



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 960**

51 Int. Cl.:
C08G 65/32 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04778925 .0**
96 Fecha de presentación : **22.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1656410**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2006**

54 Título: **Procedimiento para preparar polímeros funcionalizados a partir de alcoholes poliméricos.**

30 Prioridad: **22.07.2003 US 489583 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.06.2010

73 Titular/es: **NEKTAR THERAPEUTICS**
201 Industrial Road
San Carlos, California 94070, US

72 Inventor/es: **McManus, Samuel, P.;**
Kozłowski, Antoni y
Harris, Milton, J.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 341 960 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar polímeros funcionalizados a partir de alcoholes poliméricos.

5 **Campo de la invención**

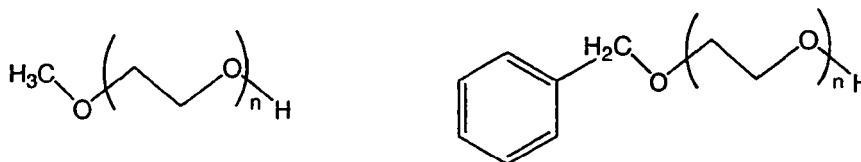
Entre otras cosas, esta invención se refiere a polímeros no peptídicos funcionalizados y solubles en agua, y en particular, a los procedimientos para preparar, purificar, y utilizar dichos polímeros.

10 La unión covalente del polímero hidrófilo, poli(etilenglicol), "PEG" de forma abreviada, a moléculas y superficies es de considerable utilidad en áreas tales como la biotecnología y la medicina. PEG es un polímero que posee muchas propiedades beneficiosas. Por ejemplo, PEG es soluble en agua y en muchos disolventes orgánicos, no es tóxico ni inmunógeno, y cuando se une a una superficie, PEG proporciona un recubrimiento biocompatible protector.

15 Las aplicaciones o usos comunes de PEG incluyen (i) enlace covalente con las proteínas, por ejemplo, para alargar la semivida en el plasma y reducir el aclaramiento a través del riñón, (ii) enlace covalente a moléculas pequeñas para mejorar la solubilidad en agua y facilitar la formulación, y para reducir la velocidad de aclaramiento del riñón, (iii) unión a superficies tales como en sustituciones arteriales, dispositivos en contacto con la sangre, y biosensores, (iv) como vehículo soluble para la síntesis de biopolímeros, y (v) como reactivo en la preparación de hidrogeles.

20 En muchos, si no en todos los usos señalados anteriormente, es necesario activar en primer lugar el PEG convirtiéndolo su extremo hidroxilo en un grupo funcional capaz de reaccionar fácilmente con un grupo funcional que se encuentre en una molécula o superficie diana deseada, tal como un grupo funcional que se encuentre en la superficie de una proteína. Para las proteínas, los aminoácidos reactivos típicos incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina, el grupo amino N terminal y el ácido carboxílico C terminal.

25 El PEG usado como material de partida para la mayor parte de reacciones de activación del PEG es normalmente un PEG bloqueado en el extremo. Un PEG bloqueado en el extremo es un PEG en el que uno o más de los grupos hidroxilo, localizado normalmente en un extremo del polímero, se convierte en un grupo no reactivo, tal como un grupo metoxi, etoxi, o benciloxi. El más comúnmente usado es metoxiPEG, abreviado como mPEG. Se prefieren generalmente PEG bloqueados en el extremo tales como mPEG, debido a que dichos PEG bloqueados en el extremo son normalmente más resistentes a la reticulación y a la agregación. A continuación se muestran las estructuras de dos alcoholes PEG bloqueados en el extremo comúnmente empleados, mPEG y monobencil PEG (también denominado como bPEG).



mPEG

bPEG

en el que n oscila normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 2.000.

30 Aunque en muchos aspectos se prefiere el uso de mPEG, existen algunas graves desventajas asociadas con el uso de mPEG como material de partida. El mPEG comercialmente disponible está a menudo contaminado con PEG diol ($\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{OH}$), en el que los valores de n son normalmente como se ha indicado anteriormente. Aunque algunos fabricantes producen PEG con un bajo contenido en diol, sigue estando presente alguna impureza del diol, y el contenido puede variar tanto como un 10-15%, o en algunos casos, incluso más. El PEG diol surge de la presencia de cantidades traza de contaminación por agua durante la polimerización catalizada por base del óxido de etileno para formar mPEG. Debido a una concentración menor de iniciador de metóxido en la preparación de PEG de elevado peso molecular, excediendo, por ejemplo, de 20 kilodalton (K) o similar, la contaminación por agua, y por tanto, la formación de diol, pueden representar un problema más grave. Para PEG con elevado peso molecular, la contaminación de diol puede alcanzar o incluso exceder el 30%. Adicionalmente, debido a que la cadena de diol puede crecer en cada extremo, la contaminación de diol tiene normalmente un peso molecular promedio más elevado que el mPEG deseado.

35 Una característica de la química de PEGilación es que, en la mayor parte de los casos, no se eliminan el diol y el PEG difuncional o diactivado correspondiente resultantes del PEG diol. En dichos casos, el producto conjugado contendrá una cierta cantidad de producto reticulado, y posee adicionalmente una polidispersabilidad aumentada debido a los contaminantes del polímero de diol y derivados de diol. Esto es muy indeseable para un producto farmacéutico, debido a que la presencia y las cantidades de dichos contaminantes pueden ser muy variables, conduciendo de esta manera a la irreproducibilidad del producto.

Se han empleado hasta la fecha diferentes soluciones en un intento por superar estos problemas. En una solución para reducir la cantidad de impurezas de diol en los materiales de partida del mPEG, se han fabricado alcoholes PEG monofuncionales mediante la polimerización de óxido de etileno en condiciones estrictamente anhidras usando un iniciador de alcohol en forma de una sal de sodio o potasio (O'dian, Principles of Polymerization, 3ª edición, Wiley, 1991; F. E. Bailey, Jr. & J. V. Koleske, in Poly(ethylene oxide), Academic Press, Nueva York, 1976). Aunque, dando como resultado mPEG que tienen algo reducido el contenido de diol, esta solución no se presta por sí misma a la síntesis a escala comercial, debido a la sensibilidad del procedimiento a la humedad y a los problemas asociados para controlar el peso molecular y la polidispersabilidad del producto. Más aún, el procedimiento es más bien complicado y caro de operar, especialmente para la fabricación de cantidades relativamente pequeñas de reactivos poliméricos de elevado peso molecular necesarios para muchas aplicaciones farmacéuticas. Además, la reactividad explosiva del monómero requiere precauciones de seguridad adicionales que se añaden al coste de fabricación.

En otra solución para erradicar la contaminación de diol, se metiló benciloxi PEG que contenía impurezas de diol y a continuación se hidrogenó para eliminar el grupo bencilo (Véase la Patente de los Estados Unidos N° 6.448.369) Como resultado, el PEG diol presente en la composición se convirtió en el dimetil éter inerte. Sin embargo, este procedimiento puede ser desventajoso en diversos aspectos. En primer lugar, esta solución se añade al número total de etapas sintéticas que se deben llevar a cabo para preparar un reactivo o producto final de PEG activado. En segundo lugar, aunque inerte, esta solución conduce todavía a la formación de una impureza en la composición de PEG activado.

Alternativamente, se puede purificar un producto de PEG activado para eliminar el material difuncional, sin embargo, dichas purificaciones son normalmente extremadamente laboriosas y consumen tiempo, así como difíciles de llevar a cabo. Por ejemplo, la cromatografía basada en gradiente, una solución para separaciones frecuentemente empleada, requiere el análisis de múltiples fracciones de eluato, utiliza un gran volumen de disolvente, y es poco adecuada para procedimientos a escala comercial. Más aún, las técnicas de separación basadas en gradiente raramente consiguen niveles de pureza aceptables, particularmente cuando se separan especies poliméricas de mayores pesos moleculares.

En suma, los procedimientos actuales para preparar PEG activados, particularmente PEG activados monofuncionales, son insatisfactorios en muchos aspectos. Para la mayor parte, los procedimientos actuales se basan en el uso de material de partida de mPEG relativamente caro, que a menudo contiene grandes cantidades del contaminante indeseable, PEG diol. Las soluciones sintéticas actuales para evitar la formación de diol son complicadas, requiriendo múltiples etapas adicionales de reacción, y pueden seguir dando como resultado la formación de cantidades detectables de PEG diol o subproductos derivados de PEG diol. Finalmente, las soluciones de separación existentes, en particular los procedimientos cromatográficos, son insatisfactorias por las razones descritas anteriormente.

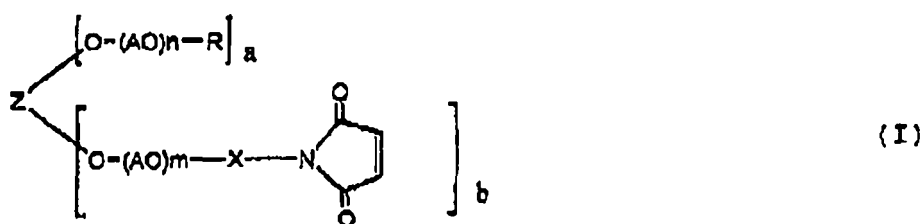
Los solicitantes han detectado una necesidad continuada en la técnica de nuevos procedimientos para preparar PEG activados que (i) no se basen en caros materiales de partida poliméricos monofuncionales, (ii) no requieran múltiples etapas de reacción engorrosas adicionales, y (iii) superen los problemas asociados con la presencia de PEG diol proporcionando reactivos poliméricos de pureza elevada que tengan un bajo contenido en diol. En respuesta a esta y a otras necesidades, los Solicitantes han, entre otras cosas, desarrollado nuevos procedimientos para formar PEG activantes que superan muchos de los inconvenientes señalados anteriormente.

El documento EP 0 614 666 A1 describe complejos liofilizados de óxido de proteína modificada con óxido de polialquileno o polipéptido con ciclodextrina. Describe éste, entre otras, la unión de proteínas y polipéptidos con polietilenglicoles de bajo diol (PEG). De los Ejemplos 1-8, únicamente el Ejemplo 3 describe un procedimiento que emplea "un polímero no peptídico y soluble en agua que comprende dos grupos hidroxilo", específicamente, óxido de polietileno. Todos los ejemplos restantes emplean metoxi-polietilenglicol o un material de partida relacionado.

Zalipsky y col. 1990 describen óxidos de polietileno funcionalizado y describen la preparación y la purificación del óxido de polietileno α -hidroxi- ω -carboximetilado.

Únicamente se proporciona un ejemplo, usando óxido de polietileno, que es idéntico al Ejemplo 4 en el documento EP 0 614 666 A1, descrito anteriormente.

El documento EP 1 283 233 A1 describe un derivado de polioxialquileno representado por la fórmula general (I) a continuación junto con los procedimientos de su producción:



El documento JP 08-165343-A describe un procedimiento para la fabricación de polialquilenmonoaminas que reduce la contaminación de la monoamina por reactivos sin reaccionar o del subproducto de poliamina.

El documento US 6.448.369 B1 describe derivados de poli(etilenglicol) heterobifuncionales y los procedimientos para su preparación y purificación.

El documento WO 2004/060965 A2 describe polímeros solubles funcionalizados con maleimida estabilizada frente a hidrólisis, junto con los procedimientos para preparar y utilizar los polímeros y sus precursores.

Resumen de la invención

Las materias sujeto de la presente invención son los procedimientos según las reivindicaciones 1-68 según se adjuntan.

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento para formar un polímero funcionalizado, que comprende:

- (a) proporcionar un polímero no peptídico y soluble en agua que comprende dos grupos hidroxilo;
- (b) hacer reaccionar el polímero no peptídico y soluble en agua que comprende dos grupos hidroxilo, en una o más etapas de reacción, con uno o más reactivos de funcionalización que sean reactivos con un grupo hidroxilo para efectuar la introducción de un grupo funcional, Y, para formar una mezcla que comprende:
 - (i) el polímero no peptídico no sustituido y soluble en agua procedente de la etapa (a),
 - (ii) un polímero monosustituido que comprende un grupo Y único, y
 - (iii) un polímero disustituido que comprende dos grupos Y,en condiciones eficaces para formar:
 - (i) entre 8 y 45 por ciento del polímero monosustituido; y
 - (ii) no más del 40% del polímero disustituido; y
 - (iii) una relación de polímero monosustituido a polímero disustituido que es de 2:1 a 40:1; y
- (c) purificar la mezcla procedente de la etapa (b) para proporcionar un polímero monosustituido sustancialmente libre de las especies poliméricas no sustituidas y disustituidas.

