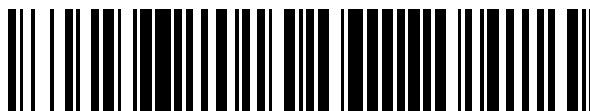


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 427**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2004** **E 10175140 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015** **EP 2253330**

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

30 Prioridad:

**11.07.2003 GB 0316294**

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

**28.10.2015**

73 Titular/es:

**POLYTHERICS LIMITED (100.0%)  
Babraham Research Campus  
Babraham Cambridge CB22 3AT, GB**

72 Inventor/es:

**GODWIN, ANTONY ROBERT;  
PEDONE, ELISA;  
CHOI, JI-WON y  
BROCCHINI, STEPHEN JAMES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

### Observaciones :

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

ES 2 549 427 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## Moléculas biológicas conjugadas y su preparación

La presente invención se refiere a moléculas biológicas conjugadas y a su preparación a partir de nuevos derivados químicamente funcionalizados de polietilenglicol.

5 Muchas moléculas terapéuticamente activas no tienen las propiedades requeridas para lograr eficacia en el uso médico clínico. Por ejemplo, ahora, Industria farmacéutica está descubriendo y produciendo mediante Ingeniería genética proteínas y polipéptidos terapéuticamente activos. Aunque en la actualidad se comercializan en Estados Unidos al menos 80 medicinas basadas en proteínas y hay al menos 350 medicinas más basadas en proteínas sometidas a ensayos clínicos (Harris J, Chess R: Effect of Pegylation on pharmaceuticals. Nature Review Drug  
10 Discovery, 2003, 2, 214 – 221), la mayoría de las proteínas naturales no son medicinas buenas porque, después de administración a pacientes, hay varios inconvenientes inherentes entre los que se incluyen: (1) las proteínas son digeridas por muchas endopeptidasas y exopeptidasas presentes en la sangre o en tejidos, (2) muchas proteínas son inmunogénicas en cierta medida y (3) las proteínas pueden excretarse rápidamente mediante ultrafiltración en el riñón. Entre otras moléculas usadas como agentes terapéuticos activos en medicinas que son sistémicamente  
15 tóxicas o carecen de biodisponibilidad y farmacocinética óptimas se incluyen moléculas de bajo peso molecular de las que una dosis eficaz está limitada por la toxicidad. Tales moléculas se usan rutinariamente para tratar la inflamación y afecciones debidas a neoplasias malignas, infección y enfermedades autoinmunes.

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

Muchos reactivos de conjugación de polímero comprenden conjugar una funcionalidad química que es hidrolíticamente inestable. Son ejemplos de reactivo de conjugación de polímero hidrolíticamente inestables son los ésteres activos que incluyen, por ejemplo, carbonatos de óxido de polialquileño-N-succinimida (Zalipsky, patente de EE.UU. Nº.122.614). Estos reactivos tienen semividas relativamente cortas en medio acuoso, que incluye sangre o plasma. Esto da por resultado la necesidad de añadir excesos estequiométricos grandes del reactivo de conjugación de polímero. La estabilidad hidrolítica del reactivo es importante porque el requisito de añadir excesos estequiométricos para la conjugación de proteínas requiere un esfuerzo y un coste significativos para purificar el conjugado de polímero-proteína de la mezcla de reacción. Además, estos reactivos hidrolíticamente inestables tienden a reaccionar preferentemente con la funcionalidad química amina de la proteína, en particular con la amina ε de los restos de lisina. Puesto que la mayoría de las proteínas de interés tienen más de un resto de lisina y, frecuentemente, muchos restos de lisina, la conjugación tiende a ser inespecífica en cuanto a que se produce en  
35 muchos sitios del resto en la proteína. Es posible purificar la mezcla de reacción de conjugación para aislar proteínas conjugadas a una molécula de polímero, aunque no es posible aislar a un coste razonable conjugados de polímero-proteína de los que la totalidad están conjugados al mismo grupo amina en la proteína. Frecuentemente, la conjugación inespecífica da como resultado una función proteínica alterada. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con unión de poli(óxido de etileno) al azar mediante restos de lisina dan como resultado anticuerpos modificados (o fragmentos de anticuerpo modificados) capaces de unirse al antígeno diana con afinidad, avidez o especificidad reducida. Además, los reactivos de conjugación de polímero específicos requieren una condiciones de la reacción de conjugación que deben seleccionarse para asegurar que las aminas de la proteína no están protonadas. Estas condiciones requieren un medio con un pH moderadamente alto (8-10), lo que permite que los restos amina sean lo suficientemente reactivos como para reaccionar con el reactivo de conjugación del polímero. Frecuentemente, las condiciones de un pH alto son perjudiciales para la proteína y causan cambios estructurales y desnaturalización. Estos procesos dan como resultado la alteración de la función proteínica. Los reactivos de conjugación de polímero específicos de amina tienden a unirse a sitios accesibles de la amina en la proteína. Estos reactivos se pueden llamar reactivos cinéticos. Son lábiles y sufren una reacción con la mayoría de los sitios nucleofílicos amino evaluables de la proteína. Los reactivos de conjugación de polímero específicos de amina que se conjugan mediante acilación de amina dan como resultado la pérdida de carga positiva en el grupo amina del resto de aminoácido en la proteína que normalmente estaría presente en condiciones fisiológicas para la proteína no conjugada. Estos rasgos de los reactivos de conjugación de polímero específicos de amina frecuentemente conducen a una alteración parcial de la función de la proteína. Otros grupos funcionales de conjugación incorporados en los polímeros para la conjugación a proteínas y que son específicos de aminas y con frecuencia hidrolíticamente lábiles incluyen los isocianatos (documento WO 94/04193) y los carbonatos (documento WO 90/13540).  
50  
55

Particularmente relevante para una eficacia optimizada y para asegurar la consistencia de dosis a dosis es cuidar de que el número de moléculas de polímero conjugadas por proteína sea el mismo y que cada molécula de polímero esté específicamente conjugada covalentemente al mismo resto de aminoácido en cada molécula de proteína. La conjugación inespecífica en sitios a lo largo de una molécula de proteína da como resultado una distribución de productos de conjugación y, frecuentemente, proteína no conjugada, obteniéndose una mezcla compleja que es  
60

difícil, laboriosa y cara de purificar.

Se han desarrollado reactivo de conjugación de polímero específicos de tiol para proteínas con el fin abordar las limitaciones a la propensión de los reactivos de conjugación a experimentar hidrólisis que sea competitiva con la conjugación a la proteína, la conjugación no específica de polímero en diferentes restos de aminoácido de la proteína y la necesidad de condiciones de pH alto en la reacción de conjugación. Los reactivo de conjugación de polímero específicos de tiol se pueden utilizar a valores del pH próximos a la neutralidad, en los que los restos funcionales amina en los restos de aminoácidos de la proteína están protonados y, por tanto, no pueden competir eficazmente en la reacción de conjugación con el reactivo de conjugación del polímero. Los reactivo de conjugación de polímero específicos de tiol que son relativamente más estables hidrolíticamente que los reactivos específicos a amina mencionados anteriormente se pueden utilizar en un exceso estequiométrico menor, de modo que se reducen los costes durante la purificación del conjugado polímero-proteína. Entre los restos funcionales de conjugación que son ampliamente selectivos para los grupos tiol se incluyen yodoacetamida, maleimida (documento WO 92/16221), vinilsulfona (documentos WO 95/13312 y WO 95/34326), vinilpiridinas (documento WO 88/05433) y ésteres acrilato y metacrilato (documento WO 99/01469). Estos restos de conjugación selectivos de tiol dan un único tioéter que conjuga el enlace entre el polímero.

La mayoría de las proteínas no tienen sulfhidrales libres porque estos sulfhidrales experimentan reacciones de reorganización y desbarajuste con los puentes disulfuro dentro de la proteína, dando como resultado una función proteínica empeorada. Para las proteínas que sí tienen sulfhidrales libres, con frecuencia estos sulfhidrales son críticos para la función de la proteína. Típicamente, en una proteína, el número de restos sulfhidrales es inferior al número de restos amina (por ejemplo, Lisina o histidina). Puesto que la conjugación a una proteína puede hacerse que sea específica en los grupos tiol y puesto que las proteínas típicamente no tienen grupos tiol libres, hay ejemplos de modificación específica del sitio de la proteína mediante mutagénesis para introducir sitios de tiol para la unión de PEG. No obstante, dichas modificaciones aumentan los costes significativamente. El sulfhidral libre introducido puede tener limitaciones similares a las mencionadas antes en la proteína diseñada por ingeniería para arrastre y dimerización de la proteína. Asimismo, el proceso de mutagénesis y la producción de la proteína modificada de fuentes bacterianas frecuentemente causa que los sulfhidrales libres se unan en un enlace disulfuro con glutatión, por ejemplo. La interleucina 2, por ejemplo, se ha modificada mediante mutagénesis para reemplazar un resto de treonina por una cisteína para tener una unión específica al sitio de unión de PEG. [Goodson RJ, Katre NV; Bio/Technology (1990) 8, 343 – 346].

Se sabe en la técnica que los parámetros de conjugación han de casar óptimamente con la molécula terapéuticamente activa de interés en términos de morfología del polímero, características del peso molecular, funcionalidad química. Aunque el conjugado de polímero-proteína puede presentar muchas propiedades favorables y necesarias para un uso seguro, médicamente eficaz, el efecto de la conjugación del polímero sobre la actividad y la estabilidad de la proteína es de vital importancia para el comportamiento. Las variables de conjugación relacionadas con la localización y la cantidad de conjugación y las características del polímero se deben correlacionar óptimamente con las propiedades biológicas y fisicoquímicas.

