



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 726**

51 Int. Cl.:
C08G 65/329 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01994295 .2**

86 Fecha de presentación : **18.12.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1345982**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Síntesis de derivados poliméricos no peptídicos de alto peso molecular.**

30 Prioridad: **18.12.2000 US 256801 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Nektar Therapeutics AI, Corporation**
490 Discovery Drive
Huntsville, Alabama 35806-2902, US

72 Inventor/es: **Kozlowski, Antoni;**
Shen, Xioaming;
Bentley, Michael, David y
Fang, Zhihao

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 284 726 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).

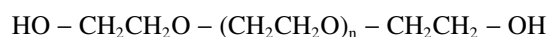
ES 2 284 726 T3

DESCRIPCIÓN

Síntesis de derivados poliméricos no peptídicos de alto peso molecular.

5 La invención se refiere a derivados de poli(etilenglicol) y se refiere a polímeros y procedimientos para su síntesis. Más particularmente, la invención se refiere a derivados de alto peso molecular y a procedimientos para la generación de derivados de alto peso molecular.

10 La unión covalente del polímero hidrófilo poli(etilenglicol), abreviado PEG, conocido también como poli(óxido de etileno), abreviado PEO, a moléculas y superficies es de considerable utilidad en biotecnología y medicina. En su forma más común, el PEG es un polímero lineal terminado con grupos hidroxilo en cada extremo:

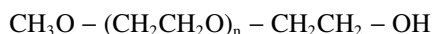


15 El polímero anterior, α , ω -dihidroxipoli(etilenglicol), se puede representar de forma abreviada como HO-PEG-OH en la que se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural:



20 en la que n oscila típicamente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4000.

25 El PEG se utiliza comúnmente como metoxi-PEG-OH, o abreviado mPEG, en el que un extremo consiste en el grupo relativamente inerte, metoxi, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo, que está sujeto a modificación química rápida. La estructura del mPEG se muestra a continuación.



30 Los copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno están estrechamente relacionados con PEG en su química, y se pueden sustituir por PEG en muchas de sus aplicaciones.



35 en la que R = H o alquilo, tal como CH₃.

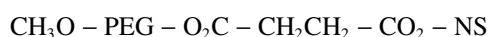
El PEG se utiliza también comúnmente en formas multibrazo en las que los PEG lineales están unidos a un núcleo central:



45 en la que R es un núcleo derivado de, por ejemplo, pentaeritritol u oligómeros de glicerol. Los PEG se pueden preparar también con enlaces degradables en la estructura principal.

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

55 Para acoplar PEG a una molécula, tal como una proteína, es a menudo necesario "activar" el PEG para preparar un derivado de PEG que tenga un grupo funcional en el extremo. El grupo funcional puede reaccionar con ciertos restos de la proteína, tal como un grupo amino, formando así un conjugado PEG-proteína. Se han descrito muchos derivados activados de PEG. Un ejemplo de uno de estos derivados activados es el "éster activo" succinimidil succinato:

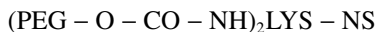


60 en el que NS =



ES 2 284 726 T3

A partir de ahora, el resto éster succinimidilo activo se representará como $-\text{CO}_2\text{-NS}$. Estos PEG activados se pueden preparar también a partir de las formas multibrazo descritas anteriormente o a partir de formas tales como:



como se describe en Harris, *et al.*, documento US 5.932.462, de que se incorpora aquí en su totalidad como referencia.

Los grupos funcionales se pueden unir al extremo del PEG por conversión directa del hidroxilo inicial a otras formas o por unión de grupos espaciadores orgánicos al grupo hidroxilo. Por ejemplo, el PEG succinato anterior se prepara por unión del anhídrido succínico a PEG. Similarmente, se puede hacer reaccionar ácido glutárico para preparar glutarato de PEG, $\text{PEG-O}_2\text{C-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$. Se pueden añadir incluso espaciadores alifáticos más largos. Como se describe en Okamoto, *et al.*, Eur. Polym. J., 19, 341-346 (1983), el PEG se puede convertir a un PEG amina por reacción del PEG-OH con $\text{ONC-(CH}_2)_6\text{-NCO}$ y convirtiendo posteriormente el isocianato restante al producto amina $\text{PEG-O}_2\text{CNH-(CH}_2)_6\text{-NH}_2$.

Como las aplicaciones de la química de PEG se han hecho más sofisticadas, ha habido una necesidad creciente de derivados de PEG de alto peso molecular y de alta pureza. La síntesis de estos compuestos es complicada debido a la dificultad para eliminar las impurezas poliméricas que se acumulan durante las preparaciones en múltiples etapas. Las impurezas de moléculas pequeñas normalmente se eliminada fácilmente por procedimientos sencillos tales como precipitación. Sin embargo, los subproductos poliméricos de alto peso molecular son generalmente bastante difíciles de eliminar y requieren la utilización de técnicas cromatográficas que consumen tiempo y son caras. Permanece la necesidad en la técnica de procedimientos mejorados para la preparación de derivados de PEG de alto peso molecular.

La invención se refiere a derivados de polímeros activados, como se define en las reivindicaciones acompañantes, y a procedimientos para su fabricación. Incluye formas de realización que implican un derivado de oligo(etilenglicol) ("OEG") pequeño y difuncional o un oligómero similar o un polímero pequeño que está unido covalentemente a un derivado polimérico poli(etilenglicol) ("PEG") grande o a un polímero similar. De esta forma, se pueden realizar la mayoría de las transformaciones químicas sobre el compuesto oligomérico o polimérico pequeño. Las impurezas poliméricas grandes son más difíciles de separar del producto deseado que las pequeñas, y los productos de estas reacciones que implican a estos polímeros incluyen típicamente reactivos que no reaccionan, componentes difuncionales que pueden resultar en reticulación, componentes que reaccionan parcialmente y otras impurezas poliméricas. Esta invención evita estas impurezas mediante la reducción del número de reacciones necesarias para generar el polímero grande.

Así, como se muestra continuación, se puede fabricar un compuesto polimérico complicado en una etapa haciendo reaccionar un oligómero complicado, por ejemplo, $\text{Y}'\text{-OEG-Y}$, en la que Y e Y' son restos activos, con un compuesto polimérico sencillo de alto peso molecular, por ejemplo, mPEG-Z , en la que Z reacciona con Y ó Y' , para generar un nuevo grupo de enlace X entre el PEG mayor y el PEG menor. De esta manera, las impurezas polimérica no se acumulan. Y e Y' pueden ser iguales o diferentes, pero se deben elegir de forma que los dos restos sean compatibles y no reaccionen uno con otro.

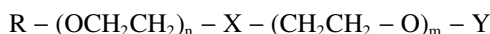
En una reacción típica para la producción de una molécula grande monofuncional de alto peso molecular, se hace reaccionar un monometoxi poli(etilenglicol) con un polímero PEG menor, en el que el grupo funcional Z sobre el polímero PEG monofuncional mayor reacciona con el grupo funcional Y' sobre un polímero heterobifuncional menor. El producto de alto peso molecular retiene el grupo activo Y. Los reactivos se unen mediante un grupo X formado por la reacción de los restos Z e Y' . Esta reacción se puede ilustrar como sigue:



Por ejemplo, un mPEG-ácido propiónico de peso molecular 32.000 que es un compuesto fabricado típicamente en diversas etapas a partir de mPEG-OH, se puede preparar en una única etapa mediante la reacción de un mPEG carbonato 30.000 activado, que se ha preparado en una etapa a partir de mPEG-OH, con el ácido α -amino- ω -ácido propiónico de peso molecular 2.000. La mayoría de las transformaciones químicas se pueden realizar sobre la pequeña PEG 2000, menos cara y más fácil de purificar.

Las moléculas grandes, monofuncionales, homobifuncionales y heterobifuncionales se puede preparar mediante la práctica de la invención, aunque no en todos los casos necesariamente con resultados equivalentes. Las reacciones que tienden a introducir complicaciones en el componente polimérico mayor de la molécula producto pueden reducir la eficiencia del método si se incrementan las impurezas con las múltiples etapas de reacción.

En una forma de realización algo más generalizada que muestra un polímero de poli(etilenglicol) con mayor especificidad, la estructura de los productos de la invención se puede describir como sigue:



ES 2 284 726 T3

La estructura anterior se prepara mediante la reacción de $R-(OCH_2CH_2)_n-Z$ con $Y'-(CH_2CH_2-O)_m-Y$, en la que Z es un grupo reactivo con Y' y, ni Y ni R, son reactivos con Z o con Y' .

R puede ser un resto bloqueado que incluye varios restos alquilo, típicamente metoxi unido al PEG. R puede ser también un grupo reactivo o un grupo reactivo protegido Y'' , en el que el grupo reactivo se puede desproteger y estar disponible para la reacción en un tiempo deseado posterior. Y e Y'' pueden ser el mismo si Y'' ha sido un grupo protegido o un grupo diferente que no participa en las reacciones utilizadas para generar la molécula producto. Los grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, aldehído, maleimido, éster activo, tiosulfonato o amina. X en un grupo de unión hidrófilo pequeño tal como amida o carbamato; n es de aproximadamente 200 a 2000; y m es de aproximadamente 1 a 120. X es deseablemente un resto pequeño e hidrófilo que no tendrá un impacto adverso en las propiedades físicas y químicas del polímero de alto peso molecular resultante.

Alternativamente, un segmento polimérico grande que es bifuncional o que tiene una funcionalidad adicional se puede unir a moléculas pequeñas en una o más funcionalidades. La funcionalidad de la molécula producto grande se puede originar de un segmento polimérico grande o de un segmento oligomérico menor o de un segmento polimérico, como se desee. La cadena principal del polímero puede tener, si se desea, grupos o grupos de unión sujetos a hidrólisis o degradación enzimática incorporados en la cadena principal, para el control de la degradabilidad de la molécula producto.