En una forma de realización, el procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un polímero que comprende una fórmula HO-POLI-OH, en la que POLI es un polímero no peptídico y soluble en agua;
- (b) opcionalmente, convertir HO-POLI-OH en una mezcla que comprende HO-POLI-OH, HO-POLI-Z, y Z-POLI-Z en la que Z es un grupo saliente, en condiciones eficaces para formar no más de un 45 por ciento de Z-POLI-Z;
- (c) hacer reaccionar HO-POLI-OH de la etapa (a) o la mezcla de la etapa (b) con un reactivo de funcionalización que comprende la estructura X-L_{0,1}, en la que

X es un grupo que reacciona con un hidroxilo, opcionalmente en forma aniónica, o con un átomo de carbono al cual se une el grupo hidroxilo o saliente,

L_{0,1} es un ligante opcional, y

Y es un grupo ionizable, opcionalmente tal como un grupo ionizable protegido, para formar una mezcla que comprende:

HO-POLI-OH,
HO-POLI-L_{0,1}-Y, y
Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y,

en condiciones eficaces para formar:

- (i) entre 8 y 45 por ciento del polímero monosustituido; y
- (ii) no más del 40 por ciento de Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y; y
- (iii) una relación de polímero monosustituido a polímero disustituido que es de 2:1 a 40:1;
- (d) opcionalmente, alquilar la mezcla procedente de la etapa (b) o de la etapa (c); y

- (e) purificar la mezcla procedente de la etapa © o de la etapa (d) mediante cromatografía de intercambio iónico para proporcionar el polímero sustancialmente puro que comprende un grupo $-L_{0,1}-Y$ único, tras la desprotección del grupo Y funcional, si es necesaria la desprotección.

5 Se describe en el presente documento un procedimiento para formar un polímero funcionalizado, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) proporcionar un polímero no peptídico y soluble en agua que comprende dos grupos hidroxilo (es decir, un polímero no peptídico y soluble en agua que tiene dos o más grupos hidroxilo); (b) hacer reaccionar el polímero no peptídico y soluble en agua que comprende los dos grupos hidroxilo, en una o más etapas de reacción, con uno o más reactivos de funcionalización para efectuar la introducción de un grupo funcional, Y, para formar una mezcla que comprenda (i) el polímero no peptídico no sustituido y soluble en agua procedente de la etapa (a),
10 (ii) un polímero monosustituido que comprende un grupo Y único, y (iii) un polímero disustituido que comprende dos grupos Y, en condiciones eficaces para formar tanto no más de aproximadamente el 45 por ciento del polímero disustituido; y (c) purificar la mezcla procedente de la etapa (b) para proporcionar un polímero monosustituido sustancialmente libre de las especies poliméricas no sustituidas y disustituidas. Se describen también en el presente documento
15 polímeros funcionalizados, así como polímeros monosustituidos, preparados según este procedimiento. El procedimiento comprende opcionalmente la etapa adicional de alquilar el polímero no peptídico que comprende dos grupos hidroxilo antes de la etapa (b), o alquilar la mezcla formada en la etapa (b) antes o posteriormente a la etapa (c) de purificación. Se puede usar opcionalmente esta etapa para convertir grupos hidroxilo sin reaccionar en grupos alcoxi.

20 Se describe también en el presente documento un procedimiento para formar un polímero alquilado funcionalizado, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: (a) proporcionar un polímero no peptídico y soluble en agua que comprende dos grupos hidroxilo; (b) alquilar el polímero no peptídico y soluble en agua para formar una mezcla que comprenda (i) el polímero no peptídico sin alquilar y soluble en agua procedente de la etapa (a), (ii) un polímero monoalquilado que comprenda un grupo alcoxi único, y (iii) un polímero dialquilado que comprenda dos grupos alcoxi, en
25 condiciones eficaces para formar al menos aproximadamente 25 por ciento en moles del polímero dialquilado; (c) hacer reaccionar la mezcla procedente de la etapa (b), en una o más etapas de reacción, con uno o más reactivos de funcionalización para efectuar la introducción de un grupo funcional, Y, para formar una mezcla que comprenda (i) el polímero no alquilado que comprende dos grupos Y, un polímero monoalquilado que comprende un grupo Y único, y un polímero dialquilado que no comprende grupos Y, (d) purificar la mezcla procedente de la etapa (c) para proporcionar un
30 polímero monoalquilado sustancialmente libre de las especies poliméricas no alquiladas y dialquiladas. Se describen también en el presente documento los polímeros alquilados funcionalizados, así como los polímeros monoalquilados sustancialmente libres de las especies poliméricas no alquiladas y dialquiladas, preparadas según este procedimiento.

35 Se describe también en el presente documento un procedimiento para formar un polímero funcionalizado, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) proporcionar un polímero que comprende una fórmula $HO-POLI-OH$, en la que POLI es un polímero no peptídico y soluble en agua; (b) opcionalmente, convertir $HO-POLI-OH$ en una mezcla que comprende $HO-POLI-OH$, $HO-POLI-Z$ y $Z-POLI-Z$, en la que Z es un grupo saliente, en condiciones eficaces para formar no más de aproximadamente el 45 por ciento de $Z-POLI-Z$; (c) hacer reaccionar $HO-POLI-OH$ de la etapa (a) o la mezcla de la etapa (b) con un reactivo de funcionalización que comprende la estructura $X-L_{0,1}-Y$,
40 en la que X es un grupo que reacciona con un hidroxilo, opcionalmente en forma aniónica, o con un átomo de carbono al cual se une el grupo hidroxilo o saliente, $L_{0,1}$ es un ligante opcional, e Y es un grupo ionizable, para formar una mezcla que comprende $HO-POLI-OH$, de $Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y$, e $Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-1$, en condiciones eficaces para formar preferiblemente no más de aproximadamente el 25 por ciento de $Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y$; (d) opcionalmente, alquilando la mezcla procedente de la etapa (b) o de la etapa (c), y (e) purificar la mezcla procedente de la etapa (c) o de la etapa (d)
45 mediante cromatografía de intercambio iónico para proporcionar el polímero sustancialmente puro que comprende un grupo $-L_{0,1}-Y$ único. Se describen también en el presente documento polímeros funcionalizados, así como el polímero sustancialmente puro que comprende un grupo $-L_{0,1}-Y$ único, preparado según este procedimiento.

50 Se describe también en el presente documento un procedimiento para separar una mezcla de especies poliméricas mediante cromatografía de intercambio iónico, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de. (a) proporcionar una mezcla de polímeros no peptídicos y solubles en agua, comprendiendo dicha mezcla un polímero neutro que carece de un grupo funcional ionizable, un polímero monofuncional que comprende un grupo funcional ionizable único, y un polímero difuncional que comprende dos grupos ionizables funcionales, (b) pasar la mezcla a través de una primera columna de intercambio iónico para proporcionar un eluato, en el que dicho paso de la etapa de la mezcla se
55 lleva a cabo en condiciones eficaces para adsorber sustancialmente todo el polímero difuncional en la primera columna; (c) pasar el eluato a través de una segunda columna de intercambio iónico en condiciones eficaces para adsorber sustancialmente todo el polímero monofuncional en dicha segunda columna, (e) lavar la segunda columna con agua o una disolución salina que tiene baja fuerza iónica para eliminar sustancialmente solo el polímero neutro que carece de un grupo funcional ionizable en una disolución de lavado; y (f) pasar una disolución que tenga fuerza iónica suficiente
60 a través de la segunda columna para desorber el polímero monofuncional.

65 Se describe también en el presente documento un equipo de cromatografía de intercambio iónico, que comprende: un suministro de una disolución de un polímero no peptídico y soluble en agua y una mezcla de polímero no peptídico que comprende un polímero neutro que carece de grupos funcionales ionizables, un polímero monofuncional que comprende un grupo funcional ionizable único, y un polímero difuncional que comprende dos grupos funcionales ionizables; una primera columna de intercambio iónico que comprende una primera entrada, una primera salida, y unos primeros medios de intercambio iónico, estando dicha primera entrada en comunicación fluida con dicho suministro,

una segunda columna de intercambio iónico que comprende una segunda entrada, una segunda salida, y unos segundos medios de intercambio iónico, estando dicha segunda entrada, adaptada para recibir el eluyente que sale procedente de dicha segunda columna de intercambio iónico. Los primeros y segundos medios de intercambio iónico pueden ser tanto iguales como diferentes, y el equipo incluye y el equipo incluye ejemplo en los que los primeros y segundos medios de intercambio iónico son iguales y ejemplos en los que los primeros y segundos medios de intercambio iónico son diferentes.

Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito de esta manera la invención en términos generales, se hará referencia ahora a los dibujos que la acompañan, en los que:

Figura 1. Ilustra gráficamente las estadísticas de sustitución de un PEG diol en una reacción de sustitución nucleófila. Esta representación gráfica demuestra las concentraciones relativas de producto de diol, mono y disustituido en una mezcla de reacción en cualquier punto durante dicha reacción.

Figura 2. Ilustra un sistema de cromatografía de intercambio iónico en el que se emplean dos columnas.

Figura 3. Ilustra un sistema de cromatografía de intercambio iónico con múltiples columnas.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a polímeros particulares, técnicas sintéticas, agentes activos y similares ya que los mismos pueden variar. Debe entenderse también que la terminología usada en el presente documento es para describir únicamente realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

Debe señalarse que, según se usa en esta memoria descriptiva, las formas singulares “un”, “uno/una”, y “el/la/lo” incluyen las referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, la referencia a un “polímero” incluye un polímero único así como dos o más polímeros iguales o diferentes, la referencia a un “conjugado” se refiere a un conjugado único así como a dos o más conjugados iguales o diferentes, la referencia a un “excipiente” incluye un excipiente único así como dos o más excipientes iguales o diferentes, y similares.

I. Definiciones

En la descripción y la reivindicación de la presente invención, se usará la siguiente terminología según las definiciones descritas a continuación.

“PEG”, “polietilenglicol” y “poli(etilenglicol)” se usan en el siguiente documento para significar cualquier óxido de poli(etileno) soluble en agua. Normalmente, los PEG para uso en la presente invención comprenderán una o más de las siguientes estructuras: “-O(CH₂CH₂O)_n-” o “-CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-”, en el que n es 3 a 3000, y pueden variar los grupos terminales y la arquitectura del PEG global. “PEG” significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más de un 50%, de subunidades que son -CH₂CH₂O-.

Un PEG comúnmente empleado es PEG bloqueado en el extremo. Cuando se define PEG como “-O(CH₂CH₂O)_n-”, el grupo bloqueado en el extremo es generalmente un grupo que contiene carbono comprendido normalmente por 1-20 carbonos y es preferiblemente alquilo (por ejemplo, metilo, etilo o bencilo) aunque se prevén también sus formas saturadas e insaturadas. Cuando se define PEG como “-CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-”, el grupo bloqueado en el extremo es generalmente un grupo que contiene carbono comprendido normalmente por 1-20 átomos de carbono y un átomo de oxígeno que está enlazado covalentemente con el grupo y está disponible para enlazar covalentemente con un extremo del PEG. En este caso, el grupo es normalmente, alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi o benciloxi) y con respecto al grupo que contiene carbono puede ser opcionalmente saturado e insaturado, así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo, y las formas sustituidas de cualquiera de los anteriores.

El otro término (“no bloqueado en el extremo”) es normalmente un hidroxilo, amina o un grupo activado que se puede someter a modificación química adicional cuando se define PEG como “-CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-”. Adicionalmente, el grupo bloqueado en el extremo puede ser también un silano.

Las formas específicas de PEG para uso en la invención incluyen los PEG que tienen una variedad de pesos moleculares, estructuras o geometrías (por ejemplo, PEG ramificados, lineales, bifurcados, multifuncionales, y similares), que se van a describir en mayor detalle a continuación.