El documento WO 99/45964 describe ciertos reactivos de conjugación de polímero Bioconj. Chem. 5(3), pp. 220 – 235 describe reticulación de los fragmentos Fab' del anticuerpo monoclonal usando reactivos de alquilación de transferencia en el equilibrio.

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

X o X' representa un polietilenglicol. Esto puede contener una única cadena lineal, o puede tener una morfología ramificada compuesta por muchas cadenas pequeñas o grandes. En una realización preferida de la invención, se inicia un polietilenglicol de cadena lineal mediante un grupo adecuado, por ejemplo, un grupo alcoxi, por ejemplo un grupo metoxi, ariloxi, carboxi o hidroxilo, y se conecta en el otro extremo de la cadena al grupo enlazador Q.

El polímero X o X' opcionalmente se puede derivatizar o funcionalizar de cualquier manera que se desee. Por ejemplo, los polímeros con dos o más restos químicos para conjugación que son el sujeto de la presente invención se pueden usar para crear conjugados de dos o más moléculas bioactivas unidas. Los grupos reactivos se pueden unir en el grupo terminal o final del polímero, o a lo largo de la cadena del polímero mediante enlazadores pendientes. Los conjugados multímeros que contienen más de una molécula biológica, típicamente un polipéptido o fármaco biológicamente activo, pueden dar como resultado beneficios sinérgicos y aditivos. Si se desea, el polímero se puede acoplar a un soporte sólido usando procedimientos convencionales.

El peso molecular óptimo del polímero dependerá, obviamente, de la aplicación prevista. Preferentemente, el peso molecular promedio en número está en el intervalo de 500 g/mol a aproximadamente 75.000 g/mol. Cuando se pretende que el compuesto de la fórmula general I abandone la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de una inflamación causada por una neoplasia maligna, infección o enfermedad autoinmune, o por traumatismo, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular más bajo, en el intervalo de 2000 – 30.000 g/mol. Para aplicaciones en las que se quiere que el compuesto de fórmula general I permanezca en circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular más alto, por ejemplo en el intervalo de 20.000-75.000 g/mol.

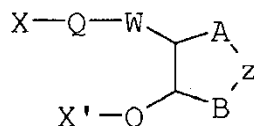
El polímero que se va a usar se debe seleccionar de modo que el conjugado sea soluble en el medio disolvente para el uso previsto. Para aplicaciones biológicas, en particular para aplicaciones de diagnóstico y aplicaciones terapéuticas para administración terapéutica clínica a un mamífero, el conjugado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

Un grupo enlazador Q puede ser, por ejemplo, un enlace directo, un grupo alquileo (preferentemente un grupo alquileo  $C_{1-10}$ ) o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, cualquiera de los cuales puede estar terminado o interrumpido por uno o varios átomos de oxígeno, átomos de azufre, grupos -NR (en los que R tiene el significado que se da más adelante), grupos ceto, grupos -O-CO- y/o grupos -CO-O-. Entre los grupos arilo adecuados se incluyen grupos fenilo y naftilo, mientras que entre los grupos heteroarilo adecuados se incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina. La unión al polietilenglicol puede ser a través de un enlace hidrolíticamente lábil o un enlace no lábil.

Entre los sustituyentes que pueden estar presentes en un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido se incluyen, por ejemplo, uno o más de sustituyentes iguales o diferentes, seleccionados de -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R, -COH, -CH<sub>2</sub>OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO<sub>2</sub>R, -SR, -SOR, -SO<sub>2</sub>R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO<sub>2</sub>R, -NR'CO<sub>2</sub>R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R, halógeno, por ejemplo flúor o cloro, -C≡CR, -C=CR<sub>2</sub> y -C=CHR, en los que cada R o R' representa de forma independiente un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo (preferentemente alquilo  $C_{1-6}$ ), o arilo (preferentemente fenilo). Es especialmente preferida la presencia de sustituyentes aceptores de electrones.

W representa un grupo ceto CO, un grupo éster -O-CO-, o un grupo sulfona -SO<sub>2</sub>-, o un grupo obtenido por reducción de uno de tales grupos, por ejemplo un grupo CH.OH, un grupo éter CH.OR, un grupo éster CH.O.C(O)R, un grupo amina CH.NH<sub>2</sub>, CH.NHR o CH.NR<sub>2</sub>, o una amida CH.NHC(O)R o CH.N(C(O)R)<sub>2</sub> o X-Q-W- juntos ser un grupo ciano.

En la siguiente parte de esta especificación, Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> se denominarán colectivamente Z. La patente matriz de la presente solicitud divisional, EP 1.648.518B1, reivindica conjugados en los que Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> representan juntos una sola molécula biológica:

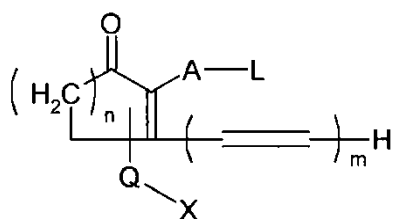


Z puede derivarse de cualquier molécula biológica deseada, por ejemplo una proteína. La proteína puede ser, por ejemplo, un polipéptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una enzima, una citocina, una quimiocina o un receptor. También se pueden usar polipéptidos constreñidos o cíclicos que usualmente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

La invención también proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula general I, como se reivindica en la reivindicación 3. La reacción se lleva a cabo en dos etapas sucesivas con moléculas sucesivas Z<sup>1</sup>Nu y Z<sup>2</sup>Nu.

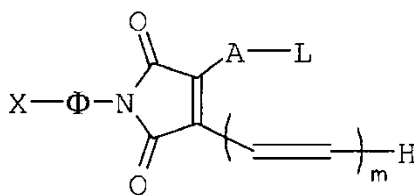
El grupo saliente L, o cada uno de ellos, puede representar, por ejemplo, -SR, -SO<sub>2</sub>R, -OSO<sub>2</sub>R, -N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R, halógeno o -OØ en los que R tiene el significado dado antes y Ø representa un grupo arilo sustituido, especialmente arilo que contiene como mínimo un sustituyente aceptor de electrones, por ejemplo, -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R, -COH, -CH<sub>2</sub>OH, -COR, -OR, -OCOR, -OCO<sub>2</sub>R, -SR, -SOR, -SO<sub>2</sub>R, -NHCOR, -NRCOR, -NHCO<sub>2</sub>R, -NR'CO<sub>2</sub>R, -NO, -NHOH, -NR'OH, -C=N-NHCOR, -C=N-NR'COR, -N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R, halógeno, especialmente cloro o, especialmente flúor, -C≡CR, -C=CR<sub>2</sub> y -C=CHR, en los que cada R y R tienen el significado dado anteriormente.

Las estructuras típicas en las que W' y X' juntos forman un anillo incluyen



(IIIa)

en la que n es un número entero de 1 a 4, y



(IIIb)

El proceso puede llevarse a cabo en un disolvente o mezcla disolventes en el que todos los reactivos son solubles. Se puede dejar que la proteína reaccione directamente con el compuesto de la fórmula general II o III en un medio de reacción acuoso. Este medio de reacción también puede tamponarse, dependiendo de los requisitos de pH del nucleófilo. El pH óptimo para la reacción es, generalmente, de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8, por ejemplo de aproximadamente 7,4, preferentemente de aproximadamente 6,0-6,5. Generalmente, las temperaturas de reacción entre 3 y 37 °C son adecuadas: las proteínas se pueden descomponer o desnaturizar con perjuicio de la función si la reacción de conjugación se efectúa a una temperatura a la que pueden producirse estos procesos. Las reacciones realizadas en medios orgánicos (por ejemplo, THF, acetato de etilo, acetona) suelen realizarse a temperaturas de hasta ambiente, por ejemplo las temperaturas por debajo de 0 °C.

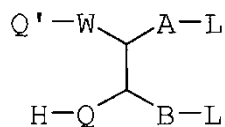
La proteína se puede conjugar efectivamente con los reactivos de la presente invención usando un equivalente estequiométrico o un ligero exceso de reactivo, a diferencia de muchos reactivos de la técnica anterior. Sin embargo, puesto que los reactivos de la presente invención no experimentan reacciones competitivas con medios acuosos utilizados para solvatar proteínas, es posible llevar a cabo la reacción de conjugación con un exceso de reactivo estequiométrico. reactivo en exceso puede eliminarse fácilmente mediante cromatografía de intercambio iónico durante la purificación rutinaria de proteínas.

Los compuestos de las fórmulas (II) y (III) son nuevos. Estos nuevos reactivos proporcionan una ruptura en la tecnología de conjugados, comprendiendo el resto funcional químico en el polímero un resto funcionalizado cruzado, latentemente conjugado por cruce, resto de bisalquilación, que es selectivo para dos nucleófilos.

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

Por tanto, ejemplo, un resto W que contiene un grupo ceto puede reducirse a un resto W que contiene un grupo CH(OH); se puede obtener un grupo éter CH.OR mediante reacción de un grupo hidroxilo con un agente de eterificación; se puede obtener un grupo éster CH.O.C(O)R mediante reacción de un grupo hidroxilo con un agente acetilante; se puede preparar un grupo amina CH.NH<sub>2</sub>, CH.NHR o CH.NR<sub>2</sub> a partir de una cetona un aldehído por aminación reductora; o se puede formar una amida CH.NHC(O)R o CH.N(C(O)R)<sub>2</sub> por acilación de una amina). Un grupo X-Q-W que es un grupo ciano se puede reducir a un grupo amina.

