgación se representan por el compuesto J.

10

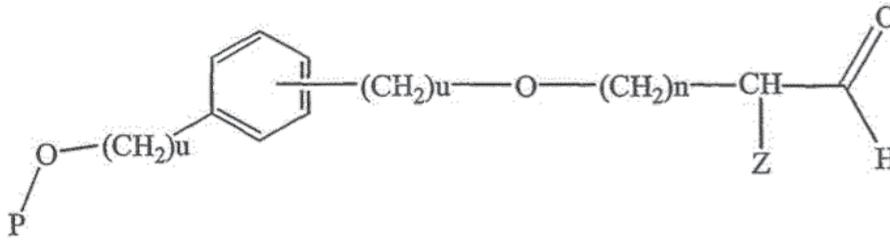
Compuesto J



en donde los sustituyentes T₁ y T₂ pueden estar en la organización orto, meta, o para.

15 Cuando los sustituyentes T₁ y T₂ son grupos alquilo de cadena lineal, y d es cero, los compuestos se representan por la Fórmula IX:

Fórmula IX:

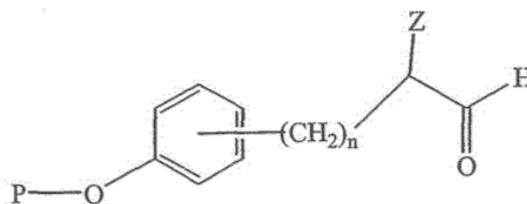


20

en donde cada u es independientemente cero o un número entero de uno a cinco y todas las demás variables son como se han definido anteriormente. En casos particulares, Z es hidrógeno o metilo.

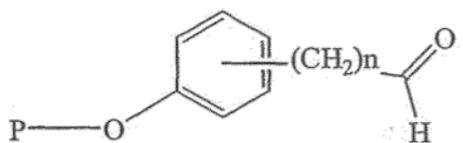
25 Las clases particulares de compuestos que se encuentran en la Fórmula IX pueden representarse por las Fórmulas VII y VIII:

Fórmula VII:



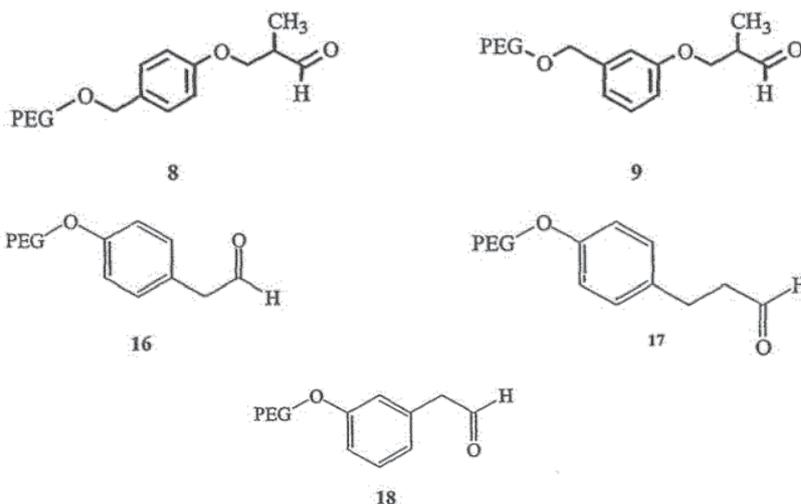
30

Fórmula VIII:



Algunos compuestos de polialquilenglicol activados representativos incluyen los siguientes, en donde el polímero de polialquilenglicol es PEG o mPEG:

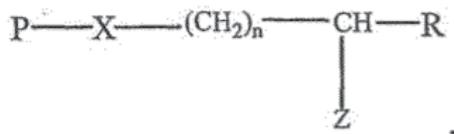
5



10

En algunos casos, los compuestos de la divulgación se representan por la Fórmula X:

Fórmula X:



15

en donde, como anteriormente, n es cero o un número entero de uno a cinco, y X es O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR', o NR'.

- 20 Cuando X es NR', R' puede ser hidrógeno, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado, en donde los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio. Z puede ser un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado.
- 25 Cuando están presentes, los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

- 35 Como se ha definido anteriormente, R es un resto activador adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula X y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo. En algunos casos, R es un hidrato de aldehído.

40 **P** es un polímero de polialquilenglicol como se ha definido anteriormente, y puede representarse por la Fórmula II:



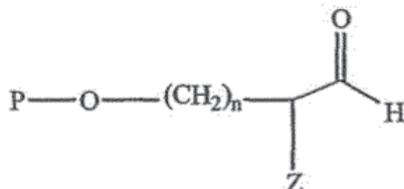
en donde **E** y **a** son como se han descrito anteriormente, y en algunos casos, puede representarse por la Fórmula III

o IV. En algunos casos, **E** es metilo, y, por lo tanto, **P** es mPEG.

Cuando **R** es un aldehído y **X** es oxígeno, los compuestos se encuentran en la estructura según la Fórmula XI:

5

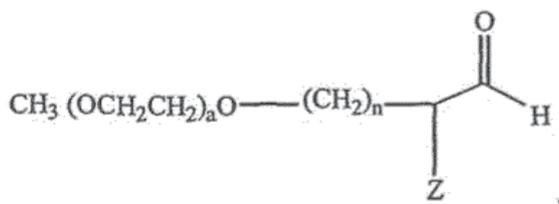
Fórmula XI:



en donde **P**, **Z** y **n** son como se han definido para la Fórmula X.

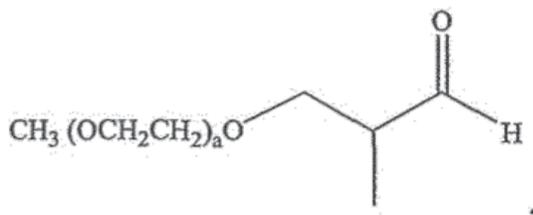
10 Cuando **P** es mPEG, los compuestos se describen por la Fórmula XII:

Fórmula XII:



15 y cuando **n** es uno y **Z** es metilo, el compuesto se representa por la Fórmula XIII:

Fórmula XIII:



20 en donde **a** es un número entero de 4 a 10.000.

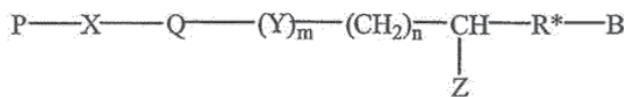
Los ejemplos de rutas sintéticas para preparar los compuestos según la divulgación se muestran en los Ejemplos más adelante.

25 La divulgación también incluye composiciones de los compuestos de polialquilenglicol (PEG) activados de la divulgación y uno o más compuestos biológicamente activos. Como se ha descrito anteriormente, los compuestos biológicamente activos son aquellos compuestos que presentan una respuesta o acción biológica cuando se administran a un sujeto. Los compuestos biológicamente activos no conjugados pueden administrarse a un sujeto además de los compuestos de la divulgación. Además, los compuestos biológicamente activos pueden contener
30 grupos reactivos que son capaces de reaccionar con y conjugarse con al menos un PGC activado de la divulgación.

La divulgación también incluye conjugados de los nuevos PGC con compuestos biológicamente activos. En un caso, los conjugados se forman a partir de un compuesto de Fórmula I y un compuesto biológicamente activo (**B**) y se describen según la Fórmula XIV:

35

Fórmula XIV:



40 Como anteriormente, **m** es cero o uno de manera que **Y** está presente o ausente, **n** es cero o un número entero de uno a cinco, y **X** e **Y** son independientemente O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR', o NR'.

Q es un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado (incluyendo estructuras de anillo bicíclicas fusionadas y bicíclicas con puente), un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Cuando están presentes, los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

Cada R' y Z es independientemente hidrógeno, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado, en donde los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, y alquiltio; R* es un resto de unión formado a partir de la reacción de R con un grupo funcional correspondiente en el compuesto biológicamente activo, B, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, R* se forma a partir de la reacción de un resto tal como una funcionalidad ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxí, hidroxí protegido, carbonato, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, o glioxal con un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

P es un polímero de polialquilenglicol como se ha definido anteriormente, y puede representarse por la Fórmula II:



en donde E es hidrógeno, un grupo alquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metilo), un marcador detectable, o un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula XIV y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo. Como anteriormente, a es un número entero de 4 a 10.000.

Cuando E es un marcador detectable, el marcador puede ser, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un resto fluorescente, un resto fosforescente, un resto quimioluminiscente, o un punto cuántico.

Cuando E es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula XIV y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, E puede formar un enlace con otra molécula del compuesto biológicamente activo (B) de manera que el compuesto de polialquilenglicol activado se une en cualquier extremo a una molécula del mismo tipo de compuesto biológicamente activo, para producir un dímero de la molécula.

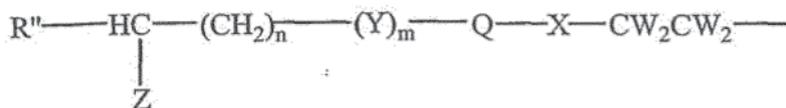
En algunos casos, E forma un enlace con un compuesto biológicamente activo distinto de B, creando un heterodímero de compuestos biológicamente activos o precursores de los mismos.

En otros casos, E forma un enlace adicional con el compuesto biológicamente activo, B, de manera que tanto E como R están unidos a través de diferentes grupos funcionales de la misma molécula del compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

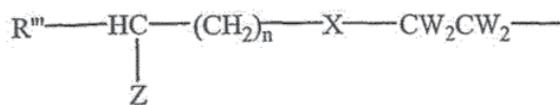
Cuando E es capaz de formar un enlace con un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, E puede ser igual a o diferente de R y se elige de restos ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxí, hidroxí protegido, carbonato, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, y glioxal.

Cuando E es capaz de formar un enlace con un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, E puede tener la estructura según la Fórmula III o Fórmula IV:

Fórmula III



Fórmula IV

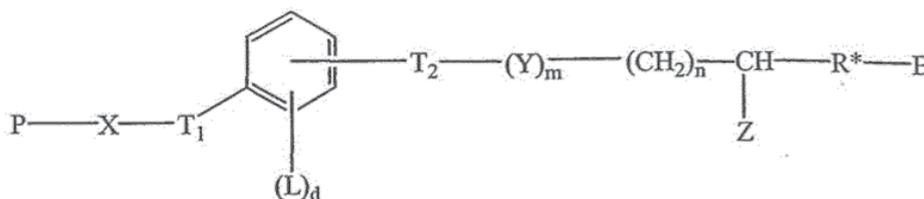


5 en donde cada Q, X, Y, Z, m, y n son, independientemente, como se ha definido anteriormente, y cada W es, independientemente, hidrógeno o un alquilo C₁ a C₇, R^m es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula III y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, y R^m es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula IV y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo. R^m y R^m se eligen, independientemente, de restos ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxilo, hidroxilo protegido, carbonato, alquenoil, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosililo, y glioxal.

10 Cuando Q en la Fórmula XIV es un alcarilo sustituido o no sustituido, el conjugado se forma a partir de un polialquilenglicol activado de Fórmula V y una molécula biológicamente activa (B), y se describe según la Fórmula XV:

15

Fórmula XV



20 en donde T₁ y T₂ son, independientemente, ausente, o un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Cuando están presentes, los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio. En algunos casos, T₁ y T₂, si están presentes, son un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado.

25 d es cero (por ejemplo, no hay sustituyentes L en el anillo aromático) o un número entero de 1 a 4. Cada L es, cuando está presente, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

30 Todas las demás variables son como se han descrito anteriormente, incluyendo P, que es un polímero de polialquilenglicol, y puede representarse por la Fórmula II:

40



45 en donde E es hidrógeno, un grupo alquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metilo), un marcador detectable; o un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula XV y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo. Como anteriormente, a es un número entero de 4 a 10.000.

Cuando E es un marcador detectable, el marcador puede ser, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un resto fluorescente, un resto fosforescente, un resto quimioluminiscente, o un punto cuántico.

50 Cuando E es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula XV y un compuesto biológicamente activo B, E puede formar un enlace con otra molécula del compuesto biológicamente activo (B) de manera que el compuesto de polialquilenglicol activado se une en cualquier extremo a una molécula del mismo tipo de compuesto biológicamente activo, para producir un dímero de la molécula.

55 En algunos casos, E forma un enlace con un compuesto biológicamente activo distinto de B, creando un heterodímero

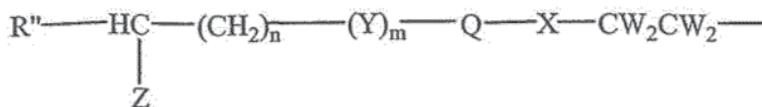
de compuestos biológicamente activos o precursores de los mismos.

En otros casos, E forma un enlace adicional con el compuesto biológicamente activo, B, de manera que tanto E como R están unidos a través de diferentes grupos funcionales de la misma molécula del compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

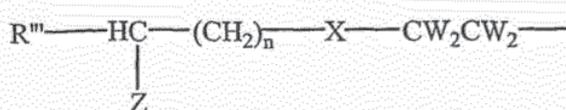
Cuando E es capaz de formar un enlace con una molécula biológicamente activa o precursor de ésta, E puede ser igual a o diferente de R y se elige de restos ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxil, hidroxil protegido, carbonato, alquenoil, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, y glioxal.

Cuando E puede formar un enlace con un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, en algunos casos, E puede tener la Fórmula III o Fórmula IV:

Fórmula III



Fórmula IV

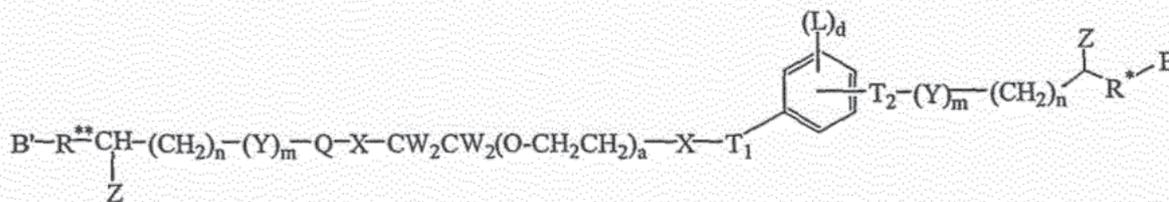


en donde cada Q, X, Y, Z, m, y n son, independientemente, como se ha definido anteriormente, y cada W es, independientemente, hidrógeno o un alquilo C₁ a C₇, R'' es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula III y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, y R''' es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula IV y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

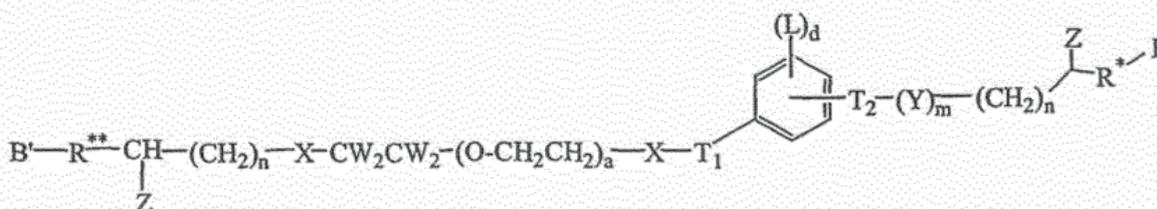
R'' y R''' se eligen, independientemente, de restos ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxil, hidroxil protegido, carbonato, alquenoil, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, y glioxal.

Cuando se une en ambos extremos a un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, estas moléculas bifuncionales pueden representarse según la Fórmula XX o Fórmula XXI:

Fórmula XX:



Fórmula XXI:



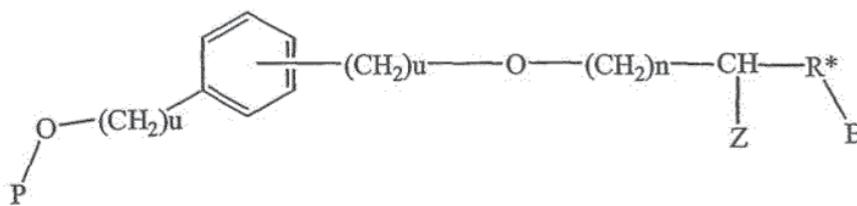
5 en donde cada X e Y, T₁ y T₂, R' y Z, L, Q, m, n, a, y n son como se han descrito anteriormente, y cada W es, independientemente, hidrógeno o un alquilo C₁ a C₇. R* y R** son, independientemente, restos de unión formados a partir de la reacción de R y R'' con un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, y B y B' son cada uno un compuesto biológicamente activo, o precursor del mismo, después de conjugación con R y R'', respectivamente.

10 En algunos casos, B y B' son el mismo tipo de compuesto biológicamente activo. En otros casos, B y B' son compuestos biológicamente activos diferentes. En otros casos más, B y B' son la misma molécula biológicamente activa. En casos adicionales, R* y R** son iguales. En otros casos, R* y R** son diferentes. Por ejemplo, en algunos casos, E puede formar un enlace con otra molécula del compuesto biológicamente activo (B = B') de manera que el PGC activado se une en cualquier extremo a una molécula del mismo tipo de compuesto biológicamente activo, para producir un dímero de la molécula. En algunos casos, E forma un enlace con un compuesto biológicamente activo distinto de B (B no es B'), creando un heterodímero de compuestos biológicamente activos o precursores de los mismos. En otros casos, E forma un enlace adicional con el compuesto biológicamente activo, B, de manera que tanto E (a través de R'' o R''') como R se unen a través de diferentes grupos funcionales de la misma molécula del compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

20 En algunos casos, R* o R** es grupo metileno y B o B' es una molécula biológicamente activa que contiene un grupo amino, en donde el grupo metileno forma un enlace con el grupo amino en B. Por ejemplo, la amina puede ser el extremo amino de un péptido, una amina de la cadena lateral de un aminoácido de un péptido, o una amina de un sustituyente de glicosilación de un péptido glicosilado. En algunos casos, el péptido es un interferón, tal como interferón-beta, por ejemplo, interferón-beta-1a. En algunos casos, este tipo de enlace se forma por una reacción de alquilación reductora.

25 Cuando los sustituyentes T₁ y T₂ de Fórmula XV son grupos alquilo de cadena lineal, X e Y son oxígeno, y d es cero, los conjugados se representan por la Fórmula XIX:

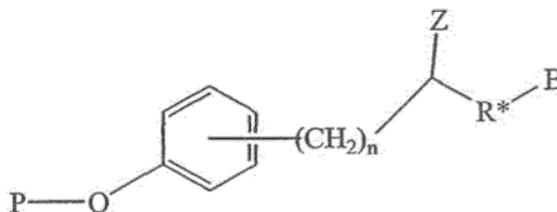
Fórmula XIX:



30 en donde cada u es independientemente cero o un número entero de uno a cinco y todas las demás variables son como se han definido anteriormente. En casos particulares, Z es hidrógeno o metilo.

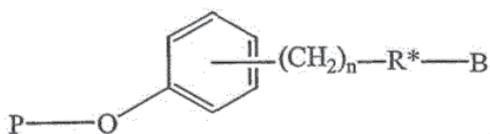
35 Las clases particulares de compuestos que se encuentran en la Fórmula XV pueden representarse por las Fórmulas XVII y XVIII formadas a partir de la reacción de las Fórmulas VII y VIII, respectivamente, con un compuesto biológicamente activo, o precursor del mismo:

Fórmula XVII:



40

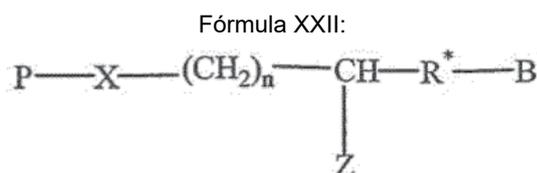
Fórmula XVIII:



45 en donde n es cero o un número entero de uno a cinco, P es un polímero de polialquilenglicol, como se ha descrito anteriormente, Z es hidrógeno, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, R* es un resto de unión como se ha descrito anteriormente, B es una molécula biológicamente activa. Estos compuestos pueden ser bifuncionales o monofuncionales, dependiendo de la identidad de E, como se ha descrito anteriormente.

En algunos casos, R* es un grupo metileno y B es una molécula biológicamente activa que contiene un grupo amino, en donde el grupo metileno forma un enlace con el grupo amino en B. Por ejemplo, la amina puede ser el extremo amino de un péptido, una amina de la cadena lateral de un aminoácido de un péptido, o una amina de un sustituyente de glicosilación de un péptido glicosilado. En algunos casos, el péptido es un interferón, tal como interferón-beta, por ejemplo, interferón-beta-1a. En algunos casos, este tipo de enlace se forma por una reacción de alquilación reductora.

Los conjugados de la divulgación también pueden formarse a partir de la reacción de compuestos según la Fórmula X con un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, para formar conjugados según la Fórmula XXII:



en donde B es una molécula biológicamente activa, como se ha descrito anteriormente y n es cero o un número entero de uno a cinco.

X es O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR', o NR', cuando X es NR', R' es hidrógeno, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Si están presentes, los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

Z es un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

R* es un resto de unión formado a partir de la reacción de R con un grupo funcional correspondiente en el compuesto biológicamente activo, B, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, R* se forma a partir de la reacción de un resto tal como una funcionalidad ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxilo, hidroxilo protegido, carbonato, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, o glioxal con un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

En algunos casos, Z es metilo y n es uno.

P es un polímero de polialquilenglicol como se ha definido anteriormente, y puede representarse por la Fórmula II:



en donde E es hidrógeno, un grupo alquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metilo), un marcador detectable, o un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula XXII y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo. Como anteriormente, a es un número entero de 4 a 10.000.

Cuando E es un marcador detectable, el marcador puede ser, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un resto fluorescente, un resto fosforescente, un resto quimioluminiscente, o un punto cuántico.

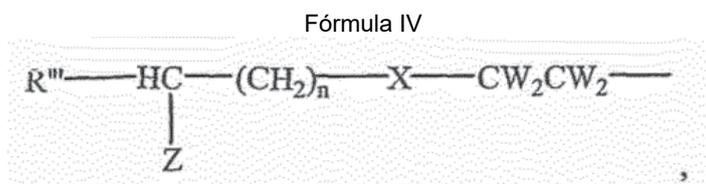
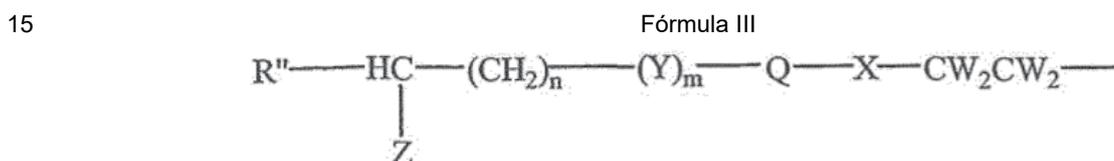
Cuando E es capaz de formar un enlace con una molécula biológicamente activa o precursor de ésta, resulta una molécula bifuncional. E puede formar un enlace con otra molécula del compuesto biológicamente activo (B) de manera que el compuesto de polialquilenglicol activado se une en cualquier extremo a una molécula del mismo tipo de compuesto biológicamente activo, para producir un dímero de la molécula.

En algunos casos, E forma un enlace con un compuesto biológicamente activo distinto de B, creando un heterodímero de compuestos biológicamente activos o precursores de los mismos.

En otros casos, E forma un enlace adicional con el compuesto biológicamente activo, B, de manera que tanto E como R están unidos a través de diferentes grupos funcionales de la misma molécula del compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

5 Cuando E es capaz de formar un enlace con una molécula biológicamente activa o precursor de ésta, E puede ser igual a o diferente de R y se elige de restos ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxil, hidroxil protegido, carbonato, alquenoil, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, y glioxal.

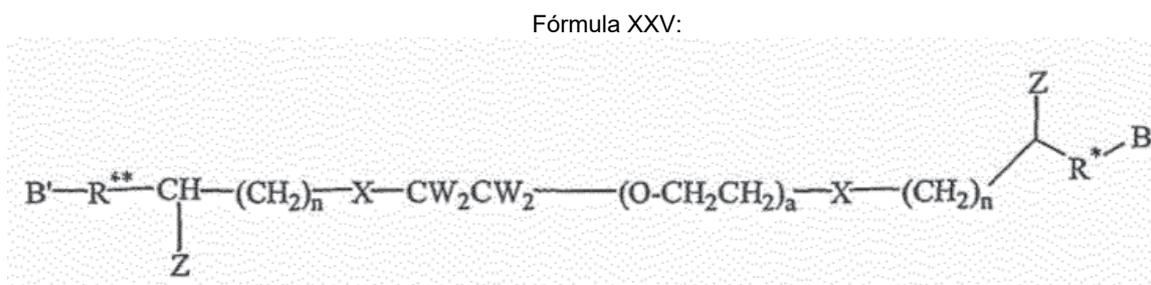
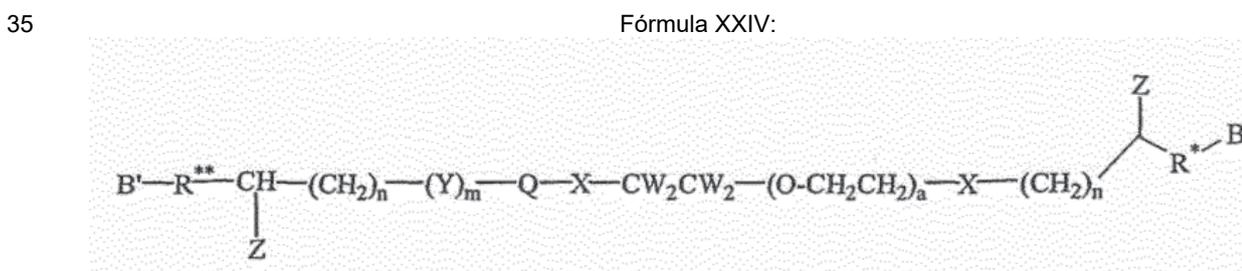
En algunos casos, E puede tener la estructura según la Fórmula III o Fórmula IV:



20 en donde cada Q, X, Y, Z, m, y n son, independientemente, como se ha definido anteriormente, cada W es, independientemente, hidrógeno o un alquilo C₁ a C₇, R'' es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula III y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, y R''' es un resto adecuado para formar un enlace entre el compuesto de Fórmula IV y un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

25 R'' y R''' se eligen, independientemente, de restos ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxil, hidroxil protegido, carbonato, alquenoil, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosilo, y glioxal, y pueden ser iguales o diferentes de R.

Cuando se unen a ambos extremos a un compuesto biológicamente activo o precursor del mismo, estas moléculas bifuncionales pueden representarse según la Fórmula XXIV o Fórmula XXV:



40 en donde cada X e Y es independientemente O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR', o NR', y cada R' y Z

es, independientemente, hidrógeno, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado.

5 Q es un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₈ saturado o insaturado (incluyendo estructuras de anillo bicíclicas fusionadas y bicíclicas con puente), un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Si están presentes, los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto
10 heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

Cada W es, independientemente, hidrógeno o un alquilo C₁ a C₇, m es cero o uno, a es un número entero de 4 a 10.000, y cada n es independientemente 0 o un número entero de 1 a 5.

