

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 025**

51 Int. Cl.:

C07K 14/56	(2006.01)
A61K 31/40	(2006.01)
A61K 38/21	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)
A61K 47/60	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2010 PCT/US2010/059714**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011 WO11072138**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2010 E 10836693 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2509593**

54 Título: **Productos conjugados de proteína-polímero**

30 Prioridad:

10.12.2009 US 285411 P

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

08.10.2020

73 Titular/es:

**PHARMAESSENTIA CORPORATION (100.0%)
13F, No. 3 YuanQu Street, NanKang District
Taipei 115, TW**

72 Inventor/es:

**LIN, KO-CHUNG y
WIDMANN, RUDOLF, DR.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 786 025 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

Productos conjugados de proteína-polímero**5 Referencia cruzada a párrafo de aplicación relacionado**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. Núm. 61/285.411 presentada el 10 de diciembre de 2009.

10 Antecedentes

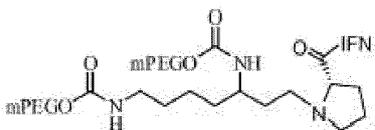
El avance en biología celular y tecnologías de proteínas recombinantes ha llevado al desarrollo de agentes terapéuticos de proteínas.

15 Sin embargo, todavía existen obstáculos importantes. La mayoría de las proteínas son susceptibles de degradación proteolítica y, por lo tanto, tienen una semivida corta en el sistema circulatorio. Otras desventajas incluyen baja solubilidad en agua e inducción de anticuerpos neutralizantes.

20 El anclaje de un polímero, p. ej., polietilenglicol (PEG), a una proteína dificulta el acceso de enzimas proteolíticas a la cadena principal de la proteína, lo que da como resultado una mayor estabilidad de la proteína. Además, también mejora la solubilidad en agua y minimiza la inmunogenicidad. Existe la necesidad de métodos eficaces para el anclaje de un polímero a una proteína.

25 Compendio

Un aspecto de esta invención se refiere al uso de un producto conjugado de proteína-polímero para el tratamiento de diversas enfermedades. El producto conjugado tiene la fórmula



30 en el que mPEG tiene un peso molecular de 20 kD e IFN es un radical interferón- $\alpha 2b$. Preferiblemente, el producto conjugado es sustancialmente puro, p. ej., con una pureza de más de 70%, 80% o 90%. Las enfermedades que son tratadas por el producto conjugado son mielofibrosis idiopática, policitemia vera y trombocitemia esencial.

35 El término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada monovalente. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, *terc*-butilo, y n-pentilo. De manera similar, los términos "alquenilo" o "alquinilo" se refieren a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada monovalente que contiene uno o más dobles enlaces C=C o uno o más triples enlaces C \equiv C.

40 El término "alquilenilo" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada bivalente. De manera similar, los términos "alquenilenilo" o "alquinilenilo" se refieren a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada bivalente que contiene uno o más enlaces dobles C=C o uno o más enlaces triples C \equiv C.

45 El término "arilo" se refiere a un sistema anular hidrocarbonado (monocíclico o bicíclico) que tiene al menos un anillo aromático. Los ejemplos de radicales arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y pirenilo.

50 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema anular hidrocarbonado (monocíclico o bicíclico) que tiene al menos un anillo aromático que contiene al menos un heteroátomo tal como O, N o S como parte del sistema anular y el resto son carbono. Los ejemplos de radicales heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, furilo, pirrolilo, tienilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, piridinilo, pirimidinilo, quinazolinilo e indolilo.

El término "cicloalquilo" se refiere a un sistema anular monocíclico o bicíclico parcial o totalmente saturado que tiene solo átomos de carbono anulares. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropanilo, ciclopentanilo y ciclohexanilo.

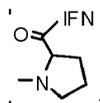
55 El término "heterocicloalquilo" se refiere a un sistema anular monocíclico o bicíclico parcial o totalmente saturado que tiene, además de carbono, uno o más heteroátomos (p. ej., O, N o S), como átomos anulares. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, piperidina, piperazina, morfolina, tiomorfolina y 1,4-oxazepano.