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



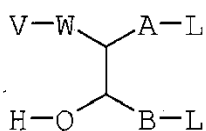
(VI)

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

5  $\text{X}-\text{V}$  (VII)

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

10



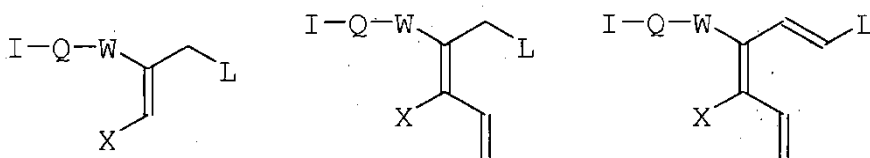
(VIII)

se puede hacer reaccionar con un polímero de fórmula general

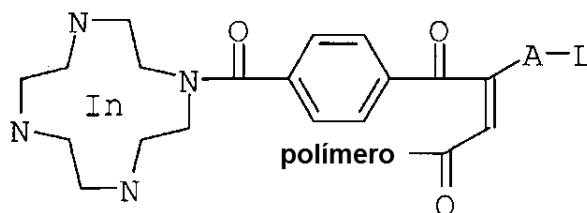
15  $\text{X}-\text{Q}'$  (IX)

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

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



25 por ejemplo



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

Los compuestos de fórmula general I se pueden usar también en aplicaciones no clínicas. Por ejemplo, muchos compuestos fisiológicamente activos, tales como enzimas, son capaces de catalizar reacciones en disolventes orgánicos y los compuestos de fórmula general I se pueden usar en tales aplicaciones. Adicionalmente se pueden usar compuestos de fórmula general I como herramientas diagnósticas.

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

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

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

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

Otras proteínas de interés son las proteínas alérgicas divulgadas por Dreborg y col., Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6 315 365 ya que tienen una alergenidad reducida cuando se conjugan con un polímero tal como poli(óxido de alqueno) y que, en consecuencia, son adecuadas para su uso como inductores de tolerancia. Entre los alérgenos divulgados se encuentran el antígeno de ambrosía E, el veneno de abeja melífera, el alérgeno del ácaro y similares.

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

Son de interés particular los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se usan en medicina clínica con fines diagnósticos y terapéuticos. El anticuerpo se puede usar solo o se puede conjugar covalentemente ("cargar") con otro átomo o molécula tal como un radioisótopo a un fármaco citotóxico/antiinfeccioso. Para la vacunación se pueden usar epítopos para producir un conjugado de polímero inmunógeno/proteína.

Un rasgo clave del procedimiento de la invención es que se realiza conjugación cruzada entre un grupo saliente de  $\alpha$ -metileno y un doble enlace con una función aceptora de electrones que actúa como un resto activador de Michael. Si el grupo saliente es propenso a la eliminación en el reactivo funcional cruzado en lugar que a dirigir el

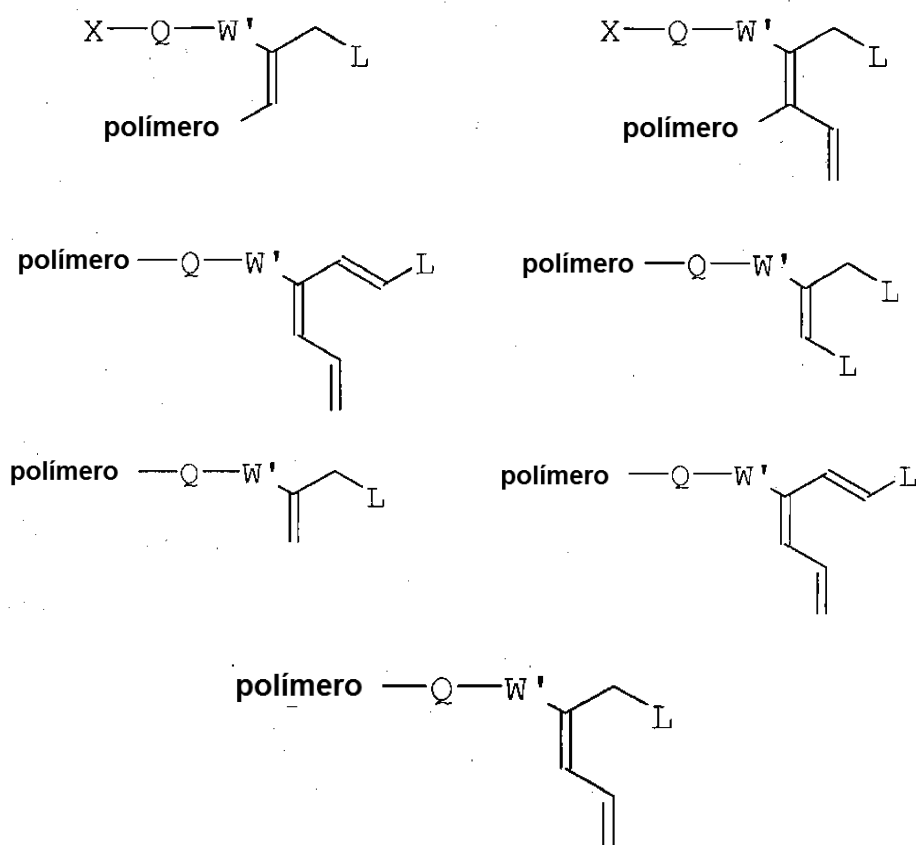
desplazamiento y el grupo aceptor de electrones es un resto activador adecuado para la reacción de Michael, la reacción intramolecular secuencial de bisalquilación se puede producir mediante reacciones consecutivas de Michael y retro de Michael. El resto saliente sirve para enmascarar un doble enlace conjugado latente que no esté expuesto hasta después de que se ha producido la primera alquilación y se produce bis-alquilación por las reacciones secuenciales e interactivas de Michael de retro-Michael como se describe en J. Am. Chem. Soc. 1979, 101, 3098 – 3110 y en J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5211 – 5212.). El grupo aceptor de electrones y el grupo saliente se seleccionan óptimamente de forma que se pueda producir bisalquilación mediante reacciones secuenciales de Michael y retro-Michael.

También es posible preparar agentes de alquilación funcionales cruzados con múltiples enlaces adicionales conjugados con el doble enlace o entre el grupo saliente y el grupo aceptor de electrones según se describe en J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5211 – 5212.

Los enlaces tiol éter formados después de la conjugación para dar un compuesto de fórmula I son, generalmente, hidrolíticamente estables en solución acuosa. Los propios reactivos son también hidrolíticamente estables. En este contexto, se considera que un compuesto es hidrolíticamente estable si no experimenta una degradación sustancial a pH fisiológico y a una temperatura de hasta 45 °C. Se considera que una degradación de menos de 50 % en estas condiciones en un período de 8 horas es no sustancial.

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

Entre algunos ejemplos de reactivos nuevos que se pueden usar en la invención se incluyen los siguientes:



Los Ejemplos siguientes ilustran la invención como se reivindica en la patente principal EP 1.648.518B1. Las Figuras 1 a 5 muestran los resultados obtenidos del Ejemplo 7.

#### Ejemplo 1



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

Un matraz de fondo redondo de una sola boca de 250 ml, se añadió *p*-nitroacetofenona (16,5 g), paraformaldehído (4,5 g), hidrocloruro de piperidina (12,1 g), etanol absoluto (100 ml) y una barra de agitación magnética. A la mezcla heterogénea agitada se añadió ácido clorhídrico (al 37 % en agua, 1 ml) y la solución se calentó a reflujo en nitrógeno. Después de un tiempo de 1-2 horas se añadió más paraformaldehído (3,0 g). La solución se mantuvo a reflujo durante aproximadamente 18 horas, tiempo durante el cual se añadió más paraformaldehído (3,0 g). Después de dejar que la solución de reacción se enfriara, sedimentó un sólido cristalino que no se disolvería con reflujo adicional. Se aisló el sólido mediante filtración y se recrystalizó usando metanol muy caliente, obteniéndose cristales amarillos grandes (10,9 g). RMN de  $^1H$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,34 – 1,50 (m, 1H), 1,64 – 1,79 (m, 2H), 1,79 – 1,94 (m, 4H), 2,89 – 3,05 (m, 2H), 3,41 (c, 2H), 3,51 – 3,54 (m, 2H), 3,82 (t, 2H), 8,26 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,44 (s, 1H).

**3-(2-Hidroxietiltiol)-*p*-nitropropiofenona:**

Una solución agitada de hidrocloruro de *p*-nitro-3-piperidinpropiofenona (30 g, 0,1 mol) y mercaptoetanol (9,5 g, 0,12 mol) en etanol al 95 % (200 ml) se calentó lentamente hasta homogeneidad. Se añadió piperidina (1,0 mol) y la mezcla de reacción se calentó hasta reflujo durante 2 horas. Después de enfriar, la mayoría del disolvente se sometió a evaporación rotatoria y se añadió acetato de etilo (200 ml) y se separó el sólido mediante filtración. La solución de acetato de etilo se extrajo secuencialmente con solución acuosa al 10 % de HCl,  $NaHCO_3$  al 5 % y salmuera y después se secó sobre  $Na_2SO_4$ , y a continuación el acetato de etilo se evaporó hasta un aceite que cristalizó, para dar 23,2 g del producto deseado que recrystalizó en acetato de etilo-éter etílico.