Los anteriores segmentos del polímero se pueden considerar ampliamente como $(Poli)_a$ para el segmento del polímero mayor y $(Poli)_b$ para el segmento de polímero menor, en los que los segmentos del polímero se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por poli(alquilenglicol), en particular poli(etilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolona, poli(N-acrililormorfolina) y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos.

Así, un polímero de alto peso molecular se puede preparar a partir de un polímero de un peso molecular menor, a partir del cual es mucho menos problemático eliminar las impurezas, y un polímero de peso molecular mayor que no se ha sometido a series de reacción o etapas de purificación complejas para eliminar las impurezas poliméricas.

La presente invención se describirá más detalladamente a partir de ahora. Esta invención, sin embargo, se puede realizar de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada por las formas de realización establecidas aquí, por el contrario, estas formas de realización se proporcionan para que esta revelación sea extensa y completa y darán a entender totalmente el ámbito de la invención a los expertos en la técnica.

Definiciones

Los términos “grupo funcional”, “resto activo”, “grupo de activación”, “sitio reactivo”, “grupo final”, “grupo químicamente reactivo” y “resto químicamente reactivo” se utilizan en la técnica y aquí para referirse a partes o unidades definidas, distintas de una molécula. Estos términos son sinónimos, de alguna manera, en las técnicas químicas y se utilizan aquí para indicar las regiones de las moléculas que realizan alguna función o actividad y que son reactivas con otras moléculas. El término “activo” cuando se utiliza junto con grupos funcionales, se refiere a aquellos grupos funcionales que reaccionan fácilmente con grupos electrófilos o nucleófilos presentes en otras moléculas, en contraste con aquellos grupos que requieren una fuerte catálisis o unas condiciones de reacción muy poco prácticas para reaccionar (esto es, grupos “inertes” o “no reactivos”). Por ejemplo, como se podría entender en la técnica, el término “éster activo” incluiría aquellos ésteres que reaccionan fácilmente con grupos nucleófilos tales como aminas. Los ejemplos de ésteres activos incluyen ésteres N-hidroxisuccinimidilo o 1-benzotriazolilo. Típicamente, un éster activo reaccionará con una amina en medio acuoso en materia de minutos, mientras que ciertos ésteres, tales como los ésteres de metilo o etilo, requieren una fuerte catálisis para poder reaccionar con un grupo nucleófilo.

El término “alquilo” se refiere a cadenas de hidrocarburo que típicamente oscilan entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 átomos de carbono de longitud, e incluye cadenas lineales y ramificadas. Las cadenas de hidrocarburo pueden ser saturadas o insaturadas. El término “alquilo sustituido” se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno o más sustituyentes que no interfieren, tales como, pero no limitados a, cicloalquilo C_3-C_6 , por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, y similares; acetileno; ciano; alcoxi, por ejemplo, metoxi, etoxi, y similares; alcanoiloxi inferior, por ejemplo, acetoxi; hidroxilo; carboxilo; amino; alquiamino inferior, por ejemplo, metilamino; cetona; halo, por ejemplo cloro o bromo; fenilo; fenilo sustituido, y similares.

Como se utiliza aquí, “no peptídico” se refiere a una cadena principal de polímero sustancialmente libre de enlaces peptídicos. Sin embargo, la cadena principal de polímero puede incluir un número menor de enlaces peptídicos espaciados a lo largo de la longitud de la cadena principal, tal como, por ejemplo, no más de aproximadamente 1 enlace peptídico por aproximadamente 50 unidades de monómero.

Un “polímero conjugado” se refiere a una cadena principal de polímero soluble en agua unida covalentemente a una molécula biológicamente activa, como la definida aquí. En el caso de que un polímero conjugado se haga reaccionar con un segundo polímero de manera que forme una cadena principal de polímero extendida, independientemente de que la molécula de unión de los polímeros tenga o no un enlace peptídico u otro enlace, el término “polímero conjugado” se refiere a la longitud total de polímero unido al agente biológicamente activo.

ES 2 284 726 T3

El término “enlace”, “conector”, o “grupo de unión” se utiliza aquí para referirse a los grupos o enlaces que se forman normalmente como resultado de una reacción química y son típicamente enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y que no reaccionan con agua a pHs útiles, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas durante un periodo de tiempo extenso, preferentemente indefinidamente. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significa que los enlaces se degradan en agua o en soluciones acuosas, que incluyen por ejemplo, sangre. Enlaces enzimáticamente inestables o degradables significa que el enlace se puede degradar por una o más enzimas.

Cuando se utilizan aquí los términos “molécula biológicamente activa”, “resto biológicamente activo”, “agente biológicamente activo”, o “fármaco” se refieren a cualquier sustancia que puede afectar cualquier propiedad física o química de un organismo biológico, que incluye pero no se limita a virus, bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, moléculas biológicamente activas, como se utiliza aquí, incluye cualquier sustancia destinada al diagnóstico, cura de mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad en seres humanos o en otros animales, o a aumentar, de alguna otra forma, el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, enzimas, pequeñas moléculas utilizadas como fármacos, colorantes, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Los tipos de agentes biológicamente activos que son adecuados para su utilización con la invención incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, fungicidas, agentes anti-virales, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-tumorales, agentes cardiovasculares, agentes anti-ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, y similares.

Los términos “polímero de bajo peso” y “polímero de bajo peso molecular” se refieren, ampliamente, a cadenas principales de polímero lineal, ramificado, multibrazo o en horquilla que comprenden un polímero no peptídico, soluble en agua, que tiene de 1 a aproximadamente 120 unidades repetidas. Estos polímeros tienen típicamente de 1 a 2 grupos funcionales, localizados típicamente en extremos opuestos de un polímero lineal, a aproximadamente 300, que se pueden localizar en los extremos de estructuras altamente ramificadas o multibrazo, aunque un número menor se puede localizar a lo largo de la cadena principal del polímero. Los polímeros adecuados se seleccionan entre poli(alquilenglicoles), tales como poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolona, poli(N-acriloilmorfolina), y copolímeros, terpolímeros, derivados y mezclas de los mismos. Se debe entender que las longitudes oligoméricas o incluso monoméricas se tienen que incluir en lo anterior. Aunque el peso molecular del polímero pequeño o del oligómero pueden variar, están típicamente en el intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 10.000 Da, dependiendo, por supuesto, del peso molecular de las unidades repetidas individuales. En el caso de PEG, una unidad de monómero de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 44 Da y los polímeros de bajo peso tendrán un peso molecular de aproximadamente 44 Da a aproximadamente 5280 Da. Los pesos moleculares de 2000, 3200, 3400 y 5000 están comúnmente disponibles comercialmente. Las personas con la experiencia habitual en la técnica reconocerán que la lista anterior de cadenas principales de polímero sustancialmente solubles en agua y no peptídicas, no pretende ser exhaustiva y es meramente ilustrativa, y se contemplan todos los materiales poliméricos que tengan las cualidades descritas anteriormente.

Los términos “polímero de alto peso” y “polímero de alto peso molecular” se refieren, ampliamente, a una cadena principal de polímero lineal, ramificada o multibrazo que comprende un polímero no peptídico, soluble en agua, que tiene más de aproximadamente 200 unidades repetidas. Estos polímeros tienen típicamente de 1 a 2 grupos funcionales, localizados típicamente en extremos opuestos de un polímero lineal, a aproximadamente 300, que se pueden localizar a lo largo de la cadena principal del polímero o en los extremos de estructuras altamente ramificadas o multibrazo. También se contemplan las estructuras en horquilla en las que un extremo está ramificado para proporcionar dos funcionalidades. Son adecuados los mismos polímeros de los que se selecciona el polímero de bajo peso. Aunque el peso molecular del polímero puede variar, es típicamente mayor de aproximadamente 8.000 Da dependiendo, por supuesto, del peso molecular de las unidades de monómero individuales. En el caso del PEG, los polímeros de alto peso tienen un peso molecular por encima de aproximadamente 8.800 Da. Los PEG disponibles comercialmente incluyen los que tienen un peso molecular nominal de 10.000, 12.000, 15.000, 18.000 y 20.000, 30.000, 40.000 y mayores. Los PEG ramificados están disponibles fácilmente a altos pesos moleculares. Las personas con la experiencia habitual en la técnica reconocerán que la lista mencionada anteriormente de cadenas de polímero, sustancialmente no peptídico, soluble en agua, no pretende ser exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente.

Como se utiliza aquí “PEG” se refiere, ampliamente, a una cadena principal de polímero lineal, multibrazo o ramificada que comprenden un polímero no peptídico, soluble en agua, que tiene unidades $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ repetidas. El polímero α , ω -dihidroxipoli(etilenglicol) se puede representar de forma abreviada como HO-PEG-HO en el que se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, en la que n oscila típicamente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 2000. La familia de polímeros PEG exhibe generalmente las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, falta de toxicidad y falta de inmunogenicidad. El término PEG se debería entender como inclusivo e incluir los poli(etilenglicoles) en cualquiera de sus formas lineal, ramificada o multibrazo, que incluyen alcoxi PEG, PEG bifuncional, PEG en horquilla, PEG ramificado, PEG colgante, o PEG con enlaces degradables en el mismo.

