
Desarrollo de un innovador proceso de síntesis de polietilenglicol activado. Pegilación de biomoléculas de interés farmacológico para mejorar la administración

Marianela Gonzalez

marianelagonzalez1983@gmail.com

Santiago E. Vaillard

Instituto de desarrollo tecnológico para la industria química (INTEC, CONICET-UNL)

Laboratorio de Química Fina

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 30/05/13

Resumen

En los últimos años se ha incrementado considerablemente el uso de biofármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, éstos pueden poseer una serie de desventajas, entre las cuales pueden mencionarse su corta vida media, la posibilidad de reconocimiento y ataque por parte del sistema inmune y la digestión proteolítica. Esto hace que sea necesaria una administración frecuente para alcanzar el efecto terapéutico deseado de manera sostenida. Con el propósito de superar estas limitaciones, se ha propuesto el acoplamiento de biomoléculas a sistemas de liberación de drogas. Dentro de estos sistemas, la conjugación de biomoléculas a polímeros ha sido muy estudiada y se ha demostrado que bioconjugación de metoxi-polietilenglicol (mPEG) con biomoléculas es una de las estrategias de elección. Esta estrategia se conoce con el nombre de pegilación. Con el correr de los años, se han desarrollado una gran cantidad de biofármacos pegilados, algunos de los cuales han recibido la aprobación de las

autoridades sanitarias, siendo rutinariamente empleados como agentes terapéuticos.

Dentro de los mPEGs que se utilizan para la conjugación a biomoléculas, los de estructura ramificada resultan particularmente atractivos por las ventajas que poseen cuando se los compara con los lineales del mismo peso molecular. En este sentido, de los 11 biofármacos pegilados aprobados para utilización terapéutica y disponibles comercialmente, 4 consisten en biomoléculas unidas al polímero ramificado mPEG₂lis. Esta estructura consiste en dos cadenas lineales de PEG unidas entre sí por una molécula de lisina. Si bien esta molécula ha sido empleada desde hace casi 30 años, se han desarrollado muy pocas estrategias de síntesis y purificación. Todas las metodologías informadas son complejas y emplean reactivos tóxicos y peligrosos.

En el presente trabajo de tesis desarrollamos un innovador proceso de síntesis de mPEG₂lis, que consta de sólo 3 etapas de síntesis, empleando condiciones suaves y que permite obtener el polímero ramificado de manera sencilla, reproducible y con muy buenos rendimientos. Notablemente, en esta novedosa estrategia no se utilizan reactivos tóxicos y difíciles de manejar, tales como fosgeno o trifosgeno. Para explorar las posibles rutas de síntesis de polímeros ramificados que contengan lisina como molécula de enlace, se empleó un alcohol de bajo peso molecular, de modo de poder evaluar las condiciones de reacción

que permitieran obtener el producto de interés. En condiciones experimentales similares, pero utilizando mPEG de 20 kDa como material de partida obtuvimos mPEG₂lis (40 kDa) con excelente rendimiento.

Para la separación de la especie ramificada del polímero lineal y de los oligómeros, se han empleado técnicas de purificación cromatográfica por intercambio iónico. En este trabajo se presenta una nueva estrategia, que consiste en la utilización de ultrafiltración tangencial, con el propósito de enriquecer la muestra en mPEG ramificado de 40 kDa, eliminando las especies de 20 kDa. Posteriormente, una cromatografía de interacción hidrofóbica permite obtener el producto puro. El rendimiento global del proceso desarrollado en este trabajo es de 38%.

El polímero ramificado mPEG₂lis fue activado como éster de *N*-hidroxisuccinimida, y posteriormente fue empleado en la conjugación con IFN α -2a. El producto pegilado obtenido en el laboratorio fue purificado por métodos cromatográficos, y el conjugado purificado fue comparado con un conjugado comercial de referencia. Las determinaciones por HPLC-EM, SDS-PAGE y los ensayos de actividad antiviral y actividad antiproliferativa *in vitro* indicaron que ambas moléculas no eran diferentes. El perfil farmacocinético de ambas resultó alentador.