**2,2-bis(*p*-toliltiolmetil)*p*-nitroacetofenona:  $C_{24}H_{23}NO_3S_2$** 

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

**2,2-bis(*p*-tolilsulfonilmetil)*p*-nitroacetofenona:  $C_{24}H_{23}NO_7S_2$** 

En un matraz de fondo redondo de 250 ml se agitó una suspensión de 2,2-bis(*p*-toliltiolmetil)-*p*-nitroacetofenona (2,5 g) y oxona (18,4 g) en metanol:agua a 1:1 (100 ml) durante 16 horas. Esto dio una suspensión de un sólido blanco a la que se añadió cloroformo (100 ml) y la fase orgánica resultante se aisló usando un embudo separador, para dejar una suspensión de un sólido blanco dentro de la fase acuosa. La fase acuosa se añadió más agua hasta que se formó una solución homogénea, que después se lavó de nuevo con cloroformo (100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con salmuera (50 ml x 2), se secaron con sulfato magnésico y se eliminó el disolvente, obteniéndose un producto sólido en bruto blanquecino después de secar al vacío (2,5 g). El producto se recrystalizó en acetona, obteniéndose cristales blancos. RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  3,43 – 3,62 (m, 4H), 4,44 (quintete, 1H), 7,35 (d, 4H), 7,68 (d, 4H); 7,88 (d, 2H), 8,22 (d, 2H); análisis calculado para  $C_{24}H_{23}NO_7S_2$  (hallado): C, 57,47 (57,27); H, 4,62 (4,74); N 2,79 (2,58); EM (FAB)  $m/z$  502 ( $[M+1]^+$ ).

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

A un matraz de fondo redondo secado a la llama, purgado con argón y provisto de termómetro y embudo de adición, se añadió 3-(2-hidroxietiltiol)-*p*-nitropropiofenona (0,5 g, 2,0 mmol) y tetrahidrofurano anhidro (50,0 ml). La solución se agitó y se enfrió en baño de hielo seco-acetona, después se añadió  $TiCl_4$  (0,23 ml, 2,1 mmol) con jeringa. Se retiró el baño de hielo y se dejó que la solución se calentara hasta la temperatura ambiente, después la solución se enfrió a -40 °C y se añadió diisopropiletilamina (1,1 ml) con jeringa. El baño de enfriamiento se retiró y se dejó que la mezcla de reacción se calentara a entre -15 °C y 0 °C, adquiriendo un color rojo. Después, la mezcla de reacción se calentó a 25 °C en un tiempo de 3-5 minutos y se añadió una solución de acroleína (0,14 g, 2,1 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (20 ml), mediante un embudo de adición en un período de 30-40 minutos. La reacción exotérmica hizo que la temperatura de la mezcla de reacción aumentara a 30-40 °C y la solución se agitó durante 20 minutos adicionales tras la adición del aldehído antes de añadir acetato de etilo (75 ml). Se usó cromatografía en capa fina para confirmar la desaparición de la 3-(2-hidroxietiltiol)-*p*-nitropropiofenona de partida y la formación de la

2-(2-hidroxietiltiometil)-p-nitro-2(Z), 4-penta-dienofenona (Rf -0,38-0,45). El producto minoritario (isómero E) se pudo observar a Rf menor, en el intervalo de 0,29-0,34. La mezcla de reacción en acetato de etilo se extrajo con HCl acuoso al 10 % y salmuera. Las capas acuosas se combinaron y se extrajeron dos veces con acetato de etilo y todas las fracciones de acetato de etilo se combinaron y se lavaron dos veces con HCl acuoso al 10 %, NaHCO<sub>3</sub> acuoso al 5 % y salmuera, después se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido. El acetato de etilo se sometió a evaporación rotatoria, para dar la 2-(2-hidroxietiltiometil)-p-nitro-2(Z), 4-pentadienofenona en bruto como un aceite que se oxidó inmediatamente como para la síntesis de 2,2-bis(p-tolilsulfonilmetil)-p-nitroacetofenona, dando 2-(2-hidroxietilsulfonilmetil)-p-nitro-2(Z), 4-pentadienofenona como un sólido que se purificó mediante cromatografía en columna o se recrystalizó en acetato de etilo o metanol y después se unió covalentemente a polietilenglicol terminado en amino como se ha descrito en otro lugar en esta memoria.

La secuencia de reacciones anterior se realizó con muchos aldehídos, entre los que se incluyen acetaldehído, metacroleína, etacroleína, butiraldehído, crotonaldehído, 2,4-pentadienilo, sorbaldehído, tolualdehído, cinamaldehído, metilcinamaldehído, clorocinamaldehído, 5-fenil-2,4-pentadienal y 7-fenil-2,4,6-heptatrienal. Esta secuencia de reacciones se realizó con muchos derivatizados de arilceto, incluidos 3-(p-toliltiometil)-*m*-nitroacetofenona, 3-(2-hidroxi-etiltio)-*m*-nitropropiofenona, 3-(etiltiometil)-*m*-nitropropiofenona, 3-(dimetilamino-etiltio)-*m*-nitropropiofenona, 3-(2-hidroxietiltio)-3-fenilpropiofenona, 3(2-hidroxietiltiol)-5-fenil-4(E)-pentenofenona, 3(etiltiometil-o-nitropropiofenona, 3-(etiltio)-propiofenona, 3(2-hidroxietilsulfonil)propiofenona, 2-(3-(2-hidroxietiltio)-1-propenil)-*m*-2(E)-4-pentadienofenona. Esta secuencia de reacciones se realizó también con derivatizados ceto alifáticos, incluidos 4-(etiltio)-2-butanona, 4-(p-toliltio)-2-butanona, 4-(4-nitrofeniltio)-2-butanona, 4-(2-hidroxietiltio)-2-butanona y metil-3-(2-hidroxietiltio)-propanoato. Los productos finales de las reacciones mencionadas en lo que antecede para estos precursores se pueden unir covalentemente a polietilenglicol como se ha descrito en otro lugar en esta memoria.

#### **Hidrocloreuro de 2,2-Bis[(p-tolilsulfonil)metil]p-aminoacetofenona C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>ClNO<sub>5</sub>S<sub>2</sub>**

A un matraz de fondo redondo de 100 ml se añadió 2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]p-nitroacetofenona (2 g), etanol (25 ml), ácido clorhídrico (al 37 % en peso en agua, 8 ml) y una barra de agitación magnética. Después, a la mezcla heterogénea resultante se añadió cloruro de estaño (II) dihidrato y la mezcla se calentó a 45 °C en baño de aceite durante 2 horas. A continuación a la solución homogénea amarilla que se había formado se añadió agua hasta que se observó que podía haber precipitación si se añadía más agua. Se dejó enfriar la solución homogénea a temperatura ambiente, lo que tuvo como resultado un compuesto amarillo que precipitó/ cristalizó, que se aisló mediante filtración al vacío. Después, el producto aislado se mezcló luego con una mezcla caliente de acetona y metanol (aproximadamente 90:10 v/v). Mediante filtración al vacío se aisló un sólido insoluble y se secó hasta una masa constante en un horno de vacío (1,4 g). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,50 (s, 6H), 3,57 – 3,73 (m solapantes, 5H), 6,27 (s, 2H), 6,39 (d, 2H), 6,96 (d, 2H), 7,47 (d, 4H), 7,55 (d, 4H).

#### **Acoplamiento de 2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]p-aminoacetofenona a α-metoxi-ω-aminopoli(etilenglicol)**

Un matraz de fondo redondo de 100 ml, de una boca, equipado con un embudo de adición y un conducto para nitrógeno se cargó con trifosgeno (23 mg), hidrocloreuro de 2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]p-aminoacetofenona (125 mg), tolueno anhidro (2,5 ml) y una barra de agitación magnética en atmósfera de nitrógeno. El embudo de adición se cargó por separado con trietilamina anhidra (68 µl) y tolueno anhidro (2,5 ml). Se colocó un baño de acetona/hielo seco debajo del matraz de fondo redondo y se dejó que se enfriara el contenido. Después se añadió gota a gota la solución de trietilamina a la solución de trifosgeno agitando durante 5-10 minutos. Se dejó que el matraz y el baño de hielo seco se calentaran hasta la temperatura ambiente, lo que tardó varias horas y, una vez que estaban a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se dejó agitando durante aproximadamente 2 horas en atmósfera de nitrógeno. A continuación, a la mezcla de reacción a temperatura ambiente se añadió gota a gota una solución de O-(2-aminoetil)-O'-metilpoli(etilenglicol) 2.000 (490 mg) y trietilamina anhidra (68 µl) en tolueno anhidro. La mezcla resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 20 horas en total). Después se abrió la mezcla de reacción a la atmósfera y se filtró por gravedad a través de una jeringa desechable de 5 ml con un trozo de lana de algodón no absorbente para que actuara de filtro. El eluyente homogéneo se pasó a un embudo separador de 100 ml y después se lavó dos veces con agua desionizada (30 ml y después 10 ml). Se combinaron las fases acuosas y después se lavaron con éter dietílico (aproximadamente 25 ml). A continuación, la fase acuosa se liofilizó, obteniéndose un producto sólido blanquecino (160 mg). Se encontró producto también en las fases de éter dietílico y tolueno. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,5 (s), 3,39 (s), 3,41 – 3,53 (n solapantes), 3,53 – 3,76 (m), 3,82 (t), 4,17 (quintete), 7,35 – 7,39 (m, 1,39), 7,46 (d), 7,68 (d).

#### **Ejemplo 2**

##### **Síntesis de reactivo de conjugación de polímero**

#### **Hidrocloreuro de p-carboxi-3-piperidinpropiofenona**

Un matraz de fondo redondo de una sola boca de 250 ml, se añadió ácido p-acetilbenzoico (10 g) e hidrocloreuro de piperidina (7,4 g), 100 ml de etanol absoluto y una barra de agitación magnética. A la mezcla heterogénea agitada se añadió ácido clorhídrico concentrado (1 ml) y a continuación la solución se calentó a reflujo en nitrógeno. Al matraz

se añadió paraformaldehído (3,7 g) y se continuó el reflujo durante aproximadamente 1, 5 horas. Se formó una solución homogénea a la que se añadió más paraformaldehído (3,7 g). Se continuó calentando durante aproximadamente 6 horas, tiempo durante el cual se añadió más formaldehído (3,7 g). La solución de reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se dejó durante una semana. Mediante filtración de la mezcla de reacción enfriada se aisló un sólido blanco. Se intentó cristalizar el sólido después de disolverlo en metanol muy caliente. Mediante filtración se aisló un producto insoluble (1,96 g) y en el filtrado cristalizó un segundo producto (0,88 g). Ambos productos aparecían idénticos mediante análisis de espectroscopia de infrarrojos y cromatografía en capa fina después de secar al vacío, por lo que se combinaron para usarlos en posteriores reacciones. ATR–FT–IR 1704, 1691, 1235, 760.