ES 2 284 726 T3

El PEG, en cualquiera de las formas descritas aquí, es típicamente claro, sin coloración, sin olor, soluble en agua, estable al calor, inerte frente a muchos agentes químicos, no se hidroliza o deteriora (a menos que esté específicamente diseñado para ello), y generalmente no es tóxico. El poli(etilenglicol) se considera biocompatible, lo que significa que el PEG es capaz de coexistir con tejidos vivos u organismos sin causarles daño. Más específicamente, el PEG es sustancialmente no inmunogénico, lo que significa que no tiende a producir una respuesta inmune en el cuerpo. Cuando se une a una molécula que tiene alguna función deseable en el cuerpo, tal como un agente biológicamente activo, el PEG tiende a enmascarar al agente y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmune de forma que un organismo puede tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG tienden a no producir una respuesta inmune sustancial o a causar coagulación u otros efectos no deseados.

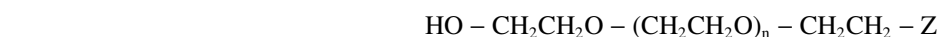
Más adelante, se muestran copolímeros al azar o de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno, que pueden utilizarse también como la cadena principal del polímero de los polímeros de alto o de bajo peso de la invención, en los que -PEG- se reemplaza por:



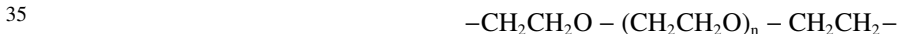
y en los que cada R es independientemente H o CH₃, y c es como se describió anteriormente para m y n, dependiendo de si la molécula es pequeña o grande.

El término “derivado polimérico” se utiliza algunas veces para describir el producto polimérico de alto peso de la invención que tiene un segmento de polímero de alto peso y un segmento de polímero de bajo peso unidos por un enlace. El término es meramente de conveniencia, y se utiliza para diferenciar el producto polimérico de sus componentes poliméricos de alto y de bajo peso cuando así se indique.

En una forma útil en la invención, el polímero de alto peso molecular es un PEG lineal terminado en un extremo con un grupo hidroxilo y en el otro extremo con un grupo funcional, Z:



El polímero anterior se puede representar de forma abreviada como HO-PEG-Z en el que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural:



en la que n es mayor de 200, y oscila típicamente entre aproximadamente 200 y 2000 para el polímero de alto peso. Este polímero se puede representar también más genéricamente como R-(poli)_a-Z, en el que (Poli)_a representa el componente mayor del polímero de la invención y R es una molécula bloqueante o un grupo reactivo adecuado o un grupo reactivo protegido, Y”.

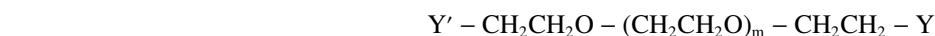
Otro tipo de PEG útil como polímero de alto peso de la invención, (Poli)_a es metoxi-PEG-Z, o de forma abreviada mPEG-Z, en el que un extremo es el grupo relativamente inerte metoxi, mientras que el otro extremo es un grupo funcional, Z. La estructura de mPEG viene dada por:



en la que n es como se describió anteriormente. La utilización de un mPEG, que tiene un grupo funcional Z, o que tiene otros sitios activos del polímero distintos de Z, bloqueados por alquilo, arilo u otros grupos no reactivos, previene al polímero de alto peso de polimerizar consigo mismo y de combinarse indeseablemente con otras moléculas presentes en la mezcla de reacción.

El grupo funcional, Z, del polímero de alto peso se selecciona de forma que el grupo Z forme fácilmente un enlace covalente con las correspondientes especies reactivas, Y o Y', que se encuentran en el polímero de bajo peso, formando de esta forma un enlace, X, entre el polímero de alto peso y el de bajo peso cuando estos reaccionan. Los grupos funcionales adecuados se discutirán más adelante.

Como una forma ejemplar útil en la práctica de la invención, el polímero de bajo peso molecular es un polímero de PEG lineal terminado en un extremo con un grupo funcional, Y o Y', capaz de formar fácilmente un grupo de unión hidrolíticamente estable cuando reacciona con el componente Z del polímero de alto peso, y un grupo funcional adicional, Y o Y', capaz de formar un enlace covalente con un agente biológicamente activo o de ser modificado hasta una forma que sea capaz de formar un enlace covalente con un agente biológicamente activo:



ES 2 284 726 T3

El polímero anterior se puede representar de forma abreviada como Y'-PEG-Y en el que se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural:



en la que m oscila de 1 a aproximadamente 120, y es típicamente menor de aproximadamente 60, para el polímero de bajo peso. Más genéricamente, el polímero se puede representar como Y'-(Poli)_b-Y, en el que (Poli)_b representa un componente pequeño del polímero de la invención. Los grupos funcionales Y' e Y del polímero de bajo peso se seleccionan de forma que no se unan fácilmente uno con otro bajo las condiciones de reacción, evitando así la polimerización consigo mismo del polímero de bajo peso. Los grupos Y' e Y aceptables se discutirán con en detalle más adelante.

Las cadenas principales del polímero pueden comprender también una estructura ramificada, que típicamente tiene un resto nuclear central ramificado y una pluralidad de cadenas de polímero, preferentemente cadenas de polímero lineales, unidas al núcleo central. En una forma de realización, el PEG se utiliza en una forma ramificada preparada, por ejemplo, por la adición de óxido de etileno a varias estructuras de un núcleo central polioliol, tal como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. En la práctica de la invención, se puede utilizar cualquier polioliol que proporcione una pluralidad de grupos hidroxilo, disponibles para la conjugación a las cadenas de polímero. La estructura nuclear de polioliol ramificado puede proporcionar aproximadamente de 3 a 100 grupos hidroxilo disponibles, y típicamente proporciona de 3 a 20, de forma que la estructura del polímero ramificada tiene de aproximadamente 3 a 100 cadenas de polímero. Las moléculas ramificadas de poli(etilenglicol) de este tipo se pueden representar de forma general como R(-PEG-OH)_a en las que R se deriva de un resto nuclear central, tal como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol, y "a" representa el número de brazos, típicamente aproximadamente de 3 a 20.

Para su utilización como polímero de alto peso molecular, los grupos hidroxilo del PEG ramificado se convierten normalmente a grupos funcionales Z antes de su combinación con el polímero de bajo peso. Los polímeros ramificados o multibrazo de alto peso tienen la forma R(-PEG-Z)_a, y son capaces de unir aproximadamente de 3 a 20 polímeros de bajo peso de la invención, dependiendo del grado de ramificación o del número de brazos que tienen grupos activos. El resto nuclear central de la molécula ramificada puede derivar de cualquiera de numerosos aminoácidos, tales como lisina, en el que el resto nuclear central típicamente proporciona dos o más sitios, por ejemplo, grupos amino, para la unión a las cadenas de polímero. Las moléculas PEG multibrazo, tales como las descritas en la Patente de EE.UU. No. 5.932.462, que se incorpora aquí en su totalidad como referencia, se pueden utilizar también como cadena principal del polímero.

La cadena principal del polímero de alto peso molecular puede comprender alternativamente un PEG en horquilla. Un ejemplo de PEG en horquilla está representado por PEG-ACHZ₂, en el que A es un grupo de unión y Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida. La Solicitud Internacional No. PCT/US99/05333, el contenido de la cual se incorpora aquí como referencia, revela varias estructuras PEG en horquilla para su utilización en una forma de realización de la invención. La cadena de átomos que une los grupos funcionales Z al átomo de carbono ramificado sirve como un grupo unidor y puede comprender, por ejemplo, cadenas alquilo, cadenas éter, cadenas éster, cadenas amida y combinaciones de las mismas. Los grupos funcionales Z se pueden utilizar en la presente invención para reaccionar con uno de los grupos funcionales, Y o Y', sobre el polímero de bajo peso para formar un enlace entre los polímeros de bajo y de alto peso molecular.

Bien la cadena principal del polímero de bajo o bien la del de alto peso puede comprender una molécula PEG colgante que tiene grupos funcionales, Z, Y o Y', según el caso, unidos covalentemente más bien a lo largo de la longitud de la cadena principal de PEG que al extremo de la cadena PEG. Los grupos reactivos colgantes se pueden unir a la cadena principal PEG directamente o a través de un resto de unión, tal como alquileno.

En el caso de un polímero de alto peso que tiene más de un grupo funcional, Z, existen muchos sitios a lo largo del polímero a los que se puede unir el correspondiente grupo funcional, Y o Y', del polímero de bajo peso. Los derivados del polímero generados de los mismos se representan por conveniencia como:

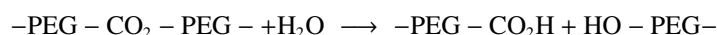


en los que PEG es un poli(etilenglicol) lineal, un alcoxi-poli(etilenglicol), un poli(etilenglicol) ramificado, o un poli(etilenglicol) en horquilla, en los que el PEG tiene un grado de polimerización de al menos aproximadamente 200, preferentemente mayor de aproximadamente 1000, y preferentemente menor de aproximadamente 2000, X es un resto de unión, m es de 1 a aproximadamente 120, y preferentemente menor de 60, Y es un grupo funcional, que incluye un grupo electrófilo o nucleófilo terminal, para la unión a un agente biológicamente activo, y q es igual al número de grupos terminales del polímero y puede ser de 1 a aproximadamente 500. Cuando q es 2, entonces los Y's pueden ser el mismo o diferentes, pero si q es mucho mayor de 3 ó 4, los Y's normalmente serían todos del mismo grupo. Más genéricamente, en la estructura anterior, el PEG puede ser (Poli)_a y la unidad de monómero CH₂CH₂O se puede representar como (Poli)_b para incluir pequeños polímeros similares, como se definió anteriormente, copolímeros, oligómeros y similares.