El grupo bloqueado en el extremo puede comprender también ventajosamente una marca detectable. Cuando el polímero tiene un grupo bloqueado en el extremo que comprende una marca detectable, se puede determinar por su interés la cantidad o la localización del polímero y/o del resto (por ejemplo, el agente activo) al cual el polímero se acopla usando un detector adecuado. Dichas marcas incluyen, sin limitación, fluorescentes, quimioluminiscentes, restos usados en marcado enzimático, colorimétricas (por ejemplo, colorantes), iones metálicos, restos radioactivos, y similares.

Los polímeros son normalmente polidispersos (es decir, el peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso de los polímeros no son iguales), poseyendo valores de polidispersabilidad bajos - expresados como una relación del peso molecular promedio en peso (PMp) al peso molecular promedio en número (PMn), (PMp/PMn) - de generalmente menos de aproximadamente 1,2, preferiblemente menos de aproximadamente 1,15, más preferiblemente menos de aproximadamente 1,10, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1,05, aún más adicionalmente preferiblemente menos de aproximadamente 1,03, y lo más preferible menos de aproximadamente 1,025.

Según se usa en el presente documento, el término “grupo funcional ionizable” y sus variaciones, es un grupo funcional que puede ganar o perder un protón mediante la interacción con otra especie o grupo funcional ionizable en medios acuosos u otros polares. Los grupos funcionales ionizables incluyen, pero no se limitan a, amina, ácidos carboxílicos, hidratos de aldehído, hidratos de cetona, amidas, hidrazinas, tioles, fenoles, oximas, ditiopiridinas, y vinilpiridinas.

Según se usa en el presente documento, el término “ácido carboxílico” es un resto que tiene un grupo funcional



[representado también como un “-COOH” o -C(O)OH], así como los restos que son derivados de un ácido carboxílico, incluyendo dichos derivados, por ejemplo, ácidos carboxílicos protegidos. De esta manera, a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa, el término ácido carboxílico incluye no sólo la forma ácida, sino también los ésteres y las formas protegidas correspondientes. Se hace referencia de nuevo a Greene y col., “PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS” 3ª Edición, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1999.

“Ácido carboxílico activado” significa un derivado funcional de un ácido carboxílico que es más reactivo que el del ácido carboxílico parental, en particular, con respecto a la sustitución nucleófila de acilo. Los ácidos carboxílicos activados incluyen, pero no se limitan a haluros de ácido (tales como cloruros de ácido), anhídridos, amidas y ésteres.

El término “reactivo” o “activado”, cuando se usa en conjunción con un grupo funcional particular, se refiere a un grupo funcional reactivo que reacciona fácilmente con un electrófilo o un nucleófilo en otra molécula. Esto está en contraste con los grupos que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción muy poco factibles a objeto de reaccionar (es decir, un grupo “no reactivo” o “inerte”).

Los términos “protegido” o “grupo protector” o “grupo de protección” se refieren a la presencia de un restos (es decir, el grupo protector) que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo particular en una molécula en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se está protegiendo así como de las condiciones de reacción que se van a emplear y, si acaso, de la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula. En Green y col., *más arriba*, se pueden encontrar los grupos protectores conocidos en la técnica.

Según se usa en el presente documento, el término “grupo funcional” o cualquiera de sus sinónimos se entiende que abarca sus formas protegidas.

El término “separador” o “resto separador” se usa en el presente documento para referirse a un átomo o una colección de átomos opcionalmente usados para unir interconectando restos tales como un término de una porción de polímero soluble en agua y un grupo funcional. Los restos separadores pueden ser estable frente a la hidrólisis o pueden incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

“Alquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo, oscilando normalmente entre aproximadamente 1 y 20 átomos de longitud. Dichas cadenas de hidrocarburos están preferible pero no necesariamente saturadas y pueden ser una cadena ramificada o lineal, aunque normalmente se prefiere una cadena lineal. Los grupos alquilo a modo de ejemplo incluyen etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares. Según se usa en el presente documento, “alquilo” incluye cicloalquilo cuando se referencian tres o más átomos de carbono.

“Alquilo inferior” se refiere a un grupo alquilo que contiene entre 1 y 6 átomos de carbono, y puede ser de cadena lineal o ramificada, según se ejemplifica por metilo, etilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo.

“Cicloalquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo cíclico saturado o no insaturado, que incluye compuestos cíclicos con puente, fusionados o de tipo espiro, formados preferiblemente por 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente 3 a aproximadamente 8.

“Sustituyentes no interferentes” son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, son normalmente no reactivos con otros grupos funcionales dentro de la molécula.

El término “sustituido” como en, por ejemplo, “alquilo sustituido”, se refiere a un resto (por ejemplo, un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes no interferentes, tales como, pero sin limitarse a: cicloalquilo C₃-C₈,

ES 2 341 960 T3

por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo y similares; halo, por ejemplo, flúor, cloro, bromo, y yodo; ciano; alcoxi, fenilo inferior (por ejemplo, fenilo 0-2 sustituido); fenilo sustituido; y similares.

5 “Arilo sustituido” es arilo que tiene uno o más grupos interferentes como sustituyente. Para las sustituciones en un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta, o para).

“Alcoxi” se refiere a un grupo -O-R, en el que R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C₁-C₂₀ (por ejemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, benciloxi, etc.), preferiblemente C₁-C₈.

10 “Arilo” significa uno o más anillos aromáticos, cada núcleo de 5 ó 6 átomos de carbono. Arilo incluye múltiples anillos de arilo que se pueden fusionar, como en naftilo o no fusionarse, como en bifenilo. Los anillos de arilo pueden estar fusionados o no fusionados también con uno o más anillos de hidrocarburo cíclico, heteroarilo, o heterocíclico. Según se usa en el presente documento, “arilo” incluye heteroarilo.

15 “heteroarilo” es un grupo arilo que contiene entre uno a cuatro heteroátomos, preferiblemente N, O, o S, o una de sus combinaciones. Los anillos de heteroarilo se pueden fusionar también con uno o más anillos de hidrocarburo cíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo.

20 “Electrófilo” se refiere a un ión o átomo o colección de átomos, que tienen un centro electrófilo que puede ser iónico, es decir, un centro que es buscador de electrones o capaz de reaccionar con un nucleófilo.

“Nucleófilo” se refiere a un ión o átomo o colección de átomos, que tienen un centro nucleofílico que puede ser iónico, es decir, un centro que es buscador de un centro electrófilo o capaz de reaccionar con un electrófilo.

25 Una unión “fisiológicamente escindible” o “hidrolizable” o “degradable” es una unión relativamente débil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de una unión a hidrolizarse en agua dependerá no solo del tipo general de enlace que conecta los dos átomos centrales sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Los enlaces hidrolíticamente inestables o débiles apropiados incluyen, pero no se limitan a, éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éteres, iminas, ortoésteres, y oligonucleótidos.

30 Un enlace “enzimáticamente degradable” se refiere a un enlace que está sujeto a degradación por una o más enzimas.

35 Un enlace o unión “estable frente a la hidrólisis” se refiere a un enlace químico, normalmente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, no experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas en cualquier extensión apreciable durante un periodo extendido de tiempo. Los ejemplos de enlaces estables frente a la hidrólisis incluyen, pero no se limitan a los siguientes: enlaces carbono-carbono (por ejemplo, en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos, y similares. Generalmente, un enlace estable frente a la hidrólisis es un enlace que presenta una velocidad de hidrólisis de menos de aproximadamente un 1-2% por día en condiciones fisiológicas. Se pueden encontrar las velocidades de hidrólisis de los enlaces químicos representativos en los libros de texto estándares de química.

40 “Multifuncional” o “multisustituido” en el contexto de un polímero significa un polímero que tiene 2 o más grupos funcionales contenidos en el mismo, en el que los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes. Los polímeros funcionales contendrán normalmente entre aproximadamente 2-100 grupos funcionales, o entre 2-50 grupos funcionales, o entre 2-25 grupos funcionales, o entre 2-15 grupos funcionales, o entre 3 a 10 grupos funcionales, o contendrán 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos funcionales en el interior del esqueleto del polímero.

50 Un polímero “difuncional” o “disustituido” significa un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos en el mismo, tanto iguales (es decir, homodifuncionales) como diferentes (es decir, heterodifuncionales).

Un polímero “monofuncional” o “monosustituido” significa un polímero que tiene un único grupo funcional contenido en el mismo (por ejemplo, un polímero basado en mPEG).

55 Un reactivo ácido o básico descrito en el presente documento incluye la forma neutra, cargada, y cualquier forma de sal correspondiente del anterior.

El término “paciente”, se refiere a un organismo vivo que padece de o es propenso a una dolencia que se puede evitar o tratar mediante la administración de un conjugado, e incluye a seres humanos y animales.

60 “Opcional” u “opcionalmente” significa que la circunstancia descrita posteriormente puede producirse o no, de tal manera que la descripción incluye ejemplos en los que se produce la circunstancia y ejemplo en los que no.

A no ser que se señale otra cosa, el peso molecular se expresa en el presente documento como peso molecular promedio en número (PM_n), que se define como $\frac{\sum NiMi}{\sum Ni}$, en la que N es el número de moléculas de polímero (o el número de moles de aquellas moléculas que tienen peso molecular Mi).

Cada uno de los términos “fármaco”, “molécula biológicamente activa”, “resto biológicamente activo”, “agente activo” y “agente biológicamente activo”, cuando se usa en el presente documento, significa cualquier sustancia que puede afectar cualquier propiedad física o bioquímica de un organismo biológico, incluyendo, pero sin limitarse a virus, bacterias, hongos, plantas, animales, y seres humanos. En particular, según se usa en el presente documento, las moléculas biológicamente activas incluyen cualquier sustancia prevista para el diagnóstico, remedio, alivio, tratamiento o prevención de la enfermedad en seres humanos u otros animales, o potenciar de otra manera el bienestar físico o mental de los seres humanos o los animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, enzimas, pequeñas moléculas de fármacos, colorantes, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Los tipos de agentes biológicamente activos que son adecuados incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, fungicidas, agentes antivíricos, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes ansiolíticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, y similares.

Según se usa en el presente documento, “no peptídico” se refiere a un esqueleto de polímero sustancialmente libre de enlaces peptídicos. Sin embargo, el esqueleto de polímero puede incluir un número menor de enlaces peptídicos separados a lo largo de la longitud del esqueleto, tal como, por ejemplo, no más de aproximadamente 1 enlace peptídico por aproximadamente 50 unidades de monómeros.

El término “conjugado” se pretende que se refiera a la entidad formada como resultado de la unión covalente de una molécula, por ejemplo, una molécula biológicamente activa, a una molécula reactiva de polímero, preferiblemente poli(etilenglicol).

“Eluato” se refiere a una disolución que ha pasado a través de una columna de cromatografía (es decir, una corriente efluente).

“Eluyente” se refiere a la fase móvil utilizada durante una separación cromatográfica.

“Precolumna” y “primera columna” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una única columna de cromatografía, así como a dos o más columnas conectadas en serie que sirven como “precolumna” o “primera columna”. Adicionalmente, los términos “columna principal” y “segunda columna” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una única columna de cromatografía, así como a dos o más columnas conectadas en serie que sirven como “columna principal” o “segunda columna”.

II. Procedimiento para preparar polímeros funcionalizados usando material de partida de poliol polimérico

Se describe en el presente documento un procedimiento para formar reactivos poliméricos funcionalizados, particularmente reactivos poliméricos monofuncionales, usando materiales de partida de poliol polimérico, tales como dihidroxi PEG, en vez de los materiales de partida de mPEG conocidos en la técnica, caros y difíciles de purificar. El procedimiento implica hacer reaccionar el material de partida de poliol polimérico con un reactivo funcionalizado que comprende un grupo funcional, -Y. El reactivo de funcionalización es capaz de reaccionar, en una o más etapas, con el poliol, para formar una pluralidad de polímeros sustituidos, comprendiendo cada uno un número variable de grupos -Y. La reacción se lleva a cabo normalmente en condiciones eficaces para producir una mezcla de un polímero no sustituido (es decir, el poliol polimérico original), un polímero monosustituido (es decir, un polímero que tiene un único grupo Y), y uno o más polímeros multisustituidos (por ejemplo, un polímero disustituido que tiene dos grupos Y) caracterizado por una diferencia relativamente amplia en el contenido del producto monosustituido y del producto(s) multisustituido(s).