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

A un matraz de fondo redondo de una boca de 50 ml se añadió hidrocloreuro de p-carboxi-3-piperidinpropiofenona (2,5 g), 4-metilbencenotiol (2,1 g), formaldehído (solución acuosa al 37 % en p/p, solución, 2,5 ml), etanol (10 ml) y una barra de agitación magnética y piperidina (aproximadamente 10 gotas). Después se acopló al matraz un condensador y la solución de reacción se calentó a reflujo. Después se añadió metanol (5 ml). Después de aproximadamente 2 horas, se añadió más formaldehído (2,5 ml) y se continuó calentando durante otras 2 horas. Después se dejó enfriar el matraz de reacción hasta la temperatura ambiente y después se diluyó la solución de reacción con éter dietílico (aproximadamente 150 ml). La fase orgánica resultante se lavó después con agua (acidificada con ácido clorhídrico 1 N a pH 2-3, 50 ml x 2), agua (50 ml) y salmuera (75 ml) y seguidamente se secó sobre sulfato magnésico. La filtración seguida de la eliminación de volátiles en un evaporador rotatorio dio un residuo sólido. El sólido se disolvió en un volumen mínimo de una mezcla predominantemente de metanol y acetona calentando. La solución homogénea se introdujo después en un congelador durante la noche, obteniéndose cristales blanquecinos, que se aislaron mediante filtración al vacío, se lavaron con acetona fresca y después se secaron hasta masa constante en horno de vacío (2,5 g): RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  2,38 (s, 6H), 3,16 – 3,31 (m, 4H), 3,85 (quintete, 1H), 7,15 (d, 4H), 7,18 (d, 4H), 7,64 (d, 2H), 8,07 (d, 2H); análisis calculado para  $C_{25}H_{24}O_3S_2$  (hallado): C, 68,78 (68,84); H, 5,54 (5,77).

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

En un matraz de fondo redondo de 250 ml se agitó una suspensión de 4-[2,2-bis[(p-toliltio)metil]acetil]benzoico (2 g) y oxona (16,9 g) en metanol:agua 1:1 v/v (100 ml) durante 16 horas. Esto dio como resultado una suspensión de un sólido blanco a la que se añadió cloroformo (100 ml) y la fase orgánica resultante se aisló usando un embudo separador, para dar una suspensión de un sólido blanco con la fase acuosa. A la fase acuosa heterogénea se añadió más agua hasta homogeneidad (aproximadamente 170 ml) y después la fase acuosa se lavó con cloroformo (75 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con agua (50 ml x 2, acidificada con unas pocas gotas de ácido clorhídrico 1N) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó con sulfato magnésico, se filtró y se eliminó el disolvente usando un evaporador rotatorio, para dar un producto sólido blanquecino en bruto (2,2 g). La purificación adicional (en 1 g de producto) se realizó mediante recristalización en acetato de etilo muy caliente, acetona y hexano, obteniéndose 0,6 g de producto. RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  2,51 (s, 6H), 3,49 – 3,72 (m, 4H), 4,44 (quintete, 1H), 7,40 (d, 4H), 7,73 – 7,78 (m, 6H), 8,13 (d, 2H); análisis calculado para  $C_{25}H_{24}O_7S_2$  (hallado): C, 59,98 (59,88); H, 4,83 (4,78).

#### 30 **Acoplamiento de ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico a $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino PEG (2000 g/mol)**

Un matraz con llave de 50 ml de una boca se cargó con ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico (100 mg) y una barra de agitación magnética. El matraz se selló y se aplicó un vacío fuerte durante aproximadamente 15 minutos. Se introdujo en el matraz atmósfera de argón y se añadió con jeringa cloruro de tionilo (1 ml) en agitación. La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 2 horas. Después se eliminaron al vacío los líquidos volátiles, obteniéndose una espuma amarilla. Se introdujo de nuevo atmósfera de argón en el matraz y se añadió diclorometano anhidro (5 ml) con jeringa, obteniéndose una solución homogénea. De nuevo se eliminaron al vacío los líquidos volátiles. Se repitió el proceso de adición/eliminación de disolvente hasta que quedó un residuo blanco. Al matraz con llave se añadió de nuevo diclorometano anhidro (5 ml) para formar una solución homogénea. Separadamente, en un matraz de fondo redondo de 25 ml, provisto de diafragma y con barra de agitación magnética se disolvieron O-(2-aminoetil)-O'-metilpoli(etilenglicol) (2.000 g/mol) (0,2 g) y trietilamina anhidra (30  $\mu$ l) en diclorometano anhidro (5 ml) en atmósfera de argón. La solución de reacción con ácido bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico se inyectó en el matraz que contenía la solución de polietilenglicol gota a gota, produciéndose inmediatamente el desprendimiento de un gas blanco. La solución resultante se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente y después se añadió más trietilamina (28  $\mu$ l). Tras 1 hora adicional, la solución de reacción se añadió gota a gota mediante una pipeta de vidrio a éter dietílico sometido a una rápida agitación. Para conseguir la precipitación fue necesario añadir hexano a la solución de éter dietílico y poner el matraz en baño de hielo. El precipitado obtenido se aisló mediante centrifugación y se secó en horno de vacío hasta peso constante, obteniéndose un producto sólido blanquecino (230 mg). Se logró una pureza mayor mediante precipitación disolviendo primero el producto en diclorometano y añadiendo la a una solución enfriada de éter dietílico. RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  2,51 (s), 3,40 (s), 3,60 – 3,75 (m), 3,84 (t), 4,36 (quintete), 7,39 (d), 7,68 (d), 7,71 (d), 7,85 (d).

#### 60 **Acoplamiento de ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico a $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino PEG (20.000 g/mol)**

- Un matraz con llave de 50 ml de una boca se cargó con ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico (100 mg) y una barra de agitación magnética. El matraz se selló y se aplicó un vacío fuerte durante aproximadamente 15 minutos. Se introdujo en el matraz atmósfera de argón y se añadió con jeringa cloruro de tionilo (1 ml) en agitación. La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 2 horas. Después de dejar enfriar el matraz hasta la temperatura ambiente, se eliminaron los líquidos volátiles al vacío, obteniéndose una espuma amarilla. Se introdujo de nuevo atmósfera de argón en el matraz y se añadió diclorometano anhidro (5 ml) con jeringa, obteniéndose una solución homogénea. De nuevo se eliminaron al vacío los líquidos volátiles. Se repitió el proceso de adición/eliminación de disolvente hasta que quedó un residuo blanco. Por último, al matraz se añadió diclorometano anhidro (5 ml) para formar una solución homogénea.
- En un matraz con llave de 50 ml distinto se disolvió O-(2-aminoetil)-O'-metilpoli(etilenglicol) (20.000 g/mol) (0,5 g) en 4 ml de tolueno anhidro en atmósfera de argón y después la solución se evaporó a sequedad al vacío. El residuo blanco obtenido se mantuvo al vacío durante 3 horas y después se disolvió en diclorometano anhidro (5 ml) en atmósfera de argón.
- La solución de reacción de ácido bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzoico se añadió lentamente gota a gota a la solución de poli(etilenglicol), que estaba en agitación y enfriada en baño de hielo. Finalizada la adición completa, se añadieron gota a gota a la solución resultante 40 µl de trietilamina seca. Una vez añadida la trietilamina, se dejó la solución resultante en agitación durante la noche y que se calentara hasta la temperatura ambiente.
- La solución de reacción se filtró después a través de un filtro de 0,45 µm y se eliminaron los líquidos volátiles del eluyente, obteniéndose un residuo ligeramente amarillo/naranja que se redisolvió en acetona caliente (10 ml). El matraz que contenía la solución homogénea resultante se colocó en un baño de hielo-agua y se agitó hasta que se produjo precipitación. El precipitado blanco se aisló en un embudo de vidrio sinterizado nº 3 y se lavó con acetona fresca enfriada (aproximadamente 30 ml). El sólido aislado se dejó secar al vacío, obteniéndose 0,4 g de sólido blanco. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,42 (s), 3,31 (s), 3,40 – 3,75 (m), 4,27 (m), 7,30 (d), 7,59 (d), 7,63 (d), 7,75 (d).
- El reactivo de conjugación α-metoxi-ω-4-[2, 2-bis[ (p-tolilsulfonil) metil]acetil]-benzamida polietilenglicol (20.00 g/mol) (0,4 g) se disolvió en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo-agua (24:1, v/v, 2 mg de hidroquinona) purgada con argón y la solución se filtró a través de un filtro PP de 0,45 µm. El eluyente se colocó en argón en un matraz de fondo redondo y se añadió trietilamina (50 µl) en agitación. El matraz se colocó después en un baño de aceite a 30 °C durante 20 horas en agitación y al cabo de este tiempo el matraz se enfrió hasta la temperatura ambiente y los líquidos volátiles se eliminaron al vacío. El residuo obtenido se disolvió en acetona caliente (10 ml) y, una vez que la solución se hizo homogénea, se colocó en baño de hielo-agua, después de lo cual se produjo precipitación con la solución en agitación. El precipitado blanco se aisló en un embudo de vidrio sinterizado nº 3 y se lavó con acetona fresca enfriada (aproximadamente 30 ml). El sólido aislado se dejó secar al vacío, obteniéndose 0,3 g de sólido blanco. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,35 (s), 3,31 (s), 3,39 – 3,78 (m), 4,28 (s), 5,84 (s), 6,22 (s), 7,26 (d), 7,65 (d), 7,72 (d), 7,81 (d)