60 Los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo mencionados en la presente

memoria incluyen radicales tanto sustituidos como no sustituidos. Los ejemplos de sustituyentes incluyen alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₈, cicloalquenilo C₅-C₈, alcoxi C₁-C₁₀, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, amino, alquil(C₁-C₁₀)amino, dialquil(C₁-C₂₀)amino, arilamino, diarilamino, hidroxiamino, alcoxi-amino, alquil(C₁-C₁₀)sulfonamida, arilsulfonamida, hidroxilo, halógeno, tio, alquil(C₁-C₁₀)tio, ariltio, ciano, nitro, acilo, aciloxi, carboxilo y éster carboxílico.

El término "radical óxido de polialquilenos" se refiere a un radical monovalente derivado de óxido de polialquilenos lineal, ramificado o en forma de estrella. El peso molecular de un radical óxido de polialquilenos puede ser de 2-100 kD. El radical óxido de polialquilenos está saturado o insaturado. Los ejemplos de un radical óxido de polialquilenos incluyen, pero no se limitan a, óxido de polietileno, polietilenglicol, óxido de poliisopropileno, óxido de polibutenileno y copolímeros de los mismos. Otros polímeros tales como el dextrano, poli(alcoholes vinílicos), poliacrilamidas o polímeros con una base hidrocarbonada también se pueden utilizar para reemplazar el radical óxido de polialquilenos, siempre que no sean antigénicos, tóxicos o provoquen una respuesta inmunitaria. El radical óxido de polialquilenos está sustituido o no sustituido. Por ejemplo, puede ser polietilenglicol protegido terminalmente con metoxi (mPEG).

El término "radical interferón-α" se refiere a un radical monovalente derivado de cualquier interferón-α. "Interferón-α" se refiere a una familia de proteínas específicas de especies altamente homólogas que inhiben la replicación viral y la proliferación celular y modulan la respuesta inmunitaria. Véanse Bonnem et al., J. Biol. Response Mod., 1984, 3(6): 580-598; y Finter, J. Hepatol., 1986, 3 Supl. 2: S157-160. Puede estar en una forma natural o modificada. El interferón-α modificado, puede ser, p. ej., una proteína que contiene interferón-α, y 1-4 residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal del interferón. Según la invención, el interferón modificado es



IFN que representa un radical interferón-α_{2b}, cuyo grupo amino del extremo N está unido al grupo carbonilo.

Muchos tipos de proteínas de interferón-α están disponibles comercialmente, incluyendo el Intron-interferón-A proporcionado por Schering Corporation, Kenilworth, NJ, el interferón Roferon proporcionado por Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ, el interferón Berofer alfa 2 proporcionado por Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn., Sumiferon proporcionado por Sumitomo, Japón, y Wellferon interferon alfa-n1 (INS) proporcionado por Glaxo-Wellcome Ltd., Londres, Gran Bretaña.

A continuación, se enumeran las secuencias de aminoácidos de cinco proteínas ilustrativas de interferón-α humano, ya sea en forma precursora o en forma madura:

```
maltfallva llvlsckssc svgcdlpqth slgsrrtlml laqmrrislf
sclkdhrhdfg fpqeefgnqf qkaetipvlh emiqqifnlf stkdssaawd
etlldkfyte lyqqlnlea cviqqvgvte tplmkedsil avrkylfrit
lylkekkysp cawevvraei mrsfslstnl qeslrske SEQ ID NO.: 1
```

(Véase Krasagakis et al., Cancer Invest. 26(6), 562-568, 2008)

```
cdlpqthslg srtrlmlllaq mrkislfsc lkdhrhdfgfp eeefgnqfqa
etipvlhemi qqifnlfstk dssaawdetl ldkfytelyq qlndleacvi
qqvgvtetpl mkedsilavr kyfqrityl kekkyspcaw evvraeimrs
fslstnlqes lrske SEQ ID NO.: 2
```

(Véase Klaus et al., J. Mol. Biol. 274 (4), 661-675, 1997)

```
mcdlpqthsl gsrrtlmllla qmrrislfsc lkdhrhdfgfp eeefgnqfqa
aetipvlhem iqqifnlfstk kdssaawdet lldkfytely qqlnleacv
iqvgvtetpl lmkedsilavr rkyfqrityl lkekkyspca wevraeimr
sfslstnlqe slrske SEQ ID NO.: 3
```

(Véase el Número de Acceso GenBank AAP20099, la versión de 30-ABR-2003).