La mezcla de productos poliméricos se somete a una etapa de purificación con el fin de separar los componentes de la mezcla y proporcionar un polímero monosustituido sustancialmente libre de las especies poliméricas no sustituidas y multisustituidas. Llevando a cabo el procedimiento de purificación/separación mientras están presente las especies deseadas de polímero monosustituido y de polímero multisustituido a diferentes concentraciones, la separación se hace más fácil y es posible la formación de reactivos poliméricos monofuncionales de elevada pureza. En esencia, se usa el control de la extensión a la cual se deja proceder la reacción de funcionalización como medio para potenciar y simplificar la separación de las especies poliméricas formadas en la reacción. La solución es particularmente muy adecuada para uso con reactivos de funcionalización que se unan a grupos funcionales ionizables del polímero y para los procedimientos de separación adaptados para la separación basada en diferencias de carga.

Con objeto de ilustrar una o más ventajas del procedimiento se considera el uso de un material de partida de dihidroxi PEG. E inicio de una reacción del dihidroxi PEG con un reactivo de funcionalización que comprende una única amina protegida o ácido carboxílico protegido dará como resultado la formación de una especie de polímero monosustituido (por ejemplo, un polímero que tiene un único grupo amina protegido o libre o un ácido carboxílico protegido o libre) y una especie de polímero disustituido (por ejemplo, un polímero dos grupos amina protegidos o de ácido carboxílico protegidos). Como el número de moles de los polímeros mono y disustituidos aumenta, el número de moles del material de partida de PEG diol original disminuirá concomitantemente. En la Figura 1 se muestra el teórico rendimiento de las especies de polímero monosustituido y disustituido expresado como % de sustitución (es decir, porcentaje de moles). Según se muestra, el producto monosustituido alcanza un teórico máximo de 50% y a continuación disminuye a medida que aumenta continuamente el porcentaje de producto disustituido. La cantidad de material de partida de PEG diol no sustituido disminuye continuamente a medida que procede la reacción.

En una o más realizaciones, se dejó proceder la reacción hasta que se formó una cierta cantidad predeterminada de las especies de polímero monosustituido y disustituido. Esta cantidad predeterminada se selecciona basándose en la disparidad en la concentración del producto monosustituido y del producto disustituido. Deteniendo la reacción en un punto caracterizado por una gran diferencia en la concentración del producto monosustituido y del producto disustituido (por ejemplo, cuando la mezcla de reacción comprende un 25,5% de producto monosustituido y únicamente un 2,25% de producto disustituido), es más fácil la separación o la purificación de la mezcla de polímero. Según se ha señalado anteriormente, esto es particularmente verdadero cuando se utilizan grupos ionizables que permiten la separación de la mezcla de polímero basándose en diferencias de carga.

Una vez que finaliza la reacción de funcionalización (por ejemplo, mediante detención rápida o agotamiento del reactivo) en el punto deseado, puede tener lugar la separación de la mezcla, y se puede usar a continuación el polímero monosustituido purificado, opcionalmente tras funcionalización adicional, para uno cualquiera de numerosos objetivos (por ejemplo, para formar un conjugado con un agente biológicamente activo). Se puede llevar a cabo una funcionalización adicional sometiendo el polímero monosustituido purificado a etapas de reacción adicionales para formar otros reactivos poliméricos activos útiles, tales como la formación de ésteres activos a partir de polímeros terminados con ácido carboxílico o la formación de maleimidas a partir de polímeros terminados con amina.

Los ejemplos de grupos funcionales adecuados que se pueden formar en el polímero purificado incluyen hidroxilo, ésteres activos (por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimidilo y éster de 1-benzotriazolilo), carbonatos activos (por ejemplo, carbonato de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de 1-benzotriazolilo, y carbonato de p-nitrofenilo), acetales, aldehídos que tienen una longitud de carbonos de 1 a 25 carbonos (por ejemplo, acetaldehído, propionaldehído, y butiraldehído), hidratos de aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, hidrazida, tiol, ácidos alcanóicos que tienen una longitud de carbonos (que incluyen el carbono de carbonilo) de 1 a aproximadamente 25 átomos de carbono (por ejemplo, ácido carboxílico, carboximetilo, ácido propanoico, y ácido butanoico), haluro de ácido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxal, diona, mesilato, tosilato, y tresilato. Se discuten los grupos funcionales ejemplares en las siguientes referencias: carbonato de N-succinimidilo (véanse, por ejemplo, las Patente de los Estados Unidos N^{os} 5.281.698, 5.468.478), amina (véanse, por ejemplo, Buckmann y col. Makromol. Chem. 182: 1379 (1981), Zalipsky y col. Eur. Polym. J. 19: 1177 (1983)), hidrazida (véase, por ejemplo; Andresz y col. Makromol. Chem. 179: 301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véanse, por ejemplo, Olson y col. en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, DC, 1997; véase también la Patente de los Estados Unidos N^o 5.672.662), succinato de succinimidilo (véanse, por ejemplo, Abuchowski y col. Cancer Biochem. Biophys. 7: 175 (1984) y Joppich y col., Makromol. Chem. 180: 1381 (1979), éster de succinimidilo (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N^o 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N^o 5.650.234), glicidil éter (véanse, por ejemplo, Pitha y col. Bur. J. Biochem. 94: 11 (1979), Elling y col., Biotech. Appl. Biochem. 13: 354 (1991), oxicarbonilimidazol (véanse, por ejemplo, Beauchamp, y col., Anal. Biochem. 131: 25 (1983), Tondelli y col. J. Controlled Release 1: 251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véanse, por ejemplo, Veronese, y col., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore y col., Appl. Biochem. Biotech., 27: 45 (1991)), aldehído (véanse, por ejemplo, Harris y col. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22: 341 (1984), la Patente de los Estados Unidos N^o 5.824.784, la Patente de los Estados Unidos 5.252.714), maleimida (véanse, por ejemplo, Goodson y col. Bio/Technology 8: 343 (1990), Romani y col. en Chemistry of Peptides and Proteins 2; 29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22: 2417 (1992)), disulfuro de ortopiridilo (véase, por ejemplo, Woghiren, y col. Bioconj. Chem. 4: 314 (1993)), acrilol (véase, por ejemplo, Sawhney y col., Macromolecules, 26: 581 (1993)), vinilsulfona (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N^o 5.900.461).

Si se desea un polímero monofuncional bloqueado en el extremo, el procedimiento puede incluir también una etapa de alquilación, que se puede producir tanto antes como después de que se hace reaccionar el material de partida de poliol del polímero con el agente de funcionalización. Preferiblemente, la etapa de alquilación opcional se produce después de la reacción de funcionalización de tal manera que la etapa de funcionalización continúa siendo la etapa controlante en el procedimiento que determina las concentraciones relativas del producto polimérico monosustituido en comparación con las especies poliméricas disustituidas u otras disustituidas. Si se lleva a cabo la etapa de alquilación antes de la reacción con el reactivo de funcionalización, a continuación la etapa de alquilación llega a controlar la reacción que determina la disparidad deseada en el contenido de polímero monosustituido frente al contenido de polímero disustituido. Alternativamente, se puede evitar la etapa de alquilación utilizando una mezcla polimérica de un diol polimérico y su forma monoalquilada (por ejemplo, mPEG) si están fácilmente disponibles dichas mezclas que tienen un equilibrio apropiado de los dos componentes.

Según se discute con mayor detalle a continuación, el grupo funcional, Y, es preferiblemente un grupo funcional ionizable. Los grupos funcionales ionizables a modo de ejemplo incluyen grupos amina y de ácido carboxílico. Los ejemplos de otros grupos funcionales adecuados incluyen hidrato de aldehído, hidrato de cetona, amida, hidrazina, hidrazida, tiol, fenol, oxima, otros ácidos alcanóicos que tienen una longitud de carbonos (incluyendo el carbono del carbonilo) de 1 a aproximadamente 25 átomos de carbono (por ejemplo, carboximetilo, ácido propanoico, y ácido butanoico), ditiopiridina, y vinilpiridina.

65 A. Materiales de partida de poliol

Se puede usar un poliol polimérico que puede comprender cualquier polímero no peptídico y soluble en agua que tenga al menos dos grupos hidroxilo unidos covalentemente al anterior. Preferiblemente, el poliol polimérico es un

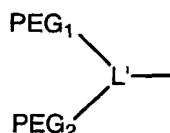
ES 2 341 960 T3

diol (es decir, un polímero que tiene dos grupos hidroxilo unidos al anterior), sin embargo, se pueden utilizar polioles que contengan más de dos grupos hidroxilo, dichos polioles comprenden aproximadamente 3-100 grupos hidroxilo, o entre 3-50 grupos hidroxilo, o entre 3-25 grupos hidroxilo, o entre 3-15 grupos hidroxilo, o entre 3-10 grupos hidroxilo, o contendrán 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos hidroxilo unidos al polímero. Aunque los grupos hidroxilo se unen preferiblemente a los términos del polímero, se pueden unir también los grupos hidroxilo al polímero como cadenas secundarias de manera colgante.

El polímero debería ser no tóxico y biocompatible, lo que significa que el polímero es capaz de coexistencia con tejidos u organismos vivos sin producir perjuicio. Cuando se hace referencia al poliol polimérico, debe entenderse que el polímero puede ser cualquiera de numerosos polímeros no peptídicos y solubles en agua, tales como los descritos en el presente documento como adecuados para el uso.

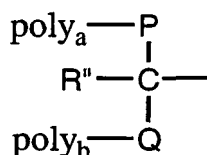
Preferiblemente, poli(etilenglicol) (es decir, PEG) es el poliol polimérico. El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de las numerosas geometrías o formas, que incluyen formas lineales, formas ramificadas o multibrazo (por ejemplo, PEG bifurcado o PEG unido a un núcleo de poliol), PEG colgante, o PEG con enlaces degradables en el mismo, que se van a describir más completamente a continuación.

Se pueden usar también moléculas de PEG multibrazo o ramificadas, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos N° 5.932.462 como polímero de PEG. Hablando de manera general, un polímero multibrazo o ramificado posee dos o más "brazos" poliméricos extendiéndose desde un punto central de la rama (por ejemplo, C en la Fórmula II a continuación). Por ejemplo, un polímero de PEG ramificado a modo de ejemplo tiene la estructura:



Fórmula I

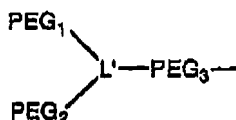
en la que PEG_1 y PEG_2 son polímeros de PEG en cualquiera de las formas o geometrías descritas en el presente documento, y que pueden ser iguales o diferentes, y L' es un enlace estable frente a la hidrólisis. Un PEG modificado a modo de ejemplo tiene la estructura:



Fórmula II

en la que; poly_a y poly_b son esqueletos de PEG, tales como metoxi poli(etilenglicol); R'' es un resto no reactivo, tal como H, metilo o un esqueleto de PEG; y P y Q son enlaces no reactivos. En una realización preferida, el polímero de PEG ramificado es lisina disustituida con metoxi poli(etilenglicol).

Se puede unir la estructura de PEG ramificado de Fórmula II con una tercera cadena de oligómero o polímero según se muestra a continuación:



Fórmula III

en la que PRO_3 es una tercera cadena de oligómero o polímero de PEG que puede ser igual o diferente de PEG_1 y PEG_2 .

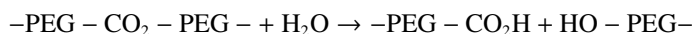
El polímero de PEG puede comprender alternativamente un PEG bifurcado.

ES 2 341 960 T3

Hablando de manera general, un polímero que tiene una estructura bifurcada se caracteriza por tener una cadena polimérica unida a dos o más grupos funcionales mediante enlaces covalentes que se extienden desde un punto de la rama estable frente a la hidrólisis en el polímero. Un ejemplo de un PEG bifurcado está representado por PEG-L-CHY₂, en el que L es un grupo de unión e Y es un grupo funcional. Cada grupo Y está unido a CH mediante una cadena de átomos de longitud definida. La Patente de los Estados Unidos N° 6.362.254 da a conocer diversas estructuras de PEG bifurcado capaces de uso. La cadena de átomos que se unen a los grupos funcionales Y en el átomo de carbono que se ramifica sirve como un grupo de enlace y puede comprender, por ejemplo, una cadena de alquilo, un enlace éter, un enlace éster, un enlace amida, o sus combinaciones.