De manera independiente, se sintetizó un nuevo derivado de mPEG lineal activado como ioduro de carbonilimidazolio, (mPEG-Im⁺I), empleando mPEG-carbonilimidazol (mPEG-Im) como intermediario de síntesis. Si bien el polímero activado mPEG-Im ha sido empleado para pegar biomoléculas, su baja reactividad hace que posea aplicación limitada en la tecnología de bioconjugación. El reactivo obtenido en este trabajo, (mPEG-Im⁺I) fue utilizado exitosa-

mente en la pegilación de IFN α -2b, obteniéndose un 32 % del producto pegilado. Esta estrategia es una alternativa interesante en relación a otros derivados de mPEG que son rutinariamente utilizados para obtener uniones uretano entre polímeros y biomoléculas. El producto disponible comercialmente PEG (12 kDa) - IFN α -2b se utilizó para realizar comparaciones con la molécula sintetizada y purificada en el laboratorio. Los resultados obtenidos sugieren que el polímero activado mPEG-Im⁺I podría ser utilizado como reactivo para la pegilación de biomoléculas con polímeros lineales, con una reactividad comparable a otros reactivos muy utilizados en bioconjugación.

Activated polyethylene glycol process synthesis development. Pegylation of pharmaceutical biomolecules to improve its administration

Summary

In the last decades, the use of biopharmaceutical products as therapeutic agents has increased significantly. However, the intrinsic properties of these macromolecules present some drawbacks leading to a frequent administration schedule to achieve the sustained therapeutic effect. To overcome these limitations, it is possible to conjugate the biomolecules to polymers, particularly methoxy polyethylene glycol (mPEG) technology known as "pegylation".

In this Thesis we develop an innovative process for the synthesis of mPEG₂lis (a branched PEG derivative), which consists of only 3 synthetic steps, employing mild conditions and allow the obtaining of the branched polymer in an simply and reproducible approach with very good yield. Remarkably, this strategy avoids the use of reagents

that are toxic and/or difficult to handle. The branched polymer mPEG₂lis was coupled to IFN α -2a and purified using chromatographic procedures. The pure conjugate was compared with an available pegylated product mPEG₂ (40 kDa) – IFN α -2a. SE-HPLC, SDS-PAGE procedures and antiviral activity and antiproliferative *in vitro* assays revealed that both molecules were not different. The pharmacokinetic profiles were encouraging.

Independently, we synthesized a new linear PEG derivative activated as carbonyl

imidazolium iodide (mPEG–Im⁺I), and this derivative was successfully employed in the pegylation of IFN α -2b, yielding 32% of the monopegylated compound. Commercially available PEG (12 kDa) – IFN α -2b, was used to make comparisons with the molecule produced in the laboratory, after being purified. We concluded that polymer mPEG–Im⁺I may be used as a PEG derivative to biomolecule conjugation, having a comparable reactivity with other activated PEGs frequently used in the field of pegylation.

Estudios de las especies americanas del género *Cenchrus* L (Poaceae: Panicoideae: Paniceae)

Hugo Francisco Gutiérrez

hgutierr@fca.unl.edu.ar

Dr. Osvaldo Morrone

Dr. José F. Pensiero

Cátedra de Botánica Sistemática Agronómica – Pabellón de Estudios botánicos y Ecológicos

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 19/03/2013

Resumen

Recientes estudios filogenéticos aportaron evidencia sobre la monofilia de los géneros *Cenchrus*, *Pennisetum* y *Odontelytrum*, proponiendo su unificación y transferencia a *Cenchrus*, el cual tiene prioridad. Hasta el presente, no hay antecedentes que consideren su tratamiento taxonómico en forma conjunta. El propósito de este trabajo fue realizar la revisión taxonómica de las especies americanas del género *Cenchrus* s.l. y, probar la utilidad de los caracteres

morfológicos evaluados en análisis filogenéticos. Como este estudio se circunscribe al continente americano, el género monotípico *Odontelytrum*, originario de África, fue excluido del análisis. Para llevar a cabo la revisión taxonómica, se estudiaron ejemplares de herbario provenientes de instituciones de Argentina y del extranjero. Previo al tratamiento taxonómico se analizó la diversidad morfológica en las estructuras vegetativas y reproductivas de las especies para identificar caracteres diagnósticos que faciliten su posterior determinación, reconociéndose 7 grupos de especies. El tratamiento taxonómico permitió reconocer 41 especies, incluidas en 7 categorías infra-genéricas (6 secciones y 2 subsecciones). Se proporcionan claves para diferenciar o reconocer los géneros afines, las secciones propuestas y los taxones que habitan en América. Además se presentan descripciones detalladas de las especies, ilustraciones de los caracteres de importancia