### 35 Ejemplo 3

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

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

### Ejemplo 4

#### 45 **Conjugación de polímero a ribonucleasa A**

- A un tubo de centrifuga de 15 ml que contenía ribonucleasa A (30 mg) se añadieron 3 ml de una solución acuosa 8 M de urea y seguidamente 2-mercaptoetanol (60 µl). El pH de la solución resultante se ajustó a 8,5 usando solución acuosa de metilamina al 10 %. Después se burbujeó nitrógeno a través de la solución de reacción durante aproximadamente 30 minutos. Mientras que se continuaba purgando con nitrógeno, se calentó el tubo a 37 °C durante 5 horas. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió en baño de hielo-agua salada y a la solución de reacción se añadieron 10 ml de una solución enfriada, purgada con argón, de HCl 1 N:etanol absoluto (1:39 v/v). Se produjo precipitación y el precipitado se aisló mediante centrifugación y después se lavó tres veces con más porciones de 10 ml de la mezcla de HCl:etanol absoluto y dos veces con éter dietílico enfriado, purgado con nitrógeno (2 x 10 ml). Después de cada lavado, el precipitado se aisló mediante centrifugación. El precipitado lavado se disolvió después en agua desionizada purgada con nitrógeno y se liofilizó, obteniéndose un sólido seco. Se confirmó la reducción parcial de ribonucleasa A y se cuantificó usando el ensayo de Ellman, que dio 5,9 tioles libres por molécula de proteína.

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

### Ejemplo 5

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

A 240 µl de una solución de 0,4 mg/ml de fragmentos Fab de anticuerpo IgG de ratón (catálogo de Abcam nº AB6668) en tampón fosfato sódico 0,02 M a pH 6, purgado con argón, que contenía cloruro sódico 0,15 M y EDTA 0,005 M se añadieron 4 µl de una solución acuosa 1 mM de dihidrocloruro de selenocisteína purgada con argón, seguido de 12 µl de una solución acuosa purgada con argón de hidrocloreto de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó en vórtex inmediatamente durante varios segundos y después se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 6 minutos. Dos muestras de 5 µl de la solución que contenía fragmentos Fab reducidos se retiraron para análisis futuros y la solución restante se dejó en reposo en baño de hielo-agua durante 4 minutos. A la solución de Fab se añadió inmediatamente una solución enfriada en baño de hielo-agua de α-metoxi-ω-4[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzamida derivada de polietilenglicol (20.000 g/mol) (1,6 µl, 50 mg/ml, tampón fosfato sódico 0,02 M purgado con argón, pH 6, que contenía cloruro sódico 0,15 M, EDTA 0,005 M e hidroquinona 0,23 mM); la solución se agitó en vórtex durante varios segundos y después se volvió a colocar en el baño de hielo-agua. Cada dos minutos se añadieron de manera análoga 1,6 µl adicionales de la solución del reactivo de conjugación hasta añadir 6,4 µl en total. Terminada la adición total, la solución de reacción se colocó en una nevera (< 5 °C) durante 2 horas. Se tomó después una muestra de la solución de reacción para análisis mediante SDS PAGE.

La mezcla de reacción se analizó mediante SEC-HPLC (inyección de 100 µl, columna de 12-24 ml superpuesta, Amersham biosciences; eluyente: fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,15 M; pH 7,0; elución isocrática durante 100 minutos a un caudal de 0,25 ml/min; detección por luz UV, 210 nm), presentando el conjugado de Fab-poli(etilenglicol), que no estaba presente en la mezcla de reacción idéntica. Las fracciones aisladas mediante SEC-cromatografía HPLC se analizaron mediante SDS-PAGE y se observó el conjugado de mono-poli(etilenglicol).

### Ejemplo 6

#### Conjugación de polímero a asparaginasa

Una muestra de 100 µl de una solución de 5 mg/ml de asparaginasa a pH 6,5 (Sigma) se diluyó con 900 µl de tampón de fosfato 20 mM (pH 6 y que también contenía NaCl 0,15 M y EDTA 5 mM). Después se añadió DL-ditioreitol (DTT, 15,4 mg) y la solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente. Después de 2 horas en reposo, la solución se purificó en una columna PD-10 (Sephadex®G-25M, Pharmacia Biotech) que se había equilibrado con tampón de fosfato 20 mM (pH 6 y que también contenía NaCl 0,15 M y EDTA 5 mM). La columna es eluyó con porciones de 1 ml de tampón recién preparado. Mediante espectroscopia de UV a 280 nm se identificaron dos fracciones que contenían proteína reducida. Estas fracciones se concentraron usando dispositivos centrífugos de filtración (MWCO 3.000; Microcon) a un volumen de aproximadamente 270 µl y después se diluyeron a 1 ml con tampón fosfato fresco a pH 6 (que adicionalmente contenía hidroquinona 0,23 mM). Para análisis posterior mediante SDS PAGE se tomaron dos muestras de 5 µl. Separadamente, en el mismo tampón fosfato se preparó una solución de 50 mg/ml de la solución del reactivo para conjugación de α-metoxi-ω-4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)metil]acetil]benzamida derivada de poli(etilenglicol) (20.000 g/mol) y se puso en un baño de hielo-agua junto con la solución de proteína durante 5 minutos. A la solución de proteína se añadieron después 58 µl de la solución del reactivo de conjugación y, después de varios segundos de agitación en vórtex, la solución de reacción se colocó en una nevera (< 5° C). Se realizó también una reacción de control en las mismas condiciones y a la misma escala pero usando asparaginasa no reducida. Se confirmó mediante SDS PAGE (4-12 % de gel bis-tris con tinción coloidal azul) una conjugación con éxito de polietilenglicol a asparaginasa, realizada con muestras tomadas de la solución de reacción después de 2 horas. Mediante SDS PAGE no se observó banda de conjugación para una muestra tomada de una reacción de control en la que no se dejó que la asparaginasa reaccionara con DTT.

### Ejemplo 7

#### Conjugación de polímero a interferón

Una solución de 100 µl de interferón α-2b (Santha Biotechnics) (1 mg/ml) diluida con 150 µl de una solución tampón (fosfato sódico 0,02 M; NaCl 0,15 M; EDTA 0,005 M; pH 6, 0 en agua desionizada purgada con argón) se redujo parcialmente añadiendo selenocistamina (1 mM en agua desionizada purgada con argón, 2 equivalentes) y TCEP (1

mM en agua desionizada purgada con argón, 5 equivalentes). La solución de proteína se enfrió a 4 °C. El reactivo de conjugación  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil) metil]acetil]benzamida derivada de polietilenglicol (20.000 g/mol) se disolvió en la solución tampón (50 mg/ml), se enfrió a 4 °C y se añadieron 16  $\mu$ l a la solución de proteína. La mezcla de reacción se agitó en vórtex y se incubó a 4 °C durante 2 horas. Los componentes no iónicos de la mezcla de reacción se eliminaron mediante cromatografía de intercambio catiónico (columna Hitrap SP FF1 de 1 ml, Amersham biosciences) usando dos tampones: (A) acetato sódico 25 mM, pH 4,0 y (B) acetato sódico 25 mM más NaCl 0,7 M, pH 4, 0. La columna se lavó (1 ml/min) con tampón (A) (5,0 ml), después con tampón (B) (5,0 ml) y después se equilibró con 10 ml de tampón (10 ml). Se cargó el conjugado en la columna (200  $\mu$ l) y seguidamente con el tampón (A) (500  $\mu$ l) y se recogió una fracción de carga (0,5 ml). La columna se lavó con 5 ml de tampón A y se recogieron fracciones. La muestra se eluyó de la columna con el tampón (B) (10 ml) y se recogieron fracciones. Se usó espectroscopia (UV, 280 nm) para determinar las fracciones que contenían proteína y estas fracciones se purificaron después en fracciones separadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño (inyecciones de 100  $\mu$ l, columna superosa 12-24 ml, Amersham biosciences; eluyente: fosfato sódico 20 mM, NaCl, NaCl 0,15 M, pH 7, 0; elución isocrática durante 100 minutos a un caudal de 0,25 ml/min; detección por UV, 210 nm). Estas condiciones de purificación proporcionaron una resolución de la línea de base para la separación del conjugado de poli(etilenglicol)-interferón de interferón nativo. La reacción de conjugación y la purificación del conjugado de poli(etilenglicol) se confirmaron mediante SDS-PAGE; gel bis-tris al 12 % (tinción de plata SilverQuest; tinción con azul coloidal y ácido perclórico 0,1 M/5 % de BaCl<sub>2</sub> y tinción con I<sub>2</sub> 0,1 M). No se observó conjugación cuando una solución de 40  $\mu$ l de interferón (1 mg/ml) en 60  $\mu$ l de fosfato sódico 0,02 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,005 M, pH 6, 0, en agua purgada con argón, se mezcló con el reactivo de conjugación  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -4-[2, 2-bis[(p-tolilsulfonil)metil-acetil]-benzamida derivada de poli(etilenglicol) (20.000 g/mol), se disolvió en la solución tampón (50 mg/ml) se enfrió a 4 °C y se añadieron 16  $\mu$ l a la solución de proteína. Esta mezcla de reacción se agitó en vórtex y se incubó a 4 °C durante 2 horas.