15 R* y R** son independientemente restos de unión como se ha descrito anteriormente, B y B' son independientemente moléculas biológicamente activas y pueden ser iguales o diferentes.

E (a través de R" o R''') puede formar un enlace con otra molécula del compuesto biológicamente activo (B) de manera que el compuesto de polialquilenglicol activado se une en cualquier extremo a una molécula del mismo tipo de compuesto biológicamente activo, para producir un dímero de la molécula.
20

En algunos casos, E (a través de R" o R''') forma un enlace con un compuesto biológicamente activo distinto de B, creando un heterodímero de compuestos biológicamente activos o precursores de los mismos.

25 En otros casos, E (a través de R" o R''') forma un enlace adicional con el compuesto biológicamente activo, B, de manera que tanto E como R están unidos a través de diferentes grupos funcionales de la misma molécula del compuesto biológicamente activo o precursor del mismo.

30 R" y R''' pueden ser iguales que o diferentes de R, y se eligen de restos ácido carboxílico, éster, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, hidroxilo, hidroxilo protegido, carbonato, alquenoilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, tiol sustituido o no sustituido, halógeno, amina sustituida o no sustituida, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, succinimidilo, isocianato, isotiocianato, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, hidroxisuccinimidilo, azol, maleimida, sulfona, alilo, vinilsulfona, tresilo, sulfo-N-succinimidilo, diona, mesilo, tosililo, y glioxal.

35 En algunos casos, R* o R** es grupo metileno y B o B' es una molécula biológicamente activa que contiene un grupo amino, en donde el grupo metileno forma un enlace con el grupo amino en B. Por ejemplo, la amina puede ser el extremo amino de un péptido, una amina de la cadena lateral de un aminoácido de un péptido, o una amina de un sustituyente de glicosilación de un péptido glicosilado. En algunos casos, el péptido es un interferón, tal como interferón-beta, por ejemplo, interferón-beta-1a. En algunos casos, este tipo de enlace se forma por una reacción de alquilación reductora.
40

Los conjugados de la divulgación pueden prepararse acoplando un compuesto biológicamente activo con un compuesto polialquilenglicol como se describe en los Ejemplos. En algunos casos, el acoplamiento se consigue mediante una reducción de alquilación reductora.
45

Los compuestos biológicamente activos de interés incluyen cualquier sustancia pretendida para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad en seres humanos u otros animales, o para aumentar de otra manera el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no están limitados a, péptidos, análogos peptídicos, proteínas, enzimas, moléculas pequeñas, agentes de tinción, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos, azúcares, oligosacáridos, células, virus, liposomas, micropartículas, superficies y micelas. Esta clase de compuestos también incluye precursores de estos tipos de moléculas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para uso con la divulgación incluyen, pero no están limitados a, citocinas, quimiocinas, linfocinas, receptores solubles, anticuerpos, antibióticos, fungicidas, agentes anti-víricos, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-tumorales, agentes cardiovasculares, agentes anti-ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos.
50
55

El compuesto biológicamente activo puede ser un péptido, tal como un interferón, incluyendo interferón-beta (por ejemplo, interferón-beta-1a) o interferón-alfa.

60 Como la modificación polimérica con un PGC de la divulgación reduce las respuestas antigénicas, un péptido extraño no necesita ser completamente autólogo con el fin de usarse como un terapéutico. Por ejemplo, un péptido, tal como interferón, usado para preparar conjugados de polímero puede prepararse a partir de un extracto de mamífero, tal como interferón humano, de rumiante, o bovino, o puede producirse sintética o recombinantemente.

65 Por ejemplo, en un aspecto, la divulgación está dirigida a compuestos y métodos para tratar afecciones que son susceptibles de tratamiento con interferón alfa o beta. La administración de un interferón beta conjugado con

polialquilenglicol (de aquí en adelante "PGC IFN-beta", "PGC IFN-β", por ejemplo, PEG IFN-beta", "PEG IFN-β" "IFN-beta PEGilado", o "IFN-β PEGilado") proporciona beneficios terapéuticos mejorados, mientras reduce sustancialmente o elimina completamente los efectos secundarios no deseables asociados normalmente con regímenes de tratamiento con interferón alfa o beta utilizados convencionalmente.

5 El PGC IFN-beta puede prepararse uniendo un polímero de polialquilenglicol al grupo amino terminal de la molécula IFN beta. Una única molécula de polialquilenglicol activado puede conjugarse con el extremo N de IFN beta mediante una reacción de alquilación reductora.

10 El conjugado PGC IFN-beta puede formularse, por ejemplo, como un líquido o un polvo liofilizado para inyección. El objetivo de la conjugación de IFN beta con un PGC es mejorar la administración de la proteína prolongando significativamente su vida media en plasma, y proporcionar de esta manera actividad prolongada de IFN beta.

15 El término "interferón" o "IFN" tal y como se usa en el presente documento significa la familia de proteínas específicas de especie altamente homólogas que inhiben la replicación vírica y la proliferación celular y modulan la respuesta inmune. Los interferones humanos se agrupan en dos clases; Tipo I, que incluye interferón α y β , y Tipo II, que está representado solo por el interferón γ . Se han desarrollado formas recombinantes de cada grupo y están disponibles comercialmente. Los subtipos en cada grupo se basan en características antigénicas/estructurales.

20 Los términos "beta interferón", "beta-interferón", "beta IFN", "beta-IFN", " β interferón", " β -interferón", " β IFN", " β -IFN", "interferón beta", "interferón-beta", "interferón β ", "interferón- β ", "IFN beta", "IFN-beta", "IFN β ", "IFN- β ", e "interferón de fibroblastos humanos" se usan indistintamente en el presente documento para describir miembros del grupo del interferón beta que tienen secuencias de aminoácidos distintas como se han identificado mediante el aislamiento y secuenciación del ADN que codifica los péptidos.

25 Además, "beta interferón 1a", "beta interferón-1a", "beta-interferón 1a", "beta-interferón-1a", "beta IFN 1a", "beta IFN-1a", "beta-IFN 1a", "beta-IFN-1a", " β interferón 1a", " β interferón-1a", " β -interferón 1a", " β -interferón-1a", " β IFN 1a", " β IFN-1a", " β -IFN 1a", " β -IFN-1a", "interferón beta 1a", "interferón beta-1a", "interferón-beta 1a", "interferón-beta-1a", "interferón β 1a", "interferón β -1a", "interferón- β 1a", "interferón- β -1a", "IFN beta 1a", "IFN beta-1a", "IFN-beta 1a", "IFN-beta-1a", "IFN β 1a", "IFN β -1a", "IFN- β 1a", "IFN- β -1a" se usan indistintamente en el presente documento para describir interferón beta producido recombinantemente o sintéticamente que tiene las secuencias de aminoácidos naturales (de tipo salvaje).

35 La llegada de la tecnología de ADN recombinante aplicada a la producción de interferón ha permitido que se sinteticen con éxito varios interferones humanos, permitiendo de esta manera la fermentación a gran escala, producción, aislamiento, y purificación de varios interferones a homogeneidad. El interferón producido recombinantemente retiene parte o la mayor parte de sus actividades antivíricas e inmunomoduladoras *in vitro* e *in vivo*. También se entiende que las técnicas recombinantes también podrían incluir un sitio de glicosilación para la adición de un resto de carbohidrato en el polipéptido derivado recombinantemente.

40 También se contempla la construcción de plásmidos de ADN recombinante que contiene secuencias que codifican al menos parte de interferón de fibroblastos humanos y la expresión de un polipéptido que tiene actividad inmunológica o biológica de interferón de fibroblastos humanos. La construcción de genes de interferón-beta híbridos que contienen combinaciones de diferentes secuencias de subtipo puede conseguirse por técnicas conocidas para los expertos en la materia.

50 Los interferones-beta recombinantes adecuados típicos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen pero no están limitados a interferón beta-1a tal como AVONEX® disponible en Biogen, Inc., Cambridge, MA, e interferón-beta-1b tal como BETASERON® disponible en Berlex, Richmond, CA.

55 Hay muchos mecanismos por los que los productos génicos inducidos por IFN proporcionan efectos protectores frente a la infección vírica. Dichos efectos inhibidores víricos ocurren en diferentes estadios del ciclo de vida vírico. Véase la Patente de EE.UU. N.º 6.030.785. Por ejemplo, IFN puede inhibir la retirada de la cubierta de partículas víricas, penetración, y/o fusión causadas por virus.

60 Las afecciones que pueden tratarse según la presente divulgación son generalmente aquellas que son susceptibles a tratamiento con interferón. Por ejemplo, las afecciones susceptibles incluyen aquellas que responderían positivamente o favorablemente (como se conocen estos términos en las técnicas médicas) a terapia basada en interferón beta. Para los propósitos de la divulgación, las afecciones que pueden tratarse con terapia de interferón beta descritas en el presente documento incluyen aquellas afecciones en donde el tratamiento con un interferón beta muestra alguna eficacia, pero en donde los efectos secundarios negativos del tratamiento con IFN- β pesan más que los beneficios. El tratamiento según los métodos de la divulgación resulta en efectos secundarios sustancialmente reducidos o eliminados comparado con el tratamiento con interferón beta convencional. Además, las afecciones que tradicionalmente se piensa que son refractarias a tratamiento con IFN- β , o aquellas para las que es poco práctico el tratamiento con una dosis manejable de IFN- β , pueden tratarse según los métodos de la presente divulgación.

Los compuestos PGC IFN- β de la divulgación pueden usarse solos o en combinación con uno o más agentes útiles para el tratamiento de una afección particular. Se ha realizado al menos un estudio piloto de interferón beta-1a recombinante para el tratamiento de hepatitis C crónica. Véase, generalmente, Habersetzer et al., *Liver* 30: 437-441 (2000). Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse en combinación con agentes antivíricos conocidos para el tratamiento de una infección vírica. Véase Kakumu et al., *Gastroenterology* 105: 507-12 (1993) y Pepinsky, et al., *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297: 1059-1066 (2001).

Tal y como se usa en el presente documento, el término "antivíricos" puede incluir, por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos, azúcares, proteínas, moléculas derivadas de virus, inhibidores de proteasas, análogos de nucleótidos y/o análogos de nucleósidos. Una "molécula pequeña" como se usa el término en el presente documento se refiere a una molécula orgánica de menos de aproximadamente 2.500 amu (unidades de masa atómica), preferentemente menor de aproximadamente 1.000 amu. Los ejemplos de compuestos antivíricos adecuados incluyen, pero no están limitados a, ribavirina, levovirina, MB6866, zidovudina 3TC, FTC, aciclovir, ganciclovir, viramida, VX-497, VX-950, e ISIS-14803. Las afecciones ejemplares que pueden tratarse con interferón incluyen, pero no están limitadas a, trastornos de la proliferación celular, en particular esclerosis múltiple, cáncer (por ejemplo, leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple, carcinoma de células basales y melanoma maligno, cáncer de ovario, linfoma de células T cutáneas), e infecciones víricas. Sin limitación, el tratamiento con interferón puede usarse para tratar afecciones que se beneficiarían de la inhibición de la replicación de virus sensibles a interferón. Por ejemplo, el interferón puede usarse solo o en combinación con AZT en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)/SIDA o en combinación con ribavirina en el tratamiento de VHC. Las infecciones víricas que pueden tratarse según la divulgación incluyen, pero no están limitadas a, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otras hepatitis no A/no B, virus del herpes, virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), herpes simple, virus de herpes humano tipo 6 (VHH-6), papiloma, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus linfotrópico T humano tipo 1 y 2 (VLTH-1/-2), rotavirus humano, rabia, retrovirus incluyendo VIH, encefalitis, e infecciones respiratorias víricas. Los métodos de la divulgación también pueden usarse para modificar varias respuestas inmunes.

Se ha observado una correlación entre el genotipo de VHC y la respuesta a terapia de interferón. Véanse, la Patente de EE.UU. N.º 6.030.785; Enomoto et al., *N. Engl. J. Med.* 334:77-81 (1996); Enomoto et al., *J. Clin. Invest.* 96:224-30 (1995). La proporción de respuesta en pacientes infectados con VHC-1b es menos del 40 %. Véase la Patente de EE.UU. N.º 6.030.785. También se han observado proporciones de respuesta bajas similares en pacientes infectados con VHC-1a. Véanse *id.*; Hoofnagel et al., *Intervirology* 37:87-100 (1994). Sin embargo, la proporción de respuesta en pacientes infectados con VHC-2 es cercana al 80 %. Véase la Patente de EE.UU. N.º 6.030.785; Fried et al., *Semin. Liver Dis.* 15:82-91 (1995). De hecho, se encontró que una secuencia de aminoácidos de una región discreta de la proteína NS5A del genotipo de VHC 1b se correlacionaba con la sensibilidad a interferón. Véase la Patente de EE.UU. N.º 6.030.785. Véanse también Enomoto et al. 1996; Enomoto et al. 1995. Esta región se ha identificado como la región determinante de la sensibilidad a interferón (ISDR). Véase *id.*

El conjugado PGC IFN-beta se administra en una cantidad farmacológicamente efectiva para tratar cualquiera de las afecciones descritas anteriormente, y se basa en la actividad de IFN beta del conjugado polimérico. El término "cantidad farmacológicamente efectiva" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que incitará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se busca por el investigador o médico. Es una cantidad que es suficiente para producir significativamente una respuesta clínica positiva mientras se mantienen niveles disminuidos de efectos secundarios. La cantidad de PGC IFN-beta que puede administrarse a un sujeto que lo necesita está en el intervalo de 0,01-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o más preferentemente 0,01-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, administrado en dosis únicas o divididas.

La administración de las dosificaciones descritas puede ser en días alternos, pero preferentemente ocurre una vez a la semana o una vez cada dos semanas. Las dosis se administran durante al menos un periodo de 24 semanas por inyección.

La administración de la dosis pueden ser oral, tópica, intravenosa, subcutánea, intramuscular, o cualquier otro método sistémico aceptable. Tomando como base el criterio del médico responsable, la cantidad de fármaco administrada y el régimen de tratamiento usado dependerá, por supuesto, de la edad, sexo e historial médico del paciente que se está tratando, el recuento de neutrófilos (por ejemplo, la gravedad de la neutropenia), la gravedad de la afección patológica específica y la tolerancia del paciente al tratamiento como se manifiesta por toxicidad local y por efectos secundarios sistémicos.

En la práctica, los conjugados de la divulgación se administran en cantidades que serán suficientes para inhibir o prevenir afecciones o enfermedades médicas no deseadas en un sujeto, tal como un mamífero, y se usan en la forma más adecuada para dichos propósitos. Las composiciones son preferentemente adecuadas para uso interno e incluyen una cantidad efectiva de un compuesto farmacológicamente activo de la divulgación, solo o en combinación con otros agentes activos, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles porque tienen una toxicidad muy baja, si es que la tienen.

Los conjugados descritos en el presente documento pueden formar el ingrediente activo de una composición farmacéutica, y se administran típicamente en una mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticos

adecuados seleccionados adecuadamente respecto a la forma pretendida de administración, esto es, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes. Las composiciones incluirán típicamente una cantidad efectiva de un compuesto activo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y además, también puede incluir cualesquiera materiales vehiculares como se usan habitualmente en las ciencias farmacéuticas. Dependiendo del modo pretendido de administración, las composiciones pueden estar en forma de dosificación sólida, semi-sólida o líquida tal como, por ejemplo, inyectables, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas de liberación prolongada, polvos, líquidos, suspensiones, o semejantes, preferentemente en dosificaciones unitarias.

Las composiciones farmacéuticas convencionales que comprenden una cantidad farmacológicamente eficaz de un conjugado, por ejemplo, PGC IFN-beta, junto con vehículos, adyuvantes, diluyentes, conservantes y/o solubilizantes farmacéuticamente aceptables pueden usarse en la práctica de la divulgación, incluyendo la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de interferón incluyen diluyentes de varios tampones (por ejemplo, arginina, Tris-HCl, acetato, fosfato) que tienen un intervalo de pH y fuerza iónica, vehículos (por ejemplo, albúmina de suero humano), solubilizantes (por ejemplo, tween, polisorbato), y conservantes (por ejemplo, alcohol bencílico). Véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 4.496.537.

La administración de los compuestos activos descritos en el presente documento puede ser mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes terapéuticos. Estos métodos incluyen administración sistémica o local tal como modos de administración oral, nasal, parenteral, transdérmico, subcutáneo, o tópico.

Por ejemplo, para administración oral en la forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua. Además, cuando se desea o es necesario, también pueden incorporarse en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes, y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de magnesio aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona, azúcares, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, de tragacanto o alginato de sodio, polietilén glicol, ceras. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio, y/o polietilén glicol. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metil celulosa, agar, bentonita, almidones de goma de xantana, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

Los conjugados de la divulgación también pueden administrarse en dichas formas de dosificación oral como comprimidos o cápsulas de liberación prolongada y liberación sostenida, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes, y emulsiones.

Las composiciones líquidas, particularmente inyectables, pueden prepararse, por ejemplo, mediante disolución, dispersión, etc. El compuesto activo se disuelve en o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, para formar de esta manera la disolución o suspensión inyectable. Además, pueden formularse formas sólidas adecuadas para disolución en líquido antes de la inyección. Las composiciones inyectables son preferentemente disoluciones o suspensiones acuosas isotónicas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, estimuladores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

Los conjugados de la presente divulgación pueden administrarse en forma intravenosa (por ejemplo, bolo o infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, todas usando formas muy conocidas para los expertos en las técnicas farmacéuticas. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, bien como disoluciones o suspensiones líquidas.

La administración parenteral inyectable se usa generalmente para inyecciones o infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Por ejemplo, cuando se usa una inyección subcutánea para administrar 0,01-100 µg/kg, o más preferentemente 0,01-10 µg/kg de IFN-beta PEGilado durante una semana, pueden administrarse dos inyecciones de 0,005-50 µg/kg, o más preferentemente 0,005-5 µg/kg, respectivamente, a las 0 y 72 horas. Además, una estrategia para administración parenteral emplea el implante de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, que asegura que se mantiene un nivel constante de dosificación, según la Pat. de EE.UU. N.º 3.710.795.

Además los conjugados preferidos para la presente divulgación pueden administrarse en forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o mediante rutas transdérmicas, usando las formas de parches cutáneos transdérmicos muy conocidas para los expertos en la materia. Para ser administrada en la forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosificación será, por supuesto, continua en lugar de intermitente a lo largo del régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, pomadas, lociones, aerosoles, pulverizadores y geles, en donde la cantidad administrada será 10-100 veces la dosis proporcionada típicamente por administración parenteral.

5 Para las composiciones sólidas, pueden usarse excipientes que incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio. El compuesto activo definido anteriormente, también puede formularse como supositorios usando, por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como el vehículo. En algunos casos, los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

10 Los conjugados de la presente divulgación también pueden administrarse en la forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina, o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, una película de componentes lipídicos se hidrata con una disolución acuosa de fármaco para formar una capa lipídica que encapsula el fármaco, como se describe en la Pat. de EE.UU. N.º 5.262.564.

15 Los conjugados de la presente divulgación también pueden administrarse por el uso de fusiones de inmunoglobulina como vehículos individuales a los que se acoplan las moléculas de compuesto. Los compuestos de la presente divulgación también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos de fármaco dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietilspanamidafenol, o polietilenoxydepollisina sustituida con residuos de palmitoilo. Los conjugados también pueden acoplarse a proteínas, tales como, por ejemplo, proteínas receptoras y albúmina. Además, los
20 compuestos de la presente divulgación pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxi butírico, polioctoésteres, poliactales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros en bloque de hidrogeles reticulados o anfipáticos.

25 Si se desea, la composición farmacéutica que se va a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, y otras sustancias tales como, por ejemplo, acetato de sodio, oleato de trietanolamina, etc.

30 El régimen de dosificación que utiliza los conjugados se selecciona según una variedad de factores incluyendo tipo, especie, edad, peso, sexo y afección médica del paciente; la gravedad de la afección que se va a tratar; la ruta de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular o sal del mismo empleada. También se consideran la actividad de los compuestos de la divulgación y la sensibilidad del paciente a efectos secundarios. Un médico o veterinario experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o parar el progreso de la afección.

35 Las dosificaciones orales de la presente divulgación, cuando se usan para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0,01-100 µg/kg/día oralmente, o más preferentemente 0,01-10 µg/kg/día oralmente. Las composiciones se proporcionan preferentemente en la forma de comprimidos ranurados que contienen 0,5-5.000 µg, o más preferentemente 0,5-500 µg de ingrediente activo.

40 Para cualquier ruta de administración, pueden usarse dosis divididas o únicas. Por ejemplo, los compuestos de la presente divulgación pueden administrarse diariamente o semanalmente, en una dosis única, o la dosificación total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro.

45 Cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores puede contener 0,1-99 %, 1-70 %, o, preferentemente, 1-50 % de los compuestos activos de la divulgación como ingredientes activos.

50 Como se ha descrito anteriormente, el curso de la enfermedad y su respuesta a tratamientos con fármaco puede seguirse por el examen clínico y los datos de laboratorio. La eficacia de la terapia de la divulgación se determina mediante el grado en donde se alivian los signos y síntomas previamente descritos de una afección, por ejemplo, hepatitis crónica, y el grado en donde se eliminan o reducen sustancialmente los efectos secundarios normales del interferón (es decir, síntomas semejantes a la gripe tales como fiebre, dolor de cabeza, enfriamiento, mialgia, fatiga, etc. y síntomas relacionados con el sistema nervioso central tales como depresión, parestesia, concentración alterada etc.).

55 En algunos casos, un compuesto polialquilado de la divulgación (por ejemplo, un interferón PEGilado) se administra conjuntamente con uno o más agentes farmacéuticos útiles para el tratamiento de una afección particular. Por ejemplo, una proteína polialquilada puede administrarse en combinación con un agente antivírico conocido o agente para el tratamiento de una infección vírica. Dichos compuestos antivíricos incluyen, por ejemplo, ribavirina, levovirina, MB6866, y zidovudina 3TC, FTC, aciclovir, ganciclovir, viramida, VX497, VX-950, e ISIS-14803.

60 El conjugado y antivírico pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, los agentes se administran a un paciente conjuntamente); administrarse secuencialmente (por ejemplo, los agentes se administran al paciente uno después del otro); o administrarse alternativamente (por ejemplo, los agentes se administran en una serie repetida, tal como agente A después agente B, después agente A, etc.).

65

En la práctica de la divulgación, el PGC IFN-beta preferido (por ejemplo, PEG IFN-beta) puede administrarse a pacientes infectados con el virus de la hepatitis C. Se prefiere el uso de PEG IFN-beta-1a.

5 Los pacientes se seleccionan para tratamiento a partir de pacientes positivos para anticuerpo anti-VHC con hepatitis activa crónica documentada por biopsia.

10 Con el fin de seguir el curso de la replicación de VHC en los sujetos en respuesta al tratamiento con fármaco, el ARN de VHC puede medirse en muestras de suero, por ejemplo, mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa anidada que usa dos conjuntos de cebadores derivados de las regiones génicas no estructurales NS3 y NS4 del genoma de VHC. Véanse, Farci et al., 1991, *New Eng. J. Med.* 325:98-104. Ulrich et al., 1990. *J. Clin. Invest.*, 86:1609-1614.

15 La actividad antivírica puede medirse por cambios en la titulación del ARN de VHC. Los datos del ARN de VHC pueden analizarse comparando las titulaciones al final del tratamiento con una medida de línea base pre-tratamiento. La reducción en el ARN de VHC sobre la semana 4 proporciona evidencia de actividad antivírica de un compuesto. Véanse, Kleter et al., 1993, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(3):595-97; Orito et al., 1995, *J. Medical Virology*, 46:109-115. Los cambios de al menos dos órdenes de magnitud (>2 log) se interpretan como evidencia de actividad antivírica.

20 Una persona que padece infección de hepatitis C crónica puede presentar uno o más de los signos o síntomas siguientes: (a) alanina aminotransferasa (ALT) sérica elevada, (b) ensayo positivo para anticuerpos anti-VHC, (c) presencia de VHC como se demuestra por un ensayo positivo para ARN de VHC, (d) estigmas clínicos de enfermedad hepática crónica, (e) daño hepatocelular. Dichos criterios no solo pueden usarse para diagnosticar hepatitis C, sino que pueden usarse para evaluar la respuesta de un paciente al tratamiento con fármaco.

25 Se sabe que la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) elevadas se producen en hepatitis C incontrolada, y una respuesta completa al tratamiento se define generalmente como la normalización de estas enzimas séricas, particularmente ALT. Véase, Davis et al., 1989, *New Eng. J. Med.* 321:1501-1506. ALT es una enzima liberada cuando las células del hígado se destruyen y es sintomática de infección por VHC. El interferón causa la síntesis de la enzima 2',5'-oligoadenilato sintetasa (2'5'OAS), que a su vez, resulta en la degradación del ARNm vírico. Véase, Houglum, 1983, *Clinical Pharmacology* 2:20-28. El incremento en los niveles séricos de la 2'5'OAS coincide con la disminución de los niveles de ALT.

35 El examen histológico de muestras de biopsia de hígado puede usarse como un segundo criterio para evaluación. Véase, por ejemplo, Knodell et al., 1981, *Hepatology* 1:431-435, cuyo Índice de Actividad Histológica (inflamación portal, necrosis fragmentaria en puentes, daño lobular, y fibrosis) proporciona un método de puntuación para la actividad de la enfermedad.

40 La seguridad y tolerabilidad o tratamiento pueden determinarse por evaluaciones clínicas y medida de los recuentos de células sanguíneas blancas y neutrófilos. Esto puede evaluarse mediante monitorización periódica de parámetros hematológicos, por ejemplo, recuentos de células sanguíneas blancas, neutrófilos, plaquetas, y células sanguíneas rojas).

