

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NOVEDOSOS MPEG CARBONATOS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN BIOCONJUGACIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS.

Menegon, Malen^A

^A Cientibecaria - Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química - (INTEC), CCT Santa Fe, CONICET-UNL

Área: Ciencias Exactas.

Sub-Área: Química

Grupo: X

Palabras clave: Pegilación, bioconjugación, mPeg carbonatos.

INTRODUCCIÓN

La PEGilación consiste en la unión de una cadena de PEG (poli-(etilenglicol)) a una proteína y se considera una poderosa herramienta para modificar macromoléculas y biomoléculas, mejorando sus propiedades químicas, bioquímicas y farmacológicas. Es así, que se emplea la PEGilación en la modificación de proteínas de uso farmacéutico y la importancia de dicha estrategia se ve reflejada en la gran cantidad de productos PEGilados disponibles en el mercado. (González y col., 2015).

Varias drogas conjugadas a PEG exhiben un comportamiento *in vivo* mucho más favorable que las formas no conjugadas; presentan menor toxicidad, y a su vez, tienen menor susceptibilidad a degradación y por lo tanto mayor tiempo de vida media en circulación. Además, la PEGilación reduce antigenicidad e inmunogenicidad. (Goswami y col., 2013).

Metoxi-poli-(etilen glicol) (mPEG) es una versión protegida de PEG, lo cual permite realizar modificaciones químicas sencillas en el grupo hidroxilo terminal "libre" y así obtener un polímero activado, es decir reactivo para ser empleado en la conjugación a macromoléculas. Por otro lado, posee propiedades de solubilidad distintivas lo que permite llevar a cabo la purificación de mPEG y derivados, de impurezas orgánicas de bajo peso molecular mediante un sencillo proceso de precipitación/centrifugación. (González y col., 2015).

A nivel nacional las tecnologías de bioconjugación y la disponibilidad de reactivos de PEGilación son muy limitadas, por lo que Argentina y Latinoamérica son un nicho de vacancia tecnológica, industrial y comercial. Aquí radica la importancia de desarrollar herramientas propias para la preparación de estos polímeros activos.

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo, es desarrollar nuevas estrategias sintéticas que permitan obtener una familia de mPEGs carbonatos activados con potencial aplicación en bioconjugación a proteínas de interés farmacológico. En particular, proponemos estudiar la síntesis, caracterización estructural y el estudio cinético de la hidrólisis alcalina de un novedoso reactivo de mPEG en el que la cadena polimérica está separada del grupo reactivo terminal por una cadena alifática de 3 átomos de carbono.

Proyecto: Desarrollo de Nuevas Tecnologías para la Preparación de mPEGs Activados Útiles en la Modificación de las Propiedades Fisicoquímicas de Biomacromoléculas.

Director del proyecto: Santiago E. Vaillard.

Director del becario/tesista: Santiago E. Vaillard.

Co-Director del becario/tesista: Victoria A. Vaillard.

METODOLOGÍA

Síntesis de mPEG activados: Se obtuvo el *N*-hidroxisuccinimil (NHS) carbonato de interés a través de una estrategia sintética que consiste en 3 pasos: a) obtención del mesilato de mPEG; b) síntesis del alcohol intermediario; y c) síntesis de mPEG NHS carbonato. Todos los compuestos fueron caracterizados por ^1H -RMN y en el caso particular del carbonato también ha sido caracterizado por Espectroscopía Infrarroja (FT-IR).

Mediciones realizadas en espectroscopia UV-Vis: Tanto para la determinación del grado de activación del carbonato como para los estudios de hidrólisis se midió la formación del anión derivado de NHS (máximo de absorción $\lambda=260$ nm). Para cada uno de los medios empleados se determinó la absorptividad molar (ϵ) del anión de NHS.

Hidrólisis de mPEG-propan-1-succinimilcarbonato: Se determinó, en forma indirecta, la desaparición de reactivo en la hidrólisis básica del carbonato sintetizado y en una muestra de mPEG carbonato comercial (5000 g/mol).

Con los datos experimentales obtenidos, se corroboró que la reacción sigue una cinética de *pseudo*-primer orden, como es informado en bibliografía para reacciones de hidrólisis similares (**Figura 1**). De graficar \ln [carbonato] vs tiempo se obtiene una recta cuya pendiente representa el valor de k' (**Ecuación 1**).

$$v = k \cdot [\text{mPeg-carbonato}]^n \cdot [\text{OH}]^m \Rightarrow v' = k' \cdot [\text{mPeg-carbonato}]^1 \quad (1)$$

Finalmente, el tiempo de vida media se definió como $\ln(2)/k'$. Los tiempos de vida media se expresaron en minutos. Los estudios cinéticos se realizaron en buffer fosfato pH 8,0, 0,1 M y 0,5 M, y en buffer borato pH 8,0, 0,1 M y 0,2 M, como así también variando el pH (borato 0,1 M, pH 9). Todas las mediciones fueron realizadas a 25°C y por triplicado.