La concentración de cada fracción purificada del conjugado de poli(etilenglicol)-interferón se determinó mediante inmunoensayo de enzimas. Se utilizó el mismo ensayo para determinar la concentración del interferón nativo que se conjugó y una muestra de interferón patrón internacional NIBSC (RU). En la Figura 1 se muestra la curva patrón reproducible y precisa obtenida para todas las formas del interferón antes mencionado. Se cultivaron células A549 (fibroblasto de pulmón humano) a 15.000 células/pocillo en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. A continuación, el interferón de NIBSC (RU), el interferón nativo conjugado y el conjugado de interferón - poli(etilenglicol) se añadieron por separado a las células por triplicado y la placa se incubó a 37 °C (5 % de CO<sub>2</sub>) durante 24 horas. Al día siguiente se preparó una solución de trabajo de EMCV (virus de encefalomiocarditis) en DMEM/2 % de FCS de virus madre almacenado a -80 °C. Se eliminó el medio que contenía el interferón o el conjugado de polietilenglicol - interferón y se reemplazó con medio que contenía EMCV. La placa de cultivo tisular se incubó después durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se eliminó el virus. Se añadieron 100 microlitros del medio DMEM/10 % de FCS y la placa se incubó a 27 °C durante 16-24 horas. Después de 16 horas, se empezó a leer la placa con regularidad para ver cuándo empezaba la muerte de las células. Después se aspiró el medio y las células se lavaron con 100  $\mu$ l de solución de tampón fosfato. A esto le siguió la adición de 50  $\mu$ l de solución de violeta de metilo [esto es, violeta de metilo (4 % de formaldehído, 0,05 % de violeta de metilo 2B (Sigma-Aldrich) ] durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavó la placa con 100  $\mu$ l de agua y se secó al aire. Se determinó la absorbancia espectrofotométrica a 570 nm usando un lector de placas. La Figura 2 confirma que el interferón usado para la conjugación tenía una actividad equivalente a la del interferón patrón internacional NIBSC (RU). La Figura 3 confirma que el interferón nativo usado para la conjugación mantenía una actividad biológica equivalente después de ser sometido a todos los procesos químicos y de purificación excepto la exposición con el reactivo de conjugación de poli(etilenglicol). La Figura 4 confirma que el interferón nativo usado para la conjugación y el conjugado de poli(etilenglicol)-interferón purificado mantenían una actividad biológica equivalente.

Se determinó la inducción de la 2'5'-oligoadenilato sintetasa (2'5'-OAS) y ARNm de proteinacina R (PRKR) por interferón- $\alpha$  2b. Se evaluaron el conjugado poli(etilenglicol)-interferón purificado y una muestra del interferón  $\alpha$  2b. Se incubaron 2 millones de células MOLT 4/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos con 5.000 pg de cada muestra de interferón medidos usando un inmunoensayo enzimático durante 24 horas a 37 °C. Se extrajo el ARN total (kit de aislamiento de ARN II, Macherey-Nagel) y se sometieron 200 ng a transcripción inversa en un volumen final de 20  $\mu$ l (Sigma, kit de transcripción inversa AMV). Las muestras se diluyeron a 1 a 4 en agua y se amplificaron 2  $\mu$ l de cada muestra en una mezcla de cuantificación de PCR en tiempo real (Sigma SybGreen ReadyMix). Los cebadores usados fueron:

2'5'-OAS directo GGC TAT AAA CCT AAC CCC CAA ATC

2'5'-OAS inverso AGC TTC CCA AGC TTC TTC TTA CAA

PRKR directo ACT CTT TAG TGA CCA GCA CAC TCG

PRKR inverso TTT AAA ATC CAT GCC AAA CCT CTT

Para una amplificación de 2',5'-OAS, a la activación de la enzima a 94 °C durante 5 minutos siguieron 48 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 segundos, hibridación a 60 °C durante 2 segundos y extensión a 72 °C durante 8 segundos. Para la amplificación de PRKR, las muestras se activaron a 94 °C durante 5 minutos y se sometieron a

48 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 segundos, hibridación a 59 °C durante 2 segundos y extensión a 72 °C durante 8 segundos. Al final de las amplificaciones se realizó un análisis de la curva de fusión de los productos. La cuantificación de los niveles inducidos de ARNm se realizó en relación a las células de control no tratadas usando la fórmula siguiente:

5

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

en la que Ct es el valor umbral de entrecruzamiento.

La Figura 5, en la que la Figura 5(a) muestra el análisis cuantitativo mediante RT-PCR en tiempo real (dos etapas) del gen de 2'5'-oligoadenilato sintetasa (2'5'-OAS) inducible por interferón, y la Figura 5(b) muestra el análisis cuantitativo mediante RT-PCR en tiempo real (dos etapas) del gen de proteína cinasa R (PRKR) inducible por interferón. Los resultados confirman que el conjugado poli(etilenglicol)-interferón-α2b estimulaba la síntesis de 2'5'-oligoadenilato sintetasa (2'5'-OAS) y ANRm de proteína cinasa (PRKR) a niveles que eran similares a los del interferón-α2b nativo no pegilado.

#### **Listado de secuencias**

15 <110> Polytherics Limited

<120> Moléculas biológicas conjugadas y su preparación

<130> 9381 EP1 SMS

20

<140> EP 09167191,7

<141> 2004-07-12

<150> GB 0316294,8

25 <151> 2003-07-11

<160> 4

<170> PatentIn versión 3,5

30

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> 2'5'-OAS cebador directo

<400> 1

40

## ES 2 549 427 T3

ggctataaac ctaaccccc aatc  
24

<210> 2

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2'5'-OAS cebador inverso

10

<400> 2

agcttcccaa gcttcttctt acaa  
24

<210> 3

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> PKR cebador directo

<400> 3

actctttagt gaccagcaca ctcg  
24

25 <210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> PRKR cebador inverso

<400> 4

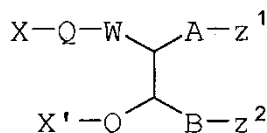
35

tttaaaatcc atgccaaacc tctt  
24



## REIVINDICACIONES

## 1. Un compuesto de fórmula general



(I)

5

en la que uno de X y X' representa un poli(etilenglicol) y el otro representa un átomo de hidrógeno;

cada Q representa independientemente un grupo enlazador;

10

W representa un grupo ceto CO, un grupo éster -O-CO- o un grupo sulfona -SO<sub>2</sub>-, o un resto que se puede preparar mediante reducción de dicho grupo; o, si X' representa un polietilenglicol, X-Q-W- juntos pueden representar un grupo ciano; y además, si X representa un polietilenglicol, X' y W junto con los átomos interyacentes pueden formar un anillo;

cada uno de Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> representa de forma independiente una proteína, cada uno de los cuales está unido a A y B por un grupo tiol;

A es una cadena alquileo o alquenileno C<sub>1-5</sub>; y

15

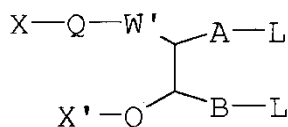
B es un enlace o una cadena alquileo o alquenileno C<sub>1-4</sub>.

20

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada grupo enlazador Q representa independientemente un enlace directo, un grupo alquileo o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, cualquiera de los cuales puede estar terminado o interrumpido por uno o varios átomos de oxígeno, átomos de azufre, grupos -NR en los que R representa un grupo alquilo o arilo, grupos ceto, grupos -O-CO- y/o grupos -CO-O-.

3. Un procedimiento de preparación de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende hacer reaccionar, bien

(i) un compuesto de fórmula general



(II)

25

en la que uno de X y X' representa un poli(etilenglicol) y el otro representa un átomo de hidrógeno;

cada Q representa independientemente un grupo enlazador;

30

W' representa un grupo ceto, un grupo éster -O-CO- o un grupo sulfona -SO<sub>2</sub>-, o, si X' representa un polietilenglicol, X-Q-W' juntos pueden representar un grupo ciano;

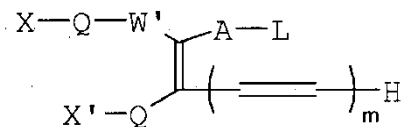
A representa una cadena alquileo o alquenileno C<sub>1-5</sub>;

B representa un enlace o una cadena alquileo o alquenileno C<sub>1-4</sub>; y

cada L representa independientemente un grupo saliente;

o bien

(ii) un compuesto de fórmula general



(III)

5

en la que X, X', Q, W', A y L tienen los significados dados para la fórmula general II y, además, si X representa un polietilenglicol, X' y W' junto con los átomos interyacentes pueden formar un anillo, y m representa un número entero de 1 a 4; con los compuestos de fórmula general Z<sup>1</sup>Nu y Z<sup>2</sup>Nu en la que cada un representa un grupo tiol.

- 10 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el, o cada, grupo saliente L representa  $-SR$ ,  $-SO_2R$ ,  $-OSO_2R$ ,  $-N^+R_3$ ,  $-N^+HR_2$ ,  $-N^+H_2R$ , halógeno o  $-O\emptyset$ , en las que R representa un grupo alquilo o arilo y  $\emptyset$  representa un grupo arilo sustituido que contiene al menos un sustituyente aceptor de electrones.
5. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto fisiológicamente tolerable de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso como medicamento.