Según se ha señalado anteriormente, el polímero de PEG puede comprender una molécula de PEG colgante que tenga grupos reactivos, tales como hidroxilo, unidos covalentemente a lo largo de la longitud del esqueleto de PEG más bien que al extremo de la cadena de PEG. Los grupos reactivos colgantes se pueden unir al esqueleto de PEG directamente o a través de un resto enlazante, tal como un grupo alquileo.

Adicionalmente a las formas anteriormente descritas de PEG, se puede preparar también el polímero con uno o más enlaces estables frente a la hidrólisis o degradables en el esqueleto del polímero, incluyendo cualquiera de los polímeros anteriormente descritos. Por ejemplo, se puede preparar PEG con enlaces éster en el esqueleto del polímero que se someten a hidrólisis. Según se muestra a continuación, esta hidrólisis da como resultado la rotura del polímero en fragmentos de peso molecular inferior.



Otros enlaces degradables por hidrólisis, útiles como un enlace degradable en el interior de un esqueleto de polímero, incluyen los enlaces carbonato; los enlaces imina resultantes, por ejemplo, de la reacción de una amina y un aldehído (véase, por ejemplo, Ouchi y col., Polymer Preprints, 38(1): 582-3 (1997)); enlaces éster de fosfato formados, por ejemplo, haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona, que se forman normalmente por reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal, que se forman normalmente por reacción entre un aldehído y un alcohol; enlaces orto éster, que se forman por ejemplo, por reacción entre un formiato y un alcohol; enlaces oligonucleótido formados mediante, por ejemplo, un grupo fosforoamidita, por ejemplo, al extremo de un polímero, y un grupo 5' hidroxilo de un oligonucleótido.

Las personas expertas en la técnica entiende que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las anteriores formas de PEG.

Se puede usar también cualquiera de una variedad de polioles poliméricos que comprenden otras cadenas de polímeros no peptídicos y solubles en agua.

El poliol polimérico puede ser lineal, o puede estar en cualquiera de las anteriores formas descritas (por ejemplo, ramificado, bifurcado, y similar). Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenglicoles), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, alcohol poli(olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquiloxazolona), poli(N-acrilolmorfolina), tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.629.384, y los copolímeros, terpolímeros, y sus mezclas.

Se pueden incorporar diferentes polímeros en el mismo esqueleto del polímero. Por ejemplo, se pueden sustituir una o más de las moléculas de PEG en las estructuras ramificadas que se muestran en las Fórmulas I-III con un tipo diferente de polímero. Se puede usar cualquier combinación de polímeros no peptídicos y solubles en agua.

El peso molecular del poliol polimérico variará dependiendo de la aplicación deseada, la configuración de la estructura polimérica, el grado de ramificación, y similares. Generalmente, son útiles los polímeros que tienen un peso molecular de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 180.000 Da, preferiblemente aproximadamente 500 Da a aproximadamente 60.000 Da, y más preferiblemente aproximadamente 5.000 Da a aproximadamente 40.000 Da. Las realizaciones poliméricas a modo de ejemplo tienen un peso molecular de aproximadamente 1.000 Da, 2.000 Da, 3.000 Da, 4.000 Da, 5.000 Da, 7.500 Da, 10.000 Da, 15.000 Da, 20.000 Da, 25.000 Da, 30.000 Da, 35.000 Da, y 40.000 Da.

El poliol polimérico se disuelve normalmente en agua o en un disolvente orgánico antes de la reacción de funcionalización discutida a continuación. Se puede utilizar cualquier disolvente orgánico compatible con polímeros del tipo usado, tal como tolueno, xileno, benceno, diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, o acetona. Se pueden usar también las mezclas de los anteriores disolventes u otros disolventes similares conocidos en la técnica.

B. Reacción de funcionalización

La etapa o etapas de reacción usadas para hacer reaccionar un reactivo de funcionalización con el poliol polimérico pueden variar dependiendo de numerosos factores, que incluyen el tipo de grupo funcional implicado, el tipo y la configuración del polímero, y así sucesivamente. La secuencia exacta. La naturaleza exacta de la secuencia de reacción no es crítica y se puede utilizar cualquier procedimiento conocido de funcionalización de polímeros del tipo usado.

Según se ha señalado anteriormente, en una realización, se dejó proceder sólo la reacción de funcionalización en condiciones eficaces para producir una mezcla de producto caracterizada por una amplia diferencia en las concentraciones del producto monosustituido y de los productos di u otros multisustituídos. Preferiblemente, se lleva a cabo también la reacción en condiciones eficaces para producir un contenido relativamente bajo de producto multisustituido.

- 5 Para conseguir la disparidad deseada de contenido, se puede detener o detener rápidamente la reacción entre el material de partida del poliol y el reactivo de funcionalización en el momento apropiado usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como cambiando rápidamente los parámetros del procedimiento (por ejemplo, la temperatura o el grado de mezcla) o controlando cuidadosamente la cantidad de reactivos, controlando por tanto la reacción sobre una base estequiométrica. Se puede determinar el momento apropiado para detener o detener rápidamente la
10 reacción obteniendo muestras periódicas de la mezcla de reacción y determinando la cantidad de especies presentes (por ejemplo, mediante procedimientos cromatográficos, procedimientos de RMN y así sucesivamente) o midiendo un parámetro (por ejemplo, el pH) conocido para correlacionarlo con la cantidad de especies presentes. Alternativamente, si se carga una deficiencia significativa del reactivo de funcionalización, la reacción procederá únicamente a una conversión parcial del diol. En este ejemplo, se puede dejar proceder la reacción hasta la finalización. En tales casos,
15 conocer la estequiometría de los reactivos permite la estimación de los componentes composicionales finales cuando se hace referencia a la Figura 1.

- La reacción se lleva a cabo generalmente en condiciones eficaces para formar no más de aproximadamente un 40 por ciento del polímero disustituido. Las reacciones a las que se deja continuar pasado este punto dan como resultado
20 un polímero disustituido que está presente en una cantidad mayor que la del polímero monosustituido, con el resultado de que la separación llega a ser crecientemente ineficiente. Aunque se deja formar normalmente no más de aproximadamente un 40 por ciento del polímero disustituido, se prefiere a menudo que el porcentaje de formación de polímero disustituido quede comprendido en uno o más de los siguientes intervalos: no más de aproximadamente 35 por ciento; no más de aproximadamente 30 por ciento; no más de aproximadamente 25 por ciento; no más de aproximadamente
25 20 por ciento; no más de aproximadamente 15 por ciento; no más de aproximadamente 12 por ciento, y no más de aproximadamente 10 por ciento. En algunas realizaciones, no se forma más de aproximadamente 8 por ciento, preferiblemente no más de aproximadamente 5 por ciento, más preferiblemente no más de aproximadamente 2 por ciento, y lo más preferible no más de aproximadamente 1 por ciento de polímero disustituido. La reacción de funcionalización da como resultado una relación de polímero monosustituido a polímero disustituido de entre aproximadamente
30 2:1 a aproximadamente 40:1, preferiblemente aproximadamente 4:1 a aproximadamente 20:1, y más preferiblemente aproximadamente 10:1 a aproximadamente 18:1.

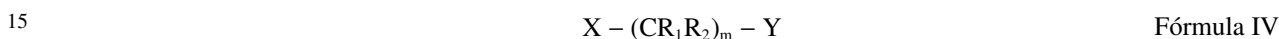
- Normalmente, la mezcla polimérica funcionalizada final comprenderá aproximadamente 8 a aproximadamente 45 por ciento, y más preferiblemente aproximadamente 8 a aproximadamente 30 por ciento. La mezcla polimérica
35 funcionalizada final comprenderá normalmente aproximadamente 1 a aproximadamente 40 por ciento del polímero disustituido, preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 12 por ciento, y más preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento. Generalmente, la mezcla polimérica funcionalizada final comprenderá aproximadamente 10 a aproximadamente 91 por ciento del poliol polimérico no sustituido original, preferiblemente aproximadamente 43 a aproximadamente 91 por ciento, más preferiblemente aproximadamente 65 a aproximadamente
40 91 por ciento.

- La reacción de funcionalización comprende normalmente una reacción de sustitución nucleófila o una reacción de adición nucleófila (por ejemplo, una reacción de adición de tipo Michael) en la que el nucleófilo puede estar presente en
45 el polímero o el reactivo de funcionalización. Por ejemplo, la reacción puede implicar la reacción de un grupo hidroxilo del poliol polimérico, o un anión del mismo, como nucleófilo con un grupo electrófilo adecuado. Alternativamente, se puede convertir los grupos hidroxilo del poliol polimérico en buenos grupos salientes, tales como ésteres de sulfonato, y hacerse reaccionar con un reactivo de funcionalización que contenga un grupo nucleófilo.

- El reactivo de funcionalización comprenderá normalmente un grupo reactivo, X, que es tanto un grupo electrófilo reactivo con un grupo hidroxilo como un anión del mismo en el poliol polimérico o, si alguno o todos los
50 grupos hidroxilo del poliol se han convertido en buenos grupos salientes, un grupo nucleófilo. El reactivo de funcionalización comprenderá también el grupo funcional, Y, que se pretende que se una covalentemente al polímero. Opcionalmente, el reactivo de funcionalización comprenderá además un resto separador que se une al grupo reactivo, X, con el grupo funcional, Y. Los restos separadores a modo de ejemplo incluyen -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-
55 NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-, -CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-OCH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-,
-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-OCH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NHCH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-
60 CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH₂-, -CH₂-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-
O-CH₂-, -C(O)-O-CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-
CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -C(O)-NHCH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-
65 NH-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -NH-CH₂-, -NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-, -C(O)-CH₂-,
-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-, -CH₂-
CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-
CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-[CH₂]_n-(OCH₂CH₂)_j-,
grupo cicloalquilo bivalente, -O-, -S-, un aminoácido, -N(R⁶)-, y las combinaciones de dos o más de cualquiera de los

anteriores, en la que R⁶ es H o un radical orgánico seleccionado entre el grupo constituido por alquilo, alquilo sustituido, alquienilo, alquienilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido, (h) es cero a seis, y (j) es cero a 20. Otros restos separadores específicos tienen las siguientes estructuras: -C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, y -O-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, en las que los valores suscritos tras cada metileno indican el número de metilenos contenidos en la estructura, por ejemplo, (CH₂)₁₋₆ significa que la estructura puede contener 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 metilenos. Adicionalmente, cualquiera de los anteriores restos separadores puede incluir adicionalmente una cadena de oligómero de óxido de etileno que comprende 1 a 20 unidades de monómero de óxido de etileno [es decir, -(CH₂CH₂O)₁₋₂₀]. Esto es, la cadena de oligómero de óxido de etileno se puede producir antes o después del resto separador, y opcionalmente entre dos átomos cualquiera de un resto separador comprendido por dos o más átomos. También, la cadena de oligómero podría no considerarse parte del resto separador si el oligómero es adyacente a un segmento de polímero y representa meramente una extensión del segmento del polímero.

En una o más realizaciones, el reactivo de funcionalización tiene la siguiente estructura:



en la que: X es un grupo reactivo con un grupo hidroxilo o un anión del mismo, o un buen grupo saliente, en una reacción de sustitución nucleófila o de adición nucleófila, R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente entre H o alquilo; m es 0-10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10), preferiblemente 1-3; e Y es un grupo funcional, opcionalmente en forma protegida, y se selecciona preferiblemente entre el grupo constituido por tales como hidrato de aldehído, hidrato de cetona, amida, hidrazina, hidrazida, tiol, ácido carboxílico, ditiopiridina, vinilpiridina, fenol, y oxima.

El grupo reactivo X es preferiblemente un buen grupo saliente, tal como halógeno (por ejemplo, bromo o cloro) o un éster de sulfonato (por ejemplo, p-tolilsulfonilo, metilsulfonilo, trifluorosulfonilo, o trifluoroetilsulfonilo), o un grupo vinilo sustituido o no sustituido. El grupo o grupos sustituyentes unidos a los átomos de carbono del grupo vinilo son normalmente alquilo, alquilo sustituido, alcoxi sustituido, o halógeno.