ES 2 284 726 T3

Además de las formas de PEG descritas anteriormente, cualquiera de los polímeros anteriores se puede preparar con uno o más enlaces débiles o degradables en la cadena principal. Por ejemplo, el PEG se puede preparar con enlaces éster en la cadena principal del polímero que están sujetos a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis resulta en la rotura del polímero en fragmentos de menor peso molecular:

5



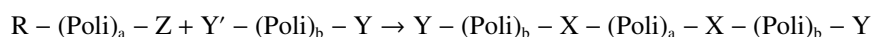
Similarmente, una cadena principal de polímero se puede unir covalentemente a un agente biológicamente activo a través de un resto de unión débil o degradable. Por ejemplo, las uniones éster formadas por la reacción de PEG ácidos carboxílicos o PEG ácidos carboxílicos activados con los grupos alcohol de un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas para liberar el agente.

Otros enlaces degradables hidrolíticamente, útiles como un enlace degradable en una cadena principal de polímero o como un enlace degradable que conecta una cadena principal de polímero a un agente biológicamente activo, incluyen los enlaces carbonato; enlaces imina que resultan, por ejemplo, de la reacción de un amina y un aldehído (ver, por ejemplo, Ouchi *et al.* Polymer Preprints, 38 (1): 582-3 (1997), que se incorpora aquí como referencia.); enlaces éster fosfato formados, por ejemplo, por reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que se forman típicamente por reacción de una hidracida y un aldehído; enlaces acetal que se forman típicamente por reacción entre un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que se forman, por ejemplo, por reacción entre un formato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, por ejemplo, en el extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; enlaces oligonucleótido formados por, por ejemplo, un grupo fosforamido, por ejemplo, en el extremo de un polímero, y el grupo 5' de un oligonucleótido.

Muchos otros polímeros son también adecuados para la invención. Las cadenas principales de polímero que son no peptídicas y solubles en agua que se pueden utilizar en lugar de PEG en la forma especificada anteriormente son: otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) (PEG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrililmorfolina), tal como se describe en la Patente de EE.UU. No. 5.629.384, que se incorpora aquí en su totalidad como referencia; y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos.

Componentes que forman el grupo de unión X

Como se mencionó, el método y el polímero funcionalizado resultante se pueden representar por:



Z es un grupo terminal funcionalizado del polímero de alto peso (Poli)_a e Y e Y' son grupos terminales funcionalizados del polímero de bajo peso (Poli)_b. R puede incluir un grupo terminal Z funcionalizado, si se desea, para producir un polímero homobifuncional como el mostrado, o un grupo activo protegido para un acoplamiento posterior a otro polímero menor activado, activado con un grupo diferente Y'', si se desea un polímero largo heterofuncional.

Varios grupos reactivos Y, Y', Y'' y Z incluyen, pero no se limitan a; carbonato de N-succinimidilo (ver las Patentes de EE.UU. Nos. 5.281.698, 5.468.478), amina (ver, por ejemplo, Buckmann *et al.* Makromol. Chem. 182: 1379 (1981), Zaplisky *et al.* Eur. Polym. J. 19: 1177 (1983)), hidracida (ver, por ejemplo, Andresz *et al.*, Makromol. Chem. 179: 301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (ver, por ejemplo, Olson *et al.*, en Poly(etilen glicol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zaplisky Eds., ACS, Washington, DC, 1977; ver también la Patente de EE.UU. No. 5.672.662), succinato de succinimidilo (ver, por ejemplo, Abuchowski *et al.*, Cancer Biochem. Biophys. 7: 175 (1984) y Joppich *et al.*, Macromol. Chem. 180: 1381 (1979)), éster de succinimidilo (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 4.670.417), carbonato de benzotriazol (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 5.650.234), éter de glicidilo (ver, por ejemplo, Pitha *et al.*, Eur. J. Biochem. 94: 11 (1979), Elling *et al.*, Biotech. Appl. Biochem. 13: 354 (1991), oxicarbonilimidazol (ver, por ejemplo, Beauchamp, *et al.*, Anal. Biochem. 131: 25 (1983), Tondelli *et al.*, J. Controlled Release 1: 251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (ver, por ejemplo, Veronese *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 27: 45 (1991)), aldehído (ver, por ejemplo, Harris *et al.*, J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22: 341 (1984), Patente de EE. UU. No. 5.824.784, Patente de EE. UU. No. 5.252.714), maleimida (ver, por ejemplo, Goodson *et al.*, Bio/Technology 8: 343 (1990), Romani *et al.*, en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22: 2417 (1992)), disulfuro de ortopiridilo (ver, por ejemplo, Woghiren, *et al.*, Bioconj. Chem. 4: 314 (1993)), acrilol (ver, por ejemplo, Sawhney *et al.*, Macromolecules, 26: 581 (1993)), vinilsulfona (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 5.900.461). Todas las referencias anteriores se incorporan aquí como referencia.

Los grupos terminales Z y los grupos Y, Y' o Y'' reactivos con Z se seleccionan de forma que los restos de los grupos terminales sean complementarios, lo que significa que los grupos terminales reaccionan fácilmente uno con otro, bajo las condiciones de reacción, para formar un grupo de unión X que es típicamente hidrolíticamente estable bajo condiciones fisiológicas. La formación del grupo de unión X es la que une el polímero de alto peso molecular

ES 2 284 726 T3

al polímero de bajo peso molecular, formando de esta forma un derivado polimérico funcionalizado de alto peso molecular global.

5 Y, Y' o Y'' pueden ser el mismo o diferente con tal que no reaccionen uno con otro. Adicionalmente, al menos un grupo reactivo Y o Y' no debería reaccionar con Z de forma que proporcione funcionalidad al polímero completo.

10 Los grupos funcionales o grupos químicamente reactivos del polímero de bajo peso se pueden seleccionar entre el grupo constituido por hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, sulfona activa, amina, amina protegida, hidracida, hidracida protegida, tiol, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tiosulfonato y tresilato.

15 Los grupos finales reactivos se pueden seleccionar entre uno o una combinación de los siguientes: $-(CH_2)_rCO_2H$, $-(CH_2)_{r'}CO_2NS$, $-(CH_2)_{r'}CO_2Bt$, $-(CH_2)_rCH(OR)_2$, $-(CH_2)_rCHO$, $-(CH_2)_2-NH_2$, $-(CH_2)_rM$, $-(CH_2)_r-S-SO_2-R$, en los que r es 1-5, r' es 0-5, R es arilo o alquilo, NS es N-succinimidilo, Bt es 1-benzotriazolilo, y M es N-maleimidilo.

20 Típicamente, el resto de unión X es hidrófilo y corto. Sin embargo, el grupo de unión se puede preparar da partir de componentes hidrofóbicos con tal que, tanto si es hidrófilo como hidrofóbico, el grupo de unión no altere sustancialmente las propiedades del polímero. Esto es, en el caso de PEG, el grupo de unión no debería alterar las propiedades establecidas anteriormente en la definición del PEG.

Condiciones de reacción

25 Los disolventes adecuados que proporcionan un medio para la reacción de los grupos terminales Z y de los Y, Y' o Y'' en la formación de los grupos de unión X incluyen pero no se limitan a tolueno, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo, cloruro de metileno, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, benceno, xilenos y disolventes con características químicas similares.

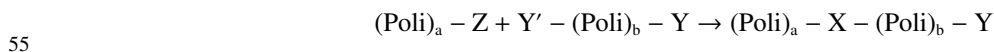
30 Se ha visto que los polímeros de bajo peso conjugados y modificados de la invención se pueden filtrar, separar y purificar con mayor eficiencia y con mejores resultados que los polímeros de alto peso conjugados o modificados del pasado. En general, es más fácil separar mezclas de polímeros de bajo peso en las especies componentes que con polímeros similares de mayor peso.

35 La modificación de los grupos terminales y la conjugación es, generalmente, un proceso en múltiples etapas y cada etapa de la funcionalización resulta en impurezas poliméricas. Si la purificación no es eficiente, que puede ser el caso cuando se trata con polímeros de alto peso, las impurezas se acumulan a través de la funcionalización del polímero hasta un nivel inaceptable. Mediante la realización, en primer lugar, de los procedimientos de funcionalización y purificación de un polímero de bajo peso y posterior unión el polímero de bajo peso purificado con un polímero de alto peso de acuerdo con esta invención, se minimizan las etapas del procedimiento que implican al polímero de alto peso, lo que resulta en un derivado del polímero conjugado o funcionalizado de alto peso de la pureza global deseable.

Procedimiento de formación del polímero de alto peso molecular activado de la invención

45 Un polímero de alto peso molecular, soluble en agua, no peptídico, que tiene al menos un grupo funcional, Z, se une covalentemente a un polímero de bajo peso molecular, típicamente oligomérico, soluble en agua, no peptídico, que tiene al menos dos grupos funcionales Y e Y', que pueden ser el mismo o diferente, con tal de que Y no sea reactivo con Y' y de que Z sea reactivo con al menos uno de Y o Y'. La invención también incluye las formas de realización de conjugación de un derivado del polímero con un agente biológicamente activo, después de que se produzca el derivado del polímero funcionalizado de acuerdo con la invención.

En general, el procedimiento y el polímero funcionalizado resultante se representan por:



60 en la que $(Poli)_a$ tiene al menos 200 unidades repetidas, típicamente al menos aproximadamente 1000, y más típicamente entre 1000 y 2000; y $(Poli)_b$ tiene hasta aproximadamente 120, y típicamente menos de 60 unidades repetidas. Y e Y' pueden ser el mismo o diferente, con tal de que Y' no sea reactivo con Y, y son grupos funcionales, y X es una molécula de unión formada por la reacción de Z y los componentes Y o Y'. En el ejemplo anterior Z es reactivo con Y' para formar el enlace X. $(Poli)_a$ puede funcionalizarse adicionalmente para producir un polímero homobifuncional con grupos reactivos Y de cada extremo. Si el grupo adicional se protege de la reacción, el grupo protector se puede eliminar del polímero conjugado resultante para generar un polímero heterobifuncional.