**Figura 1**

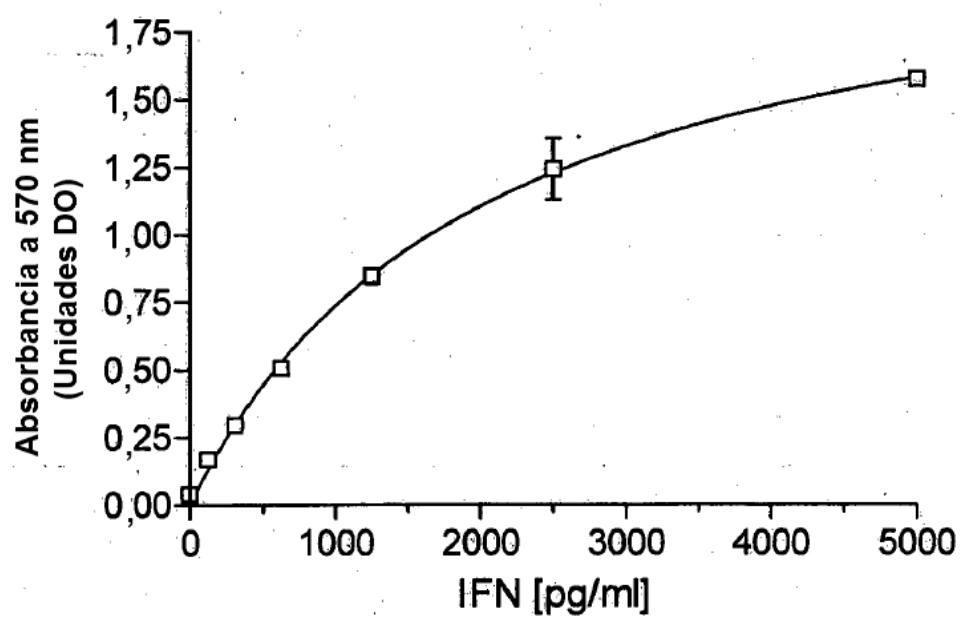
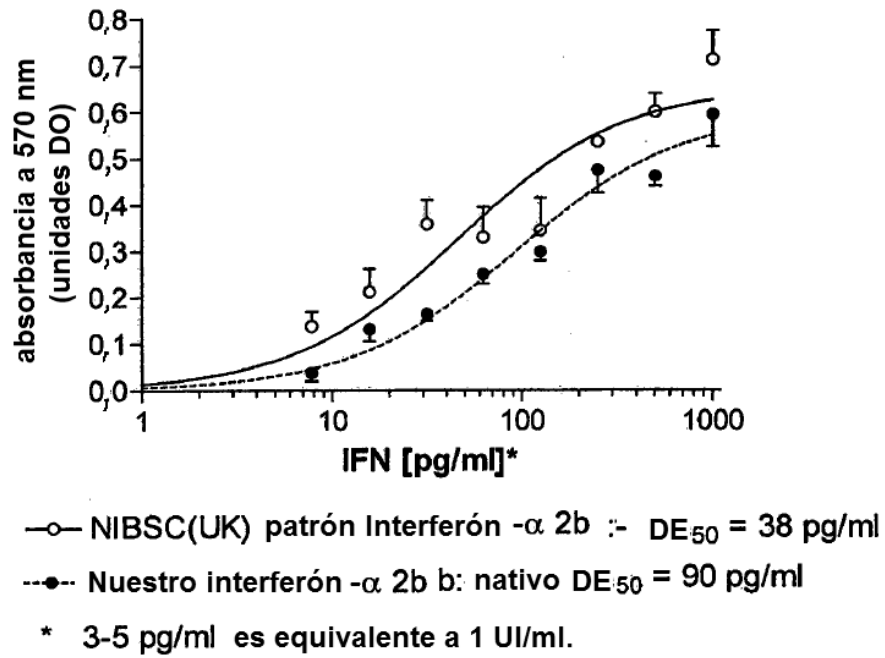
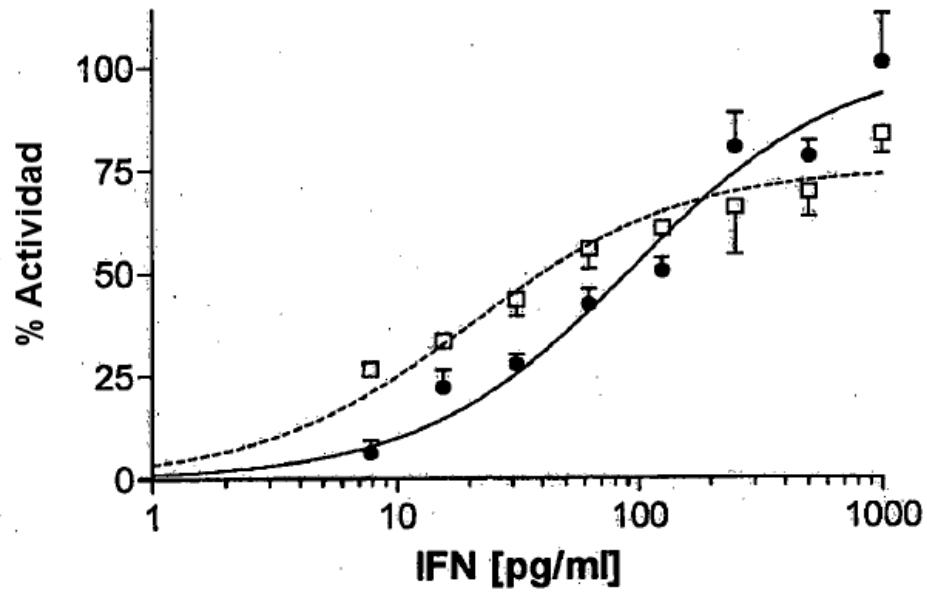


Figura 2



**Figura 3**



- Nuestro interferón - $\alpha$  2b b nativo:  $DE_{50} = 90$  pg/ml
- Nuestro interferón - $\alpha$  2b b nativo tratado pero sin pegar :-  $DE_{50} = 40$  pg/ml

Figura 4

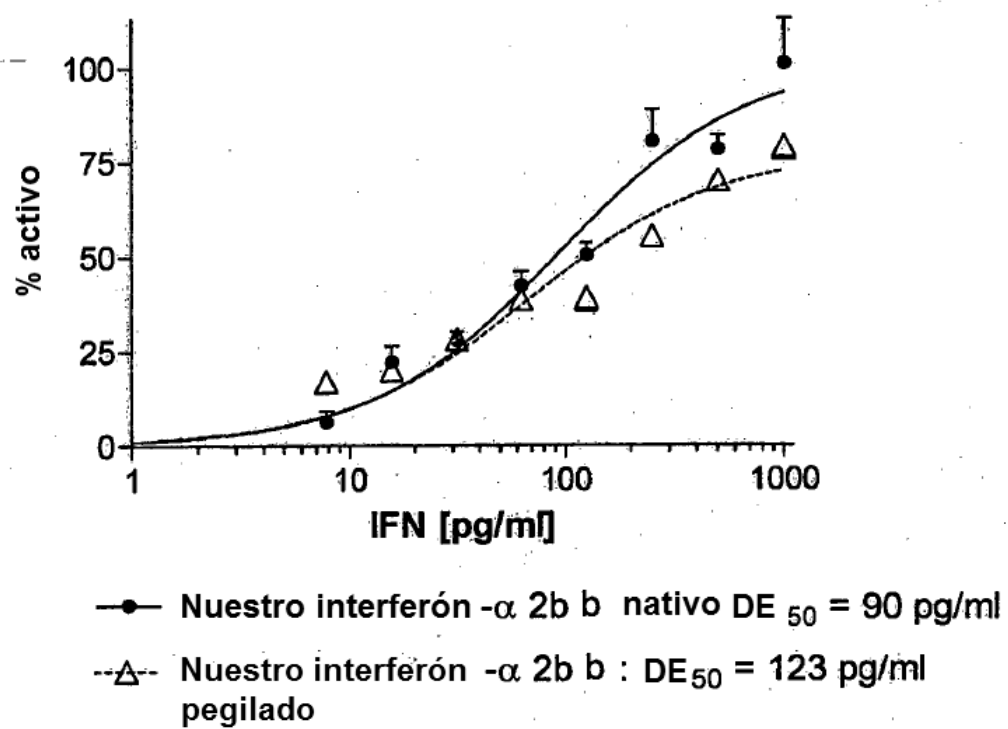


Figura 5(a)

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

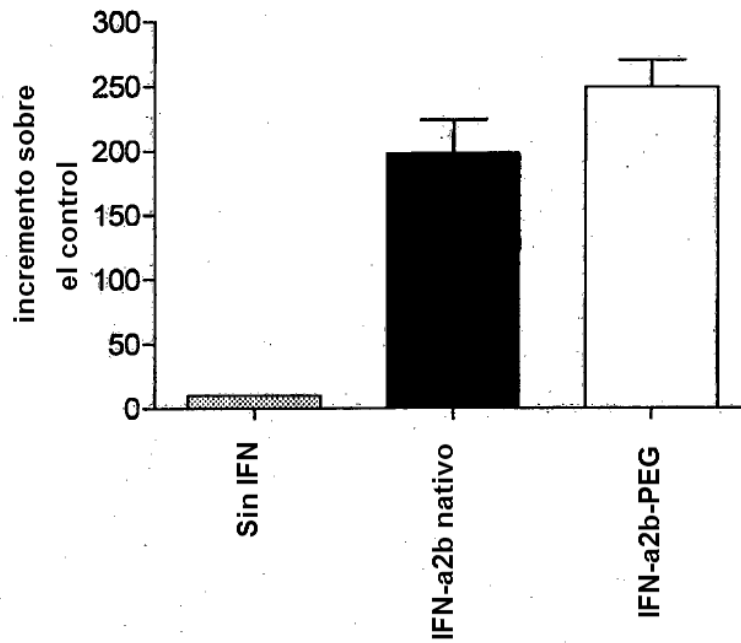


Figura (b)

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