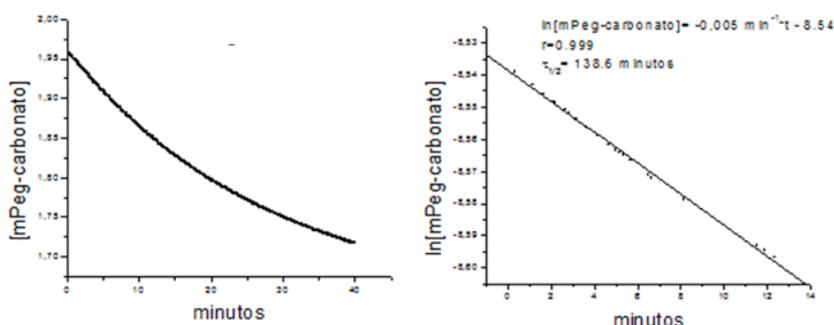
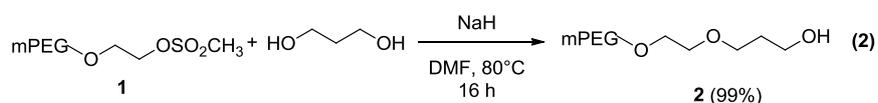


Figura 1: Cinética de hidrólisis de mPEG-carbonatos en medios alcalinos. Datos obtenidos para el carbonato **3** en buffer borato 0,1M pH 8,0.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se utilizó como material de partida el mPEG mesilato de 20 KDa (**1**), el cual se hizo reaccionar con 1,3-propanodiol, obteniéndose el alcohol **2** con excelente rendimiento (**Ecuación 2**). El alcohol **2** luego fue utilizado en la síntesis del mPEG succinimidil carbonato **3**, utilizando *N,N* di-succinimidil carbonato (DSC) y piridina (**Ecuación 3**).



Tanto el carbonato como el alcohol intermediario, fueron obtenidos con excelentes

rendimientos aislados y elevada pureza empleando un sencillo proceso de precipitación/centrifugación. La metodología es versátil, ya que un mismo protocolo permitió obtener otros derivados análogos (no mostrados en este trabajo). Por otro lado, se determinó mediante espectroscopía UV, el grado de activación del carbonato sintetizado, obteniendo un valor de 73%.



Es importante destacar que el producto no ha sido hasta el momento descrito en bibliografía y que por lo tanto ha sido exhaustivamente caracterizado tanto por IR (Figura 2) como por RMN (Figura 3).

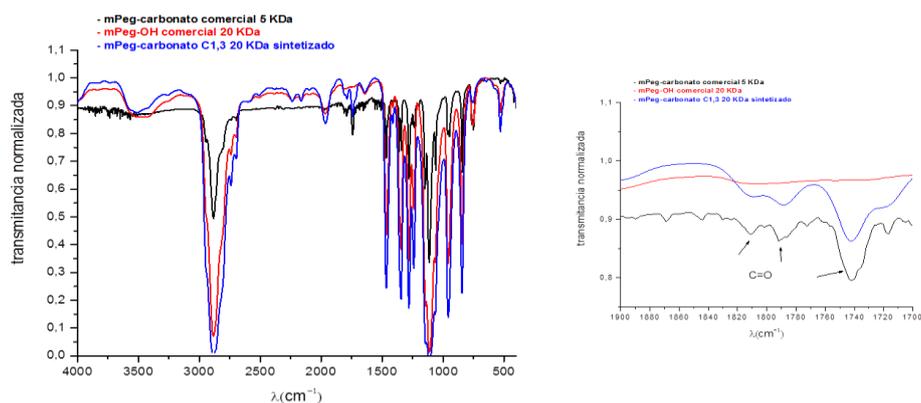


Figura 2: Espectro de IR del carbonato **3**

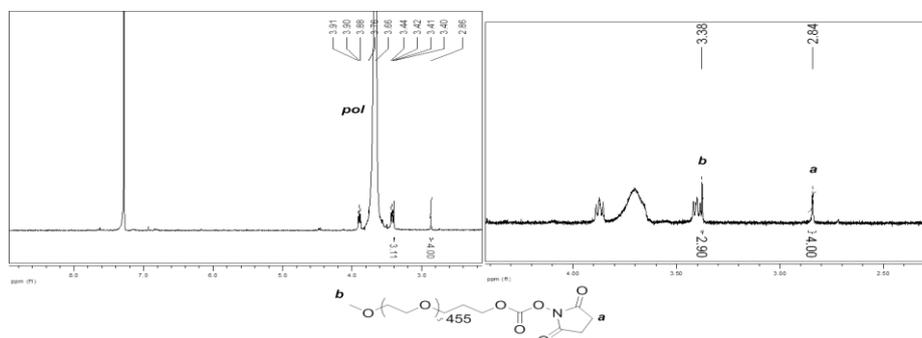
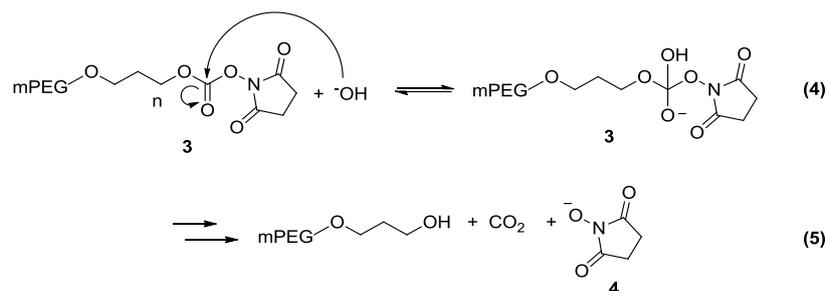