mallfp11aa lvmtsypvg slgcdlpqnh gllsrntlvl lhqmrrisfp
 lclkdrdrfr fpqemvkgqsq lqkahvmsvl hemlqqifsl fhterssaaw
 nmtlldqlht elhqqlqhle tcllqvvggeg esagaiSSpa ltlrryfqgi
 rvylkekkys dcawevvrme imkslflstn mgerlrskdr dlGSS SEQ ID
 NO.: 4

(Véase Capon et al., J. Mol. Cell. Biol. 5(4): 768-779, 1985)

lsyksicslg cdlpqthslg nrralillaq mgrispsfscI kdrhdfglpq
 eefdgngqfQk tqaisvlhem iqqtfnlfst edssaaweqs llekfstely
 qqlnnleacv iqevgmeetp lmnedsilav rkyfgritly ltekkyspca
 wevvraeimr slsfstnlqk rlrckd SEQ ID NO.: 5

(Véase Lund et al., J. Interferon Res. 5(2), 229-238, 1985)

10 En un ejemplo, la proteína interferón- α utilizada para preparar un producto conjugado de la presente descripción tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80% (p. ej., 85%, 90%, 95% o 99%) idéntica a una de las anteriores secuencias de aminoácidos enumeradas anteriormente, o al fragmento de las mismas que corresponde a un interferón alfa maduro.

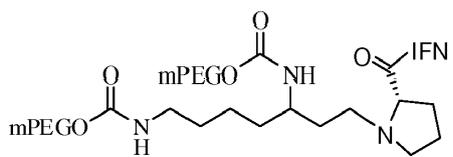
15 El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, modificado como en Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Tal algoritmo se incorpora a los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-10 1990. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Cuando existen espacios entre dos secuencias, se puede utilizar Gapped BLAST como describen Altschul et al., en Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST).

25 El término "grupo funcional de conexión" se refiere a un grupo funcional bi-valente, estando un extremo conectado al radical polimérico y estando el otro extremo conectado al radical proteico. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, -O-, -S-, éster carboxílico, carbonilo, carbonato, amida, carbamato, urea, sulfonilo, sulfinilo, amino, imino, hidroxiamino, fosfonato o grupo fosfato.

30 El producto conjugado de proteína-polímero descrito anteriormente puede estar en forma libre o en forma de sal, si corresponde. Se puede formar una sal, por ejemplo, entre un anión y un grupo cargado positivamente (p. ej., amino) en un producto conjugado de proteína-polímero de esta invención. Los aniones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, fosfato, citrato, metanosulfonato, trifluoroacetato y acetato. Del mismo modo, también se puede formar una sal entre un catión y un grupo cargado negativamente (p. ej., carboxilato) en un producto conjugado de proteína-polímero de esta invención. Los cationes adecuados incluyen iones de sodio, iones de potasio, iones de magnesio, iones de calcio y un catión de amonio como el ión tetrametilamonio.

40 Además, el producto conjugado de proteína-polímero puede tener uno o más dobles enlaces, o uno o más centros asimétricos. Tal producto conjugado puede existir en forma de racematos, mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales, mezclas diastereoméricas y formas isoméricas de doble enlace cis o trans o E o Z.

El producto conjugado de proteína-polímero de esta invención se muestra a continuación:



45 en el que mPEG tiene un peso molecular de 20 kD e IFN es un radical interferón- α_{2b} .

También se describe el uso del producto conjugado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de

uno de los trastornos mencionados anteriormente.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