45 Pueden prepararse varias formulaciones de liberación prolongada o sostenida adicionales usando métodos convencionales muy conocidos en la técnica.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Síntesis de polialquilenglicoles activados

50

A) Alquilación de alcoholes

Los polialquilenglicoles activados se sintetizan alquilando un polialquilenglicol que tiene una funcionalidad hidroxilo terminal libre. Una reacción genérica se describe en el Esquema I:

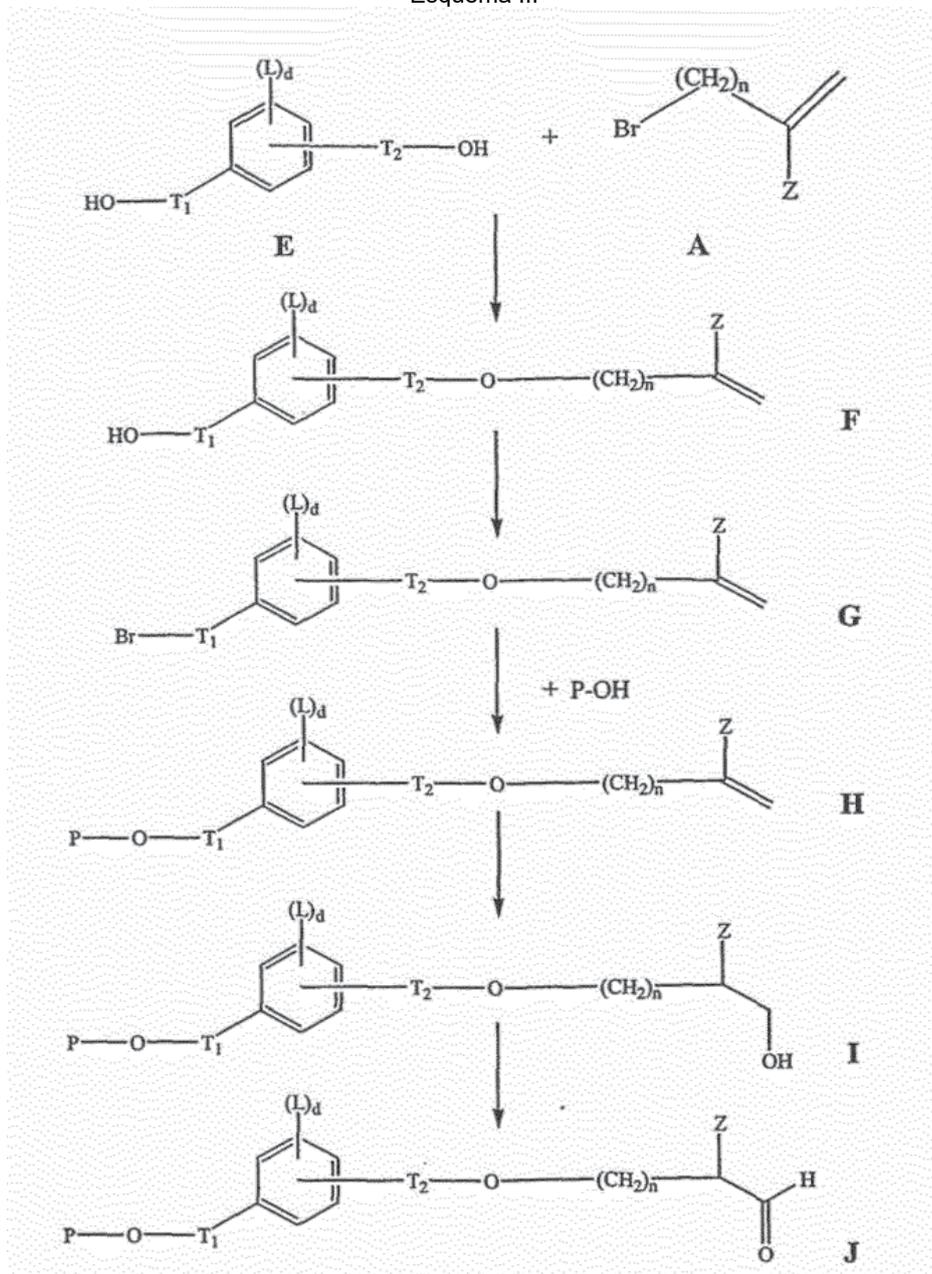
55

agitación durante 30 min a temperatura ambiente. A la mezcla se añadió NaHCO_3 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ saturado (2 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se siguió el procedimiento de procesamiento anterior para proporcionar **3** (mPEG-O-2-metilpropionaldehído, 120 mg) como un sólido blanco. La $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) mostró δ 9,75 (s, 1H), 2,69 (m, 1H), 1,16 (d, 3H).

5

Se sigue un procedimiento similar para los alcoholes aromáticos, como se muestra en el Esquema III:

Esquema III



10

En general, el alcohol aromático (E) se hace reaccionar con el haluro de alquilo (A) para formar el mono éter (F). El grupo alcohol remanente del compuesto F se convierte en el haluro (por ejemplo, bromuro) en el Compuesto G, que se hace reaccionar con el polialquilenglicol (P-OH) para proporcionar el éter (H). Este compuesto se convierte en el aldehído (J) a través de hidrobromación al alcohol primario (I) seguido de oxidación.

15

En estos compuestos, n es un número entero de cero a cinco, d es cero o un número entero de uno a cuatro, y Z puede ser un grupo alquilo o heteroalquilo C_1 a C_{20} de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado. Z también puede ser un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C_3 a C_7 saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido o un alcarilo sustituido o no sustituido (el alquilo es un alquilo C_1 a C_{20} saturado o insaturado) o grupo heteroalcarilo. Para los compuestos sustituidos, los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina,

20

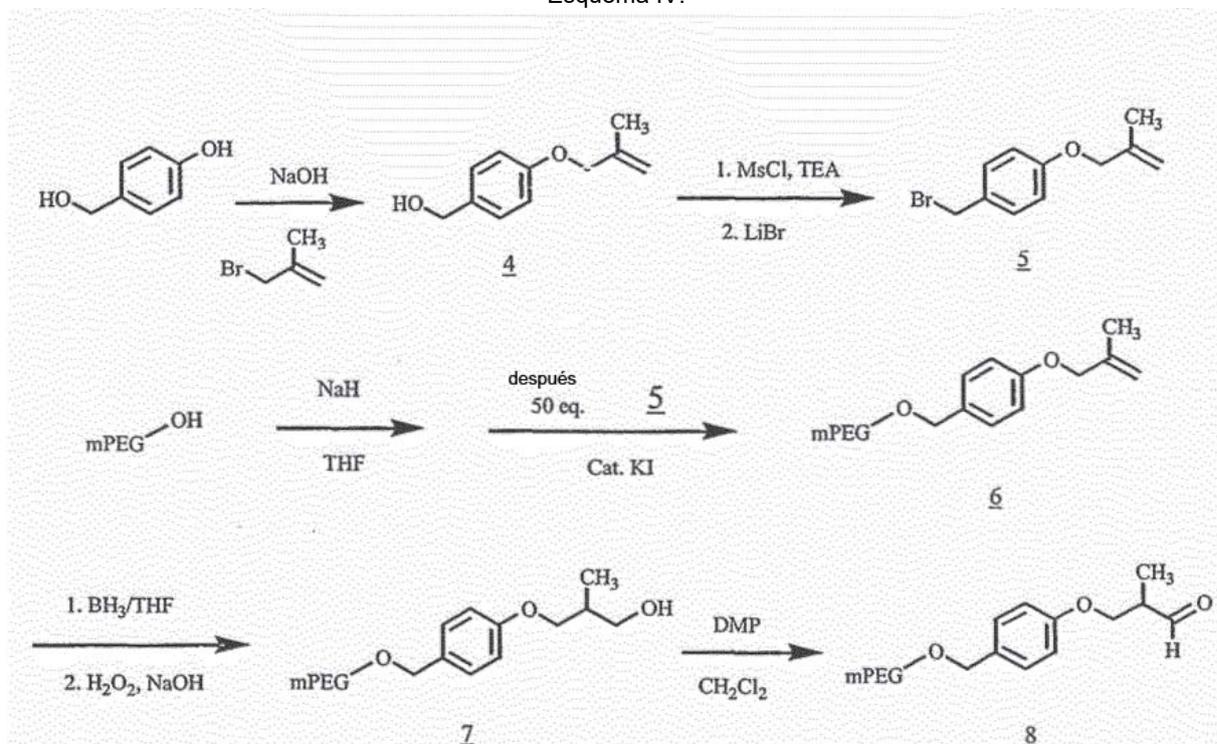
ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquilitio.

Además, T₁ y T₂ son, independientemente, ausente, o un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, y puede estar en orto, meta, o para entre sí. Cada L (cuando está presente) es, independientemente, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₇ saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido o un alcarilo sustituido o no sustituido en donde el alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado. Los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquilitio.

Habitualmente, P-OH es polietilen glicol (PEG) o monometoxi polietilen glicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 5.000 a 40.000 Da.

Por ejemplo, la síntesis de mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído (8) se muestra en el Esquema IV;

Esquema IV:



A una disolución de 4-hidroxi-bencílico alcohol (2,4 g, 20 mmol) en THF (50 ml) y agua (2,5 ml) se añadió en primer lugar hidróxido de sodio (1,5 g, 37,5 mmol) y entonces 3-bromo-2-metilpropeno (4,1 g, 30 mmol). Esta mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 h. A la mezcla se añadió 10 % ácido cítrico (2,5 ml) y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3×15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado (10 ml), se secaron y se concentraron para proporcionar el compuesto **4**, (3,3 g, 93 %). La ¹HRMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,29 (m, 2H), 6,92 (m, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,01 (s, 1H), 4,56 (s, 2H), 4,46 (s, 2H), 1,85 (s, 3H).

Se añadieron cloruro de mesilo (MsCl; 2,5 g, 15,7 mmol) y trietil amina (TEA; 2,8 ml, 20 mmol) a una disolución del compuesto **4** (2,0 g, 11,2 mmol) en CH₂Cl₂ (25 ml) a 0 °C. y la reacción se puso en la nevera durante 16 h. Un procesamiento habitual rindió un aceite amarillo claro (2,5 g, 87 %). La ¹HRMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,31 (m, 2H), 6,94 (m, 2H), 5,16 (s, 1H), 5,01 (s, 1H), 5,03 (s, 2H), 4,59 (s, 2H), 4,44 (s, 2H), 3,67 (s, 3H), 1,85 (s, 3H). Este aceite (2,4 g, 9,4 mmol) se disolvió en THF (20 ml) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió agua (2,5 ml) a la mezcla y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3×15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron para proporcionar el bromuro deseado **5** (2,3 g, 96 %) como un aceite amarillo claro. La ¹HRMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,29 (m, 2H), 6,88 (m, 2H), 5,11 (s, 1H), 4,98 (s, 1H), 4,53 (s, 2H), 4,44 (s, 2H), 1,83 (s, 3H).

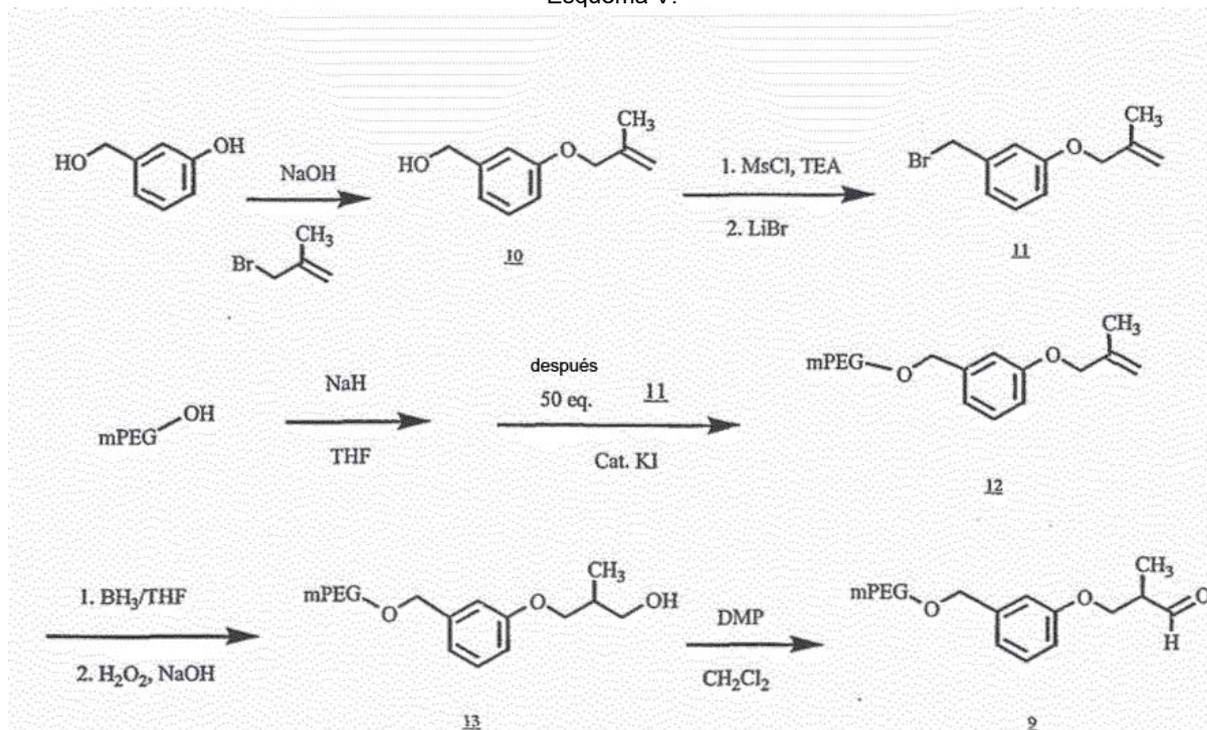
Se trató mPEG-OH de 20 kDa (2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml) y se añadió el compuesto 5 (0,55 g, 22,8 mmol) a la mezcla con una cantidad catalítica de KI. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 16 h. Se añadió agua (1,0 ml) a la mezcla y el disolvente se eliminó en vacío. Al residuo se añadió CH₂Cl₂ (25 ml) y la capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 ml. La adición gota a gota a una disolución de éter (150 ml) resultó en un precipitado blanco que se recogió para rendir 6 (1,5 g) como un polvo blanco. La ¹HRMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,21 (d, 2H), 6,90 (d, 2H), 5,01 (s, 1H), 4,99 (s, 1H), 4,54 (s, 2H), 4,43 (s, 2H), 1,84 (s, 3H).

A una disolución del compuesto 6 (1,0 g, 0,05 mmol) en THF (10 ml) y CH₂Cl₂ (2 ml) enfriada hasta 0 °C, se añadió BH₃/THF (1,0 M, 3,5 ml) y la reacción se agitó durante 1 h. Se añadió una disolución 2,0 M de NaOH (2,5 ml) lentamente y seguido de 30 % H₂O₂ (0,8 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. Se siguió el procedimiento de procesamiento anterior (CH₂Cl₂, precipitado de éter) para rendir 7 (350 mg) como un sólido blanco. La ¹HRMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,21 (d, 2H), 6,84 (d, 2H), 4,54 (s, 2 H), 2,90 (m, 2H), 1,96 (d, 3H).

El compuesto 7 (150 mg, 0,0075 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (1,5 ml) y se añadió DMP (15 mg) mientras la mezcla de reacción se agitaba a temperatura ambiente durante 1,5 h. La ¹HRMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 9,76 (s, 1H), 7,21 (d, 2H), 6,78 (d, 2H), 4,44 (s, 2 H), 4,14 (m, 2H), 2,85 (m, 1H), 1,21 (d, 3H). A la mezcla se añadió NaHCO₃ saturado (0,5 ml) y Na₂S₂O₃ (0,5 ml) y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 1 h. Se siguió el procedimiento de procesamiento anterior (disolución de CH₂Cl₂, precipitado de éter) para proporcionar 8 (92 mg) como un sólido blanco.

De manera similar, se sintetizó mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído (9) como se describe en el Esquema V.

Esquema V:



A una disolución de 3-hidroxi-2-metilpropeno (2,4 g, 20 mmol) en THF (50 ml) y agua (2,5 ml) se añadió en primer lugar hidróxido de sodio (1,5 g, 37,5 mmol) y entonces 3-bromo-2-metilpropeno (4,1 g, 30 mmol). Esta mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 h. A la mezcla se añadió 10 % ácido cítrico (2,5 ml) y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3×15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado (10 ml), se secaron y se concentraron para proporcionar el compuesto 10 (3,2 g, 90 %). La ¹HRMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,26 (m, 1H), 6,94 (m, 2H), 6,86 (m, 1H), 5,11 (s, 1H), 5,01 (s, 1H), 4,61 (s, 1H), 4,44 (s, 2H), 1,82 (s, 3H).

Se añadieron MsCl (2,5 g, 15,7 mmol) y TEA (2,8 ml, 20 mmol) a una disolución del compuesto 10 (2,0 g, 11,2 mmol) en CH₂Cl₂ (25 ml) a 0 °C, y la reacción se puso en la nevera durante 16 h. Un procesamiento habitual rindió un aceite amarillo claro (2,5 g, 87 %). La ¹HRMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,31 (m, 1H), 7,05 (m, 2H), 6,91 (m, 1H), 5,16 (s, 1 H), 5,04 (s, 1H), 4,59 (s, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,71 (s, 3H). Este aceite (2,4 g, 9,4 mmol) se disolvió en THF (20 ml) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h y se enfrió

hasta temperatura ambiente. A la mezcla se añadió agua (2,5 ml) y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3×15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron para proporcionar el bromuro deseado **11** (2,2 g, 92 %) como un aceite amarillo claro. La ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,29 (m, 1H), 6,98 (m, 2H), 6,85 (m, 1H), 5,14 (s, 2H), 4,98 (s, 2H), 4,50 (s, 2H), 4,44 (s, 2H), 1,82 (d, 3H).

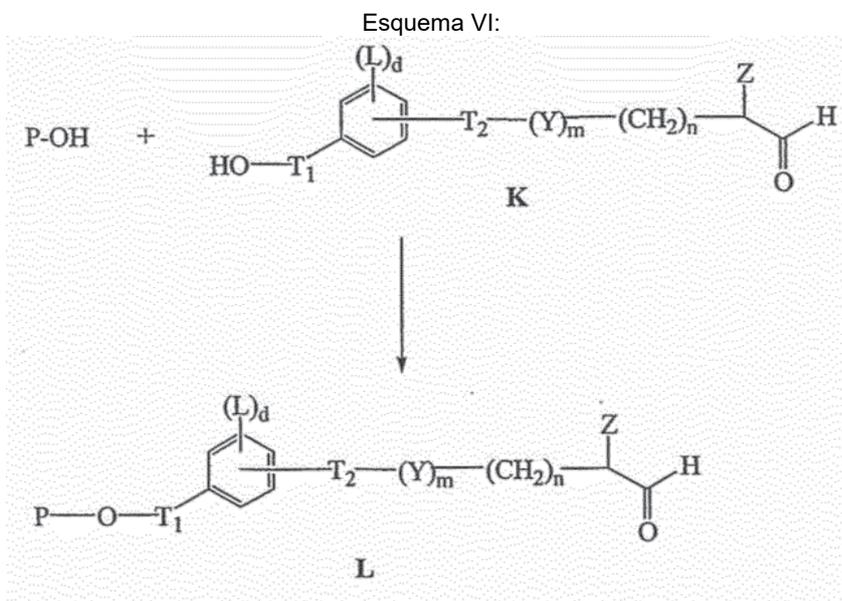
Se trató mPEG-OH de 20 kDa (2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml) y se añadió el compuesto **11** (0,55 g, 22,8 mmol) a la mezcla con una cantidad catalítica de KI. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 16 h. Se añadió agua (1,0 ml) a la mezcla y el disolvente se eliminó en vacío. Al residuo se añadió CH₂Cl₂ (25 ml) y la capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 ml. La adición gota a gota a una disolución de éter (150 ml) resultó en un precipitado blanco que se recogió para rendir **12** (1,8 g) como un polvo blanco. La ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,19 (m, 1H), 6,88 (m, 2H), 6,75 (m, 1H), 4,44 (s, 2H), 4,10 (m, 2H), 1,82 (d, 3H).

A una disolución del compuesto **12** (1,0 g, 0,05 mmol) en THF (7,5 ml) y CH₂Cl₂ (2,5 ml) enfriada hasta 0 °C, se añadió BH₃/THF (1,0 M, 3,5 ml) y la reacción se agitó durante 1 h. Se añadió una disolución 2,0 M de NaOH (3 ml) lentamente, seguido de 30 % H₂O₂ (0,85 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. Se siguió el procedimiento de procesamiento anterior (CH₂Cl₂, precipitado de éter) para rendir **13** (450 mg) como un sólido blanco. La ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 7,15 (m, 1H), 6,84 (m, 2H), 6,69 (m, 1H), 4,50 (s, 2H), 2,90 (m, 2H), 1,95 (d, 3H).

El compuesto **13** (200 mg, 0,01 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (1,5 ml) y se añadió DMP (20 mg) mientras la mezcla de reacción se agitaba a temperatura ambiente durante 1 h. La ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) mostró δ 9,74 (s, 1H), 7,17 (m, 1H), 6,86 (m, 2H), 6,74 (m, 1H), 4,48 (s, 2H), 4,15 (m, 2H), 2,78 (m, 1H), 1,22 (d, 3H). A la mezcla se añadió NaHCO₃ saturado (0,5 ml) y Na₂S₂O₃ (0,5 ml) y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 1 h. Se siguió el procedimiento de procesamiento anterior (disolución de CH₂Cl₂, precipitado de éter) para proporcionar **9** (142 mg) como un sólido blanco.

B) Generación mediante reacción con alcoholes aromáticos

Los polialquilenglicoles activados se sintetizan por una reacción de Mitsunobu entre un polialquilenglicol que tiene una funcionalidad hidroxilo terminal libre y un alcohol aromático. El esquema de reacción se describe en el Esquema VI.



El polialquilenglicol (P-OH) se hace reaccionar con un alcohol (K) para formar el éter (L). En estos compuestos, m es cero o uno, d es cero o un número entero de uno a cuatro, y n es cero o un número entero de uno a cinco. Y es O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR', y NR'. T₁ y T₂ son independientemente, ausente, o un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada.

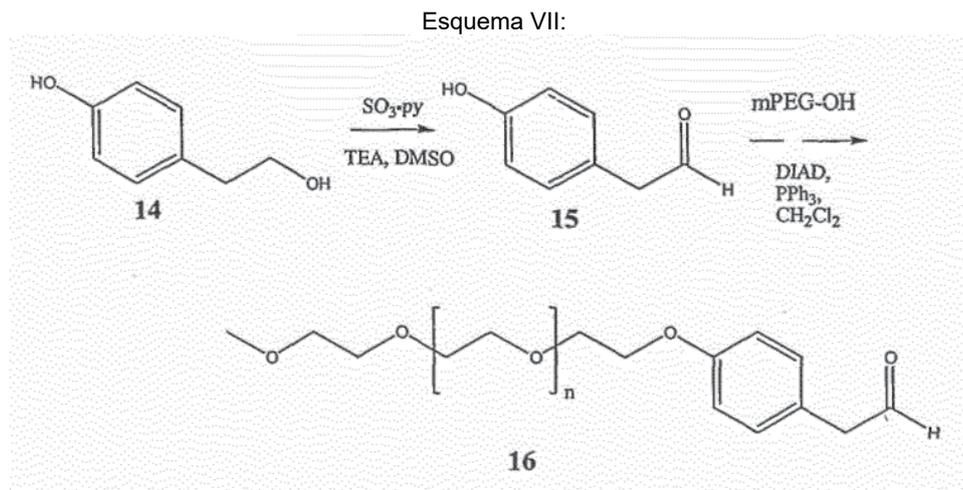
R' y Z son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada.

Cada L (si está presente) es, independientemente, un grupo alquilo o heteroalquilo C₁ a C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C₃ a C₇ saturado o insaturado, un grupo arilo o

heteroarilo sustituido o no sustituido o un alcarilo sustituido o no sustituido. El alquilo es un grupo alquilo o heteroalcarilo C₁ a C₂₀ saturado o insaturado, y los sustituyentes pueden ser halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilato, éster, formilo, acilo, tiocarbonilo, tioéster, tioacetato, tioformiato, alcoxilo, fosforilo, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo, resto aromático, resto heteroaromático, imino, sililo, éter, o alquiltio.

P es un polímero de polialquilenglicol. Habitualmente, P-OH es polietilen glicol (PEG) o monometoxi polietilen glicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 5.000 a 40.000 Da.

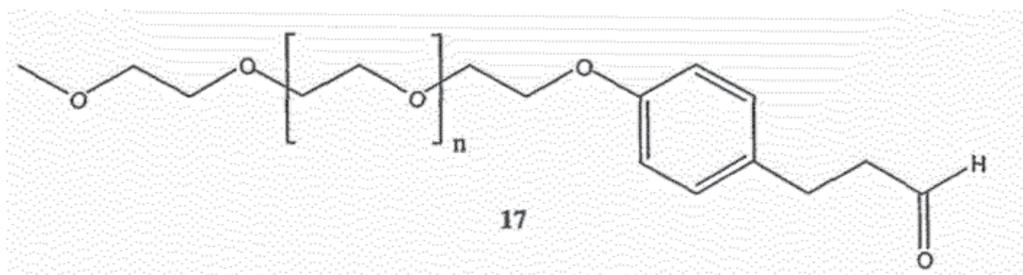
10 Por ejemplo, una síntesis de mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído (**16**) se describe en el Esquema VII.



15 Se sintetizó 4-hidroxifenilacetaldehído (**15**) como se describe en *Heterocycles*, 2000, 53, 777-784. Se disolvió 4-hidroxifenil alcohol (Compuesto **14**, 1,0 g, 7,3 mmol, Aldrich) en dimetilsulfóxido (8 ml, Aldrich). Con agitación, se añadió TEA (2,2 ml, 16 mmol, Aldrich) lentamente. Se disolvió completamente complejo de piridina-trióxido de azufre (SO₃•pi) (2,5 g, 16 mmol, Aldrich) en dimetilsulfóxido (9 ml, Aldrich) y esta disolución se añadió gota a gota al alcohol, con agitación vigorosa. Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con CH₂Cl₂, después se lavó con agua enfriada en hielo. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró a sequedad. La purificación usando cromatografía en gel de sílice con hexano-acetato de etilo como eluyente (5:1, después 2:1) rindió 488 mg (49 %) de 4-hidroxifenilacetaldehído (**15**).

25 El mPEG-OH de 20 kDa (101 mg, 0,005 mmol) y 4-hidroxifenilacetaldehído (**15**) (39 mg, 0,29 mmol) formaron un azeótropo cuatro veces con tolueno, después se recogieron en CH₂Cl₂ anhidro (2 ml, Aldrich). A esta disolución se añadió trifetilfosfina (PPh₃; 66 mg, 0,25 mmol, Aldrich) y después diisopropilazodicarboxilato (DIAD; 49 µl, 0,25 mmol, Aldrich) con agitación. Después de 3 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a dietil éter agitado vigorosamente. El precipitado resultante se aisló por filtración y se lavó tres veces con dietil éter. El material crudo se recogió en CH₂Cl₂ y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró a sequedad. El material se recogió en un mínimo de CH₂Cl₂, se precipitó añadiendo gota a gota a dietil éter agitado. Este material se recogió por filtración, se lavó tres veces con dietil éter y se secó para proporcionar 63 mg (62 %) de mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído (**16**).

Una síntesis de mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído (**17**) se preparó de una manera similar.