En una o más realizaciones, X es halógeno, m es 0, e Y es p-tolilsulfonilo, metilsulfonilo, trifluorosulfonilo, o trifluoroetilsulfonilo. Otros reactivos de funcionalización a modo de ejemplo de Fórmula IV incluyen X'-(CR₁R₂)_m-C(O)-O-R_p, CH₂=CY'-(CR₁R₂)_m-C(O)-O-R_p, X'-(CR₁R₂)_m-Z, CH₂=CY'-(CR₁R₂)_m-Z, X'-(CR₁R₂)_m-CN, y CH₂=CY'-(CR₁R₂)_m-CN, en el que X' es Br o Cl, Z es un ortoéster, Y' es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, o alcoxi sustituido, y R_p es alquilo o alquilo sustituido. Si el grupo funcional, Y, del reactivo de funcionalización es una forma protegida, el procedimiento comprende además desproteger el grupo funcional. Por ejemplo, si el grupo Y es un ácido carboxílico protegido (por ejemplo, un ortoéster o un alquil éster), la etapa de desprotección comprende la hidrólisis del grupo protector para formar el ácido carboxílico. Un grupo de ácido carboxílico protegido a modo de ejemplo tiene la estructura -C(O)-O-R_p, en la que R_p es un grupo alquilo o alquilo sustituido. Los ácidos carboxílicos protegidos incluyen; ésteres, tales como éster de metilo, éster de metoximetilo, éster de metiltiometo, éster de tetrahidropirranilo, éster de benciloximetilo, éster de feniácilo, éster de n-ftalimidometilo, éster de 2,2,2-tricloroetilo, éster de 2-haloetilo, éster de 2-(p-toluenosulfonil)etilo, éster de t-butilo, éster de cinnamilo, éster de bencilo, éster de trifenilmetilo, éster de bis(p-nitrofenil)metilo, éster de 9-antrilmetilo, éster de 2-(9,10-dioxo)antrilmetilo, éster de piperonilo, éster de trimetilsililo, éster de t-butildimetilsililo, y éster de S-t-butilo; tiolésteres, tales como metiltiol, etiltiol, feniltiol, p-s-nitrofeniltiol, benciltiol y t-butiltiol; amidatos tales como O-alquil-N-alquilo, O-aril-N-alquilo, O-alquil-N-arilo, O-aril-N-arilo, 1-3-oxazolininas 2-sustituidas, 1-2-(4H)-dihidrooxazinas 2-sustituidas; tioamidatos, tales como S-alquil-N-alquilo, S-aril-N-alquilo, S-alquil-N-arilo, S-aril-N-arilo, 1,3-tiazolininas 2-sustituidas, 1,3-(4H)-1,3-dihidrotiazinas 2-sustituidas; amidas e hidrazinas tales como N,N-dimetilamida, N-7-nitroindolamida, hidrazida, N-fenilhidrazida, N, N'-diisopropilhidrazida.

Si el grupo Y es una amina protegida (por ejemplo, un grupo carbonitrilo), la etapa de desprotección puede comprender reducir el grupo carbonitrilo para formar la amina. Alternativamente, se puede considerar el grupo carbonitrilo como un ácido carboxílico protegido y la desprotección podría implicar la hidrólisis. Las aminas protegidas incluyen: carbamatos tales como 9-fluorenilmetilo, 9-(2-sulfo)fluorenilmetilo, 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetilo, 17-tetrabenz[a,c,g,i]fluorenilmetilo, 2-cloro-3-indenilmetilo, benz[f]inden-3-ilmetilo, 2,7-di-t-butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metilo, 1,1-dioxobenz[b]tiofeno-2-ilmetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-feniletilo, 1-(1-adamantil)-1-metiletilo, 2-cloroetilo, 1,1-dimetil-2-haloetilo, 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilo, 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo, 1-metil-1-(4-bifenil)etilo, 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletilo, 2-(2' y 4'-piridil)etilo, 2,2-bis(4'-nitrofenil)etilo, N-(2-pivaloilamino)-1,1-dimetiletilo, 2-[(2-nitrofenil)ditio]-1-feniletilo, 2-(N,N-diciclohexil-carboxamido)etilo, t-butilo, 1-adamantilo, 2-adamantilo, vinilo, alilo, cinnamilo, 2-3'-piridil-prop-2-enilo, 8-quinolilo, N-hidroxipiperidinilo, alquilditio, p-metoxibencilo, p-nitrobencilo, p-clorobencilo, 2,4-diclorobencilo, 4-metilsulfonilbencilo, 9-antrilmetilo, difenilmetilo, 2-metiltioetilo, 3-metilsulfoniletilo, 2-(p-toluenosulfonil)etilo, [2-(1,3-ditianil)]metilo, 4-metiltiofenilo, 2,4-dimetiltiofenilo, 2-fosfonioetilo, 1-metil-1-(trifenilfosfonio)etilo, [2-(1,3-ditianil)]metilo, 4-metiltiofenilo, 2,4-dimetiltiofenilo, 2-fosfonioetilo, 1-metil-1-(trifenilfosfonio)etilo, 1,1-dimetil-2-cianoetilo, 2-dansiletilo, 2-(4-nitrofenil)etilo, 4-fenilacetoxibencilo, 4-azidobencilo, 4-azidometoxibencilo, m-cloro-p-aciloxibencilo, p-(dihidroxiboril)bencilo, 5-bencisoxazolilmetilo, 2-(trifluorometil)-6-cromonilmetilo, m-nitrofenilo, 2,5-dimetoxibencilo, 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etilo, α-metilnitropiperonilo, o-nitrobencilo, y 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilo; derivados de tipo urea tales como derivado de fenotiazinil-(10)-carbonilo, N'-p-toluenosulfonilaminocarbonilo, N'-fenilaminotiocarbonilo; amidas tales como N-formilo, N-cloroacetilo, N-tricloroacetilo, N-trifluoroacetilo,

N-fenilacetilo, N-3-fenilpropionilo, N-4-pentenoilo, N-picolinoilo, N-3-piridilcarboxamido, derivado de N-benzoil-fenilalanilo, N-p-fenilbenzoilo, N-o-nitrofenilacetilo, N-o-nitrofenoxiacetilo, N-3-(o-nitrofenil)propionilo, N-2-metil-2-(o-nitrofenoxi)propionilo, N-3-metil-3-nitrobutirilo, N-o-nitrocinnamoilo, N-o-nitrobenzoilo, N-3-(4-t-butil-2,6-dinitrofenil)2,2-dimetilpropionilo, N-o-(benzoiloximetil)benzoilo, N-2-metil-2-o-fenilazofenoxi)propionilo, N-4-clorobutirilo, N-acetoacetilo, N-3-(p-hidroxifenil)propionilo, (N'-ditiobenciloxicarbonilamino)acetilo, derivado de N-acetilmetionina, y 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona; derivados cíclicos de imida tales como N-ftaloilo, N-tetracloroftaloilo, N-4-nitroftaloilo, N-ditiasuccinoilo, N-2,3-difenilmaleoilo, N-2,5-dimetilpirrolilo, N-2,5-bis(triisopropilsiloxi)pirrolilo, N-2,5-bis(triisopropilsiloxi)pirrolilo, aducto de N-1,1,4,4-tetrametildisilazaciclopentano, N-1,1,3,3-tetrametil-1,3-disilaisoindolilo, 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 3,5-dinitro-4-piridonil 1 sustituido, 1,3,5-dioxazinilo. Estos y otros grupos protectores se describen en detalle en Greene y col, *más arriba*.

Según se ha señalado anteriormente, en una o más realizaciones, los grupos hidroxilo del poliol, o alguna de sus fracciones, se convierten a un buen grupo saliente antes de la reacción con el reactivo de funcionalización. Por ejemplo, se pueden convertir los grupos hidroxilo a un grupo saliente de estructura -Z, en el que Z es halógeno o un éster de sulfonato, haciendo reaccionar el poliol con un reactivo que tiene, por ejemplo, la estructura X'-SO₂-R₃, en la que R₃ es alquilo o alquilo sustituido y X' es Br o Cl. Los grupos R₃ preferidos incluyen p-tolilo, metilo, trifluorometilo, y trifluoroetilo. En esta realización, la conversión de los grupos hidroxilo a buenos grupos salientes puede servir como etapa de control usada para producir la disparidad deseada en la concentración entre el producto polimérico monosustituido y la especie polimérica multisustituida. Por ejemplo, la reacción para convertir los grupos hidroxilo a buenos grupos salientes se puede llevar a cabo en condiciones eficaces para formar no más de aproximadamente un 25 por ciento del polímero disustituido (es decir, la especie polimérica que tiene dos grupos hidroxilo convertidos en grupos salientes) y normalmente no más de aproximadamente un 12 por ciento del polímero disustituido. En algunas realizaciones, no más de aproximadamente un 8 por ciento, preferiblemente no más de aproximadamente un 5 por ciento, más preferiblemente, no más de aproximadamente un 2 por ciento, y lo más preferible, no se forma más de aproximadamente un 1 por ciento del polímero disustituido. La reacción que convierte los grupos hidroxilo en grupos salientes da como resultado normalmente una relación de polímero monosustituido a polímero disustituido de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 40:1, preferiblemente aproximadamente 4:1 a aproximadamente 20:1, más preferiblemente aproximadamente 10:1 a aproximadamente 18:1.

D. Etapa opcional de alquilación

Si se desea un polímero monofuncional bloqueado en el extremo, el procedimiento puede incluir una etapa de alquilación, tanto antes, como después de la reacción de funcionalización anteriormente descrita. Preferiblemente, la etapa de alquilación se produce después de la reacción de funcionalización de tal manera que se deja llegar la finalización sin necesidad de controlar la reacción estequiométricamente según se describe más completamente a continuación. Normalmente, la etapa de alquilación se producirá antes de que se necesite cualquier etapa de desprotección.

Si se lleva a cabo la etapa de alquilación antes de la reacción de funcionalización, a continuación, la reacción de alquilación llega a ser la etapa controladora de la reacción que determina la relación de los productos de polímero monosustituido a polímero disustituido. En esta realización, el material de partida de poliol se somete a una etapa de alquilación, formando de esta manera una mezcla que comprende un polímero no alquilado, un polímero monoalquilado que comprende un único grupo alcoxi, y un polímero dialquilado que comprende dos grupos alcoxi, en condiciones eficaces para formar al menos aproximadamente un 25 por ciento en moles del polímero dialquilado. A continuación se hace reaccionar esta mezcla polimérica con un reactivo de funcionalización según se ha descrito anteriormente para formar una mezcla que comprende un polímero no alquilado que comprende dos grupos Y, un polímero monoalquilado que comprende un único grupo Y, y un polímero dialquilado que no comprende grupos Y. A continuación se puede purificar esta mezcla polimérica para proporcionar un polímero monoalquilado monofuncional sustancialmente libre de especies poliméricas no alquiladas y dialquiladas. En algunas realizaciones, se deja proceder la reacción de alquilación hasta que se produce al menos aproximadamente un 25 por ciento en moles de polímero dialquilado, preferiblemente al menos aproximadamente 65 por ciento en moles, más preferiblemente al menos aproximadamente 40 por ciento en moles, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90 por ciento en moles.

La etapa de alquilación convierte los grupos hidroxilo en grupos alcoxi de fórmula -OR', en la que R' es un grupo alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C₁-C₂₀, alquilo C₁-C₂₀ sustituido, alquilenilo C₁-C₂₀ arilo, alquilenilo C₁-C₂₀ arilo sustituido. Los grupos R' preferidos incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, y bencilo.

Preferiblemente, la reacción de alquilación comprende tratar el poliol polimérico (si se produce la etapa de alquilación antes de la funcionalización) o la mezcla polimérica (si se produce la etapa de alquilación después de la funcionalización), con cualquier agente alquilante conocido en la técnica, tal como dialquilsulfato, alquil sulfonatos (tales como alquil p-toluenosulfonato, alquil metanosulfonato, alquil trifluorometilsulfonato, y alquil trifluoroetilsulfonato), diazoalcano, haluro de alquilo, N,N'-dimetilformamida dialquil acetal, 3-alquil-1-p-toliltriазeno, hidróxido de trimetilanilinio, fluoroborato de trialquilo, hexafluorofosfonato de trimetilsulfonio, o tricloroacetimidato de alquilo.