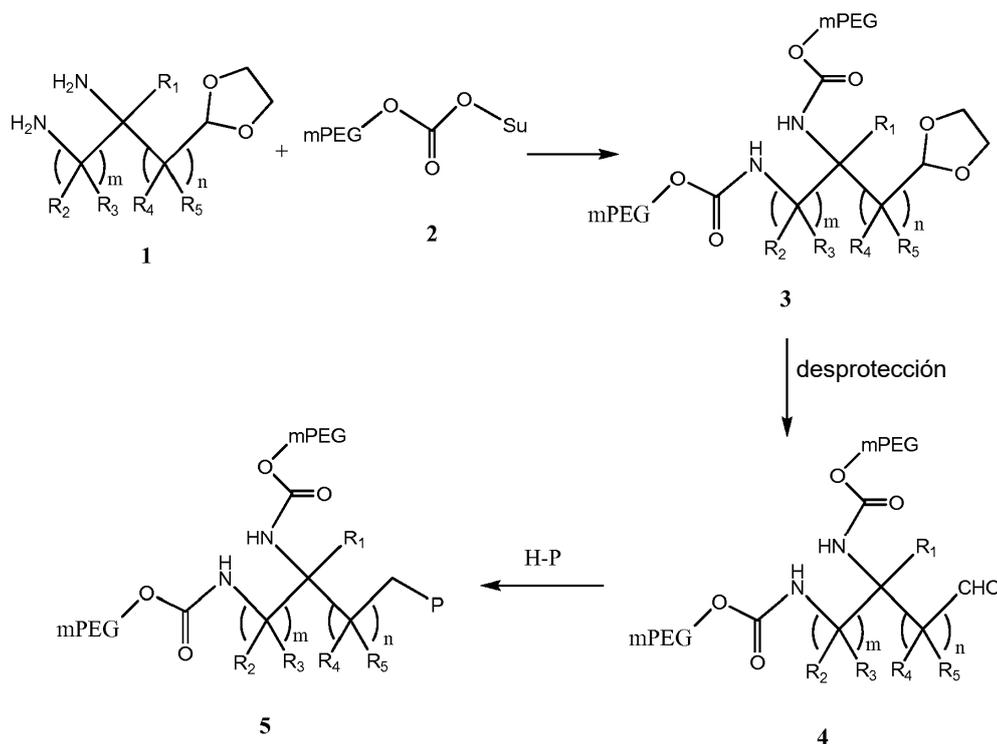
5

Descripción detallada

10

Los productos conjugados de proteína-polímero se pueden preparar por métodos sintéticos bien conocidos en la técnica química, p. ej., los métodos descritos en el documento de Estados Unidos Núm. de Serie 12/192.485. El esquema 1 muestra un ejemplo de preparación de productos conjugados de proteína-polímero. El compuesto 1 de diamina, que contiene un grupo acetal, se hace reaccionar con carbonato de N-hidroxisuccinimidilo-mPEG (es decir, compuesto 2) para formar el compuesto 3 di-PEGilado, que posteriormente se convierte en aldehído 4. Este compuesto aldehído se hace reaccionar con una proteína que tiene un grupo amino libre mediante alquilación reductora para proporcionar un producto conjugado de proteína-polímero.

15



Esquema 1

20

Un producto conjugado de proteína-polímero sintetizado de ese modo se puede purificar adicionalmente mediante un método tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, electroforesis, diálisis, ultrafiltración o ultracentrifugación.

25

Las reacciones químicas descritas anteriormente incluyen el uso de disolventes, reactivos, catalizadores, reactivos de grupos protectores y de grupos desprotectores, y ciertas condiciones de reacción. Además, pueden incluir etapas, ya sea antes o después de las etapas descritas específicamente en la presente memoria, para añadir o eliminar grupos protectores adecuados con el fin de permitir finalmente la síntesis de un producto conjugado de proteína-polímero. Además, se pueden realizar varias etapas sintéticas en una secuencia u orden alternativo para proporcionar los productos conjugados de proteína-polímero deseados. Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles para sintetizar productos conjugados de proteína-polímero aplicables son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, las descritas en R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2^a Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) y sus ediciones posteriores.

35

El producto conjugado de la invención puede tener una pureza muy alta. Es decir, 60% o más (p. ej., 70%, 80% o 90%) de las moléculas del producto conjugado son idénticas en todos los aspectos, incluyendo la secuencia del

radical de proteína y su posición de unión al radical de polímero.

El producto conjugado de esta invención puede ser farmacéuticamente activo en la forma de producto conjugado. Alternativamente, puede liberar un interferón- α farmacéuticamente activo, *in vivo* (p. ej., por medio de hidrólisis) escindiendo enzimáticamente la conexión entre el radical de proteína y el radical de polímero. Los ejemplos de enzimas involucradas en la escisión *in vivo* de las conexiones incluyen enzimas oxidativas (p. ej., peroxidasas, amina oxidasas o deshidrogenasas), enzimas reductoras (p. ej., cetorreductasas) y enzimas hidrolíticas (p. ej., proteasas, esterases, sulfatasas o fosfatasas).