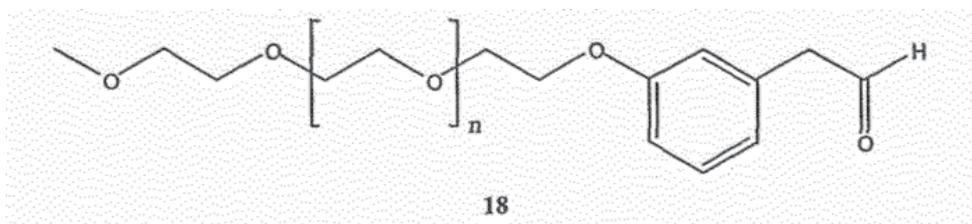
40 Se preparó 4-hidroxifenilpropionaldehído por una síntesis análoga a la de para 4-hidroxifenilacetaldehído (*Heterocycles*, 2000, 53, 777-784). Se disolvió 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol (1,0 g, 6,6 mmol, Aldrich) en dimetilsulfóxido (8 ml, Aldrich). Se añadió TEA (2,0 ml, 14 mmol, Aldrich) lentamente con agitación. Se disolvió completamente complejo de piridina-trióxido de azufre (SO₃•pi) (2,3 g, 15 mmol, Aldrich) en dimetilsulfóxido (9 ml,

Aldrich) y esta disolución se añadió gota a gota al alcohol, con agitación vigorosa. Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con CH₂Cl₂, después se lavó con agua enfriada en hielo. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró a sequedad. La purificación usando cromatografía en gel de sílice con hexano-acetato de etilo como eluyente (5:1, después 2:1) rindió 745 mg (75 %) de 4-hidroxifenilpropionaldehído.

5 El mPEG-OH de 20 kDa (100 mg, 0,005 mmol) y 4-hidroxifenilpropionaldehído (40 mg, 0,27 mmol) formaron un azeótropo cuatro veces con tolueno, después se recogieron en CH₂Cl₂ anhidro (2 ml, Aldrich). A esta disolución se añadió trifetilfosfina (66 mg, 0,25 mmol, Aldrich) y después diisopropilazodicarboxilato (49 µl, 0,25 mmol, Aldrich) con agitación. Después de 3 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a dietil éter agitado vigorosamente. El precipitado resultante se aisló por filtración y se lavó tres veces con dietil éter. El material crudo se recogió en CH₂Cl₂ y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró a sequedad. El material se recogió en un mínimo de CH₂Cl₂, se precipitó añadiendo gota a gota a dietil éter agitado. Este material se recogió por filtración, se lavó tres veces con dietil éter y se secó para proporcionar 60 mg (60 %) de mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído (**17**).

15

También se preparó mPEG-O-*m*-fenilacetaldehído (**18**) de esta manera.



20 Se preparó 3-hidroxifenilacetaldehído por una síntesis análoga a la de 4-hidroxifenilacetaldehído (*Heterocycles*, 2000, 53, 777-784). Se disolvió 3-hidroxifenetil alcohol (1,0 g, 7,5 mmol, Aldrich) en dimetilsulfóxido (8 ml, Aldrich). Se añadió TEA (2,0 ml, 14 mmol, Aldrich) lentamente con agitación. Se disolvió completamente complejo de piridina-trióxido de azufre (SO₃•pi) (2,4 g, 15 mmol, Aldrich) en dimetilsulfóxido (8 ml, Aldrich) y esta disolución se añadió gota a gota al alcohol, con agitación vigorosa. Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, la reacción se paró con agua enfriada en hielo, después se extrajo con CH₂Cl₂. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró a sequedad. La purificación usando cromatografía en gel de sílice con hexano-acetato de etilo como eluyente (3:1, después 1:1) rindió 225 mg (22 %) de 3-hidroxifenilacetaldehído.

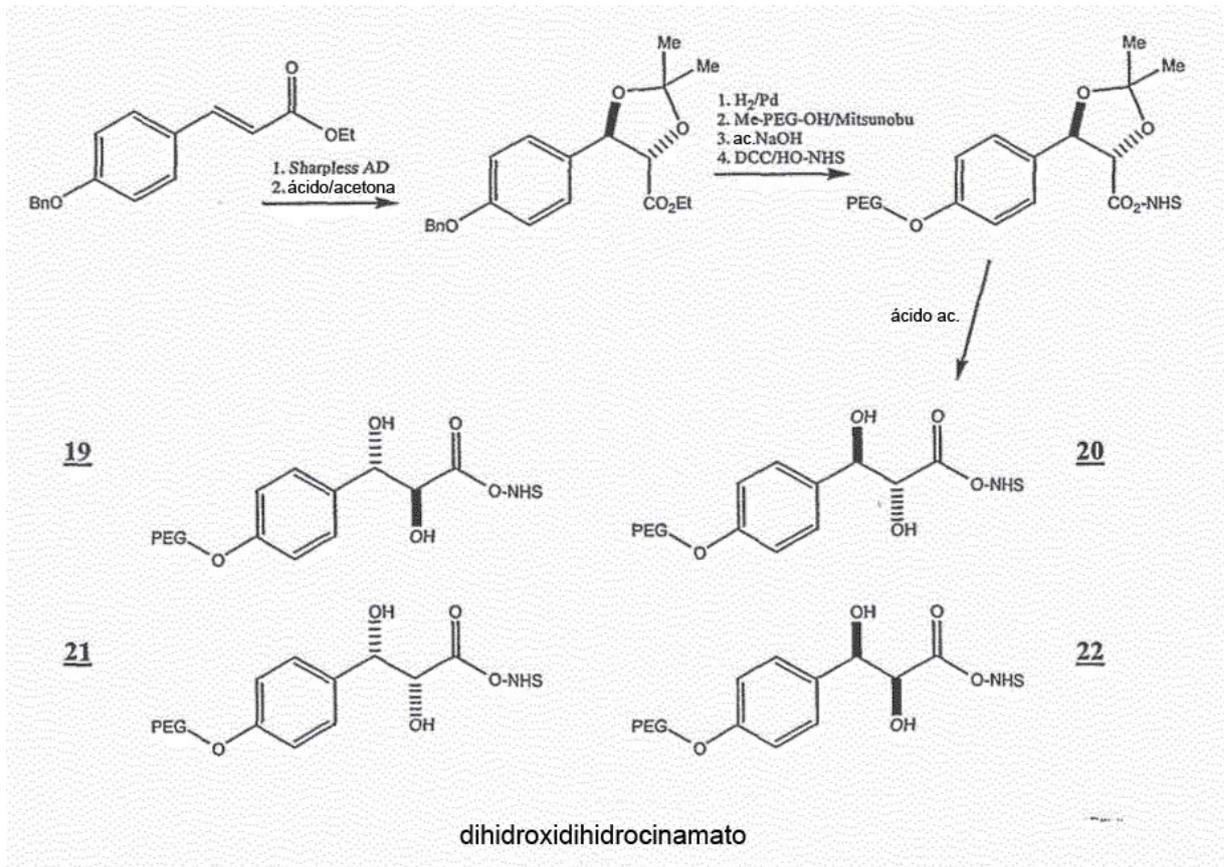
25

30 El mPEG-OH 20 kDa (307 mg, 0,015 mmol) y 3-hidroxifenilacetaldehído (117 mg, 0,86 mmol) formaron un azeótropo cuatro veces con tolueno, después se recogieron en CH₂Cl₂ anhidro (5 ml, Aldrich). A esta disolución se añadió trifetilfosfina (200 mg, 0,76 mmol, Aldrich) y después diisopropilazodicarboxilato (147 µl, 0,75 mmol, Aldrich) con agitación. Después de 3 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a dietil éter agitado vigorosamente. El precipitado resultante se aisló por filtración y se lavó tres veces con dietil éter y se secó para rendir 284 mg (93 %) de mPEG-O-*m*-fenilacetaldehído (**18**).

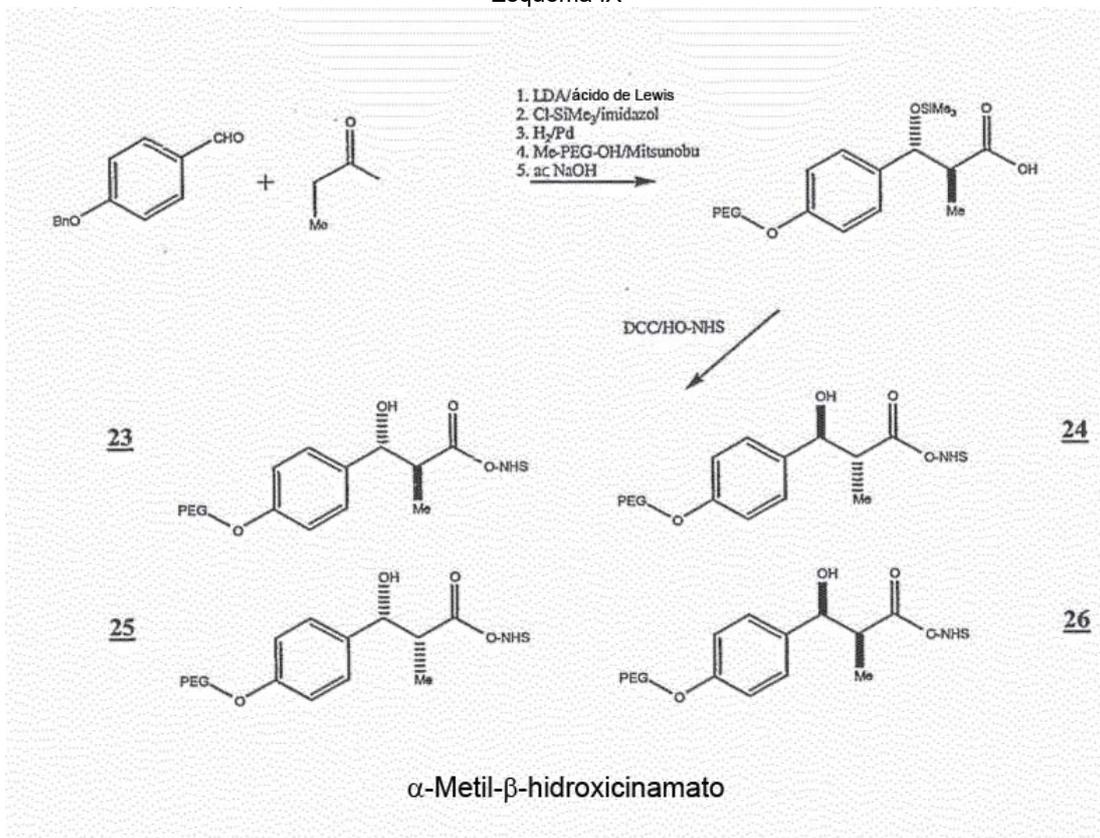
35

Los compuestos PEG-cinamato-N-hidroxi succinimato (NHS) quirales se generan, por ejemplo, como se muestra en los Esquemas VIII y IX:

Esquema VIII



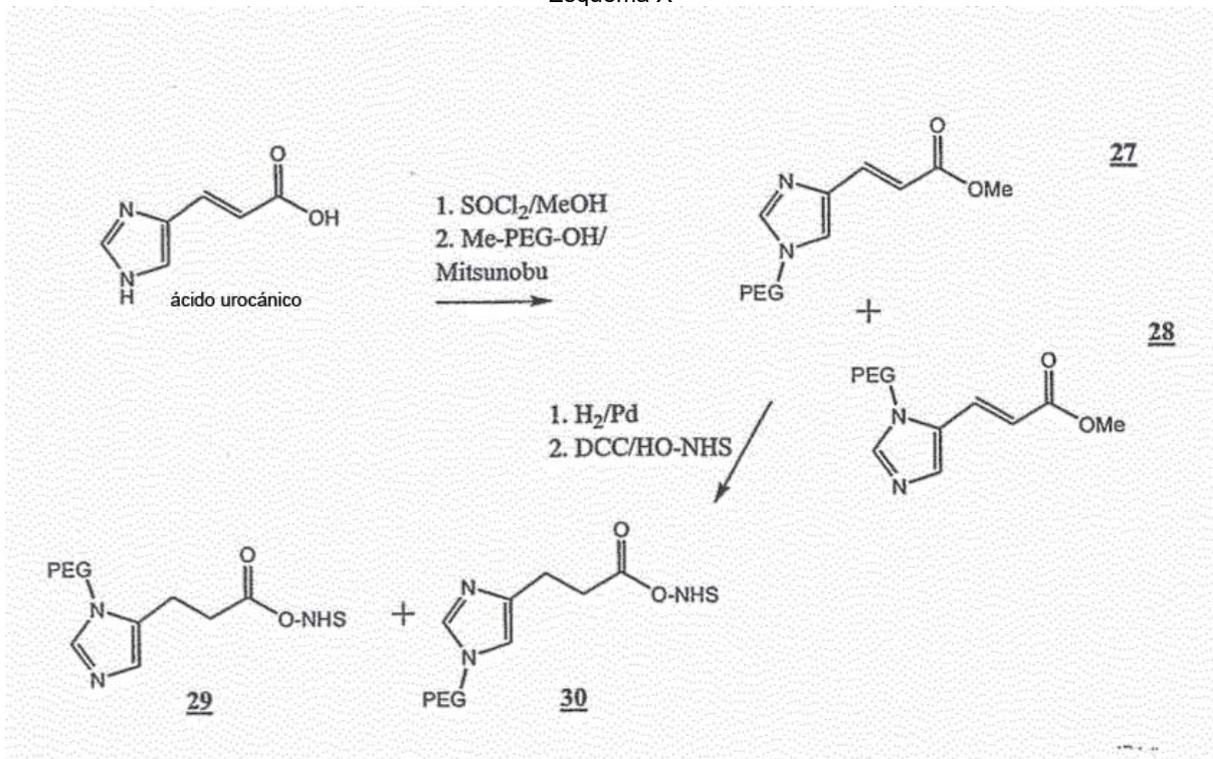
Esquema IX



5 Los compuestos PEG-Dihidrourocanato-NHS también se generan mediante una reacción de Mitsunobu, como se

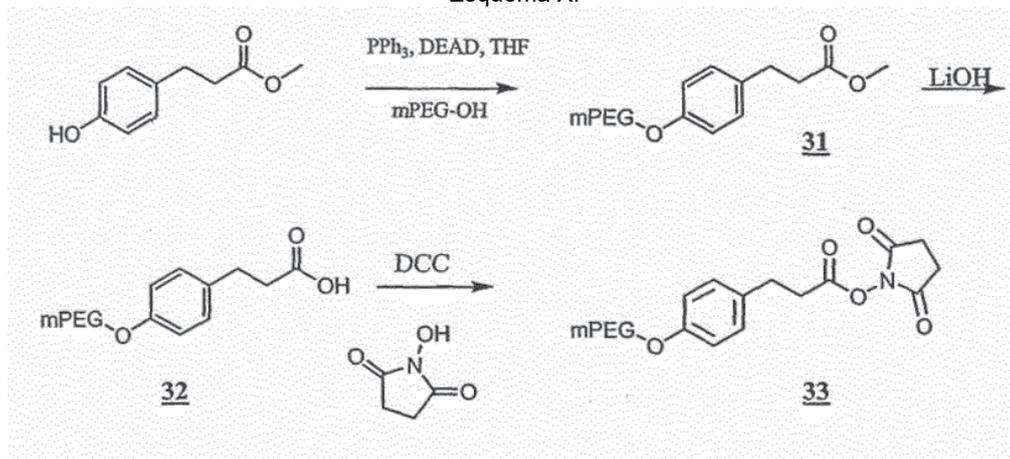
muestra en el Esquema X:

Esquema X



5 Los compuestos PEG-Dihidrocinamato-NHS también se generan a partir de un alcohol aromático como se muestra en el Esquema XI:

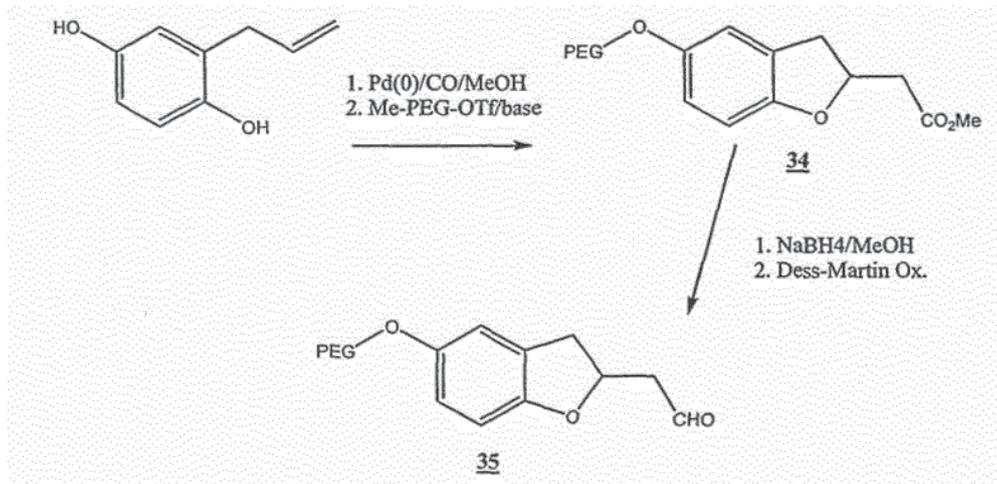
Esquema XI



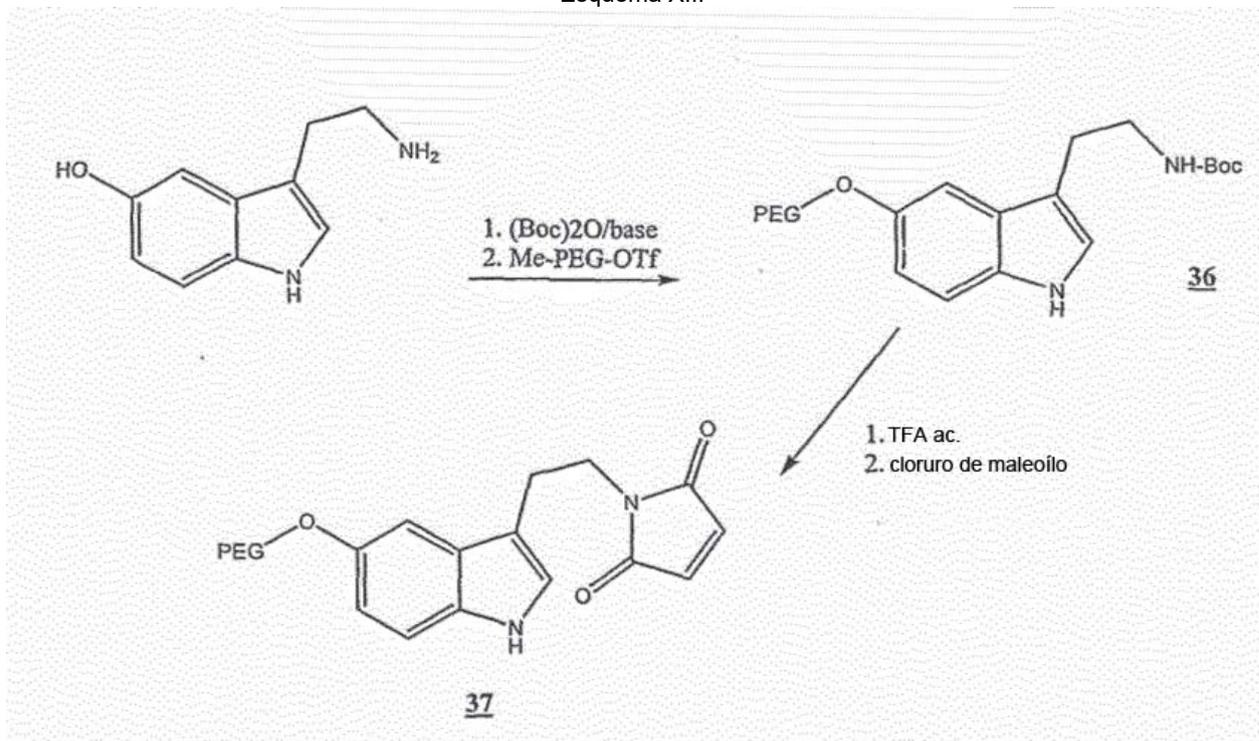
10

Los PEG-benzofuranos y PEG-indoles se generan como se muestra en los Esquemas XII y XIII:

Esquema XII



Esquema XIII



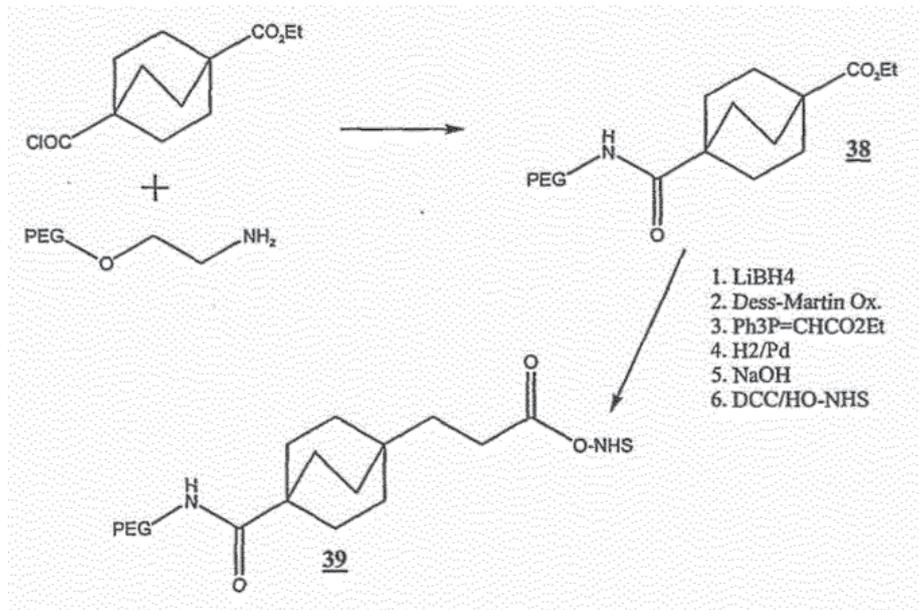
5

C) Generación mediante reacción de PEG-aminas

Las PEG aminas se hacen reaccionar con haluros de alquilo para generar PEG-amidas. Un ejemplo de la generación de un conjugado PEG-amida-biciclooctano-NHS se muestra en el Esquema XIV:

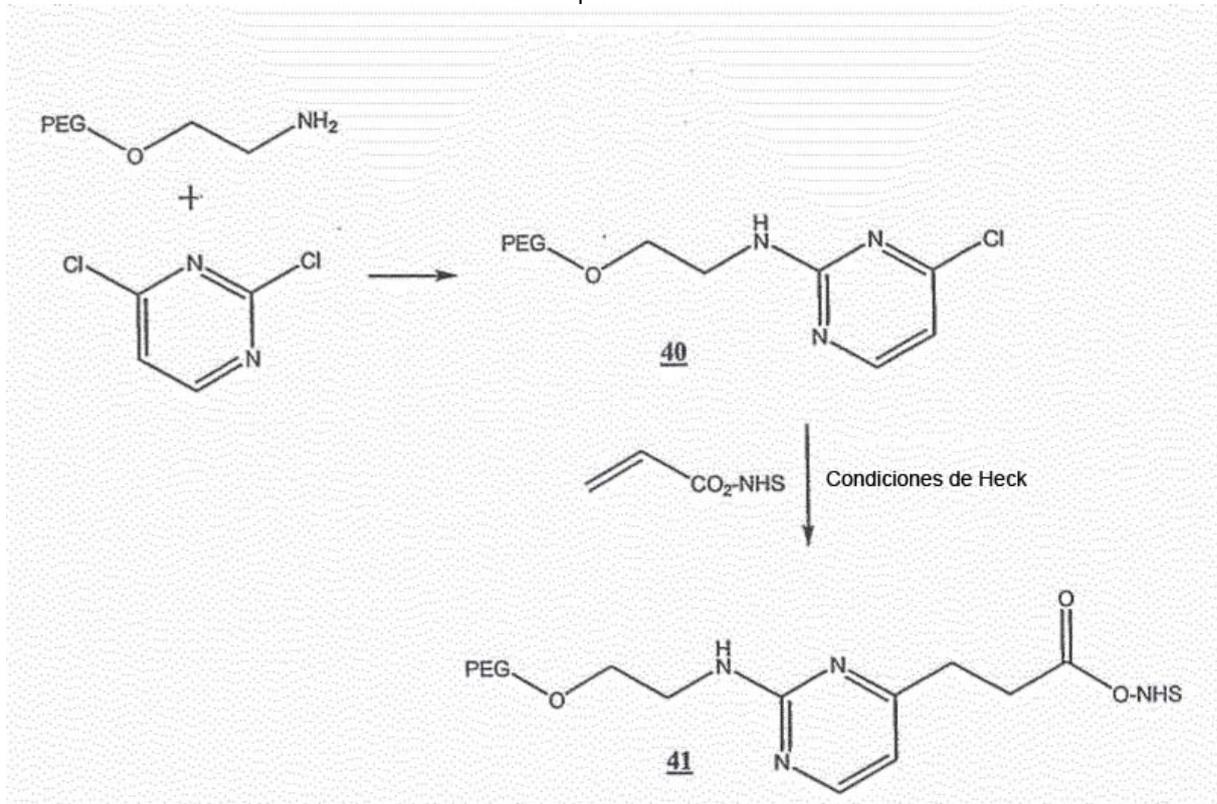
10

Esquema XIV



5 Una PEG-amina primaria se conjuga con un haluro de arilo para formar un conjugado PEG-amina secundaria, que se hace reaccionar bajo condiciones de Heck (un acoplamiento estereoespecífico catalizado por paladio de un alqueno con un haluro orgánico o triflato que carece de hidrógenos β hibridados en sp^3) con un NHS-alqueno para formar el conjugado PEG deseado. La síntesis de un conjugado que contiene pirimidina se muestra en el Esquema XV:

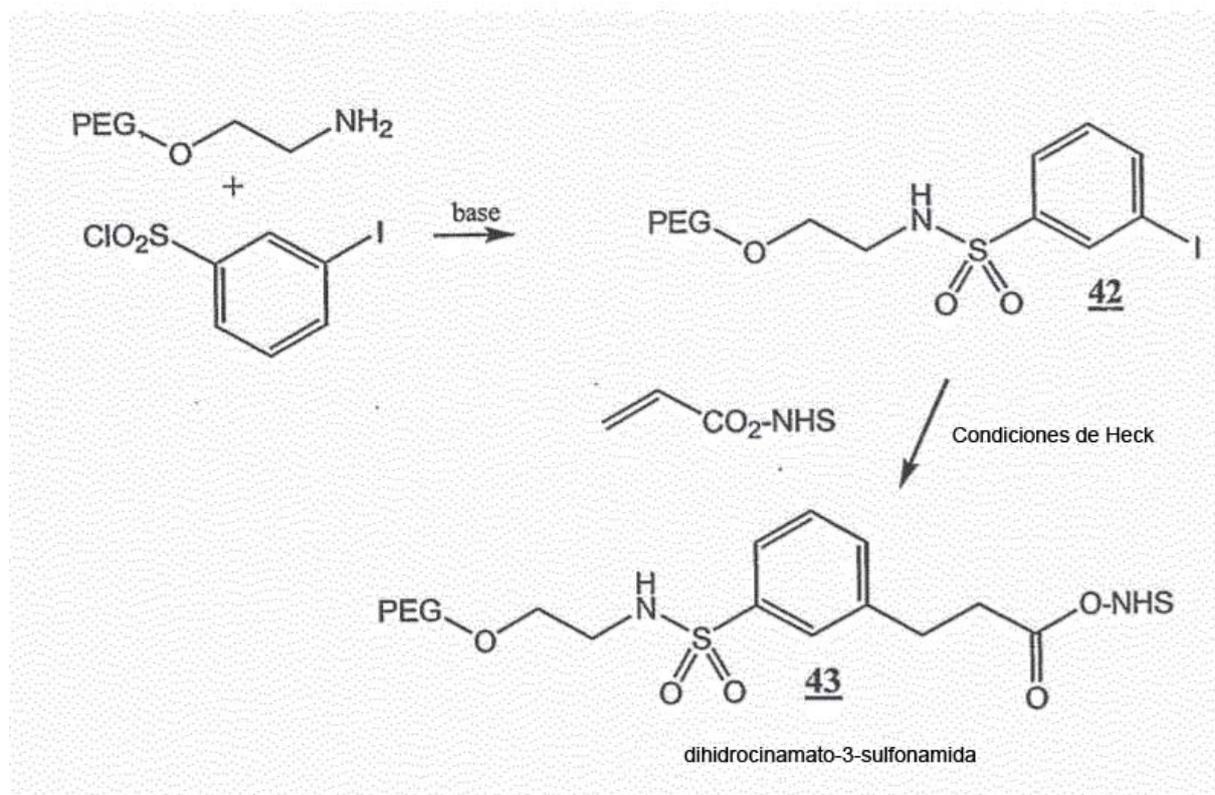
Esquema XV



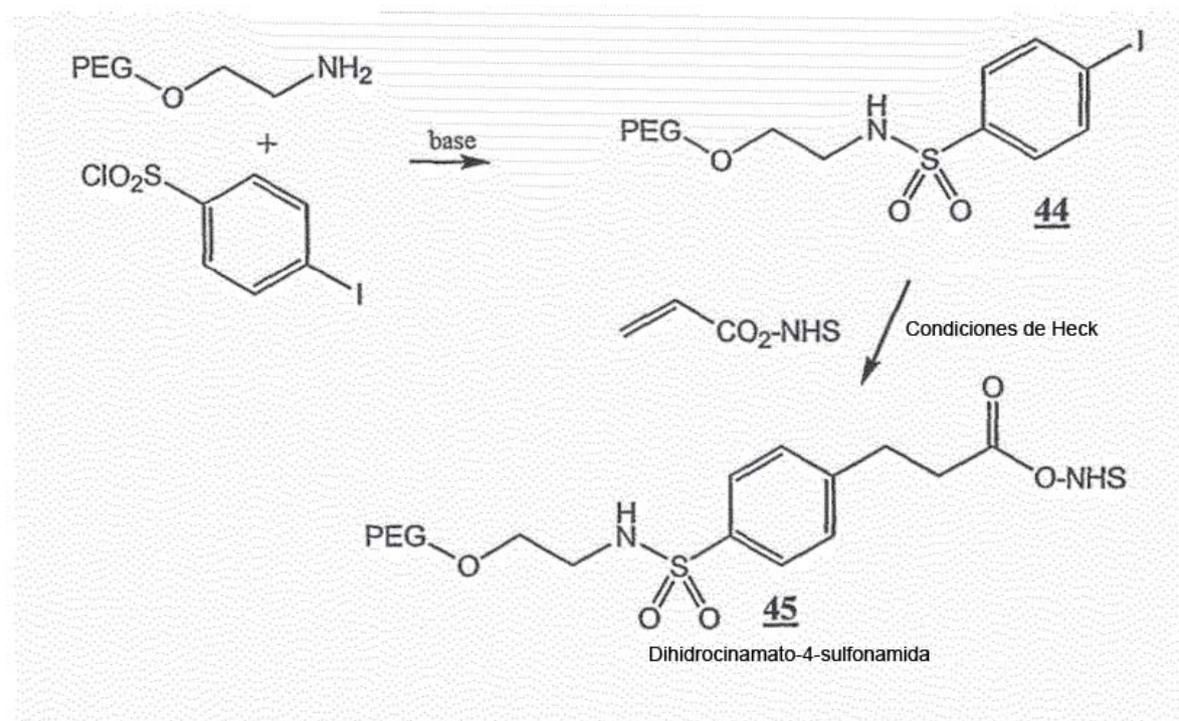
10

Los conjugados PEG-sulfonamida también se sintetizan de esta manera, como se muestra en el Esquema XVI:

Esquema XVI



y



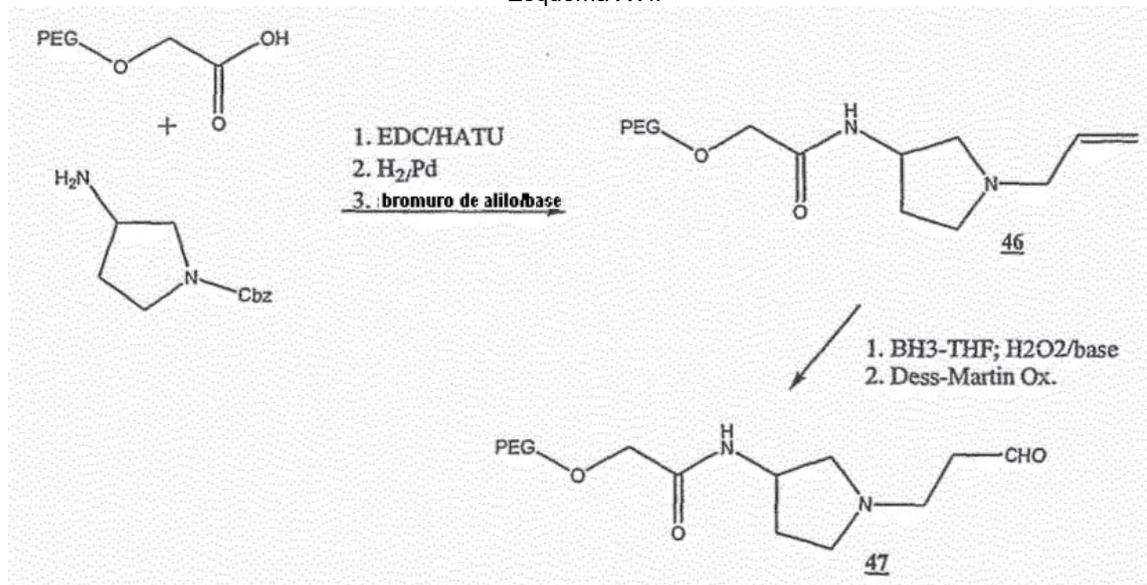
5

D) Compuestos generados mediante reacción con heterociclos

Los compuestos PEG se hacen reaccionar con nitrógenos en anillo o no en anillo en heterociclos para formar especies PEG reactivas. Las reacciones representativas se muestran en los Esquemas XVII para aminopirrolidina y XVIII para diversas piperazinas:

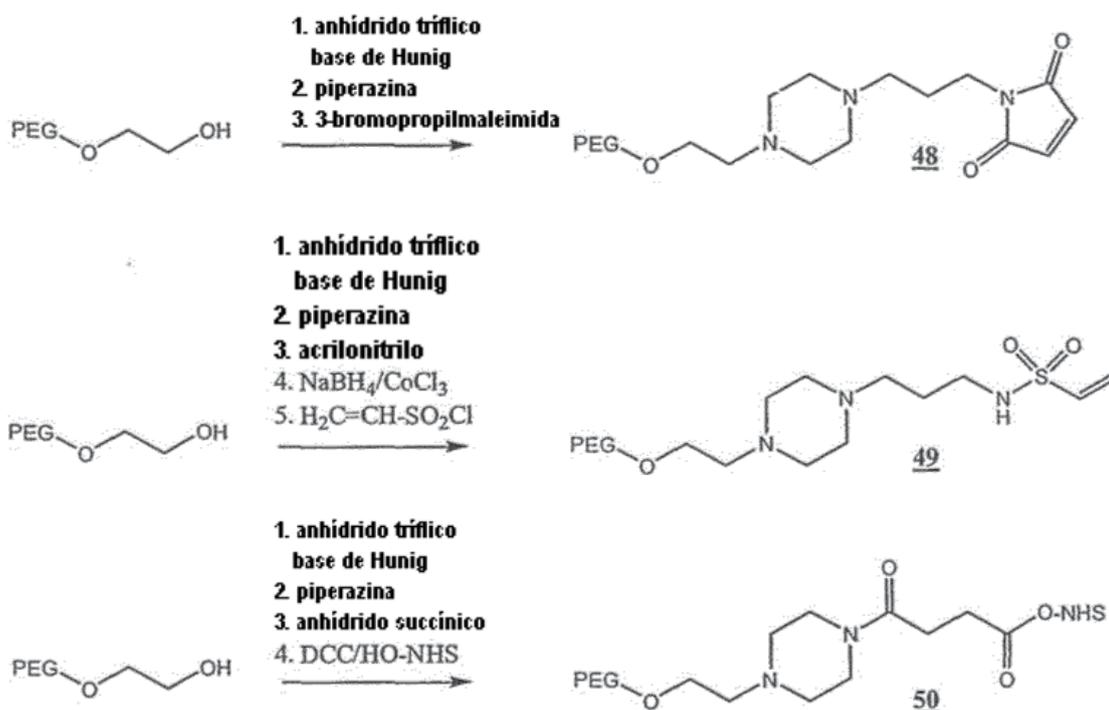
10

Esquema XVII



5

Esquema XVII



EJEMPLO 2: Preparación de conjugados peptídicos

- 10 Los conjugados peptídicos según la presente divulgación pueden prepararse haciendo reaccionar una proteína con una molécula de PGC activada. Por ejemplo, el interferón (IFN) puede hacerse reaccionar con un PEG-aldehído en presencia de un agente reductor (por ejemplo, cianoborohidruro de sodio) mediante alquilación reductora para producir el conjugado PEG-proteína, unido mediante un enlace amina. Véase, por ejemplo, la Patente Europea 0154316 B1.
- 15 Se PEGiló IFN-β-1a humano con los polialquilenglicoles activados siguientes de la divulgación: mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa, y mPEG-O-*m*-fenilacetaldéhído de 20 kDa. Las proteínas PEGiladas se purificaron a homogeneidad a partir de sus mezclas de reacción respectivas y se sometieron a una serie de ensayos de caracterización para averiguar la
- 20 la identidad, pureza, y potencia de las proteínas modificadas.

A continuación aparece una divulgación detallada de la preparación y caracterización de IFN- β -1a humano modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, y mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa.

5

A) Preparación y caracterización de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa

Se PEGiló IFN- β -1a humano en su extremo N con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa. El producto de la química de alquilación reductora usado para incorporar el PEG en el núcleo de IFN- β -1a resultó en la formación de una unión amina que es extremadamente estable frente a la degradación. El IFN- β -1a PEGilado se sometió a caracterización extensa, incluyendo análisis por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), mapeo peptídico, y evaluación de actividad en un ensayo antivírico *in vitro*. La pureza del producto, según se mide por SDS-PAGE y SEC, fue mayor del 90 %. En la muestra PEGilada no hubo evidencia de agregados. Los niveles residuales de IFN- β -1a no modificado en el producto estuvieron por debajo del límite de cuantificación, pero parecieron representar aproximadamente 1 % del producto. La actividad específica del IFN- β -1a PEGilado en el ensayo de actividad antivírica se redujo aproximadamente 2 veces comparado con el IFN- β -1a no modificado (CE_{50} = 32 μ g/ml para IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa frente a CE_{50} = 14 μ g/ml para IFN- β -1a no modificado). El IFN- β -1a PEGilado a granel se formuló a 30 μ g/ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,3, que contenía 14 mg/ml de albúmina de suero humano (HSA), similar a la formulación usada para AVONEX® (Biogen, Cambridge, Mass.) que se ha sometido a caracterización extensa. El material fue suministrado como un líquido congelado que se almacenó a -70 °C.

Las propiedades del IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa se resumen en la Tabla 1:

25

Tabla 1. Propiedades del IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa

Eficiencia de PEGilación	>90 %
Proporción IFN- β -1a/PEG	1:1
Pureza	>90 %
Sitio de unión	Extremo N
Actividad antivírica CE_{50}	32 μ g/ml

30

1. Preparación de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa.

Se diluyeron 10 ml de AVONEX® no formulado (IFN- β -1a a granel intermedio, un lote clínico de fármaco a granel que pasó todos los ensayos para uso en seres humanos, a 250 μ g/ml en 100 mM fosfato de sodio pH 7,2, 200 mM NaCl) con 12 ml de 165 mM MES pH 5,0 y 50 μ l de 5 N HCl. La muestra se cargó en una columna de SP-Sefarosa FF de 300 μ l (Pharmacia). La columna se lavó con 3 x 300 μ l de 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 75 mM NaCl, y la proteína se eluyó con 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 600 mM NaCl. Las fracciones de elución se analizaron para su absorbancia a 280 nm y se estimó la concentración de IFN- β -1a en las muestras usando un coeficiente de extinción de 1,51 para una disolución de 1 mg/ml. Las fracciones del pico se combinaron para proporcionar una concentración de IFN- β -1a de 3,66 mg/ml, que se diluyó posteriormente a 1,2 mg/ml con agua.

40

A 0,8 ml del IFN- β -1a del combinado eluido de la SP-Sefarosa diluido, se añadieron 0,5 M fosfato de sodio pH 6,0 hasta 50 mM, se añadió cianoborohidruro de sodio (Aldrich) hasta 5 mM, y se añadió mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa hasta 5 mg/ml. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 16 h en la oscuridad. El IFN- β -1a PEGilado se purificó de la mezcla de reacción en una columna SP-Sefarosa FF de 0,5 ml como sigue: 0,6 ml de la mezcla de reacción se diluyeron con 2,4 ml de 20 mM MES pH 5,0, y se cargó en la columna de SP-Sefarosa. La columna se lavó con fosfato de sodio pH 5,5, 75 mM NaCl y el IFN- β -1a PEGilado se eluyó de la columna con 25 mM MES pH 6,4, 400 mM NaCl. El IFN- β -1a PEGilado se purificó adicionalmente en una columna de FPLC de exclusión molecular Superosa 6 HR 10/30 con 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 150 mM NaCl como la fase móvil. La columna de exclusión molecular (25 ml) se corrió a 20 ml/h y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las fracciones de elución se analizaron para contenido de proteína por absorbancia a 280 nm, se combinaron, y se determinó la concentración de proteína del combinado. La concentración de IFN- β -1a PEGilado se indica en equivalentes de IFN ya que el resto de PEG no contribuye a la absorbancia a 280 nm. Se tomaron para análisis muestras del combinado, y el resto se diluyó hasta 30 μ g/ml con tampón de formulación que contenía HSA, se alicuotó a 0,25 ml/vial, y se almacenó a -70 °C.

55

2. Espectro UV de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa purificado. El espectro UV (240-340 nm) de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa se obtuvo usando la muestra a granel formulada pre-HSA. La muestra PEGilada presentó un máximo de absorbancia a 278-279 nm y un mínimo de absorbancia a 249-250 nm, consistente con la observada para el intermedio a granel IFN- β -1a no modificado. La concentración de proteína del producto PEGilado se estimó a partir del espectro usando un coeficiente de extinción de $\epsilon_{280}^{0,1\%} = 1,51$. La concentración de proteína del granel PEGilado fue 0,23 mg/ml. No había turbidez presente en la muestra como es evidente por una ausencia de absorbancia a 320 nm.

65

3. Caracterización de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa por SDS-PAGE. Se

5 sometieron 4 µg de IFN-β-1a no modificado y modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa a SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel con un gradiente 10-20 %. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250, y se muestra en la Figura 1 (Carril A, marcadores de peso molecular (desde la parte superior a la inferior; 100 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 27 kDa, y 18 kDa, respectivamente); Carril B, IFN-β-1a no modificado; Carril C, IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa). El análisis por SDS-PAGE de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa reveló una única banda principal con una masa aparente de 55 kDa, consistente con la modificación por un único PEG. No se detectaron formas de masa superior que resultan de la presencia de grupos PEG adicionales. En el producto purificado, PEGilado, se detectó IFN-β-1a no modificado; sin embargo, la cantidad está por debajo del límite de cuantificación. El nivel de IFN-β-1a no modificado en la preparación se estima que representa solo aproximadamente el 1 % de la proteína total.

15 4. Caracterización de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa por cromatografía de exclusión por tamaño. Se sometieron IFN-β-1a no modificado y modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa a SEC en una columna de FPLC de exclusión molecular analítica Superosa 6 HR10/30 usando PBS pH 7,2 como la fase móvil. La columna se corrió a 20 ml/h y el eluyente se monitorizó para absorbancia a 280 nm, como se muestra en la Figura 2: Panel A: estándares de peso molecular (670 kDa, tiroglobulina; 158 kDa, gamma globulina; 44 kDa, ovalbúmina; 17 kDa, mioglobina; 1,3 kDa, vitamina B12), Panel B: IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa; Panel C: IFN-β-1a no modificado. El IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa eluyó como un único pico afilado con una masa molecular aparente de aproximadamente 200 kDa, consistente con el volumen hidrodinámico grande del PEG. No se observó evidencia de agregados. Se detectó IFN-β-1a no modificado en la preparación pero estaba por debajo del límite de cuantificación. Tomando como base el tamaño del pico, el IFN-β-1a no modificado representa el 1 % o menos del producto, consistente con lo observado usando SDS-PAGE.

25 5. Análisis de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa por mapeo peptídico. La especificidad de la reacción de PEGilación se evaluó por mapeo peptídico. El IFN-β-1a no modificado y modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa se digirieron con endoproteinasa Lys-C de *Achromobacter* (Wako Bioproducts) y los productos de escisión resultantes se fraccionaron por HPLC de fase reversa en una columna Vydac C₄ usando un gradiente de 30 min de 0 a 70 % acetonitrilo, en 0,1 % TFA. El eluyente de la columna se monitorizó para absorbancia a 214 nm.

35 Todos los péptidos predichos de la digestión por endoproteinasa Lys-C de IFN-β-1a se han identificado previamente por secuenciación N-terminal y espectrometría de masas (Pepinsky et al., (2001) J Pharmacology and Experimental Therapeutics 297:1059), y, de los mismos, solo el péptido que contiene el extremo N de IFN-β-1a se alteró por modificación con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa; como es evidente por su desaparición del mapa peptídico. Los datos de mapeo indican por lo tanto que el resto PEG se une específicamente a este péptido. Los datos indican además que la modificación por PEG está dirigida al extremo N de la proteína ya que solo la modificación N-terminal resultaría en la pérdida específica de este péptido.

40 B) Preparación y caracterización de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa

45 Se PEGiló IFN-β-1a humano en el extremo N con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa. El producto de la química de alquilación reductora que se usó para incorporar el PEG en el núcleo de IFN-β-1a resulta en la formación de una unión amina que es extremadamente estable frente a la degradación. El IFN-β-1a PEGilado se sometió a caracterización extensa, incluyendo análisis por SDS-PAGE, SEC, mapeo peptídico, y evaluación de actividad en un ensayo antivírico *in vitro*. La pureza del producto, según se mide por SDS-PAGE y SEC, fue mayor del 95 %. En la muestra de IFN-β-1a PEGilado no hubo evidencia de agregados. Los niveles residuales de IFN-β-1a no modificado en el producto estuvieron por debajo del límite de cuantificación, pero parecieron representar aproximadamente 1 % del producto. La actividad específica del IFN-β-1a PEGilado en el ensayo de actividad antivírica se redujo aproximadamente 2 veces comparado con el IFN-β-1a no modificado (CE₅₀= 31 pg/ml para IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa frente a CE₅₀= 14 pg/ml para IFN-β-1a no modificado). El IFN-β-1a PEGilado a granel se formuló a 30 µg/ml en PBS pH 7,2, que contenía 15 mg/ml de HSA, similar a la formulación usada para AVONEX® que se ha sometido a caracterización extensa. El material fue suministrado como un líquido congelado que se almacenó a -70 °C.

Las propiedades del IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa se resumen en la Tabla 2:

60 **Tabla 2.** Propiedades del IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa

65	Eficiencia de PEGilación	>80 %
	Proporción IFN-β-1a/PEG	1:1
	Pureza	>95 %
	Sitio de unión	Extremo N

Actividad antivirica CE₅₀

31 pg/ml

1. Preparación de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa. Se diluyeron 80 ml de AVONEX® no formulado (IFN-β-1a a granel intermedio, un lote clínico de fármaco a granel que pasó todos los ensayos para uso en seres humanos, a 254 µg/ml en 100 mM fosfato de sodio pH 7,2, 200 mM NaCl) con 96 ml de 165 mM MES pH 5,0, y 400 µl de 5 N HCl. La muestra se cargó en una columna SP-Sefarosa FF de 1,2 ml (Pharmacia). La columna se lavó con 6,5 ml de 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 75 mM NaCl, y la proteína se eluyó con 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 600 mM NaCl. Las fracciones de elución se analizaron para su absorbancia a 280 nm y se estimó la concentración de IFN-β-1a en las muestras usando un coeficiente de extinción de 1,51 para una disolución de 1 mg/ml. Las fracciones del pico se combinaron para proporcionar una concentración de IFN-β-1a de 4,4 mg/ml. A 2,36 ml de los 4,4 mg/ml de IFN-β-1a del combinado de eluato de la SP-Sefarosa, se añadió 0,5 M fosfato de sodio pH 6,0 hasta 50 mM, se añadió cianoborohidruro de sodio (Aldrich) hasta 5 mM, y se añadió mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, hasta 10 mg/ml. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 21 h en la oscuridad. El IFN-β-1a PEGilado se purificó de la mezcla de reacción en una columna SP-Sefarosa FF de 8,0 ml como sigue: se diluyeron 9,44 ml de la mezcla de reacción con 37,7 ml de 20 mM MES pH 5,0, y se cargó en la columna SP-Sefarosa. La columna se lavó con fosfato de sodio pH 5,5, 75 mM NaCl y después el IFN-β-1a PEGilado se eluyó de la columna con 25 mM MES pH 6,4, 400 mM NaCl. El IFN-β-1a PEGilado se purificó adicionalmente en una columna de exclusión molecular de FPLC Superosa 6 HR 10/30 con 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 150 mM NaCl como la fase móvil. La columna de exclusión molecular (25 ml) se corrió a 24 ml/h y se recogieron fracciones de 0,25 ml. Las fracciones de elución se analizaron para contenido de proteína por SDS-PAGE, se combinaron, y se determinó la concentración de proteína del combinado. La concentración de IFN-β-1a PEGilado se indica en equivalentes de IFN después de ajustar para la contribución del PEG a la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 2 para una disolución de 1 mg/ml del IFN-β-1a PEGilado. Se tomaron muestras del combinado para análisis, y el resto se diluyó hasta 30 µg/ml con tampón de formulación que contenía HSA, se alicuotó a 0,25 ml/vial, y se almacenó a -70 °C.

2. Espectro UV de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa purificado. El espectro UV (240-340 nm) de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa se obtuvo usando la muestra a granel formulada pre-HSA. La muestra PEGilada presentó un máximo de absorbancia a 278-279 nm y un mínimo de absorbancia a 249-250 nm, consistente con la observada para el intermedio a granel de IFN-β-1a no modificado. La concentración de proteína del producto PEGilado se estimó a partir del espectro usando un coeficiente de extinción de $\epsilon_{280}^{0,1\%} = 2,0$. La concentración de proteína del granel PEGilado fue 0,42 mg/ml. No había turbidez presente en la muestra como es evidente por la ausencia de absorbancia a 320 nm.

3. Caracterización de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa por SDS-PAGE. Se sometieron 2,1 µg de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa a SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel con un gradiente 4-20 %. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250. El análisis de SDS-PAGE de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa reveló una única banda principal con una masa aparente de 55 kDa consistente con la modificación por un único PEG. En el producto PEGilado purificado se detectó IFN-β-1a no modificado; sin embargo, la cantidad está por debajo del límite de cuantificación. El nivel de IFN-β-1a no modificado en la preparación se estima que representa solo aproximadamente el 1 % de la proteína total.

4. Caracterización de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa por cromatografía de exclusión por tamaño. Se sometió IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa a SEC en una columna de exclusión molecular de FPLC analítica Superosa 6 HR10/30 usando PBS pH 7,0 como la fase móvil. La columna se corrió a 24 ml/h y el eluyente se monitorizó para absorbancia a 280 nm. El IFN-β-1a PEGilado eluyó como un único pico afilado sin evidencia de agregados (Figura 3).

5. Análisis de IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa por mapeo peptídico. La especificidad de la reacción de PEGilación se evaluó por mapeo peptídico. Se digirieron 13,3 µg de IFN-β-1a no modificado y modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa con 20 % (p/p) de endoproteinasa Lys-C de *Achromobacter* (Wako Bioproducts) en PBS que contenía 5 mM DTT, 1 mM EDTA, a pH 7,6, a temperatura ambiente durante 30 h (volumen final = 100 µl). Se añadieron 4 µl de 1 M DTT y 100 µl de 8 M urea y las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Los péptidos se separaron por HPLC de fase reversa en una columna Vydac C₁₈ (214TP51) usando un gradiente de 70 min de 0-63 % acetonitrilo, en 0,1 % TFA, seguido de un gradiente de 10 min de 63-80 % acetonitrilo, en 0,1 % TFA. El eluyente de la columna se monitorizó para absorbancia a 214 nm.

Todos los péptidos predichos de la digestión por endoproteinasa Lys-C de IFN-β-1a se han identificado previamente por secuenciación N-terminal y espectrometría de masas (Pepinsky et al., (2001) J Pharmacology and Experimental Therapeutics 297:1059), y, de los mismos, solo el péptido que contiene el extremo N de IFN-β-1a se alteró por modificación con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa; como es evidente por su desaparición del mapa. Los datos de mapeo indican por lo tanto que el resto PEG se une específicamente a este péptido. Los datos

indican además que la modificación por PEG está dirigida al extremo N de la proteína ya que solo la modificación N-terminal resultaría en la pérdida específica de este péptido.