Figura 3: Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 para el carbonato **3** (derecha). Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 con supresión de señal a 3,65 ppm (cadena polimérica) para el carbonato **3** (izquierda).

Con el objetivo de poder evaluar cómo la variación en la longitud del espaciador entre la cadena polimérica y el grupo activado podría afectar la reactividad del nuevo derivado obtenido, se procedió a realizar varios estudios cinéticos de la reacción de hidrólisis del carbonato en un medio alcalino. La reacción de hidrólisis propuesta es una reacción en etapas (**Ecuaciones 4 y 5**), donde se propone que la reacción limitante de la velocidad es el ataque del oxhidrilo al carbonilo del grupo carbonato (**Ecuación 4**, grupo reactivo). Las etapas subsiguientes son rápidas e irreversibles, dando lugar a la formación del anión de NHS **4**, el cual puede ser cuantificado por espectroscopia UV a 260 nm. Es importante destacar que para cada buffer empleado se determinó el ϵ del anión, como así también el rango de concentración a emplear, con el fin de garantizar que en dicho rango se cumple la ley de Lambert-Beer.



Se evaluaron el carbonato comercial de 5 KDa (que posee un espaciador hidrocarbonado de 2 átomos de carbono) y el carbonato **3** en diferentes soluciones buffer (**Tabla 1**). Se observó que al variar el peso molecular, de 5 KDa a 20 KDa, y aumentando en 1 átomo de carbono la longitud del espaciador, el tiempo de vida media se incrementó aproximadamente 5,5 veces. Estos resultados parciales nos permitieron establecer que sólo es necesario el aumento de 1 átomo de carbono en la cadena del espaciador para obtener un cambio notorio en la reactividad del derivado. Esta relación se mantuvo al variar el buffer empleado (fosfato y borato), sin embargo al aumentar la fuerza iónica (buffer fosfato 0,5 M), se observó una gran disminución de los tiempos de vida media obtenidos. Cuando se incrementó en una unidad el pH, (borato pH 9, 0,1 M) los $\tau_{1/2}$ disminuyeron drásticamente, asimismo la relación comercial/**3** (~2).

buffer	comercial	3
Fosfato pH: 8, 0,1 M	44,3±1,7	110,0±9,5
Fosfato pH:8, 0,5 M	12,2±0,3	41,0±3,9
Borato pH: 8, 0,1 M	44,1±2,0	139,7±13,8
Borato pH:8, 0,2 M	43,5±3,9	93,3±3,5
Borato pH:9, 0,1 M	5,8±0,4	12,5±1,0

Tabla 1: Tiempos de vida media $\tau_{1/2}$ (minutos) de una muestra comercial y del carbonato en diferentes soluciones buffer.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un novedoso mPEG-carbonato con rendimientos y grados de activación de muy buenos a excelentes. El mismo ha sido caracterizados por espectroscopía IR y $^1\text{H-RMN}$. El carbonato fue evaluado en reacciones de hidrólisis en medio alcalino, con el fin de poder establecer una relación estructura/reactividad. Se observó que al aumentar en 1 átomo de carbono el espaciador entre el grupo reactivo y la cadena polimérica, los $\tau_{1/2}$ aumentan significativamente en todos los buffers empleados. Es así, que en principio, la reactividad de los nuevos derivados podría ser modulada variando la naturaleza del espaciador. Es importante destacar, que se obtienen valores de $\tau_{1/2}$ diferentes para el mismo derivado, variando sólo la naturaleza y concentración del buffer empleado. Esto permitiría, a priori, modular también la reactividad del mPEG activado variando las condiciones experimentales en las cuales se realice la conjugación.

BIBLIOGRAFÍA

- González, M.; Vaillard, V. A.; Vaillard, S. E**, 2015. Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies, Scrivener Publishing LLC, Vijay K. Thakur and Manju K. Thakur (eds.), 1, 63-123.
- Goswami, L. N; Houston, Z. H; Sarma, S. J; Jalisatgi, S. S; Hawthorne, M. F.**, 2013. Org. Biomol. Chem., 11, 1116–1126.
- Allmaier, G.**, 2010. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 52, 432–437.