El producto conjugado de esta invención se puede utilizar para el tratamiento de la esclerosis múltiple, la infección viral crónica (tal como la infección por el virus de la hepatitis B, la infección por el virus de la hepatitis C y la infección por el virus del papiloma humano), el cáncer, la mielofibrosis idiopática, la policitemia vera y la trombocitemia esencial. Tiene una semivida *in vivo* inesperadamente larga, una dosis de fármaco reducida y/o un intervalo de dosificación prolongado.

Como se emplea en la presente memoria, los términos "tratar" o "tratamiento" se definen como la aplicación o administración de una composición que incluye un producto conjugado de proteína-polímero a un sujeto (humano o animal), que tiene un trastorno, un síntoma de trastorno, un enfermedad o trastorno secundario al trastorno, o una predisposición al trastorno, con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar o mejorar el trastorno, el síntoma del trastorno, la enfermedad o trastorno secundario al trastorno o la predisposición al trastorno. "Una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un producto conjugado de proteína-polímero que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por algunas pruebas o marcadores) o subjetivo (es decir, un sujeto da una indicación o siente un efecto).

También dentro del alcance de esta invención, una composición farmacéutica contiene una cantidad eficaz de al menos uno de los productos conjugados de proteína-polímero descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, esta invención incluye un método para administrar una cantidad eficaz de uno o más de los productos conjugados de proteína-polímero a un paciente con una o más enfermedades. Las dosis eficaces variarán, como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo, p. ej., de la velocidad de hidrólisis de un producto conjugado de proteína-polímero, los tipos de enfermedades a tratar, la vía de administración, el uso de excipientes y la posibilidad de uso conjunto con otro tratamiento terapéutico.

Para poner en práctica el método de la presente invención, una composición que tiene uno o más de los compuestos mencionados anteriormente se puede administrar por vía parenteral, oral, nasal, rectal, tópica o bucal. El término "parenteral" como se emplea en la presente memoria se refiere a inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intraperitoneal, intratraqueal o intracraneal, así como cualquier técnica de infusión adecuada.

Una composición inyectable estéril puede ser una solución o suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el manitol, el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión (p. ej., mono o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. Otros tensioactivos de uso común, tales como Tween o Span u otros agentes emulsionantes similares o potenciadores de biodisponibilidad que se utilizan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, también se pueden emplear para fines de formulación.

Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos, los portadores comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo se puede suspender o disolver en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Se puede preparar una composición para inhalación o aerosol nasal de acuerdo con mecanismos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Por ejemplo, tal composición se puede preparar como una solución en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

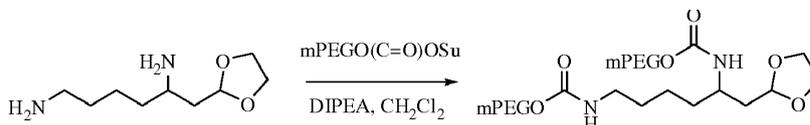
Una composición que tiene uno o más de los compuestos descritos anteriormente también se puede administrar en forma de supositorios para administración rectal.

Un portador farmacéuticamente aceptable se utiliza rutinariamente con uno o más compuestos activos mencionados anteriormente. El portador en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" en el sentido de que es compatible con el ingrediente activo de la composición (y preferiblemente, capaz de estabilizar el ingrediente activo) y no perjudicial para el sujeto a tratar. Se pueden utilizar uno o más agentes solubilizantes como excipientes farmacéuticos para el suministro de un compuesto mencionado anteriormente. Los ejemplos de otros portadores incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, laurilsulfato de sodio y D&C Amarillo núm. 10.

Se pueden utilizar ensayos adecuados para evaluar de manera preliminar la eficacia de los productos conjugados descritos anteriormente en el tratamiento de diversas enfermedades. Por ejemplo, se puede evaluar la eficacia del producto conjugado en el tratamiento de la policitemia vera y la trombocitemia esencial siguiendo los métodos descritos por Kiladjian et al., en Blood 2008; 112(8):3065-72 y Langer et al., en Haematologica 2005; 90: 1333-1338, respectivamente.

El siguiente ejemplo se debe interpretar como meramente ilustrativo, y no limita el resto de la descripción de ninguna manera. Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción de la presente memoria, utilizar la presente invención en toda su extensión.