65 Los derivados del polímero de la invención resultantes comprenden un segmento del polímero de alto peso molecular, soluble en agua que esta conectado covalentemente, vía un grupo de unión, a un segmento del polímero de bajo peso molecular, soluble en agua. El segmento del polímero de bajo peso molecular tiene un grupo terminal funcionalizado, Y, además del grupo terminal que proporciona la unión con el segmento del polímero de alto peso molecular.

ES 2 284 726 T3

El grupo terminal funcionalizado adicional, Y, en el segmento del polímero de bajo peso molecular, proporciona un grupo de unión para la unión covalente de un agente biológicamente activo o para la conversión en tal grupo.

Los siguientes ejemplos se muestran como ejemplos no limitantes de la invención

5

Ejemplo 1

Síntesis de α -t-Boc amino- ω -metanosulfonato PEG (3400)

10 Se formó un azeótropo de α -N-t-Boc amino- ω -hidroxi PEG (3400) (PM 3318 Da, 4,0 g, 0,0012 moles) (Shearwater Corp.) en cloroformo (80 ml) en un evaporador rotatorio a 35°C a sequedad y se añadió cloroformo (50 ml) al jarabe residual. La solución se enfrió a 4°C bajo atmósfera de argón y se inyectó trietilamina (0,31 ml, 0,0022 moles), seguido por una inyección lenta de cloruro de metanosulfonilo (0,15 ml, 0,0019 moles). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche bajo atmósfera de argón mientras que se permitía que la temperatura del baño aumentara hasta temperatura ambiente. Se añadió carbonato sódico anhidro (4,0 g) a la mezcla de reacción y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. Se añadió isopropanol (40 ml) y se recogió el producto precipitado mediante filtración y secado bajo vacío. Rendimiento: 3,7 g de α -t-Boc amino- ω -metanosulfonato PEG (3400). RMN (DMSO- d_6): 1,37 ppm (s, -OC(CH₃)₃), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,31 ppm (t, -CH₂SO₂-), 6,76 ppm (-CH₂NH-CO-). Este ejemplo demuestra como el grupo funcional, Y, del polímero de bajo peso, α -N-t-Boc amino- ω -hidroxi PEG (3400), se modifica con un buen rendimiento de polímero de bajo peso modificado.

15

20

Ejemplo 2

Síntesis de α -t-Boc amino- ω -p-toluentiosulfonato PEG (3400)

25 Se formó un azeótropo de α -t-Boc amino- ω -metanosulfonato PEG (3400) (el producto del Ej. 1) (1,0 g, 0,30 mmoles) a sequedad, en cloroformo (30 ml) en un evaporador rotatorio a 35°C y se añadió etanol anhidro (15 ml) al jarabe residual. Se añadió p-toluentiosulfonato potásico (292 mg, 1,25 mmoles) y la mezcla se sometió a reflujo bajo atmósfera de argón durante toda la noche. Se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio a 40°C y el residuo se secó bajo vacío durante 30 minutos. El producto crudo se disolvió en 100 ml de una solución tampón de 1M NaH₂PO₄·Na₂HPO₄ (contenía 10% en peso de NaCl) a PH 5,8 y la solución resultante se extrajo con diclorometano (100 ml x 3). La fase de diclorometano se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y el filtrado se concentró hasta casi sequedad en un evaporador rotatorio. El producto se precipitó por adición de isopropanol/éter (40 ml/20 ml), se recogió mediante filtración y se secó bajo vacío. Rendimiento: 0,7 g de α -t-Boc amino- ω -p-toluentiosulfonato PEG (3400). RMN (DMSO- d_6): 1,37 ppm (s, -OC(CH₃)₃), 2,43 ppm (s, CH₃-CH₂=CH₂/Ar), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 6,76 ppm (t, -CH₂NH-CO-), 7,49 ppm (dd, CH₃-CH₂=CH₂/Ar), 7,82 ppm (dd, CH₃-CH₂=CH₂/Ar). Este ejemplo demuestra de nuevo como el grupo funcional, Y, del polímero de bajo peso, α -t-Boc amino- ω -metanosulfonato PEG (3400), se modifica con un buen rendimiento de polímero de bajo peso modificado.

30

35

40

Ejemplo 3

Síntesis de α -NH₂- ω -p-toluentiosulfonato PEG (3400)

45 Se disolvió α -t-Boc amino- ω -p-toluentiosulfonato PEG (3400) (el producto del Ej. 2) (0,7 g) en diclorometano anhidro (3,5 ml) y ácido trifluoroacético (3,5 ml) bajo atmósfera de argón. La solución se agitó a temperatura ambiente durante una hora y se concentró a sequedad. Se añadió isopropanol (20 ml) y el producto precipitado se recogió mediante filtración y se secó bajo vacío. Rendimiento: 0,6 g de α -NH₂- ω -p-toluentiosulfonato PEG (3400). RMN (DMSO- d_6): 2,43 ppm (s, CH₃-CH₂=CH₂/Ar), 2,95 ppm (t, -OCH₂CH₂NH₂), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 7,49 ppm (dd, CH₃-CH₂=CH₂/Ar), 7,82 ppm (dd, CH₃-CH₂=CH₂/Ar). Este ejemplo demuestra de nuevo como el grupo funcional, Y, del polímero de bajo peso, α -t-Boc amino- ω -p-toluentiosulfonato PEG (3400), se modifica con un buen rendimiento de polímero de bajo peso modificado.

50

Ejemplo 4

55

Síntesis de mPEG (23,4 Da)-p-toluentiosulfonato

60 Se disolvieron mPEG (20 kDa)-1-benzotriazol (813 mg, PM 21 kDa, 0,039 mmoles) (Shearwater Corp.) y PEG (3400)- α -NH₂- ω -p-toluentiosulfonato (el producto del Ej. 3) (PM 3805 Da, 200 mg, 0,053 mmoles) en diclorometano anhidro (20 ml) bajo atmósfera de argón y se inyectó trietilamina (30,8 μ l, 0,22 mmoles). La solución se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, posteriormente se concentró a sequedad. Se añadió 2-propanol (10 ml) y el producto precipitado se recogió mediante filtración y se secó bajo vacío. Rendimiento: 843 mg. El mPEG (23,4 kDa)-p-toluentiosulfonato (560 mg) crudo en 50 ml de agua destilada se cargó en una columna empaquetada con 50 ml de medio Poros. La columna se eluyó con 100 ml de agua destilada. Se añadió cloruro sódico (15 g) al eluyente y la solución resultante se extrajo con diclorometano (100 ml x 3). El extracto se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y el filtrado se concentró hasta casi sequedad en un evaporador rotatorio. Se añadió éter etílico (50 ml) para precipitar el producto. El producto se recogió mediante filtración y se secó bajo vacío. Rendimiento: 495 mg de mPEG (23,4 Da)-p-toluentiosulfonato. RMN (DMSO- d_6): 2,43 ppm (s, CH₃-CH₂=CH₂/Ar), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 7,23

65

ES 2 284 726 T3

ppm (t, -NHCOO-), 7,49 ppm (dd, CH₃-CH₂=CH₂/Ar), 7,82 ppm (dd, CH₃-CH₂=CH₂/Ar. Este ejemplo demuestra la combinación de un polímero de alto peso, mPEG (20 kDa)-1-benzotriazol, con un polímero de bajo peso modificado, PEG(3400)- α -NH₂- ω -p-toluentiosulfonato, mediante la reacción del grupo funcional Z, benzotriazol, con el grupo funcional Y', amina, para formar un grupo de unión entre los segmentos del polímero de alto peso y de bajo peso.

5

Ejemplo 5

Formación del conjugado de PEG y α 1-antitripsina

10 2,8 mg de mPEG p-toluentiosulfonato (el producto del Ej. 4) (24 kDa) se añadieron a una solución de α 1-antitripsina (1 mg, Sigma, PM 25 KDa) en 100 mM de fosfato sódico (pH 7,2, 1 ml) y se agitó la solución durante toda la noche a temperatura ambiente. La electroforesis capilar indicó que el conjugado PEG α 1-antitripsina se formó con un rendimiento del 36%. La electroforesis en gel con SDS también demostró la presencia del conjugado PEG. El tratamiento del conjugado PEG con β -mercaptoetanol resultó en la formación de α 1-antitripsina como se evidenció por electroforesis en gel, lo que indicaba la presencia de un puente disulfuro en el conjugado PEG α 1-antitripsina. Este ejemplo demostró la combinación de un agente biológicamente activo, α 1-antitripsina, con el derivado del polímero de alto peso molecular del Ej. 4 mediante la funcionalización del grupo terminal Y, p-toluentiosulfonato.

Ejemplo 6

20

m-PEG (22 kDa)-ácido propiónico

25 PEG (2 kDa)-ácido α -amino- ω -propiónico (0,24 g, 0,00012 moles) (Shearwater Corporation) y trietilamina (0,060 ml) se añadieron a una solución de m-PEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol (2,0 g, 0,0001 moles) (Shearwater Corporation) en cloruro de metileno (20 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se disolvió en cloruro de metileno y se precipitó con alcohol isopropílico. El producto húmedo se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 1,9 g. RMN (d₆-DMSO): 2,44 ppm (t, -CH₂-COO-), 3,11 ppm (q, -CH₂-NH-), 3,24 ppm (s, -OCH₃), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,04 ppm (m, -CH₂-O(C=O)-), 7,11 ppm (t, -(C=O)-NH-). La cromatografía de intercambio aniónico rindió m-PEG (22 kDa)-ácido propiónico (93%) y m-PEG-20 kDa (7%). Este ejemplo demuestra la combinación de un polímero de alto peso, mPEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol, con un polímero de bajo peso, PEG (2 kDa)- α -amino- ω -ácido propiónico, mediante los grupos terminales carbonato funcionalizado, Z, y amino, Y'.