D. Esquemas de reacción a modo de ejemplo

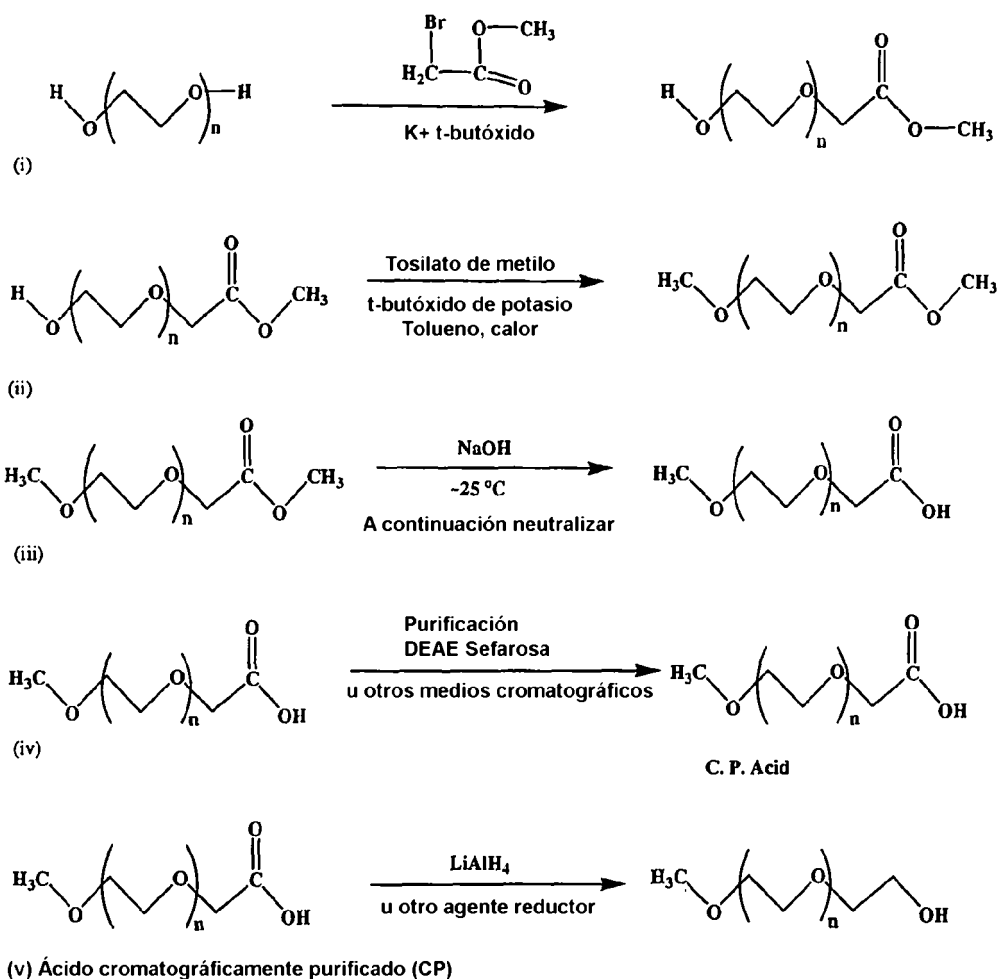
Para ilustrar adicionalmente algunas reacciones, se proporcionan a continuación los esquemas de reacción a modo de ejemplo. Se entiende que estos esquemas son representativos; se proporcionan detalles de las siguientes transformaciones y purificaciones particulares en la sección de Ejemplos. Se pueden extender los esquemas proporcionados a continuación a cualquiera de los polímeros, reactivos de funcionalización, grupos salientes, grupos protectores, y los modos de purificación descritos en el presente documento.

El Esquema I demuestra el uso de PEG diol como material de partida (más bien que mPEG) para preparar un mPEG monofuncional. La introducción de un grupo ionizable, en este caso un carboxilo, vuelve el material de PEG adecuado para una separación cromatográfica por intercambio iónico según se describe en detalle en el presente documento, para proporcionar mPEG monofuncional que está esencialmente libre de impurezas de diol y derivados de diol.

Hablando de manera general, los polímeros monofuncionalizados purificados, bloqueados o no en el extremo, contienen menos de un 3% en peso de un polímero difuncional.

El material monofuncionalizado de mPEG purificado, dependiendo de la naturaleza del grupo funcional, es de una pureza adecuada para la conjugación con una proteína, pequeña molécula, superficie, o similar, o para cualquier otra aplicación farmacéutica, o puede ser funcionalizado además para preparar un reactivo polimérico deseado.

Esquema I



En el Esquema I, se usa PEG diol como material de partida. En (i), el PEG diol está funcionalizado usando un agente de funcionalización a modo de ejemplo, metil éster del ácido bromo-acético. El reactivo de funcionalización

reacciona con la forma aniónica del PEG diol para desplazar el halógeno, y formar el metil éster de metileno correspondiente. Según se ilustra en el Esquema I(i), uno de los grupos de PEG hidroxilo se convierte al metil éster de metileno correspondiente. Aunque se muestra como un sencillo esquema de reacción en el que únicamente un extremo del polímero está funcionalizado, según se ha descrito con mayor detalle en el presente documento, el producto de la reacción de funcionalización es realmente una mezcla del material de partida de PEG diol no sustituido, el producto de PEG-OH monosustituido deseado, y el éster de PEG disustituido. Se puede vigilar el progreso de la reacción para asegurar que la reacción se detiene o se detiene rápidamente en el momento deseado, aunque usando una cantidad conocida de materiales de partida y una cantidad limitada del reactivo de funcionalización se detendrá la reacción automáticamente como resultado del agotamiento del reactivo de funcionalización. De nuevo, la experimentación rutinaria proporcionará la cantidad de reactivo de funcionalización que da como resultado las cantidades deseadas de productos.

Con referencia a la Figura 1, se puede observar que la formación de un 25% de producto monosustituido corresponde a aproximadamente un 72% de PEG diol sin reaccionar y a aproximadamente un 3% de producto disustituido. Tras la formación de un 50% de producto de PEG monosustituido (la cantidad máxima de producto monosustituido que se puede formar a partir del material de partida de diol), la mezcla de producto bruto contiene un 25% de cada producto de PEG diol y de PEG disustituido. La Figura 1 demuestra también que como la cantidad de producto de PEG disustituido en la mezcla de reacción excede un 25%, la cantidad de producto monosustituido disminuye concomitantemente. De esta manera, la reacción finaliza (por ejemplo, como resultado del agotamiento del reactivo de funcionalización) o se detiene rápidamente tras la formación de un 25% o menos de producto disustituido. Se puede vigilar el progreso de la reacción usando una cualquiera de numerosas técnicas analíticas, tales como RMN ^1H o HPLC.

Volviendo al Esquema I, en I(ii), la hidrólisis en la mezcla de PEG procedente de I(i), concretamente aquella presente en el material de partida de PEG diol y el producto monosustituido, se metilan con un grupo protector, por ejemplo, tosilato o cualquier otro grupo protector adecuado, seguido por la conversión del grupo funcional, en este caso un metil éster, a un grupo ionizable, $-\text{COOH}$, designado generalmente en el presente documento como Y. Se prefiere el uso de metilo como grupo alquilante cuando se desean materiales funcionales de mPEG. En este momento, la mezcla de reacción contiene dimetoxi PEG neutro (resultante de la etapa de alquilación), mPEG monofuncional, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{COOH}$ (denominado también como “carboximetil ácido de mPEG”), y PEG difuncional, $\text{HOOCCH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_2\text{COOH}$, (denominado también como “bis-carboximetil PEG”) A continuación se purifica la mezcla para eliminar el PEG neutro, que nominalmente es dimetoxi PEG pero con impurezas neutras tales como PEG diol o mPEG-OH y PEG difuncional. Aunque se puede emplear cualquiera de numerosas técnicas de purificación adecuadas, generalmente, se prefiere la cromatografía, y en particular, la cromatografía de intercambio iónico. La separación de PEG diol (opcionalmente en su forma alquilada, denominada normalmente en el presente documento como PEG neutro) y de PEG disustituido (denominado también en el presente documento como PEG difuncional) a partir del material monofuncional deseado se lleva a cabo preferiblemente de una manera secuencial.

En el Esquema I, el ácido purificado se reduce a continuación al alcohol correspondiente para proporcionar mPEG-OH que es extremadamente puro, es decir, que, en algunos casos contiene menos de un 1% de diol. Aunque se muestra como agente reductor el hidruro de aluminio litio, se puede usar cualquier agente reductor adecuado. Los ejemplos incluyen borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, H_2 /paladio, trietilborohidruro de litio, HI, metales alcalinos en amoníaco líquido, y cinc con ácido o base. En algunos casos, la cantidad de diol o de material difuncional presente en el material purificado está por debajo de los límites habituales de detección. Aunque el Esquema I ilustra la reducción del ácido carboxílico al alcohol correspondiente para proporcionar mPEG-OH de pureza ultra alta, se entiende que esta transformación es ilustrativa, y que se puede llevar a cabo cualquiera de las numerosas transformaciones alternativas posteriores del polímero ácido.

El Esquema I puede referirse también a cuando se considera este aspecto de la invención más generalmente. Más aún, las descripciones detalladas de las variables y los ejemplos de las mismas se pueden extender a cada aspecto del procedimiento al cual se aplican. Por ejemplo, se puede usar cualquier polímero no peptídico soluble en agua en lugar de PEG. Dicho polímero se representa generalmente como HO-POLI-OH, en el que POLI es la porción de polímero no peptídico y soluble en agua de la molécula. Aunque no se muestra en el Esquema I, el procedimiento puede incluir opcionalmente una etapa en la que los grupos hidroxilo en el diol polimérico se convierten a un mejor grupo saliente, Z.

Los grupos salientes incluyen halógenos tales como yoduro, bromuro, y cloruro, así como ésteres de sulfonato, $-\text{N}_2^+$. Los grupos salientes preferidos son los grupos que son mejores grupos salientes que $-\text{OH}$. Según se ha descrito anteriormente para la metilación de PEG en la Figura 1, la conversión a un mejor grupo saliente produce una mezcla de productos, sin reaccionar, material de partida de diol polimérico no sustituido, polímero monosustituido que tiene un único grupo Z, HO-POLI-Z; polímero disustituido que comprende dos grupos Z, Z-POLI-Z. De nuevo, dichas transformaciones se llevan a cabo normalmente en condiciones eficaces para formar no más de aproximadamente un 25% del polímero disustituido.

En una etapa posterior, se hace reaccionar el diol polimérico (o la mezcla del polímero producida en una etapa precedente opcional par convertir los hidroxilos en grupos salientes), en una o más etapas de reacción, con un reactivo de funcionalización. El reactivo de funcionalización reacciona con el polímero en una reacción de sustitución

nucleófila o de adición nucleófila. El reactivo de funcionalización es útil para introducir en el polímero un grupo funcional, lo más preferible, un grupo ionizable, o un precursor de un grupo ionizable, o un grupo ionizable en forma protegida.

5 En una o más realizaciones particulares, el reactivo de funcionalización comprende la estructura X-L-Y, en la que X es un grupo que permite al reactivo de funcionalización reaccionar con el polímero en una reacción de adición o de sustitución nucleófila. Preferiblemente, X es un grupo que reacciona con un hidroxilo, opcionalmente en forma aniónica, o con un átomo de carbono al cual el hidroxilo se une, o se desplaza mediante un hidroxilo. L es un ligante opcional que se interpone entre X e Y. L_0 indica la ausencia de un ligante y L_1 indica la presencia de un ligante, y L comprende ambos. Preferiblemente L es estable frente a la hidrólisis, y esta constituido por átomo o grupos de átomos no reactivos y cada uno de los restos descritos anteriormente con respecto al resto separador descrito anteriormente puede ser un L.