C) Preparación y caracterización de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa

5 Se PEGiló IFN- β -1a humano en el extremo N con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa. El producto de la química de alquilación reductora que se usó para incorporar el PEG en el núcleo de IFN- β -1a resultó en la formación de una unión amina que es extremadamente estable frente a la degradación. El IFN- β -1a PEGilado se sometió a caracterización extensa, incluyendo análisis por SDS-PAGE, SEC, mapeo peptídico, y evaluación de actividad en un ensayo antivírico *in vitro*. La pureza del producto, según se mide por SDS-PAGE y SEC, fue mayor del 95 %. En la muestra de IFN- β -1a PEGilado no hubo evidencia de agregados. Los niveles residuales de IFN- β -1a no modificado en el producto estuvieron por debajo del límite de cuantificación, pero parecieron representar aproximadamente 1 % del producto. En un ensayo de estabilidad, no fue evidente ni agregación ni degradación de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa en tampón Tris pH 7,4, después de una incubación a 37 °C durante hasta 7 días. La actividad específica del IFN- β -1a PEGilado en el ensayo de actividad antivírica se redujo aproximadamente 2 veces comparado con el IFN- β -1a no modificado (CE₅₀= 31 pg/ml para IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa frente a CE₅₀= 14 pg/ml para IFN- β -1a no modificado). El IFN- β -1a PEGilado a granel se formuló a 30 μ g/ml en PBS pH 7,3, que contenía 14 mg/ml de HSA, similar a la formulación usada para AVONEX® que se ha sometido a caracterización extensa. El material fue suministrado como un líquido congelado que se almacenó a -70 °C.

Las propiedades del IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa se resumen en la Tabla 3:

Tabla 3. Propiedades del IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa

25	Eficiencia de PEGilación	>80 %
	Proporción IFN- β -1a/PEG	1:1
	Pureza	>95 %
	Sitio de unión	Extremo N
	Actividad antivírica CE ₅₀	31 pg/ml

30 1. Preparación de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa. Se diluyeron 20 ml de AVONEX® no formulado (IFN- β -1a a granel intermedio, un lote clínico de fármaco a granel que pasó todos los ensayos para uso en seres humanos, a 250 μ g/ml en 100 mM fosfato de sodio pH 7,2, 200 mM NaCl) con 24 ml de 165 mM MES pH 5,0, 100 μ l de 5 N HCl, y 24 ml de agua. La muestra se cargó en una columna SP-Sefarosa FF de 600 μ l (Pharmacia). La columna se lavó con 2 \times 900 μ l de 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 75 mM NaCl, y la proteína se eluyó con 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 600 mM NaCl. Las fracciones de elución se analizaron para su absorbancia a 280 nm y se estimó la concentración de IFN- β -1a en las muestras usando un coeficiente de extinción de 1,51 para una disolución de 1 mg/ml. Las fracciones del pico se combinaron para proporcionar una concentración de IFN- β -1a de 2,3 mg/ml. A 1,2 ml del IFN- β -1a del combinado del eluato de SP-Sefarosa, se añadieron 0,5 M fosfato de sodio pH 6,0 hasta 50 mM, se añadió cianoborohidruro de sodio (Aldrich) hasta 5 mM, y se añadió mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa, hasta 10 mg/ml. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 18 h en la oscuridad. El IFN- β -1a PEGilado se purificó de la mezcla de reacción en una columna SP-Sefarosa FF de 0,75 ml como sigue: se diluyeron 1,5 ml de la mezcla de reacción con 7,5 ml de 20 mM MES pH 5,0, 7,5 ml de agua, y 5 μ l de 5 N HCl, y se cargó en la columna SP-Sefarosa. La columna se lavó con fosfato de sodio pH 5,5, 75 mM NaCl y después el IFN- β -1a PEGilado se eluyó de la columna con 20 mM MES pH 6,0, 600 mM NaCl. El IFN- β -1a PEGilado se purificó adicionalmente en una columna de exclusión molecular de FPLC Superosa 6 HR 10/30 con 5 mM fosfato de sodio pH 5,5, 150 mM NaCl como la fase móvil. La columna de exclusión molecular (25 ml) se corrió a 20 ml/h y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las fracciones de elución se analizaron para contenido de proteína por absorbancia a 280 nm, se combinaron, y se determinó la concentración de proteína del combinado. La concentración de IFN- β -1a PEGilado se indica en equivalentes de IFN después de ajustar para la contribución del PEG (mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa tiene un coeficiente de extinción a 280 nm de 0,5 para una disolución de 1 mg/ml) a la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 2 para una disolución de 1 mg/ml del IFN- β -1a PEGilado. Se tomaron muestras del combinado para análisis, y el resto se diluyó hasta 30 μ g/ml con tampón de formulación que contenía HSA, se alicuotó a 0,25 ml/vial, y se almacenó a -70 °C.

60 2. Espectro UV de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa purificado. El espectro UV (240-340 nm) de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa se obtuvo usando la muestra a granel formulada pre-HSA. La muestra PEGilada presentó un máximo de absorbancia a 278-279 nm y un mínimo de absorbancia a 249-250 nm, consistente con la observada para el intermedio a granel de IFN- β -1a no modificado. La concentración de proteína del producto PEGilado se estimó a partir del espectro usando un coeficiente de extinción de $\epsilon_{280}^{0,1\%} = 2,0$. La concentración de proteína del granel PEGilado fue 0,10 mg/ml. No había turbidez presente en la muestra como es evidente por una ausencia de absorbancia a 320 nm.

65 3. Caracterización de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa por SDS-PAGE. Se sometieron 2,5 μ g de IFN- β -1a no modificado y modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa a SDS-

PAGE en condiciones reductoras en un gel con gradiente 10-20 %. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250, y se muestra en la Figura 4 (Carril A: IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa; Carril B: IFN- β -1a no modificado; Carril C: marcadores de peso molecular (desde la parte superior a la inferior; 100 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 27 kDa, y 18 kDa, respectivamente)). El análisis por SDS-PAGE de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa reveló una única banda principal con una masa aparente de 55 kDa consistente con la modificación por un único PEG. No se detectaron formas de masa superior resultantes de la presencia de grupos PEG adicionales. En el producto PEGilado purificado se detectó IFN- β -1a no modificado; sin embargo, la cantidad está por debajo del límite de cuantificación. El nivel de IFN- β -1a no modificado en la preparación se estima que representa solo aproximadamente el 1 % de la proteína total.

4. Caracterización de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa por cromatografía de exclusión por tamaño. Se sometió IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa a SEC en una columna de exclusión molecular analítica de FPLC Superosa 6 HR10/30 usando PBS pH 7,2 como la fase móvil. La columna se corrió a 20 ml/h y el eluyente se monitorizó para absorbancia a 280 nm, como se muestra en la Figura 5: Panel A: estándares de peso molecular (670 kDa, tiroglobulina; 158 kDa, gamma globulina; 44 kDa, ovalbúmina; 17 kDa, mioglobina; 1,3 kDa, vitamina B12); Panel B: IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa. El IFN- β -1a PEGilado eluyó como un único pico afilado con una masa molecular aparente de aproximadamente 200 kDa consistente con el volumen hidrodinámico grande del PEG. No se observó evidencia de agregados. Se detectó IFN- β -1a no modificado en la preparación pero estaba por debajo del límite de cuantificación. Tomando como base el tamaño del pico, el IFN- β -1a no modificado representa el 1 % o menos del producto, consistente con lo observado usando SDS-PAGE.

5. Análisis de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa por mapeo peptídico. La especificidad de la reacción de PEGilación se evaluó por mapeo peptídico. Se digirieron IFN- β -1a no modificado y modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa con endoproteinasa Lys-C de *Achromobacter* (Wako Bioproducts) y los productos de escisión resultantes se fraccionaron por HPLC de fase reversa en una columna Vydac C₄ usando un gradiente de 30 min de 0 a 70 % acetonitrilo, en 0,1 % TFA. El eluyente de la columna se monitorizó para absorbancia a 214 nm.

Todos los péptidos predichos de la digestión por endoproteinasa Lys-C de IFN- β 1a se han identificado previamente por secuenciación N-terminal y espectrometría de masas (Pepinsky et al., (2001) J Pharmacology and Experimental Therapeutics 297:1059), y, de los mismos, solo el péptido que contiene el extremo N de IFN- β -1a se alteró por modificación con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa; como es evidente por su desaparición del mapa. Los datos de mapeo indican por lo tanto que el resto PEG se une específicamente a este péptido. Los datos indican además que la modificación por PEG está dirigida al extremo N de la proteína ya que solo la modificación N-terminal resultaría en la pérdida específica de este péptido.

6. Estabilidad del IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa. Para ensayar la estabilidad de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa, se diluyeron muestras hasta 0,1 μ g/ml con 100 mM tampón Tris-HCl, pH 7,4, y se incubaron a 37 °C durante hasta 7 días. Se tomaron 20 μ l de muestra (2 μ g) en los días 0, 2, 5, y 7, y se analizó por SDS-PAGE en condiciones reductoras, como se muestra en la Figura 6: Carril A: marcadores de peso molecular (desde la parte superior a la inferior; 100 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 27 kDa, 18 kDa, y 15 kDa, respectivamente); Carriles B, C, D, y E: IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído tomado en el día 0, 2, 5, y 7, respectivamente. No se observó evidencia de agregación o degradación de IFN- β -1a PEGilado incluso después de 7 días a 37 °C.

EjemPlo 3. Actividad específica de IFN- β -1a humano PEGilado en un ensayo antivírico *in vitro*

La actividad antivírica específica de muestras de IFN- β -1a PEGilado se ensayó en células de carcinoma de pulmón humano (células A549) que se habían expuesto al virus de la encefalomiocarditis (EMC), y usando el agente de tinción metabólico 2,3-bis[2-Metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianilida (MTT; M-5655, Sigma, St. Louis, MO) como una medida de las células metabólicamente activas que permanecen después de la exposición al virus. Brevemente, las células A549 se pretrataron durante 24 h bien con IFN- β -1a no modificado o PEGilado (empezando a 66,7 μ g/ml y diluyendo de manera seriada 1,5 veces hasta 0,8 μ g/ml) antes del pulso con el virus. Las células se pulsaron durante 2 días con virus EMC a una dilución que resultó en la muerte celular completa en ausencia de IFN. Las placas se revelaron con MTT. Se preparó una disolución madre de MTT a 5 mg/ml en PBS y se esterilizó por filtración, y 50 μ l de esta disolución se diluyeron en los cultivos celulares (100 μ l por pocillo). Después de incubar a temperatura ambiente durante 30-60 min, la disolución MTT/medio se desechó, las células se lavaron con 100 μ l PBS, y finalmente el agente de tinción metabolizado se solubilizó con 100 μ l 1,2 N HCl en isopropanol. Las células viables (según se determina por la presencia del agente de tinción) se cuantificaron por absorbancia a 450 nm. Los datos se analizaron representando la absorbancia frente a la concentración de IFN- β -1a, y la actividad de IFN- β -1a se definió como la concentración a la que el 50 % de las células estaban muertas, es decir, el 50 % de efecto citopático (CE₅₀) o 50 % de DO₄₅₀ máxima. El ensayo se realizó ocho veces para IFN- β -1a no modificado y tres a cuatro veces con las diferentes muestras de IFN- β -1a PEGilado. Para cada ensayo, se obtuvieron puntos de datos en duplicado para cada concentración de proteína. Las representaciones representativas de viabilidad celular frente a la concentración de IFN- β -1a no modificado o PEGilado se muestran en las Figuras 7A y 7B. En la Figura 7A, los símbolos son como sigue: IFN- β -1a no modificado (O), IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (□), IFN- β -

1a modificado con mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (Δ), e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (\diamond). En la Figura 7B, los símbolos son como sigue: IFN- β -1a no modificado (O), IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa (\square), IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa (Δ), e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*m*-fenilacetaldehído de 20 kDa (\diamond).

Los valores CE₅₀ (la concentración a protección vírica mitad de la máxima) para IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa, mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa, y mPEG-O-*m*-fenilacetaldehído de 20 kDa se muestran en la Tabla 4. Todos los IFN- β -1a PEGilados se modificaron y purificaron a homogeneidad esencialmente como se describe para IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa como se ha descrito anteriormente.

Tabla 4. Actividad antivírica específica de IFN- β -1a no modificados y PEGilados

Proteína	CE ₅₀ media (pg/ml)
IFN- β -1a no modificado	14 (intervalo 12-16)
IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa	32 (intervalo 26-37)
IFN- β -1a modificado con mPEG-O- <i>p</i> -metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa	41 (intervalo 36-47)
IFN- β -1a modificado con mPEG-O- <i>m</i> -metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa	31 (intervalo 27-35)
IFN- β -1a modificado con mPEG-O- <i>p</i> -fenilacetaldehído de 20 kDa	31 (intervalo 25-39)
IFN- β -1a modificado con mPEG-O- <i>p</i> -fenilpropionaldehído de 20 kDa	31 (intervalo 27-34)
IFN- β -1a modificado con mPEG-O- <i>m</i> -fenilacetaldehído de 20 kDa	27 (intervalo 25-29)

EJEMPLO 4. Farmacocinética de IFN- β -1a no modificados y PEGilados administrados intravenosamente en ratas

Se inyectaron intravenosamente a ratas Lewis hembra canuladas bien 80 μ g/kg de IFN- β -1a no modificado o 24 μ g/kg de los IFN- β -1a PEGilados siguientes; IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa, IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa, IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*m*-fenilacetaldehído de 20 kDa, e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa. Tanto las proteínas no modificadas como PEGiladas se formularon en presencia de 14-15 mg/ml HSA como vehículo. Para la proteína no modificada, se obtuvo sangre (0,2 ml) a través de la cánula a diferentes puntos de tiempo; inmediatamente antes de la administración, y a las 0,083, 0,25, 0,5, 1,25, 3, y 5 horas post-administración. Para las proteínas PEGiladas, se obtuvo sangre (0,2 ml) a través de la cánula inmediatamente antes de la administración, y a las 0,083, 0,25, 0,5, 1,25, 3, 24, 48, y 72 h post-administración. Se recogió sangre completa en tubos separadores de suero (Beckton Dickinson No. 365956) y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min para permitir la coagulación. La sangre coagulada se centrifugó durante 10 min a 4 °C y el suero se retiró y almacenó a -70 °C hasta el momento del ensayo.

Las muestras de suero se descongelaron y se ensayaron en ensayos antivíricos. Las muestras de suero se diluyeron 1:50 en medio que contenía suero (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco que contenía 10 % (v/v) de suero bovino fetal, 100 U de cada una de penicilina y estreptomina, y 2 mM L-glutamina) y se ensayaron en ensayos antivíricos. Las muestras se titularon en pocillos designados de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos que contenía células de carcinoma de pulmón humano (A549, #CCL-185, ATCC, Rockville, Md.). Se ensayaron en cada placa diluciones de un estándar (66,7, 44,4, 29,6, 19,8, 13,2, 8,8, 5,9, 3,9, 2,6, 1,7, 1,2, y 0,8 pg/ml de la misma forma de IFN- β -1a administrada a la rata) y de tres muestras de suero. Las células A549 se pretrataron con muestras de suero diluidas durante 24 h antes del pulso con el virus de la encefalomiocarditis (EMC). Después de una incubación de 2 días con el virus, las células viables se tiñeron con una disolución de MTT (a 5 mg/ml en tampón fosfato) durante 1 h, se lavaron con tampón fosfato, y se solubilizaron con 1,2 N HCl en isopropanol. Los pocillos se leyeron a 450 nm. Se generaron curvas estándar del IFN- β -1a no modificado o PEGilado para cada placa y se usaron para determinar la cantidad de IFN- β -1a no modificado o PEGilado en cada muestra de ensayo. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos usando análisis no compartimental con software WinNonLin versión 3.0 o 3.3.

La Figura 8A muestra las representaciones de concentración frente a tiempo para IFN- β -1a no modificado (panel superior) e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (panel inferior), y la Figura 8B muestra las representaciones de concentración frente a tiempo para IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (panel superior) y mPEG-O-*p*-fenilacetaldehído de 20 kDa (panel inferior). Los puntos de datos son promedios de medidas de 3 ratas.

La Tabla 5 muestra los parámetros farmacocinéticos C_{max} (concentración máxima observada), t_{1/2} (vida media de eliminación), AUC (área bajo la curva), V_{ss} (volumen de distribución en estado estacionario), velocidad de aclaramiento, y MRT (tiempo de residencia medio) para IFN- β -1a no modificado y estas formas de IFN- β -1a PEGilado. Los datos mostrados en las Figuras 8A y 8B y en la Tabla 5 se obtuvieron en el mismo estudio.

La Figura 9A muestra las representaciones de concentración frente a tiempo para IFN- β -1a no modificado (panel superior) e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilpropionaldehído de 20 kDa (panel inferior). Los puntos de datos son promedios de medidas de 2 ratas. La Figura 9B muestra las representaciones de concentración frente a tiempo para IFN- β -1a modificado con mPEG-O-*m*-fenilacetaldéido con 20 kDa (panel superior) y mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (panel inferior). Los puntos de datos son promedios de medidas de 3 ratas.

La Tabla 6 muestra los parámetros farmacocinéticos para IFN- β -1a no modificado y estas formas de IFN- β -1a PEGilado. Los datos mostrados en las Figuras 9A y 9B y en la Tabla 6 se obtuvieron en el mismo estudio; independiente de los datos mostrados en las Figuras 8A y 8B, y en la Tabla 5.

Como está claro a partir de los datos mostrados en las Figuras 8A, 8B, 9A, y 9B, y en las Tablas 5 y 6, la PEGilación de IFN- β -1a con moléculas de PEG de la divulgación mejora las propiedades farmacocinéticas de IFN- β -1a. En todos los casos, las proteínas PEGiladas se aclararon menos rápidamente que el IFN- β -1a no modificado, resultando en velocidades de aclaramiento de 3,9-8,3 ml/h/kg comparado con 160-170 ml/h/kg para la proteína no modificada. Como una consecuencia de las velocidades de aclaramiento reducidas, el tiempo de residencia medio (MRT) se incrementó de aproximadamente 1 h para la proteína no modificada hasta 4,8-7,6 h para las proteínas PEGiladas. De manera similar, la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) se incrementó de aproximadamente 1 h para la proteína no modificada hasta 5,2-13 h para las proteínas PEGiladas. Los valores de área bajo la curva (AUC) también se incrementaron significativamente después de la PEGilación de IFN- β -1a. Para IFN- β -1a no modificado, la AUC fue aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ mientras para las proteínas PEGiladas los valores de AUC variaron de aproximadamente 3 a 6 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, a pesar del hecho de que las proteínas PEGiladas se dosificaron a un nivel 3,3 veces menor que la proteína no modificada. Para la concentración máxima observada (C_{max}), los valores fueron generalmente mayores para IFN- β -1a no modificado que para las proteínas PEGiladas, reflejando la dosis menor de las proteínas modificadas administrada. Para el volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}), los valores para todas las proteínas PEGiladas fueron menores que para IFN- β -1a no modificado, indicando una restricción en su capacidad para salir del compartimento sanguíneo central.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos para IFN-β-1a no modificado, IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*p*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, e IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*p*-fenilacetaldéhído de 20 kDa después de administración intravenosa en ratas^a

Parámetro	Unidades	IFN-β-1a no modificado	IFN-β-1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa	IFN-β-1a modificado con mPEG-O- <i>p</i> -metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa	IFN-β-1a modificado con mPEG-O- <i>p</i> -fenilacetaldéhído de 20 kDa
C _{max}	pg/ml	1.400.000	720.000	710.000	590.000
t _{1/2}	h	0,98	13	11	6,8
AUC	pg•h/ml	510.000	4.800.000	4.500.000	2.900.000
V _{ss}	ml/kg	160	39	40	53
Aclaramiento	ml/h/kg	160	5,0	5,3	8,3
MRT	h	0,98	7,6	7,4	6,4

^a Los datos farmacocinéticos para los IFN-β-1a no modificados y PEGilados mostrados se obtuvieron en el mismo estudio.

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos para IFN-β-1a no modificado, IFN-β-1a modificado con mPEG-O-ρ-fenilpropionaldehído de 20 kDa, IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-fenilacetaldéhído de 20 kDa, e IFN-β-1a modificado con mPEG-O-*m*-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa después de administración intravenosa en ratas^a

Parámetro	Unidades	IFN-β-1a no modificado	IFN-β-1a modificado con mPEG-O-ρ-fenilpropionaldehído de 20 kDa	IFN-β-1a modificado con mPEG-O- <i>m</i> -fenilacetaldéhído de 20 kDa	IFN-β-1a modificado con mPEG-O- <i>m</i> -metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa
C _{max}	pg/ml	670.000	930.000	550.000	700.000
t _{1/2}	h	0,92	5,2	7,7	7,1
AUC	pg·h/ml	470.000	4.700.000	3.800.000	6.200.000
V _{ss}	ml/kg	140	25	46	21
Aclaramiento	ml/h/kg	170	5,1	6,4	3,9
MRT	h	0,81	4,8	7,2	5,5

^aLos datos farmacocinéticos para los IFN-β-1a no modificados y PEGilados mostrados se obtuvieron en el mismo estudio.

EJEMPLO 5: Farmacocinética y farmacodinámica comparativas de IFN-β-1a humano no modificado y PEGilado en primates no humanos

Se realizan estudios comparativos de dosis única y repetida con IFN-β-1a no modificado y PEGilado para determinar su estabilidad y actividad relativas en primates no humanos. En estos estudios, la farmacocinética y farmacodinámica de los conjugados IFN-β-1a PEGilados se compara con la de IFN-β-1a no modificado y pueden extenderse a seres humanos inferencias razonables.

Animales y métodosEstudio 1 (dosis repetida)

Éste es un estudio de dosis repetida, de grupo paralelo, para evaluar la farmacocinética y farmacodinámica comparativa de IFN-β-1a no modificado y PEGilado. Se usan para este estudio primates (por ejemplo, monos Rhesus) sanos. Antes de la dosificación, todos los animales se evalúan para signos de mala salud por un veterinario de animales de laboratorio en dos ocasiones en los 14 días anteriores a la administración del artículo de ensayo; una evaluación debe ser en las 24 h anteriores a la primera administración del artículo de ensayo. Solo recibieron el artículo de ensayo los animales sanos. Las evaluaciones incluyen un examen físico general y recogidas de sangre pre-dosis para patología clínica de línea base y nivel de anticuerpo de línea base frente a IFN-β-1a. Todos los animales se pesan y se registran las temperaturas corporales en las 24 h anteriores a las administraciones del artículo de ensayo. Doce sujetos se incluyen y se asignan a grupos de tres para recibir 1×10^6 U/kg de IFN-β-1a no modificado o PEGilado, pero de otra manera IFN-β-1a idéntico. La administración es bien por la ruta subcutánea (SC) o intravenosa (IV). Seis animales macho reciben el artículo de ensayo por la ruta IV (3 por tratamiento) y otros 6 animales macho reciben el artículo de ensayo por la ruta SC (3 por tratamiento). Todos los animales deben no haber recibido anteriormente tratamiento con IFN-β. Cada animal se dosifica en dos ocasiones, las dosis están separadas por cuatro semanas. El volumen de la dosis es 1,0 ml/kg. La sangre se recoge para ensayo farmacocinético a las 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, y a las 96 horas después de cada inyección. Las muestras de sangre para la medida del marcador de respuesta biológica inducida por IFN, neopterinina sérica, se recogen a las 0, 24, 48, 72, 96, 168, 336, y a las 504 h después de la administración del fármaco de estudio. Las evaluaciones durante el periodo de estudio incluyen observaciones clínicas realizadas 30 min y 1 h post-dosis para signos de toxicidad. Se realizan observaciones visuales diarias y se registra la apariencia general, signos de toxicidad, malestar, y cambios en el comportamiento. Los pesos corporales y temperaturas corporales se registran a intervalos regulares a lo largo de 21 días post-dosis.

Estudio 2 (dosis única)

Éste es un estudio de dosis única, de grupo paralelo, para evaluar la farmacocinética y farmacodinámica comparativa de IFN-β-1a no modificado y PEGilado. Se usan para este estudio primates (por ejemplo, monos Rhesus) sanos. Antes de la dosificación, todos los animales se evalúan para signos de mala salud por un veterinario de animales de laboratorio en dos ocasiones en los 14 días anteriores a la administración del artículo de ensayo; una evaluación debe ser en las 24 h anteriores a la primera administración del artículo de ensayo. Solo recibieron el artículo de ensayo los animales sanos. Las evaluaciones incluyen un examen físico general y recogidas de sangre pre-dosis para patología clínica de línea base y nivel de anticuerpo de línea base frente a IFN-β-1a. Todos los animales se pesan y se registran las temperaturas corporales en las 24 h anteriores a las administraciones del artículo de ensayo. Veinte sujetos se incluyen y se asignan a uno de cinco grupos de cuatro animales (2 machos y 2 hembras por grupo) para recibir bien 1×10^6 U/kg de IFN-β-1a no modificado o PEGilado intramuscularmente (IM), o 2×10^5 U/kg, 1×10^6 U/kg, o 5×10^6 U/kg de IFN-β-1a PEGilado intravenosamente (IV). Todos los animales deben no haber recibido anteriormente tratamiento con IFN-β. El volumen de la dosis es generalmente 1,0 ml/kg. La sangre se recoge para ensayo farmacocinético a las 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, y a las 96 horas, y a los 7, 14, 21, y a los 28 días después de la administración del fármaco de estudio. Las muestras de sangre para la medida del marcador de respuesta biológica inducida por IFN, 2'-5'-oligoadenilato sintasa (2'-5'-OAS), se recogen a las 0, 12, 24, 48, 72, y a las 96 horas, y a los 7, 14, 21, y a los 28 días después de la administración del fármaco de estudio. Las evaluaciones durante el periodo de estudio incluyen observaciones clínicas realizadas 30 min y 1 h post-dosis para signos de toxicidad. Se realizan observaciones visuales diarias y se registra la apariencia general, signos de toxicidad, malestar, y cambios en el comportamiento. Los pesos corporales y temperaturas corporales se registran a intervalos regulares a lo largo de 28 días post-dosis.

Métodos de ensayo

Los niveles de IFN-β-1a en suero se cuantifican usando un bioensayo de efecto citopático (CPE). El ensayo CPE mide los niveles de actividad antivírica mediada por IFN. El nivel de actividad antivírica en una muestra refleja el número de moléculas de IFN activo contenidas en esa muestra en el momento en donde se recoge la sangre. Esta estrategia ha sido el método estándar para evaluar la farmacocinética de IFN-β. El ensayo CPE detecta la capacidad de IFN-β para proteger a las células de carcinoma de pulmón humano (A549, #CCL-185, ATCC, Rockville, MD) de la citotoxicidad debida al virus de la encefalomiocarditis (EMC). Las células se preincuban durante 15-20 h con muestras de suero para permitir la inducción y síntesis de proteínas inducibles por IFN que son responsables de la respuesta antivírica. El virus EMC se añade y se incuba durante 30 h adicionales antes de evaluar la citotoxicidad usando tinción con cristal

violeta. Un estándar de IFN- β interno así como un estándar interno de IFN- β -1a PEGilado se ensaya simultáneamente con las muestras en cada placa de ensayo. Este estándar se calibra frente a un estándar de referencia de IFN de fibroblastos humanos natural (WHO Second International Standard for Interferon, Human Fibroblast, Gb-23-902-53). Cada placa de ensayo también incluye pocillos control del crecimiento celular que no contienen IFN- β de ninguna clase ni EMC, y pocillo control del virus que contienen células y EMC pero no IFN- β . También se preparan placas control que contienen el estándar y las muestras para determinar el efecto, si existe, de las muestras en el crecimiento celular. Estas placas se tiñen sin la adición de virus. Las muestras y estándares se ensayan en duplicado en cada una de dos placas de ensayo replicadas, rindiendo cuatro puntos de datos por muestra. Se reporta la concentración media geométrica de los cuatro replicados. El límite de detección en este ensayo es 10 U/ml. Las concentraciones séricas de neopterina se determinan en la unidad de farmacología clínica usando ensayos disponibles comercialmente. Las concentraciones séricas de 2'-5'-OAS se determinan en un laboratorio subcontratado usando un ensayo validado disponible comercialmente.