Ejemplo 7

m-PEG (22 kDa)-ácido propiónico, éster de N-hidroxisuccinimida

40 A una solución de PEG (22 kDa)-ácido propiónico (el producto del Ej. 6) (1,1 g, 0,000050 moles) en cloruro de metileno anhidro (10 ml), se le añadió N-hidroxisuccinimida (0,0063 g, 0,000055 moles), seguido por 1,3-diciclohexilcarbodiimida (solución 1,0 M en cloruro de metileno, 0,05 ml, 0,000055 moles). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó. El producto crudo se disolvió en cloruro de metileno, se precipitó con alcohol isopropílico, y se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 0,9 g. RMN (d₆-DMSO): 2,81 ppm (s, -CH₂-CH₂-(succinato)), 2,92 ppm (t, -CH₂-COO-), 3,11 ppm (q, -CH₂-NH-), 3,24 ppm (s, -OCH₃), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,03 ppm (m, -CH₂-O(C=O)-), 7,11 ppm (t, -(C=O)-NH-). Este ejemplo demuestra la modificación del grupo funcional, Y, del polímero producido en el Ej. 6 de ácido propiónico a ácido propiónico, éster de N-hidroxisuccinimida.

Ejemplo 8

50

PEG (2 kDa)-ácido α -amino- ω -propiónico, éster metílico

55 1-hidroxibenzotriazol (0,30 g), 4-(dimetilamino)piridina (1,0 g), alcohol metílico (3,2, 0,100 moles) y 1,3-diciclohexilcarbodiimida (solución 1,0 M en cloruro de metileno, 7,5 ml, 0,0075 moles) se añadieron a una solución de PEG (2 kDa)-ácido α -amino- ω -propiónico (10 g, 0,0050 moles) (Shearwater Corporation) en cloruro de metileno anhidro (100 ml). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, la mezcla se concentró hasta aproximadamente 50 ml, se filtró y se añadió a 800 ml de éter dietílico frío. El producto de precipitación se filtró y se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 9,5 g. RMN (d₆-DMSO): 2,53 ppm (t, -CH₂-COO-), 2,95 ppm (t, -CH₂-amina), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG). Este ejemplo demuestra la modificación del grupo terminal funcional, Y, del polímero de bajo peso molecular, de PEG (2 kDa)-ácido α -amino- ω -propiónico, de ácido propiónico a ácido propiónico, éster metílico.

Ejemplo 9

m-PEG (32 kDa)-ácido propiónico, éster metílico

65 PEG (2 kDa)-ácido α -amino- ω -propiónico, éster metílico (el producto del Ej. 8) (0,24 g, 0,00012 moles) y trietilamina (0,060 ml) se añadieron a una solución de m-PEG (30 kDa)-carbonato de benzotriazol (3,0 g, 0,0001 moles)

ES 2 284 726 T3

(Shearwater Corporation) en cloruro de metileno (20 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se disolvió en cloruro de metileno, se precipitó con alcohol isopropílico y se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 2,8 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,53 ppm (t, $-\text{CH}_2\text{-COO-}$), 3,11 ppm (q, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{-O(C=O)-}$), 7,11 ppm (t, $-(\text{C=O})\text{-NH-}$). Este ejemplo demuestra la combinación del polímero de bajo peso producido en el Ej. 8 con un polímero de bajo peso, m-PEG (30 kDa)-carbonato de benzotriazol, mediante los grupos funcionales, Z, carbonato de benzotriazol, e Y', amino.

Ejemplo 10

10 *m-PEG (32 kDa)-ácido propiónico*

m-PEG (32 kDa)-ácido propiónico, éster metílico (el producto del Ej. 9) (2,8 g, 0,000082 moles) se disolvió en 20 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 12,0 con una solución de 0,5 M NaOH. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a pH=12,0+/-0,1. A continuación, se añadió cloruro sódico (3 g) y el pH se ajustó a 3 con 5% de ácido fosfórico. El producto se extrajo 3 veces con cloruro de metileno y los extractos combinados se secaron con cloruro de magnesio anhidro. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el producto se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 1,6 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,44 ppm (t, $-\text{CH}_2\text{-COO-}$), 3,11 ppm (q, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{-O(C=O)-}$), 7,11 ppm (t, $-(\text{C=O})\text{-NH-}$). La cromatografía de intercambio aniónico dio m-PEG (32 kDa)-ácido propiónico (97,5%), m-PEG-30 kDa (2,5%). Este ejemplo demuestra la modificación del grupo funcional, Y, del polímero producido en el Ej. 9, de ácido propiónico, éster metílico a ácido propiónico.

Ejemplo 11

25 *m-PEG (32 kDa)-ácido propiónico, éster de N-hidroxisuccinimida*

A una solución de PEG (32 kDa)-ácido propiónico (el producto del Ej. 10) (1,6 g, 0,000050 moles) en cloruro de metileno anhidro (10 ml), se le añadió N-hidroxisuccinimida (0,0063 g, 0,000055 moles), seguido por 1,3-diciclohexilcarbodiimida (solución 1,0 M en cloruro de metileno, 0,05 ml, 0,000055 moles). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, se filtró y el disolvente se evaporó. El producto crudo se disolvió en cloruro de metileno, se precipitó con alcohol isopropílico, y se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 0,9 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,81 ppm (s, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-(succinato)}$), 2,92 ppm (t, $-\text{CH}_2\text{-COO-}$), 3,11 ppm (q, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,03 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{-O(C=O)-}$), 7,11 ppm (t, $-(\text{C=O})\text{-NH-}$). Este ejemplo demuestra la modificación del grupo funcional, Y, del polímero producido en el Ej. 9 de ácido propiónico a ácido propiónico, éster de N-hidroxisuccinimida.

Ejemplo 12

40 *m-PEG (32 kDa)-ácido butanoico*

PEG (3,4 kDa)-ácido α -amino- ω -butanoico (0,45 g, 0,00012 moles) (Shearwater Corporation) y trietilamina (0,060 ml) se añadieron a una solución de m-PEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol (2,0 g, 0,0001 moles) (Shearwater Corporation) en cloruro de metileno (20 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se disolvió en cloruro de metileno, se precipitó con alcohol isopropílico y se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 2,2 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,72 ppm (q, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$), 2,24 ppm (t, $-\text{CH}_2\text{-COO-}$), 3,11 ppm (q, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$), 3,24 (s, $-\text{O-CH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{-O(C=O)-}$), 7,11 ppm (t, $-(\text{C=O})\text{-NH-}$). La cromatografía de intercambio aniónico rindió m-PEG (23,4 kDa)-ácido butanoico (92%) y m-PEG-20 kDa (8%). Este ejemplo demuestra la combinación de un polímero de bajo peso, PEG (3,4 kDa)-ácido α -amino- ω -butanoico, con un polímero de alto peso, PEG (20 kDa) carbonato de benzotriazol, mediante los grupos funcionales, Z, carbonato de benzotriazol y amino, Y'.

Ejemplo 13

55 *m-PEG (32 kDa)-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida*

A una solución de PEG (23,4 kDa)-ácido butanoico (el producto del Ej. 12) (1,17 g, 0,000050 moles) en cloruro de metileno anhidro (10 ml), se le añadió N-hidroxisuccinimida (0,0063 g, 0,000055 moles), seguido por 1,3-diciclohexilcarbodiimida (solución 1,0 M en cloruro de metileno, 0,05 ml, 0,000055 moles). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, se filtró y el disolvente se evaporó. El producto crudo se disolvió en cloruro de metileno, se precipitó con alcohol isopropílico, y se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 1,0 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,83 ppm (q, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$), 2,70 ppm (t, $-\text{CH}_2\text{-COO-}$), 2,81 ppm (s, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-(succinato)}$), 2,92 ppm, 3,11 ppm (q, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,03 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{-O(C=O)-}$), 7,11 ppm (t, $-(\text{C=O})\text{-NH-}$). Este ejemplo demuestra la modificación del grupo funcional, Y, del polímero producido en el Ej. 12 de ácido butanoico a ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida.

ES 2 284 726 T3

Ejemplo 14

m-PEG (20 kDa)-amina

5 A una solución de m-PEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol (2,0 g, 0,0001 moles) (Shearwater Corporation) en cloruro de metileno (20 ml) se le añadió trietilenglicol diamina, el peso fórmula (FW) medio es 148,21 (0,3g, 0,0020 moles) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se evaporó a sequedad y el producto crudo se disolvió en cloruro de metileno y se precipitó con alcohol isopropílico. El producto se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 1,8 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,64 ppm (t, $-\text{CH}_2$ -amina-), 3,11 ppm (q, $-\text{CH}_2$ -NH-), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2$ -O(C=O)-), 7,11 ppm (t, $-(\text{C}=\text{O})$ -NH-). La cromatografía de intercambio catiónico rindió m-PEG (20 kDa)-amina (97,5%). Este ejemplo demuestra la combinación de un polímero de bajo peso, trietilenglicol diamina, con un polímero de alto peso, m-PEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol, mediante los grupos funcionales carbonato de benzotriazol, Z, y amino, Y'.