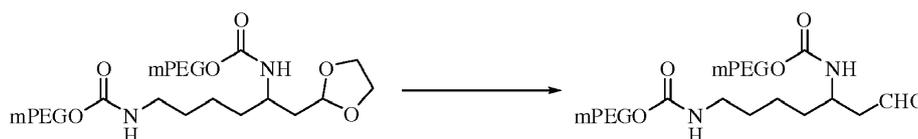
Preparación de di-PEG aldehído



Se preparó PEGO(C=O)OSu de 20 kD a partir de mPEGOH de 20 kD adquirido en (SunBio Inc., CA, EE.UU.) de acuerdo con el método descrito en Bioconjugate Chem. 1993, 4, 568-569.

Se añadió una solución de 6-(1,3-dioxolan-2-il)hexano-1,5-diamina en diclorometano (11,97 g de la solución que contenía 9,03 mg de diamina, 47,8 μ moles) a un matraz que contenía PEGO(C=O)OSu de 20 kD (1,72 g, 86,0 μ moles). Una vez que PEGO(C=O)OSu se hubo disuelto completamente, se añadió N,N-diisopropiletilamina (79 μ L, 478 μ moles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, y a continuación se añadió metil t-butil éter (200 mL) gota a gota con agitación. El producto precipitado resultante se recogió y se secó a vacío para proporcionar di-PEG acetal (1,69 g, 98%) en forma de un sólido de color blanco.

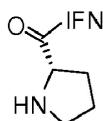
RMN- H^1 (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 7,16 (t, $J = 5,2$ Hz, 1 H), 7,06 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H), 4,76 (t, $J = 4,8$ Hz, 1 H), 4,10-3,95 (m, 4 H), 1,80-1,65 (m, 1 H), 1,65-1,50 (m, 1 H), 1,48-1,10 (m, 6 H).



El di-PEG acetal (4,0 g, 0,2 mmoles) se suspendió en tampón de pH 2,0 (ácido crítico, 40 mL). La mezcla de reacción se agitó a 35°C durante 24 h y después se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se concentraron y después se redisolieron en diclorometano (20 mL). La solución se añadió gota a gota a metil t-butil éter (400 mL) con agitación. El producto precipitado resultante se recogió y se secó a presión reducida para proporcionar di-PEG aldehído (3,8 g, 95%) en forma de un sólido de color blanco.

RMN- H^1 (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 9,60 (s, 1 H), 7,24 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H), 7,16 (t, $J = 5,2$ Hz, 1 H), 4,10-3,95 (m, 4 H), 3,95-3,80 (m, 1 H), 3,00-2,85 (m, 2 H), 2,58-2,36 (m, 2 H), 1,46- 1,15 (m, 6 H).

Preparación de interferón modificado.



Se clonó un interferón- α_{2b} humano recombinante modificado mediante un método de PCR utilizando ADN genómico humano como molde. Los oligonucleótidos se sintetizaron basándose en las secuencias flanqueantes de interferón-

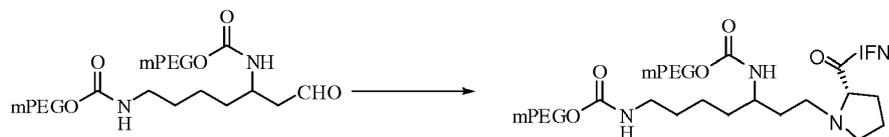
α_{2b} humano (GenBank Núm. de Acceso J00207, 8 de enero de 2008). Los productos de PCR derivados se subclonaron en el vector pGEM-T (Promega). La variante de IFN se amplificó por PCR nuevamente a través de los clones pGEM-T y con posterioridad se subclonó en el vector de expresión de proteínas pET-24a (Novagen), un vector impulsado por el promotor de la ARN polimerasa de T7, utilizando NdeI/BamHI como sitios de clonación. El vector pET-24a se transformó a continuación en la cepa *E. coli* BL21-CodonPlus (DE 3)-RIL (Stratagene). Los clones de alta expresión se seleccionaron manteniendo *E. coli* BL21-CodonPlus (DE 3)-RIL transformada en presencia de karamicina (50 μ g/mL) y cloranfenicol (50 μ g/mL).