Métodos farmacocinéticos y estadísticos

Se usa software Rstrip™ (MicroMath, Inc., Salt Lake City, UT) para ajustar los datos a modelos farmacocinéticos. Las concentraciones medias geométricas se representan por tiempo para cada grupo. Como los resultados de los ensayos se expresan en diluciones, las medias geométricas se consideran más apropiadas que las medias aritméticas. Los niveles de IFN sérico se ajustan para valores de línea base y las concentraciones séricas no detectables se ajustan a 5 U/ml, lo que representa la mitad del límite inferior de detección. Para los datos de infusión IV, se ajusta un modelo de infusión IV de dos compartimentos a las concentraciones séricas detectables para cada sujeto, y los datos de SC se ajustan a un modelo de inyección de dos compartimentos.

Se calculan los parámetros farmacocinéticos siguientes:

- (i) concentración de pico observada, C_{max} (U/ml);
- (ii) área bajo la curva de 0 a 48 h, AUC (U x h/ml) usando la regla trapezoidal;
- (iii) vida media de eliminación (h);
- y, a partir de los datos de infusión IV (si se emplea IV):
- (iv) vida media de distribución (h);
- (v) aclaramiento (ml/h/kg)
- (vi) volumen aparente de distribución, V_d (ml/kg).

Se usa software WinNonlin (Versión 1.0, Scientific Consulting Inc., Apex, N.C.) para calcular las vidas medias de eliminación después de inyección IV y SC. Para neopterina y 2'-5'-OAS, las medias aritméticas por tiempo se presentan para cada grupo. Se calcula E_{max} , el cambio máximo desde la línea base, se someten C_{max} , AUC, y E_{max} a un análisis de varianza de una vía para comparar los grupos de dosificación. C_{max} y AUC se transforman logarítmicamente antes del análisis; se reportan las medias geométricas.

EJEMPLO 6: Efectos anti-angiogénicos de IFN- β -1a humano PEGilado; la capacidad de IFN- β -1a PEGilado para inhibir la proliferación de células endoteliales *in vitro*

Se mantienen en cultivo células endoteliales venosas humanas (Cell Systems, Cat. # 2V0-P75) y células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (Cell Systems, Cat. # 2M1-C25) con el Kit de Medio CS-C (Cell Systems, Cat. # 4Z0-500). 24 h antes del experimento, las células se tripsinizan, y se resuspenden en medio de ensayo, 90 % M199 y 10 % suero bovino fetal (FBS), y se ajustan a la densidad celular deseada. Las células se siembran en placas recubiertas de gelatina de 24 o 96 pocillos, bien a 12.500 células/pocillo o 2.000 células/pocillo, respectivamente. Después de incubar toda la noche, el medio de ensayo se reemplaza con medio fresco que contiene 20 ng/ml de Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF) humano recombinante (Becton Dickinson, Cat. # 40060) y se añaden varias concentraciones de IFN- β -1a no modificado o PEGilado de la divulgación o control positivo (puede usarse endostatina como un control positivo, como podría usarse un anticuerpo frente a bFGF). El volumen final se ajusta a 0,5 ml en la placa de 24 pocillos o 0,2 ml en la placa de 96 pocillos. Después de 72 h, las células se tripsinizan para recuento Coulter, se congelan para lectura de fluorescencia CyQuant, o se marcan con [3 H]-timidina. Este ensayo *in vitro* ensaya las moléculas de IFN- β -1a humano PEGilado de la divulgación para efectos en la proliferación de células endoteliales que puede ser indicativo de efectos anti-angiogénicos *in vivo*. Véase O'Reilly, *et al.*, Cell 88: 277-285 (1997).

EJEMPLO 7: Modelos *in vivo* para ensayar los efectos anti-angiogénicos y de neovascularización de IFN- β -1a humano PEGilado e IFN- β -1a de roedor PEGilado

Se ensayaron IFN- β -1a no modificado e IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa para su capacidad de inhibir la formación de vasos orientados radialmente que entran en la periferia de tumores de melanoma maligno humano SK-MEL-1 en ratones desnudos homocigóticos (*nu/nu*) atímicos. Las células SK-MEL-1 se crecieron en cultivo hasta el 80 % de confluencia, y 2×10^6 células se inocularon intradérmicamente (0,1 ml de volumen en el día 0) en el flanco en la línea axilar media en ratones desnudos homocigotos (*nu/nu*) atímicos NCR de tres semanas de edad (Taconic, Germantown, NY). 24 horas después (día 1), recibieron grupos de tres ratones cada uno las dosis

subcutáneas siguientes de control de vehículo, IFN- β -1a no modificado, o IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa:

Grupo A: 0,1 ml de 45,6 mg/ml albúmina de suero humano (control de vehículo) una vez en el día 1 solo

Grupo B: 0,1 ml de 45,6 mg/ml albúmina de suero humano que contiene 1 MU (5 μ g) de IFN- β -1a no modificado diariamente en los días 1-9 inclusive

Grupo C: 0,1 ml de 45,6 mg/ml albúmina de suero humano que contiene 1 MU unidades (10 μ g) de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa una vez en el día 1 solo

Grupo D: 0,1 ml de 45,6 mg/ml albúmina de suero humano (control de vehículo) diariamente en los días 1-9 inclusive

Los ratones se sacrificaron en el día 10 (Avertin, 0,5 ml intraperitonealmente) y el sitio de inoculación del tumor se evaluó para neovascularización, medido por un observador ciego para el grupo de tratamiento. Los vasos se contaron bajo aumento fijo en un microscopio de disección. Cada vaso orientado radialmente que entra en la periferia del tumor se puntuó como un único vaso. Cada grupo consistió en tres ratones.

Como se muestra en la Figura 10, una única administración de 1 MU de IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa (grupo C) fue tan efectiva en la reducción del número de neovasos como una administración diaria de 1 MU de IFN- β -1a no modificado (grupo B). Sin embargo, el efecto del IFN- β -1a modificado con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa es más pronunciado cuando se considera que la administración diaria del vehículo solo tenía algún efecto inhibitorio (comparar el grupo A, vehículo administrado una vez, con el grupo D, vehículo administrado diariamente).

También se ha desarrollado una variedad de otros modelos que pueden usarse para ensayar los efectos anti-angiogénicos y anti-neovascularización de las moléculas PEGiladas de la invención. Algunos de estos modelos se han descrito en las Patentes de los Estados Unidos 5.733.876 (31 mar., 1998: "Method of inhibiting angiogenesis") y 5.135.919 (4 ago., 1992: "Method and a pharmaceutical composition for the inhibition of angiogenesis"). Otros ensayos incluyen el ensayo de la membrana corioalantoidea sin cáscara (CAM) de Taylor y Folkman; Nature 297:307 (1982) y Crum et al., Science 230:1375 (1985); el modelo de anti-angiogénesis del método del saco de aire dorsal de ratón de Folkman et al.; J. Exp. Med. 133: 275 (1971), y el ensayo del microbolsillo corneal en rata Gimbrone, Jr. et al., J. Natl. Cancer Inst. 52:413 (1974) en donde se induce la vascularización corneal en ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley (Charles River, Japón) implantando 500 ng de bFGF (bovino, R & D Systems, Inc.), impregnado en gránulos de copolímero de etileno-acetato de vinilo, en cada córnea. Además, existe un modelo en donde se induce la angiogénesis en ratones NIH-Swiss o desnudos atómicos (*nu/nu*) después del implante de células de carcinoma de mama MCF-7 o células de carcinoma de ovario NIH-OVCAR-3 como describen Lindner y Borden; Int. J. Cancer 71:456 (1997). También pueden usarse líneas celulares tumorales adicionales incluyendo (pero no limitado a) células de melanoma maligno humano SK-MEL-1 para inducir la angiogénesis como se ha descrito anteriormente. Pueden ensayarse varias dosis, con varias frecuencias de dosificación, y durante varias duraciones tanto para proteínas IFN- β -1a no modificadas como PEGiladas de la divulgación.

Otros métodos para ensayar IFN- β -1 murino PEGilado y de rata para efectos anti-angiogénicos en un modelo animal incluyen (pero no están limitados a) protocolos para el cribado de nuevos agentes anticancerosos potenciales como se describe en el original Cancer Chemotherapy Reports, Parte 3, Vol. 3, No. 2, septiembre 1972 y el suplemento In Vivo Cancer Models, 1976-1982, NIH Publication No. 84-2635, febrero 1984. Debido a la especificidad de especie de los interferones de Tipo I, para evaluar la actividad anti-angiogénica de IFN- β PEGilado en modelos de roedores, se generan preparaciones de IFN- β de roedor PEGilado (por ejemplo, murino y de rata). Dichos métodos de cribado se ejemplifican por un protocolo para ensayar los efectos anti-angiogénicos de IFN- β murino PEGilado en Carcinoma de Pulmón de Lewis implantado subcutáneamente:

Origen de la línea tumoral

Esta línea tumoral surgió espontáneamente en 1951 como un carcinoma del pulmón en un ratón C57BL/6.

Resumen del procedimiento de ensayo

Un fragmento de tumor se implanta subcutáneamente en la región axilar de un ratón B6D2F1. El agente de ensayo (es decir, un interferón PEGilado de la divulgación) se administra a varias dosis, subcutáneamente (SC) o intraperitonealmente (IP) en múltiples días después del implante del tumor. El parámetro medido es el tiempo de supervivencia medio. Los resultados se expresan como un porcentaje del tiempo de supervivencia control.

Animales

Propagación: ratones C57BL/6.

Ensayo: ratones B6D2F1.

Peso: los ratones están en un intervalo de peso de 3 g, con un peso máximo de 18 g para machos y 17 g para hembras.

Sexo: se usa un sexo para todos los animales de ensayo y control en un experimento.
Fuente: una fuente, si es factible, para todos los animales en un experimento.

Tamaño del experimento

5 Diez animales por grupo de ensayo.

Transferencia tumoral

10 PROPAGACIÓN:

Fragmento: preparar un fragmento de 2-4 mm de un tumor donante SC.
Tiempo: día 13-15.
Sitio: implantar el fragmento SC en la región axilar con una punción en la región inguinal.

15 ENSAYO:

Fragmento: preparar un fragmento de 2-4 mm de un tumor donante SC.
Tiempo: día 13-15.
20 Sitio: implantar el fragmento SC en la región axilar con una punción en la región inguinal.

Programa de ensayo

Día 0: implantar el tumor. Realizar cultivos bacterianos. Ensayar compuesto control positivo en cada experimento con numeración impar. Preparar los materiales. Registrar las muertes diariamente.
25 Día 1: evaluar los cultivos. Desechar el experimento si está contaminado. Aleatorizar a los animales. Tratar como se instruye (en el día 1 y en los días siguientes).
Día 2: volver a evaluar los cultivos. Desechar el experimento si está contaminado.
30 Día 5: pesar Día 2 y día de la evaluación de la toxicidad del agente de ensayo inicial.
Día 14: día de control de muerte temprana.
Día 48: día de control no recogida.
Día 60: final y evaluar el experimento. Examinar los pulmones para tumor.

Control de calidad

35 Programar el compuesto control positivo (NSC 26271; Citoxán a una dosis de 100 mg/kg/inyección) en cada experimento con numeración impar, cuyo régimen es intraperitoneal en el Día 1 solo. El límite menor para Ensayo/Control para el control positivo es 140 %. El tiempo de supervivencia medio control no tratado aceptable es 19-35,6 días.

Evaluación

45 El parámetro medido es tiempo de supervivencia medio. Computar los pesos corporales medios de los animales para el Día 1 y Día 5, computar la proporción Ensayo/Control para todos los grupos de ensayo. Se computan los pesos corporales medios de los animales para día de estadificación y día de evaluación final. La proporción Ensayo/Control se computa para todos los grupos de ensayo con >65 % supervivientes en el Día 5. Un valor de la proporción Ensayo/Control <86 % indica toxicidad. Una diferencia excesiva en el cambio de peso corporal (ensayo menos control) también puede usarse para evaluar la toxicidad.

Criterios para actividad

50 Una proporción Ensayo/Control inicial mayor de o igual a 140 % se considera necesaria para demostrar actividad moderada. Un valor de la proporción Ensayo/Control reproducible de más de o igual a 150 % se considera actividad significativa.

EJEMPLO 8: Modelos *in vivo* para ensayar los efectos anti-proliferativos y anti-tumorales de IFN-β-1a humano PEGilado e IFN-β de roedor PEGilados

60 Varios modelos *in vivo* están disponibles para ensayar los efectos anti-proliferativos y anti-tumorales de los IFN-β-1a humanos no modificados y PEGilados de la divulgación. En un modelo descrito por Bailon et al., Bioconjugate Chemistry 12:195 (2001), se implanta a ratones desnudos atímicos (Harlan) subcutáneamente 2 x 10⁶ células renales humanas A498, renales humanas ACHN, o renales humanas G402 bajo el flanco trasero y se deja 3-6 semanas para permitir que los tumores se desarrollen. Se administra IFN-β-1a humano no modificado o PEGilado a varias dosis, con varias frecuencias de dosificación, y durante varias duraciones, y se mide el volumen tumoral y se compara entre los 65 tratamientos. En otro modelo descrito por Lindner y Borden, J. Interferon Cytokine Res 17: 681 (1997), se implanta a ratones BALB/c hembra ooforectomizadas desnudas atímicas (*nul/nul*) 2 x 10⁶ células de carcinoma de mama humano

MCF-7 (más estradiol), MDA-MB-231, MDA-MB468, o BT-20, células de carcinoma de ovario humano NIH-OVCAR-3, células de carcinoma de colon humano HT-29, o células de melanoma maligno humano SK-MEL-1 o FEMX, en la dermis que cubre las glándulas mamarias cerca de las axilas, y se evalúa el tamaño de los tumores como una función del tiempo. Se administra IFN- β -1a humano no modificado o PEGilado a varias dosis, con varias frecuencias de dosificación, y durante varias duraciones, y se mide el volumen tumoral y se compara entre los tratamientos. Otros modelos para ensayar los efectos anti-proliferativos y anti-tumorales de IFN- β -1a humano PEGilado incluyen (pero no están limitados a) modelos de cáncer de pulmón locales y metastásicos descritos por Qin et al., Molecular Therapy 4: 356 (2001), y modelos de xenoinjerto en ratones desnudos de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal humano descritos por Tada et al., J Clinical Investigation 108: 83 (2001).

Otros métodos para ensayar IFN- β murino y de rata PEGilado para efectos anti-proliferativos y anti-tumorales en modelos animales incluyen (pero no están limitados a) un modelo de ratón de mesotelioma maligno descrito por Odaka et al., Cancer Res 61: 6201 (2001), modelos de cáncer de pulmón local y metastásico descritos por Qin et al., Molecular Therapy 4: 356 (2001), y modelos de ratón singénicos de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal descritos por Tada et al., J Clinical Investigation 108: 83 (2001).

EJEMPLO 9: modelos *in vivo* para ensayar los efectos anti-víricos de IFN- β murino PEGilado e IFN- β -1a humano PEGilado

Un modelo de ratón *in vivo* está disponible para ensayar el efecto de IFN- β murino no modificado y PEGilado en los niveles del Virus de la Hepatitis B (VHB) humana en ratones SCID transgénicos para VHB. Larkin et al., Nature Medicine 5:907 (1999). En este modelo, ratones SCID transgénicos que portan un dímero cabeza-a-cola del genoma de VHB humano tienen niveles detectables de formas replicativas de VHB y ARN pre-genómico en el hígado, y virus VHB en el suero. Los hepatocitos de los ratones transgénicos también son positivos para las proteínas HBsAg, HbcAg, y HbxAg, lo que es indicativo de replicación vírica. Un ejemplo de un protocolo para comparar IFN- β murino no modificado y PEGilado en este modelo se proporciona a continuación:

30 ratones (5 grupos de 5 más 5 de reserva) con una titulación vírica comparable se titulan en dos puntos de tiempo independientes (separados al menos 1 semana) para establecer una titulación de línea base y para asegurar que sus titulaciones permanecen constantes antes de la dosificación con IFN- β murino. Se dosifican grupos de 5 ratones 3 veces a la semana (lunes, miércoles, y viernes) subcutáneamente con las muestras siguientes, como se muestra en la Tabla 7.

Grupo	Muestra de dosificación
1	Control de vehículo (1 mg/ml albúmina de suero murino, MSA)
2	30 U IFN- β murino no modificado en 1 mg/ml MSA
3	300 U IFN- β murino no modificado en 1 mg/ml MSA
4	3.000 U IFN- β murino no modificado en 1 mg/ml MSA
5	30 U IFN- β murino PEGilado en 1 mg/ml MSA
6	300 U IFN- β murino PEGilado en 1 mg/ml MSA
7	3.000 U IFN- β murino PEGilado en 1 mg/ml MSA

Las titulaciones víricas se determinan semanalmente durante la dosificación y semanalmente a bi-semanalmente durante 6 meses después de la dosificación. Se construyen gráficos de titulación vírica frente a tiempo para una comparación de los animales vehículo y tratados con IFN- β respecto al aclaramiento y re-establecimiento de la titulación vírica. Se realiza entonces un segundo estudio con las dosis apropiadas de IFN- β murino no modificado y PEGilado con 10-20 ratones por grupo para un total de 30-60 ratones (10-20 para control, 10-20 para IFN- β murino no modificado, y 10-20 para IFN- β murino PEGilado). Las titulaciones víricas se ensayan como anteriormente, y en el momento del sacrificio, el suero se analiza para titulación vírica así como para HbsAg por SDS-PAGE y transferencia Western. También se retiran los hígados, se congelan o fijan según sea necesario, y se tiñen para la presencia de HbsAg, HbcAg, y HbxAg. También pueden realizarse otros ensayos histológicos, histoquímicos, o bioquímicos apropiados familiares para los expertos en la materia en muestras de suero y tejido.

También está disponible un modelo de ratón *in vivo* para ensayar el efecto de IFN- β -1a humano no modificado y PEGilado en los niveles del Virus de la Hepatitis C (VHC) humano en ratones que portan hígados humanos quiméricos. Mercer et al., Nature Medicine 7:927 (2001). En este modelo, se injertan hepatocitos humanos normales en ratones SCID que portan un transgén de activador de plasminógeno (*Alb-uPA*) y se inocula a los ratones suero de humanos infectados con los diferentes genotipos de VHC. Las células de hígado humano injertadas se infectan con el virus y los replicados del virus. Los niveles de ARN de VHC en el suero pueden cuantificarse por PCR, así como los niveles de ARN positivo y negativo (forma replicativa) en las células de hígado. Se realiza un protocolo de estudio apropiado similar (pero no limitado a) al descrito anteriormente para IFN- β murino no modificado y PEGilado en ratones SCID transgénicos para VHB para evaluar la eficacia de IFN- β -1a humano no modificado y PEGilado en este modelo, es decir, para determinar el efecto del tratamiento en la titulación de VHC, histología hepática, niveles séricos de ALT, y la presencia de formas replicativas de VHC en el tejido hepático humano injertado. También pueden realizarse otros ensayos histológicos, histoquímicos, o bioquímicos apropiados familiares para los expertos en la materia en muestras de suero y tejido.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado y un vehículo, adyuvante, diluyente, conservante y/o solubilizante farmacéuticamente aceptables,
- 5 en donde el conjugado comprende el producto de la reacción de un polímero de polialquilenglicol activado y B, en donde
 B es un interferón beta (IFN β); y
 dicho polímero de polialquilenglicol activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-p-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-m-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-p-fenilacetaldéhidó de 20 kDa, mPEG-O-p-fenilpropionaldehído de 20 kDa o mPEG-O-m-fenilacetaldéhidó de 20 kDa.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicho polímero de polialquilenglicol activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho IFN- β es IFN- β -1a.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicho solubilizante se selecciona de tween o polisorbato.
- 20 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicho diluyente comprende un tampón.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde dicho tampón se selecciona de arginina, Tris-HCl, acetato o fosfato.
- 25 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición contiene agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH, acetato sódico y/u oleato de trietanolamina.
- 30 8. Proceso para fabricar la composición farmacéutica de la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas:
- (a) añadir un polímero de polialquilenglicol activado a una solución de IFN β para formar una mezcla, en donde dicho polímero de polialquilenglicol activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-p-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-m-metilfenil-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa, mPEG-O-p-fenilacetaldéhidó de 20 kDa, mPEG-O-p-fenilpropionaldehído de 20 kDa o mPEG-O-m-fenilacetaldéhidó de 20 kDa;
- 35 (b) hacer reaccionar dicho polímero de polialquilenglicol activado con dicho IFN β en presencia de cianoborohidruro sódico a través de alquilación reductora para formar un conjugado; y
- (c) combinar dicho conjugado con un vehículo, adyuvante, diluyente, conservante y/o solubilizante farmacéuticamente aceptables.
- 40 9. El proceso de la reivindicación 8, en donde dicho polímero de polialquilenglicol activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa y en donde dicho IFN- β es IFN- β -1a.
- 45 10. El proceso de la reivindicación 9, en donde dicho proceso tiene una eficiencia de PEGilación del >90 %.
11. El proceso de la reivindicación 9, en donde dicho proceso tiene una proporción IFN- β /polialquilenglicol de 1:1.
12. El proceso de la reivindicación 9, que comprende además purificar dicho conjugado a una pureza del >90 % antes de combinar dicho conjugado con un vehículo, adyuvante, diluyente, conservante y/o solubilizante farmacéuticamente aceptables.
- 50 13. El proceso de la reivindicación 8, en donde dicho IFN- β es IFN- β -1a.

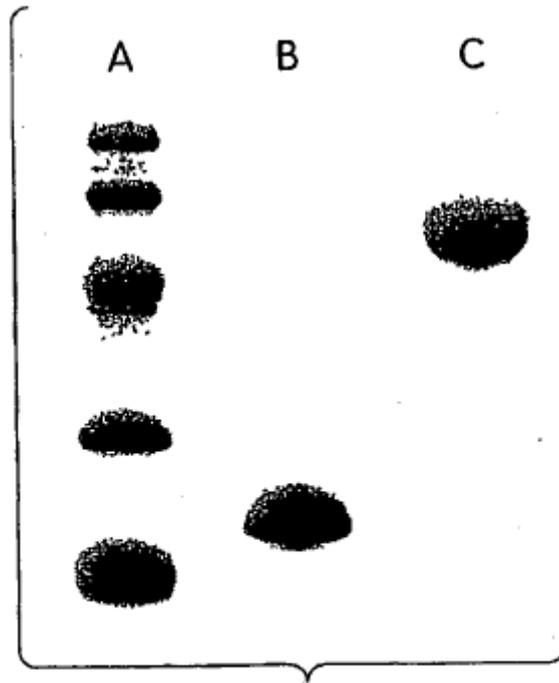


Fig. 1

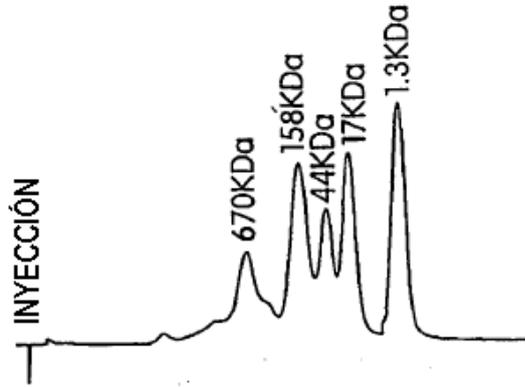


Fig. 2A

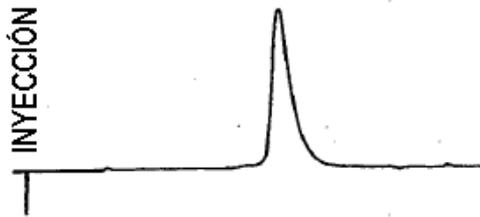


Fig. 2B

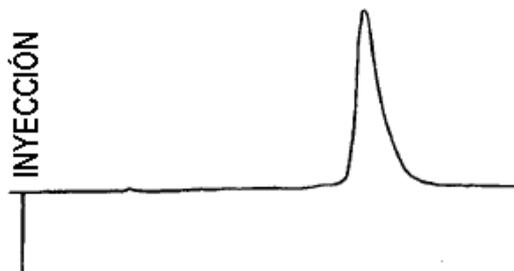


Fig. 2C

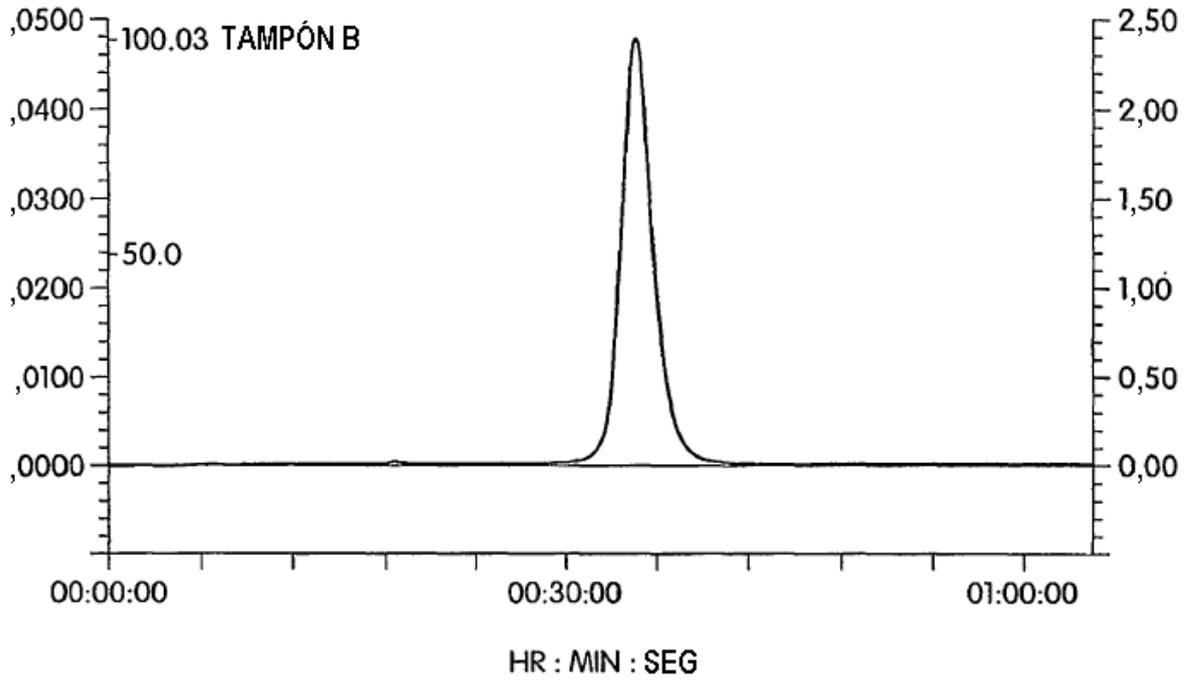


Fig. 3

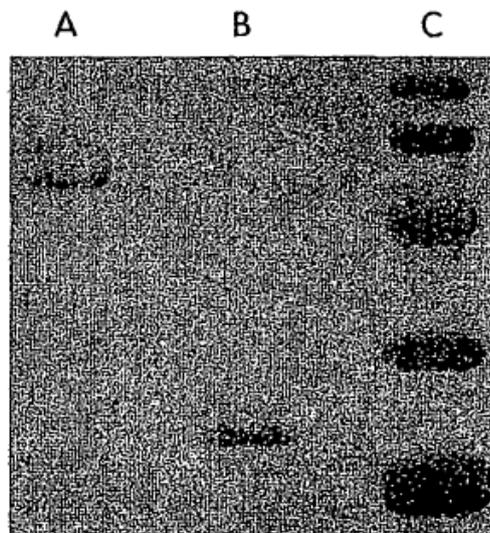
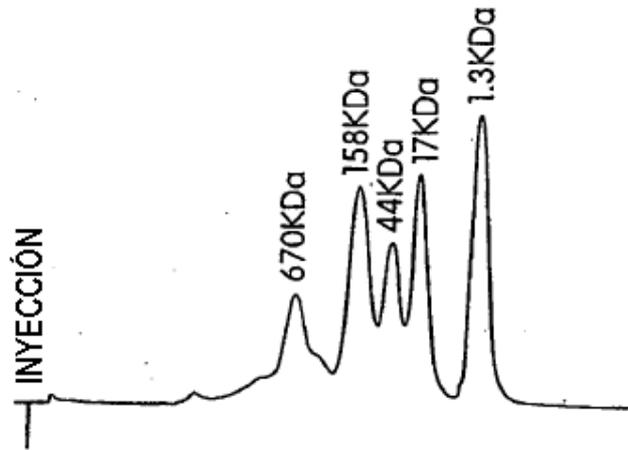
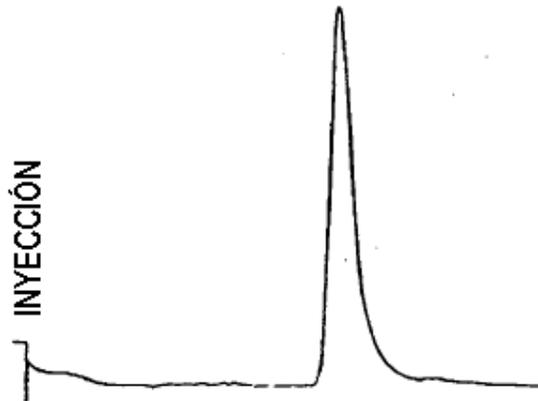