15

Ejemplo 15

PEG (3,4 kDa)- α -amina- ω -propionaldehido, dietil acetal

20

A una solución de PEG (3,4 kDa)-ácido α -hidroxi- ω -propionaldehido, dietil acetal (NOF) (1,0 g, 0,000294 moles) en una mezcla de tolueno (20 ml) y diclorometano (5 ml), se le añadieron trietilamina (0,07 ml, 0,000502 moles, 171% de cantidad estequiométrica) y cloruro de metanosulfonilo (0,028 ml, 0,000362 moles, 123% de cantidad estequiométrica) y la mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se filtró y el disolvente se destiló bajo presión reducida. El residuo se añadió a una mezcla de 16 ml de hidróxido amónico concentrado y 1,6 g de cloruro amónico, se agitó durante 42 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se extrajo con diclorometano (3 veces, 20 ml). El extracto se lavó con 5 ml de 1M ácido clorhídrico, 5 ml de agua destilada y se secó con sulfato sódico anhidro. A continuación, el disolvente se destiló bajo presión reducida dando 0,78 g de PEG (3,4 kDa)- α -hidrocloruro de amina- ω -propionaldehido, dietil acetal. RMN (d_6 -DMSO): 1,10 ppm (t, CH_3 -, acetal), 1,74 ppm (q, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ -, acetal), 2,94 ppm (t, $-\text{CH}_2$ -hidrocloruro de amina), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,55 ppm (t, $-\text{CH}$ -, acetal), 7,11 ppm (t, $-(\text{C}=\text{O})$ -NH-). Este ejemplo demuestra la modificación de un grupo terminal funcional, Y', de un polímero de bajo peso, PEG (3,4 kDa)-ácido α -hidroxi- ω -propionaldehido, de un grupo hidroxilo a un grupo amino.

35

Ejemplo 16

m-PEG (23,4 kDa)-propionaldehido, dietil acetal

40 A una solución de m-PEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol (2,0 g, 0,0001 moles) (Shearwater Corporation) en cloruro de metileno (20 ml) se le añadió PEG (3,4 kDa)- α -amina- ω -propionaldehido, dietil acetal (0,36 g, 0,000106 moles) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se disolvió en cloruro de metileno y se precipitó con alcohol isopropílico. El producto se disolvió en cloruro de metileno y se precipitó con alcohol isopropílico. El producto húmedo se secó bajo presión reducida. Rendimiento: 1,8 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,10 ppm (t, CH_3 -, acetal) 1,74 ppm (q, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ -, acetal), 3,11 ppm (q, $-\text{CH}_2$ -NH-), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2$ -O(C=O)-), 4,55 ppm (t, $-\text{CH}$ -, acetal), 7,11 ppm (t, $-(\text{C}=\text{O})$ -NH-). Este ejemplo demuestra la combinación del polímero de bajo peso producido en el Ej. 15, PEG (3,4 kDa)- α -amina- ω -propionaldehido, dietil acetal, con un polímero de alto peso, m-PEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol, mediante los grupos funcionales carbonato de benzotriazol, Z, y amino, Y'.

50

Ejemplo 17

m-PEG (23,4 kDa)-propionaldehido

m-PEG (23,4 kDa)-propionaldehido, dietil acetal (producto del Ej. 16) (1,8 g) se disolvió en 20 ml de agua y se ajustó el pH de la solución a 3 con ácido fosfórico diluido. La solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se utilizó 0,5 M hidróxido sódico para ajustar el pH de la solución a 7. El producto se extrajo con cloruro de metileno, el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se destiló bajo presión reducida. Rendimiento: 1,6 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,60 ppm (dt, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ -, aldehído), 3,24 ppm (q, $-\text{CH}_2$ -NH-), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2$ -O(C=O)-), 7,11 ppm (t, $-(\text{C}=\text{O})$ -NH-), 9,65 ppm (t, $-\text{CH}$ -, aldehído). Este ejemplo demuestra la modificación del grupo funcional, Y, del polímero producido en el Ej. 16, de propionaldehido, dietil acetal a propionaldehido.

65

ES 2 284 726 T3

Ejemplo 18

PEG2 (43,4 kDa)-propionaldehido, dietil acetal ramificado

5 A una solución de PEG2 (40 kDa)-éster de N-hidroxisuccinimida ramificado (1,0 g, 0,000025 moles) (Shearwater Corporation) en cloruro de metileno (8 ml), se le añadió PEG (3,4 kDa)- α -hidrocloruro de amina- ω -propionaldehido, dietil acetal (0,12 g, 0,0000352 moles) en trietilamina (0,01 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se disolvió en cloruro de metileno y se precipitó con éter dietílico. El producto húmedo se secó bajo presión reducida.
10 Rendimiento: 0,83 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,10 ppm (t, CH_3 -, acetal) 1,74 ppm (q, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$, acetal), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,55 ppm (t, $-\text{CH}-$, acetal), Este ejemplo demuestra la combinación del polímero de bajo peso, PEG (3,4 kDa)- α -hidrocloruro de amina- ω -propionaldehido, dietil acetal, con el polímero de alto peso ramificado, PEG2 (40 kDa)-éster de N-hidroxisuccinimida, mediante los grupos funcionales éster de N-hidroxisuccinimida, Z, e hidrocloruro de amina, Y'.

15 Ejemplo 19

PEG2 (43,4 kDa)-propionaldehido ramificado

20 PEG (43,4 kDa)-propionaldehido, dietil acetal ramificado (producto del Ej. 18) (0,4 g) se disolvió en 10 ml de agua y se ajustó el pH de la solución a 3 con ácido fosfórico diluido. La solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se utilizó 0,5 M hidróxido sódico para ajustar el pH de la solución a 7. El producto se extrajo con cloruro de metileno. El extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se destiló bajo presión reducida.
25 Rendimiento: 0,35 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,60 ppm (dt, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$, aldehído), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$ -), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 9,65 ppm (t, $-\text{CH}$, aldehído). Este ejemplo demuestra la modificación del grupo terminal, Y, del polímero producido en el Ej. 18, de propionaldehido, dietil acetal a propionaldehido.

Ejemplo 20

30 *M-PEG_{20K}-Maleimida*

A una solución de m-PEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol (20,0 g, 0,001 moles) (Shearwater Corporation) en cloruro de metileno (200 ml) se le añadió Maleimida-trietilenglicol-TFA amina (0,68 g, 0,002 moles) y 4-metilmorfolina (0,44 ml, 0,004 moles). La reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se evaporó a sequedad y se precipitó con alcohol isopropílico (1000 ml). El precipitado se recuperó por filtración en vacío y se seco bajo vacío durante toda la noche. Rendimiento: 19,5 g. RMN (d_6 -DMSO):
35 3,11 ppm (q, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, cadena principal PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{-O(C=O)-}$), 7,04 ppm (s, $-(\text{C=O})\text{-CH=CH-(C=O)-}$), 7,11 (t, $-(\text{C=O})\text{-NH}$). Este ejemplo demuestra la combinación de un polímero de alto peso, mPEG (20 kDa)-carbonato de benzotriazol, con un polímero de bajo peso, Maleimida-trietilenglicol-TFA amina, mediante los grupos funcionales carbonato de benzotriazol, Z, y amina, Y'.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un derivado polimérico activado, comprendiendo dicho derivado polimérico un (o más de uno) primer segmento polimérico no peptídico, soluble en agua, que tiene, al menos, aproximadamente 200 unidades repetidas unidas covalentemente a través de, al menos, un resto de unión a, al menos, un segundo segmento polimérico no peptídico, soluble en agua, que no tiene más de aproximadamente 120 unidades repetidas, en el que dichas unidades de dichos primer y segundo segmentos poliméricos pueden ser iguales o diferentes, en el que el mencionado (al menos uno) resto de unión no altera sustancialmente las propiedades de dicho derivado polimérico, teniendo dicho derivado polimérico, al menos, un resto activo seleccionado entre el grupo constituido por restos electrófilos y restos nucleófilos, localizados en uno de los mencionados primer y segundo segmentos poliméricos, y en el que el primer y segundo segmentos poliméricos se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiaácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolona, poli(N-acrilomorfolina), y copolímeros, terpolímeros, y mezclas de los mismos.
2. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que, al menos, un resto activo es un resto sencillo localizado sobre dicho segundo segmento polimérico.
3. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dicho primer segmento polimérico comprende, además, un grupo funcional protegido.
4. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dicho primer segmento polimérico tiene de aproximadamente 200 a 2000 unidades de monómero repetidas.
5. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dicho primer segmento polimérico tiene de aproximadamente 200 a 700 unidades repetidas.
6. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dicho segundo segmento polimérico tiene de aproximadamente 1 a 120 unidades repetidas.
7. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dicho segundo segmento polimérico tiene de aproximadamente 40 a 80 unidades repetidas.
8. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dichos primer y segundo segmentos poliméricos son poli(etilenglicol).
9. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dicho resto de unión entre los mencionados primer y segundo segmentos poliméricos es un resto hidrófilo seleccionado entre un enlace amida o carbamato.
10. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dicho resto activo se selecciona entre el grupo constituido por hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenoil, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, amina protegida, hidracida, hidracida protegida, tiol, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosيلاتos, tiosulfonato y tresilato.
11. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, en el que dichos segmentos poliméricos se seleccionan entre el grupo constituido por segmentos poliméricos lineales, ramificados y multibrazo.
12. Un derivado polimérico activado, comprendiendo dicho derivado polimérico un segmento monometoxi poli(etilenglicol) lineal que tiene de aproximadamente 200 a 700 unidades de monómero repetidas, unido covalentemente a través de, al menos, un resto de unión amida o carbamato a un extremo de un segmento de poli(etilenglicol) lineal que tiene de 1 a 120 unidades de monómero repetidas, y en el que dicho segmento de poli(etilenglicol) lineal de 1 a 120 unidades de monómero repetidas incluye, al menos, un resto activo, seleccionado entre el grupo constituido por restos electrófilos y restos nucleófilos, en el extremo del mismo opuesto a dicho segmento de poli(etilenglicol) de 200 a 700 unidades de monómero repetidas.
13. Un derivado polimérico seleccionado entre el grupo constituido por monometoxi poli(etilenglicol)-p-tolueniosulfonato; monometoxi poli(etilenglicol)-ácido propiónico; monometoxi poli(etilenglicol)-ácido propiónico, éster de N-hidroxisuccinimida; monometoxi poli(etilenglicol)-ácido propiónico, éster de metilo; monometoxi poli(etilenglicol)-ácido butanoico; monometoxi poli(etilenglicol)-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida; monometoxi poli(etilenglicol)-ácido butanoico, éster de metilo; monometoxi poli(etilenglicol)-amina; monometoxi poli(etilenglicol)-propionaldehído; monometoxi poli(etilenglicol)-propionaldehído, dietilacetil; di-monometoxi poli(etilenglicol)-lisina propionaldehído; di-monometoxi poli(etilenglicol)-lisina propionaldehído, éster de dietilo, y monometoxi poli(etilenglicol)-maleimida; teniendo dicho derivado polimérico un peso molecular de, al menos, aproximadamente 10.000 daltons y teniendo al menos dos segmentos poli(etilenglicol) distintos unidos mediante un grupo de unión.
14. El derivado polimérico según la Reivindicación 13, conjugado a una molécula biológicamente activa.