Se empleó un medio de caldo Terrífico (BD, 200 ml) para la propagación de BL21-CodonPlus (DE 3)-RIL con el gen Pro-IFN en un matraz de 1000 mL. El matraz se agitó a 37°C a 230 rpm durante 16 h. Las fermentaciones discontinuas y semi-continuas se realizaron en un fermentador de jarra de 5 litros (Bioflo 3000; New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ). La fermentación discontinua utilizó 150 mL de un inóculo de precultivo durante la noche y 3 L del medio de caldo Terrífico con karamicina (50 μ g/mL), cloranfenicol (50 μ g/mL), glicerol al 0,4% y elementos vestigiales al 0,5% (v/v) (10 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/L de H_3BO_3 , 2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,84 g/L EDTA, 50 ml/L HCl). La concentración de oxígeno disuelto se controló a 35% y el pH se mantuvo a 7,2 mediante la adición de una solución acuosa de NaOH 5 N. Se preparó una solución de alimentación que contenía 600 g/L de glucosa y 20 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cuando el pH aumentó a un valor mayor que el punto de ajuste, se añadió un volumen apropiado de la solución de alimentación para aumentar la concentración de glucosa en el caldo de cultivo. La expresión del gen Pro-IFN se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final 1 mM y el caldo de cultivo se cosechó después de incubar durante 3 horas.

El sedimento celular recogido se resuspendió con tampón TEN (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, NaCl 100 mM) a una razón aproximada de 1:10 (g de peso húmedo/mL) y se desorganizó con un microfluidizador, y a continuación se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min. El sedimento que contenía cuerpos de inclusión (IB) se lavó dos veces con tampón TEN y se centrifugó como se describió anteriormente. El sedimento que contenía IB se suspendió después en 150 mL de una solución acuosa de guanidinio HCl (GuHCl) 4 M y se centrifugó a 20.000 rpm durante 15 minutos. Los IB se solubilizaron a continuación en 50 mL de solución de GuHCl 6 M. El material solubilizado de GuHCl se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 min. El replegamiento se inició por dilución de los IB desnaturados en 1,5 L de un tampón de replegamiento recién preparado (Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), L-Arginina 0,5 M, EDTA 2 mM) que se agitó solamente durante la adición. La mezcla de reacción de replegamiento se dejó incubando durante 48 h sin agitar. El interferón- α_{2b} humano recombinante replegado (es decir, Pro-IFN) se sometió a diálisis frente a tampón Tris 20 mM (con EDTA 2 mM y urea 0,1 M, pH 7,0) para una purificación adicional por cromatografía en columna de Q-Sepharose.

La proteína humana recombinante replegada Pro-IFN se cargó en una columna de Q-Sepharose (GE Amersham Pharmacia, Pittsburgh, PA). La columna se preequilibró y se lavó con un tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,0). El producto se hizo eluir con una mezcla de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) y NaCl 200 mM. Las fracciones que contenían Pro-IFN se recogieron basándose en su absorbancia a 280 nm. La concentración de Pro-IFN se determinó mediante un kit de análisis de proteínas utilizando el método de Bradford (Pierce, Rockford, IL).

Preparación del producto conjugado de proteína-polímero

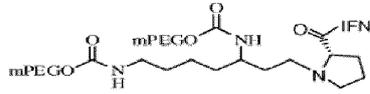


A una solución de di-PEG aldehído preparada anteriormente (1,2 g, 0,03 mmoles) en agua (72 mL) se le añadieron tampón fosfato de sodio 2 M (pH 4,0, 5 ml) y Pro-IFN (200 mg en 22,2 ml de tampón de pH 7,0 que contenía Tris-HCl 20 mM y NaCl 0,2 M, 0,01 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos; después se añadió solución acuosa de cianoborohidruro de sodio (400 mM, 1,25 mL, 0,5 mmoles). La mezcla de reacción se agitó en la oscuridad durante 16 h y se purificó por cromatografía en SP XL Sepharose. Las fracciones que contenían el producto conjugado de polímero-proteína deseado se recogieron basándose en su tiempo de retención y absorbancia a 280 nm. La concentración del producto conjugado se determinó mediante un kit de análisis de proteínas utilizando el método de Bradford (Pierce, Rockford, IL). El rendimiento aislado del producto conjugado fue aproximadamente de 40% o superior.

REIVINDICACIONES

1. Un producto conjugado para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis idiopática, policitemia vera o trombocitemia esencial, que tiene la fórmula

5



en la que mPEG tiene un peso molecular de 20 kD e IFN es un radical de interferón- α 2b.