Fig. 4



A



B

Fig. 5

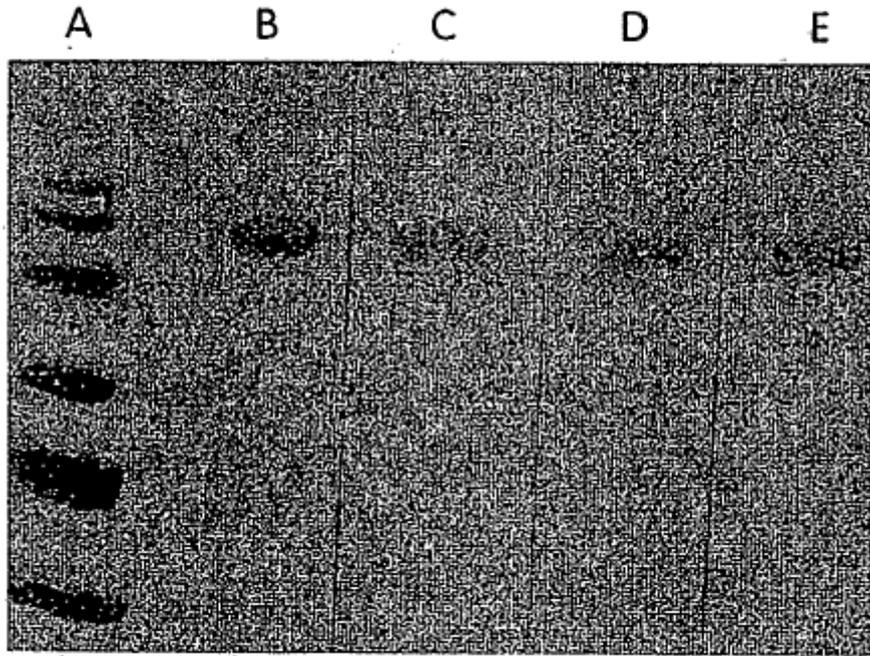


Fig. 6

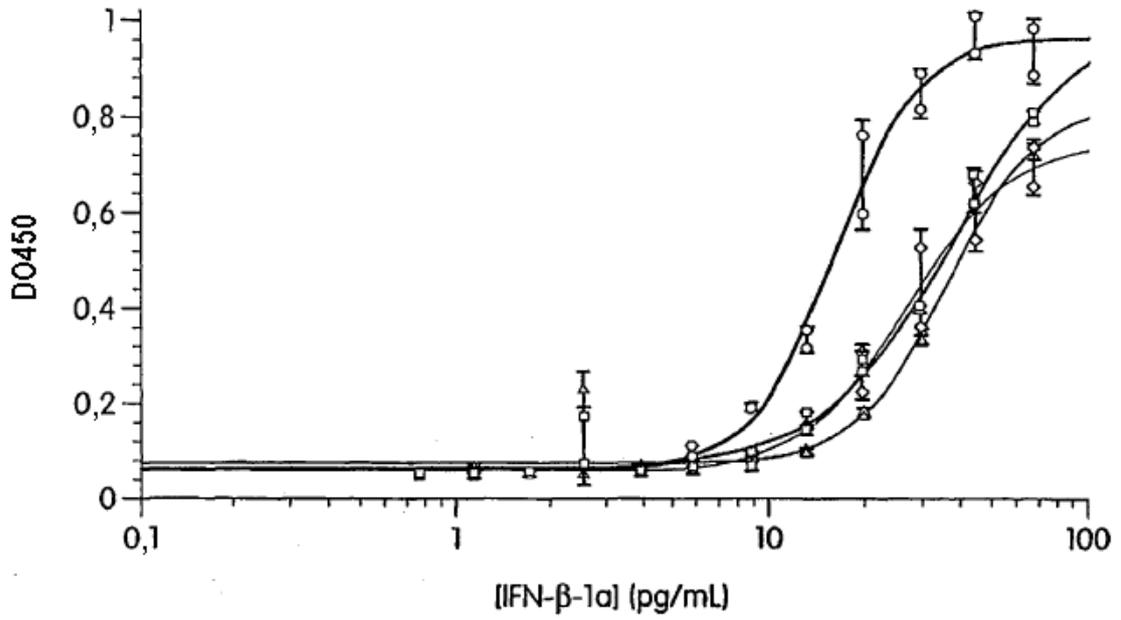


Fig. 7A

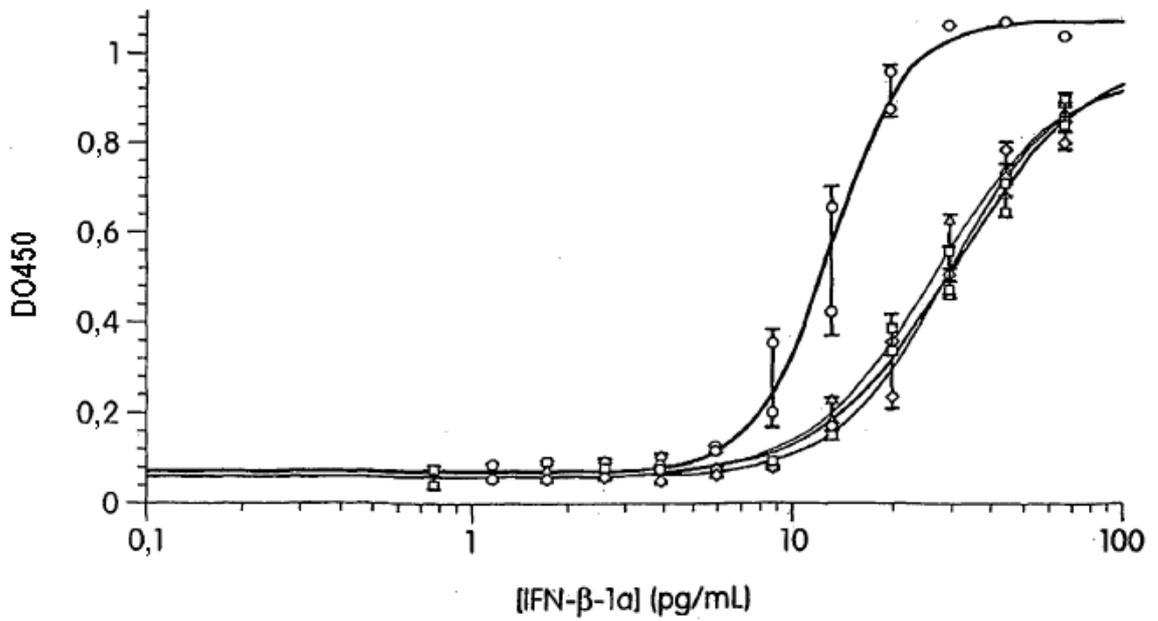


Fig. 7B

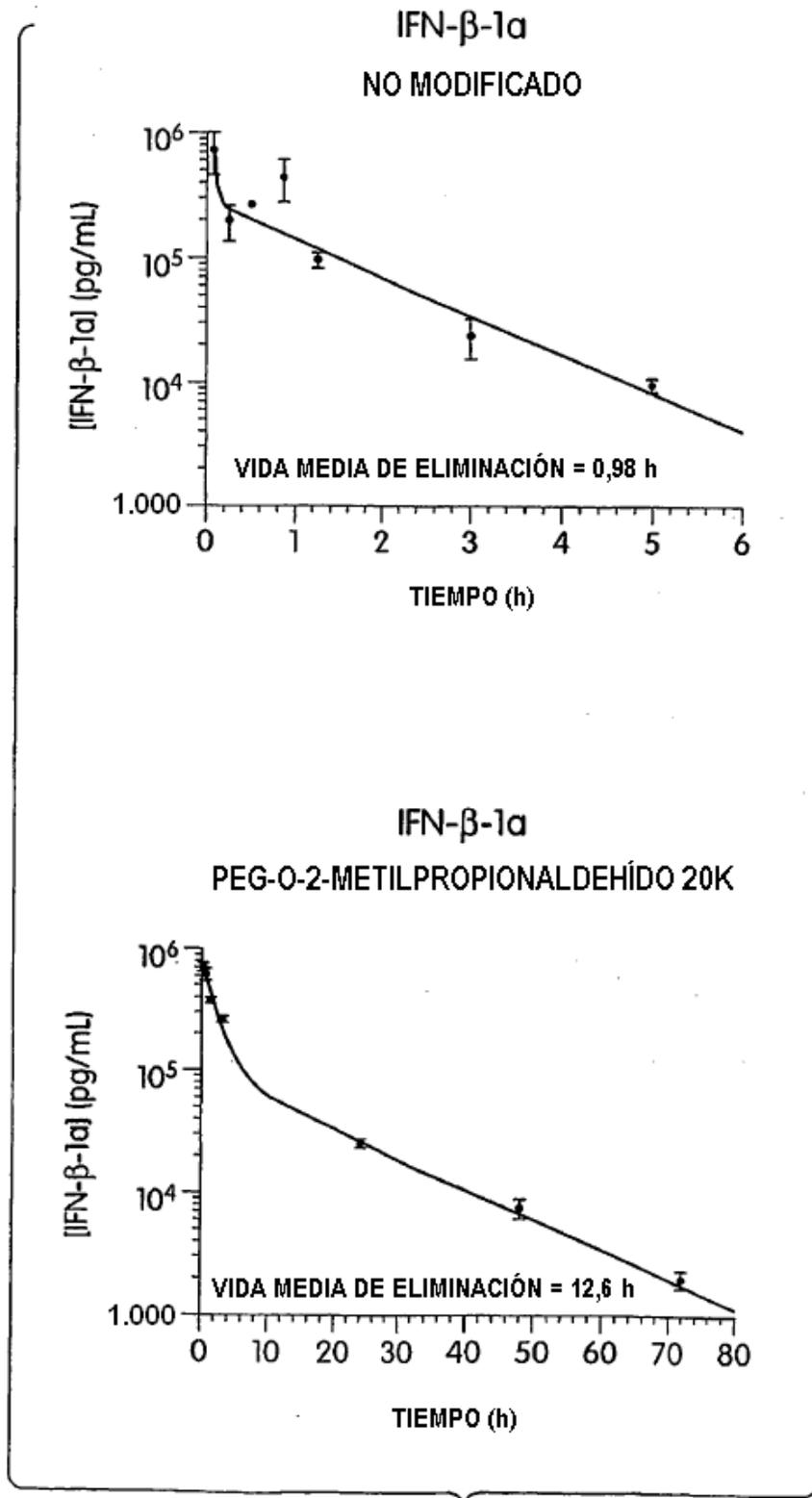


Fig. 8A

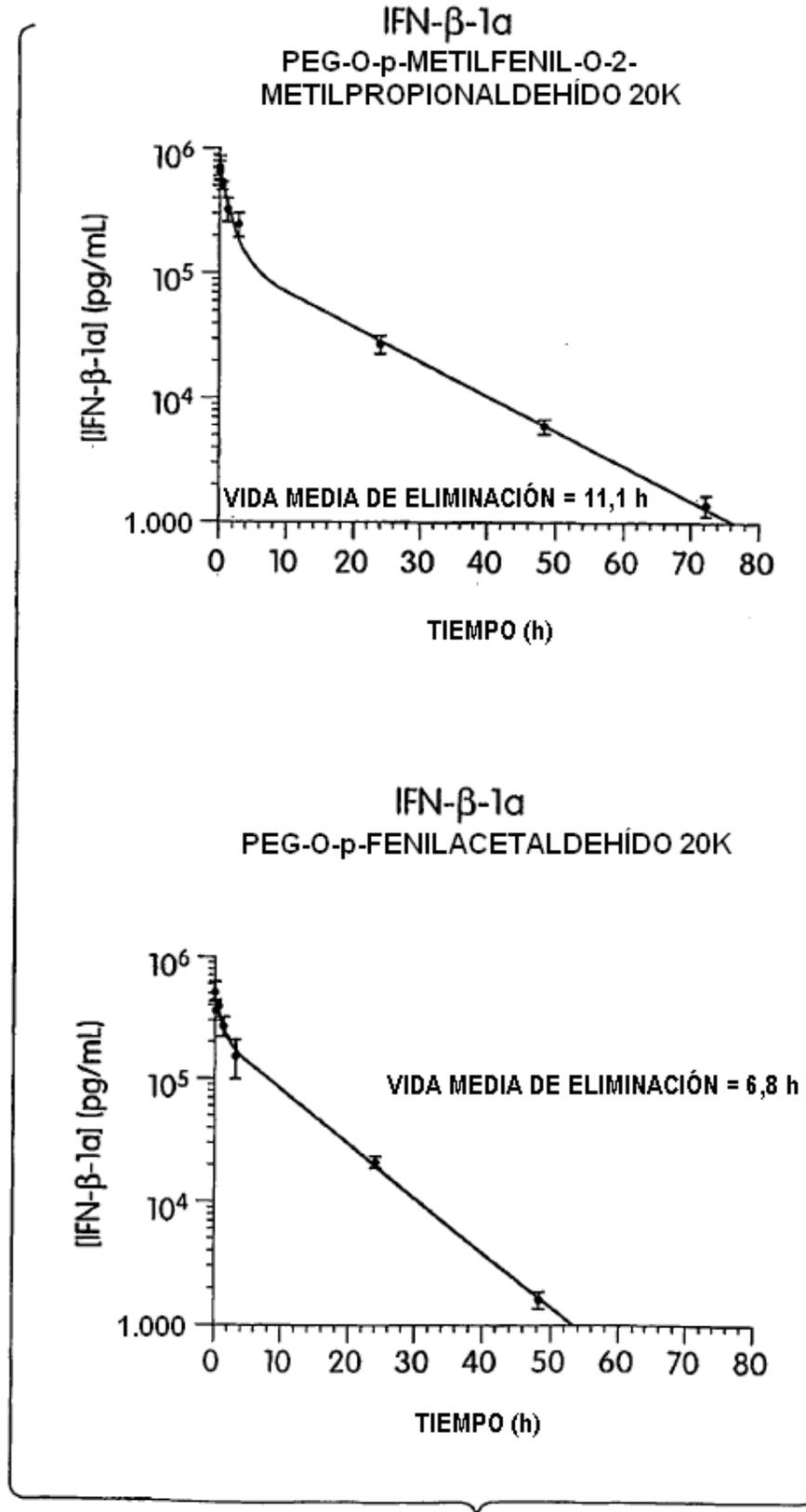


Fig. 8B

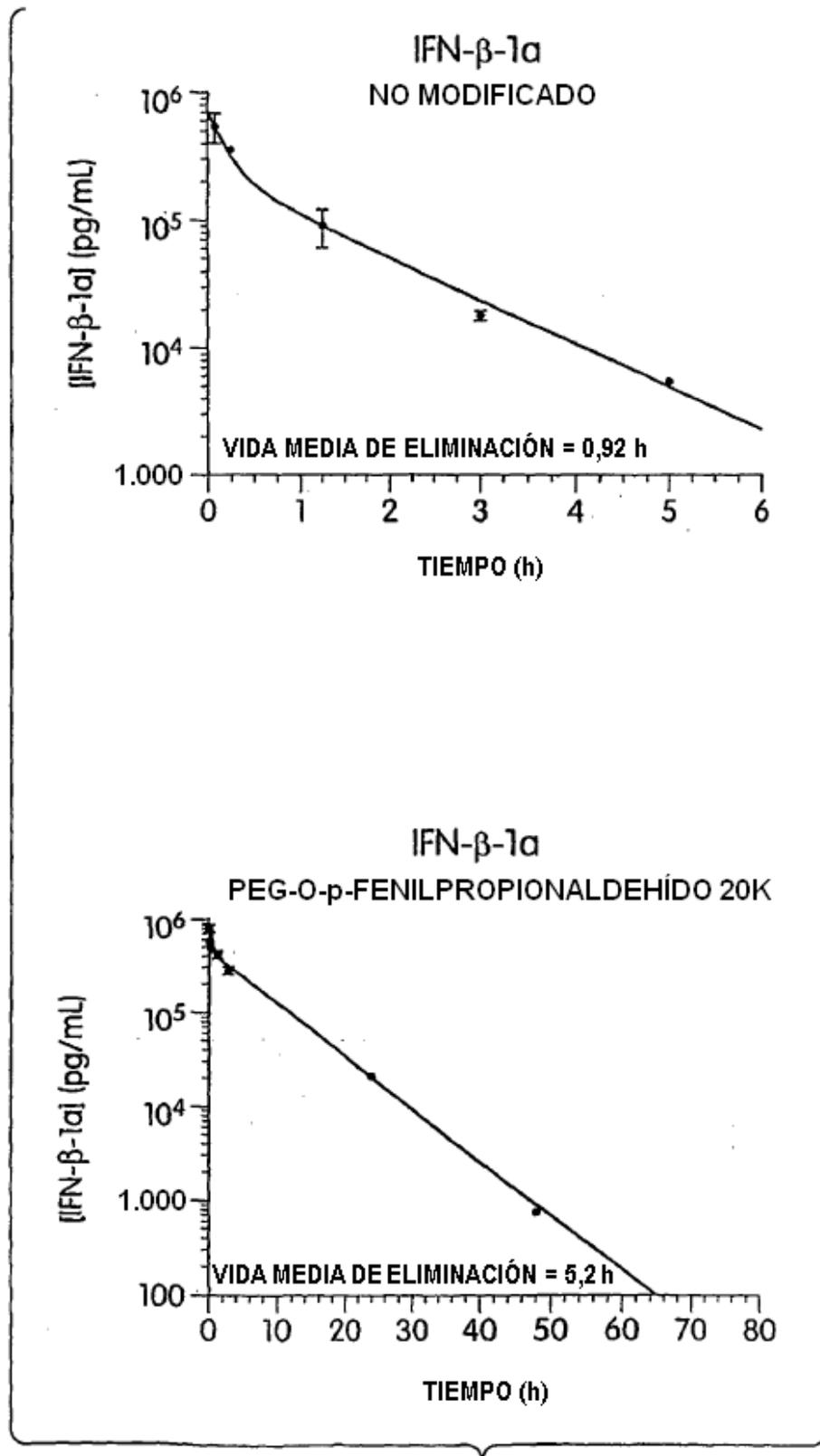


Fig. 9A

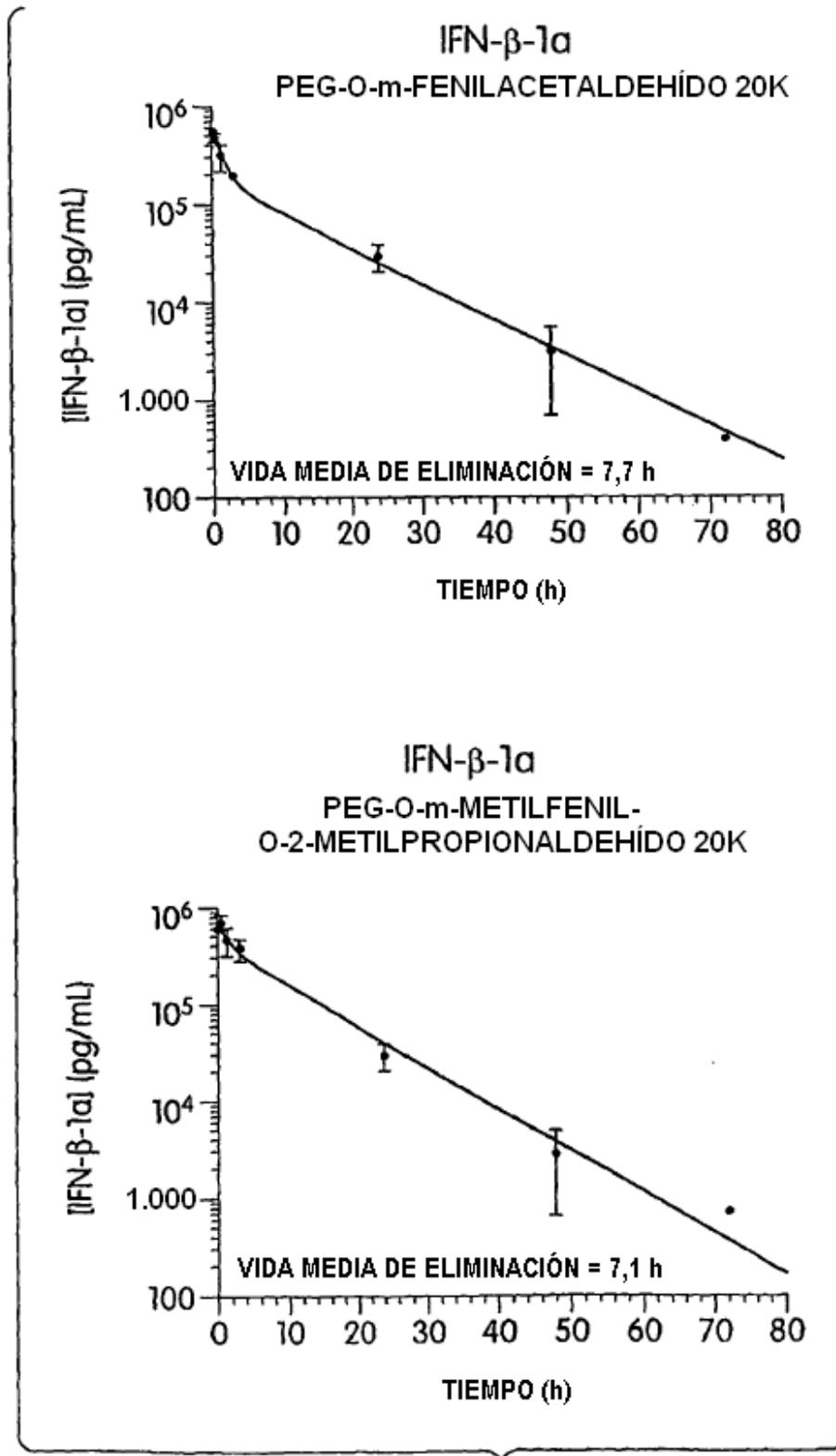


Fig. 9B

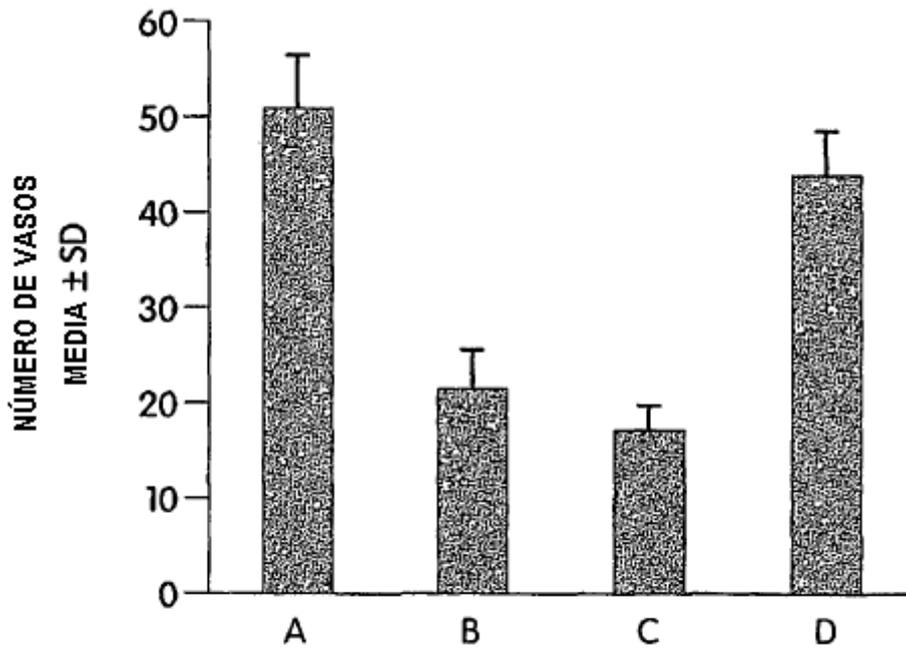


Fig. 10