ES 2 284 726 T3

15. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, que tiene la estructura $(\text{Poli})_a\text{-X-(Poli)}_b\text{-Y}$, en la que $(\text{Poli})_a$ es un segmento polimérico no peptídico, soluble en agua, que tiene más de aproximadamente 200 unidades repetidas, X es un resto de unión que no altera sustancialmente las propiedades del derivado polimérico, $(\text{Poli})_b$ es un segmento polimérico no peptídico, soluble en agua, que tiene de 1 a aproximadamente 120 unidades repetidas, que pueden ser las mismas o diferentes de las de $(\text{Poli})_a$, e Y es un resto electrófilo o nucleófilo.

16. El derivado polimérico según la Reivindicación 1, que tiene la estructura $\text{Y-(Poli)}_b\text{-X-(Poli)}_a\text{-X-(Poli)}_b\text{-Y}$, en el que $(\text{Poli})_a$ es un segmento polimérico no peptídico, soluble en agua, que tiene más de 200 unidades repetidas, X es un resto de unión que no altera sustancialmente las propiedades del derivado polimérico, $(\text{Poli})_b$ es un segmento polimérico no peptídico, soluble en agua, que tiene de 1 a aproximadamente 120 unidades repetidas, y en el que Y es un resto electrófilo o nucleófilo.

17. El polímero según la Reivindicación 1, en el que el resto activo se selecciona entre el grupo constituido por $-(\text{CH}_2)_r\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_{r'}\text{CO}_2\text{NS}$, $-(\text{CH}_2)_{r'}\text{CO}_2\text{Bt}$, $-(\text{CH}_2)_r\text{CH(OR)}_2$, $-(\text{CH}_2)_r\text{CHO}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_r\text{M}$, $-(\text{CH}_2)_r\text{-S-SO}_2\text{-R}$, en el que r es 1-5, r' es 0-5, R es arilo o alquilo, NS es N-succinimidilo, Bt es 1-benzotriazolilo, y M es N-maleimidilo.

18. El polímero según la Reivindicación 1, en el que uno o ambos de dichos primer y segundo segmentos poliméricos comprenden, además, grupos que se degradan hidrolíticamente o enzimáticamente entre dichos monómeros.

19. Un polímero que tiene la composición $\text{PEG-[X-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{-Y]}_q$ en la que:

PEG es un polímero no peptídico, soluble en agua, seleccionado entre poli(etilenglicol) lineal, alcoxi-poli(etilenglicol), poli(etilenglicol) ramificado, poli(etilenglicol) en horquilla, con o sin enlaces degradables hidrolíticamente o enzimáticamente, en el que el poli(etilenglicol) tiene al menos 200 unidades de monómero repetidas,

X es un resto de unión,

m es de 1 a aproximadamente 120,

Y es un resto que tiene un grupo terminal electrófilo o nucleófilo, y

q es de 1 a aproximadamente 500.

20. El polímero según la Reivindicación 19, en el que Y se selecciona entre el grupo constituido por hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, amina protegida, hidracida, hidracida protegida, tiol, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tiosulfonato y tresilato.

21. El polímero según la Reivindicación 19, en el que para $q=2$, Y se selecciona independientemente entre el grupo constituido por hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, amina protegida, hidracida, hidracida protegida, tiol, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tiosulfonato y tresilato.

22. El polímero según la Reivindicación 19, en el que Y se selecciona entre $-(\text{CH}_2)_r\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_{r'}\text{CO}_2\text{NS}$, $-(\text{CH}_2)_{r'}\text{CO}_2\text{Bt}$, $-(\text{CH}_2)_r\text{CH(OR)}_2$, $-(\text{CH}_2)_r\text{CHO}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_r\text{M}$, $-(\text{CH}_2)_r\text{-S-SO}_2\text{-R}$, en los que r es 1-5, r' es 0-5, R es arilo o alquilo, NS es N-succinimidilo, Bt es 1-benzotriazolilo, y M es N-maleimidilo.

23. El polímero según la Reivindicación 19, en el que X es un enlace amida o carbamato.

24. El polímero según la Reivindicación 19, en el que el poli(etilenglicol) tiene de 200 a 2000 unidades repetidas.

25. Un polímero de la composición $\text{R-(OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-X-(CH}_2\text{CH}_2\text{-O)}_m\text{-Y}$

en la que:

R se selecciona entre un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y un resto funcional que tiene un grupo terminal electrófilo o nucleófilo,

n es mayor de 200

m es entre 1 y aproximadamente 120,

X es un resto de unión, e

Y es un resto que tiene un grupo terminal electrófilo o nucleófilo, que puede ser el mismo o diferente de R.

ES 2 284 726 T3

26. Un procedimiento para generar un polímero no peptídico, soluble en agua, con al menos un grupo funcional, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

5 proporcionar un primer polímero no peptídico, soluble en agua, compuesto por, al menos, aproximadamente 200 unidades repetidas y que tiene, al menos, un primer grupo funcional;

10 proporcionar un segundo polímero no peptídico, soluble en agua, compuesto por, al menos, de 1 a aproximadamente 120 unidades repetidas y que tiene, al menos, un segundo grupo funcional, en el que dicho segundo grupo funcional es reactivo con el mencionado primer grupo funcional del polímero de alto peso, en el que, al menos, uno de los mencionados primer y segundo polímeros, comprenden, además, un grupo funcional que no es reactivo con cualquiera de los mencionados primer y segundo grupos funcionales, y en el que dicho primer y segundo segmentos poliméricos se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmacrilamida), poli(hidroxialquilmacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiaácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolona, poli(N-acriloilmorfolina), y copolímeros, terpolímeros, 15 y mezclas de los mismos; y

20 hacer reaccionar los mencionados primer y segundo grupos funcionales, uniendo, con ello, covalentemente dichos primer y segundo polímeros para proporcionar un polímero no peptídico, soluble en agua, con al menos un grupo funcional.

27. El procedimiento según la Reivindicación 26, en el que el primer y segundo grupos funcionales se seleccionan entre carbonato de N-succinimidilo, amina, hidracida, propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo, succinato de succinimidilo, éster de succinimidilo, carbonato de benzotriazol, éter de glicidilo, oxicarbonilimidazol, carbonato de p-nitrofenilo, aldehído, maleimida, disulfuro de ortopiridilo, acrilol, vinilsulfona. 25

28. El procedimiento según la Reivindicación 26, en el que el grupo funcional que no es reactivo con el primer y segundo grupos funcionales se selecciona entre el grupo constituido por hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, amina protegida, hidracida, hidracida protegida, tiol, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tiosulfonato y tresilato. 30

29. El procedimiento según la Reivindicación 26, en el que se hacen reaccionar el primer y segundo grupos funcionales en presencia de un disolvente seleccionado entre el grupo constituido por tolueno, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo, cloruro de metileno, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, benceno, xileno, y combinaciones de los mismos. 35

30. El procedimiento según la Reivindicación 26, en el que cada uno de los polímeros es poli(etilenglicol) seleccionado entre el grupo constituido por las formas monofuncional y difuncional lineal, ramificada, multibrazo y en horquilla. 40

31. El procedimiento según la Reivindicación 26, en el que el primer polímero es un metoxi-poli(etilenglicol) lineal.

45 32. El procedimiento según la Reivindicación 26, que comprende, además, la etapa de conjugación del grupo funcional que no es reactivo con el primer y segundo grupos funcionales a un agente biológicamente activo.

50 33. El procedimiento según la Reivindicación 32, en el que el agente biológicamente activo se selecciona entre una proteína, péptido, carbohidrato, oligonucleótido, ADN, ARN y lípido.

34. El procedimiento según la Reivindicación 26, en el que el primer polímero comprende un grupo reactivo protegido y que incluye, además, la etapa de eliminación del resto protector de los polímeros de alto y bajo peso, unidos covalentemente, para generar una funcionalidad adicional.

55 35. El derivado polimérico de la Reivindicación 1, en el que dicho segmento del segundo polímero tiene un peso molecular de, al menos, 100 daltons.

60 36. El procedimiento según la Reivindicación 26, en el que el segundo polímero tiene un peso molecular de, al menos, 100 daltons.

65