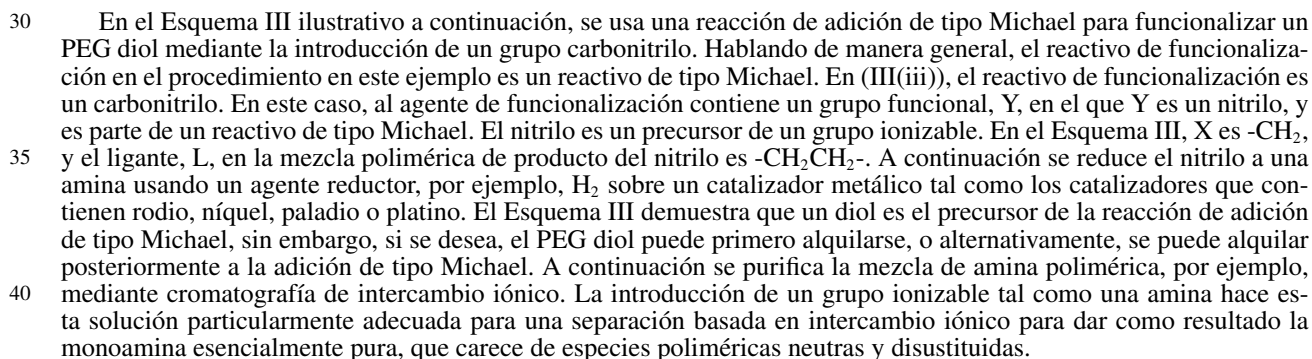
15 En una o más realizaciones, L tiene una estructura $-(CR_1R_2)_m-$, en la que R_1 , en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado entre el grupo constituido por alquilo, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, y arilo sustituido; y R_2 , en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado entre el grupo constituido por alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, y arilo sustituido, y m varía entre 0-15. Por ejemplo, m puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15. En una o más realizaciones, R_1 y R_2 son cada uno independientemente H o alquilo, y m varía entre 0-10. Normalmente, el grupo alquilo es un alquilo inferior de cadena lineal o un alquilo inferior ramificado tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, etc, prefiriéndose generalmente una cadena lineal. Un sustituyente de alquilo particularmente preferido es metilo. En una o más de sus realizaciones, R_1 y R_2 son cada uno independientemente H o alquilo inferior. En una o más realizaciones más adicionales, R_1 y R_2 son cada uno H, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10. Adicionalmente, L puede ser $-(CR_1R_2)_m-$ en el que R_1 en el carbono próximo a Y es alquilo, y en todos los otros casos, R_1 y R_2 son H. En una realización particular de la anterior, R_1 es metilo o etilo o propilo. Alternativamente, L es $-(CR_1R_2)_m-$ en el que R_1 en el carbono beta de Y es alquilo, preferiblemente metilo o etilo o propilo de isopropilo, y en todos los otros casos, R_1 y R_2 son H. Aunque cualquiera de los restos separadores a modo de ejemplo descritos más arriba puede ser un resto L, los restos L preferidos en algunas realizaciones poseen una estructura seleccionada entre $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH(CH_2CH_3)-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-O-CH_2-$, $-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-$, $-OCH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH-O-$, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-OCH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$.

35 Preferiblemente, Y es un grupo funcional ionizable los grupos funcionales ionizables son particularmente muy adecuados para las purificaciones cromatográficas y se pueden explotar como un medio para separar especies poliméricas no sustituidas, monosustituidas, y disustituidas contenidas en una mezcla. Se realizan idealmente cantidades relativas de las diversas especies poliméricas mediante las diversas transformaciones, formando por tanto una mezcla que comprende un polímero neutro de fórmula HO-POLI-OH, un polímero monosustituido de fórmula HO-POLI-L-Y, y un polímero disustituido de fórmula Y-L-POLI-L-Y, en el que idealmente no está presente más de aproximadamente un 25 por ciento de la especie polimérica disustituida en relación con las otras especies poliméricas.

45 Opcionalmente, el procedimiento puede comprender además la alquilación de la mezcla polimérica producida tanto en la primera como en la segunda etapa para convertir los restantes grupos hidroxilo en grupos alcoxi. A partir de entonces, se puede purificar la mezcla polimérica resultante usando, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico, para proporcionar un polímero monosustituido sustancialmente puro que comprende un único grupo -L-Y, y en el caso en el que se ha llevado a cabo una alquilación, para proporcionar un polímero monosustituido metoxi terminado sustancialmente puro.

50 El Esquema II proporciona otra realización representativa del procedimiento. En el Esquema II, PEG diol se metila en primer lugar para proporcionar una mezcla polimérica según se ha descrito anteriormente (II(i)). A continuación se hace reaccionar la mezcla polimérica alquilada con un agente de funcionalización, en este caso, 1-(3-bromo-propil)-4-metil-2,6,7-trioxa-biciclo[2.2.2]octano (II(ii)). Según se puede observar, el agente de funcionalización posee un grupo, en este caso, Br^- , que se desplaza mediante el contra anión del hidróxido. El Br^- es un ejemplo de la variable, X. El agente de funcionalización contiene también Y, en este caso un ácido carboxílico protegido.

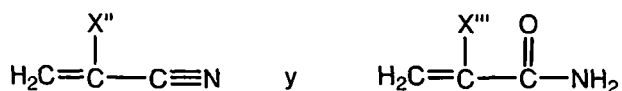
60 Específicamente, Y es un ortoéster, 4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2.]octano, pero puede ser cualquier grupo protector de carboxilo. La porción ligante, L, en el agente de funcionalización, es $-(CH_2)_2-$. A continuación se elimina el grupo protector, en este ejemplo, mediante hidrólisis, para producir un PEG de ácido carboxílico (II(iii)). Según se ha descrito anteriormente, aunque se muestra como el mPEG-ácido, el mPEG ácido está realmente presente en una mezcla que comprende PEG neutro, dimetoxi PEG, el mPEG-ácido monofuncional deseado, así como el material difuncional, $HOOC-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2COOH$. El PEG de ácido carboxílico monofuncional se purifica a continuación, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico. Se puede modificar también el Esquema II para llevar a cabo la etapa de alquilación tras la introducción del ortoéster (es decir, tras la reacción con el reactivo de funcionalización).



Esquema III



Se pueden sustituir otros reactivos de tipo Michael por el carbonitrilo que se muestra en el Esquema III. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes reactivos de tipo Michael,

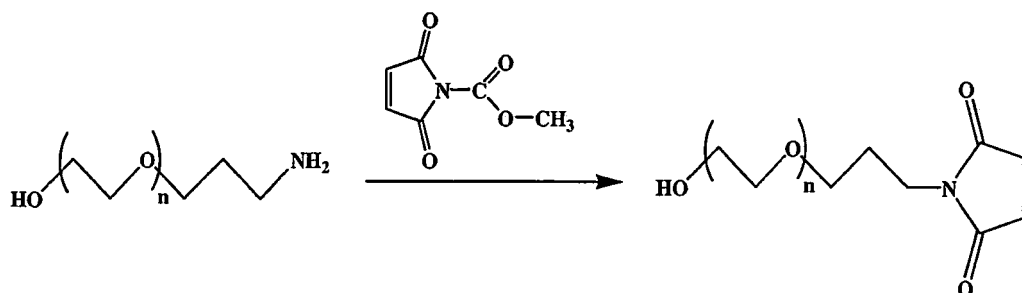


en el que X'' es halo o alquilo y X''' es H, halo, o alquilo.

Se puede usar la amina CP que se muestra en el Esquema III para preparar una variedad de derivados heterobifuncionales mediante la funcionalización adicional tanto del grupo amino terminal como del -OH terminal. Más aún, usando un material cromatográficamente purificado tal como la amina CP, cualquiera de dicho polímero heterobifuncional preparado a partir del mismo estará esencialmente libre de contaminantes poliméricos tal como las especies poliméricas neutras y disustituidas descritas en el presente documento.

Se proporciona uno de dichos esquemas de reacción representativos como el Esquema IV a continuación. En el Esquema IV, la amina CP procedente del Esquema III se convierte en una maleimida mediante la transformación del grupo amino. Esta solución sintética es ventajosa debido a que los polímeros terminados en maleimida son particularmente útiles para la conjugación con restos que contienen tiol, tales como las cisteínas en proteínas. Más aún, el polímero terminado en maleimida amino heterobifuncional se puede transformar adicionalmente a continuación, si se desea, mediante funcionalización adicional en el extremo hidroxilo.

Esquema IV



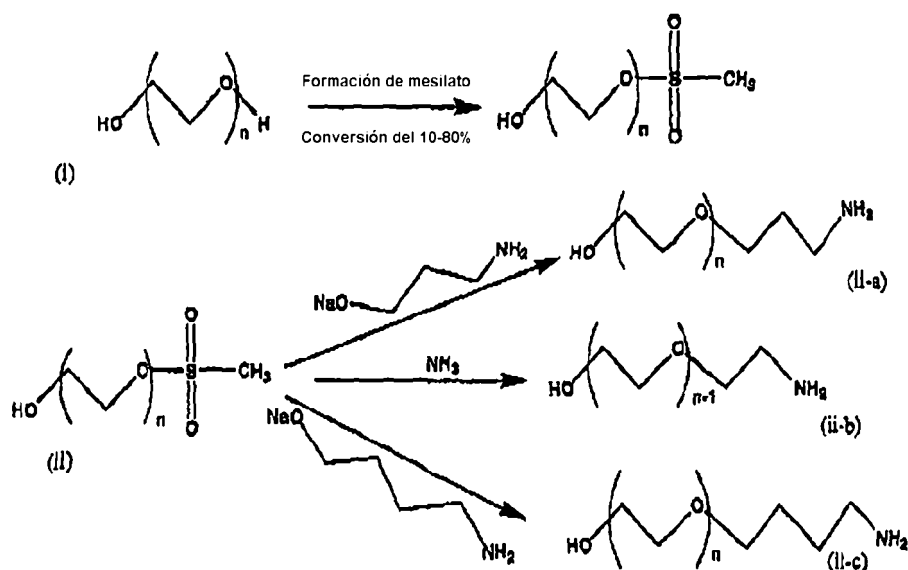
En el Esquema IV, la amina CP se convierte en la maleimida mediante reacción con el metil éster del ácido N-metoxycarbonilmaleimida 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-carboxílico. Se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 6.602.498 los derivados poliméricos de maleimidilo adicionales que se pueden preparar a partir de los materiales de partida cromatográficamente purificados descritos en el presente documento, así como los procedimientos que pueden usar los materiales de partida cromatográficamente purificados. Se puede emplear esta solución de la reacción con cualquier amina polimérica cromatográficamente purificada preparada mediante los procedimientos descritos en el presente documento. De nuevo, como con todos los esquemas ilustrativos en el presente documento, el esquema a continuación es aplicable a cualquiera de los polímeros descritos en el presente documento, reactivos de funcionalización y polímeros monofuncionales purificados.

En el Esquema IV (así como en cada uno de los Esquemas I, II, III y V), (n) es un entero positivo, normalmente en al menos uno de los siguientes intervalos: entre 2 y 3.000, entre 10 y 2.000; y entre 100 y 1000. Adicionalmente, cada hidrógeno de los grupos hidroxilo que se muestra en el Esquema IV puede opcionalmente ser un radical orgánico, normalmente un alquilo (tal como un alquilo inferior) incluyendo bencilo. El polímero terminado en amina en el esquema IV es un material de partida útil para formar el reactivo polimérico que soporta un grupo maleimídico terminal (según se muestra en el Esquema IV) que se puede usar, por ejemplo, en una reacción de conjugación con una proteína biológicamente activa.

El Esquema V representa otra realización más particular del procedimiento. Generalmente, los hidroxilos en un diol polimérico (o en un alcohol polimérico bloqueado en el extremo) se transforman en primer lugar en un mejor grupo saliente. Un grupo saliente a modo de ejemplo que se muestra aquí es mesilato o metanosulfonilo, aunque se puede usar cualquier grupo saliente adecuado. En la primera etapa de esta solución, se mantiene preferiblemente la conversión a aproximadamente un 20% con el fin de reducir en último término la cantidad de amina difuncional formada. De nuevo, aunque se muestra una única especie polimérica monofuncionalizada en V(i), el polímero monofuncionalizado está realmente presente en una mezcla de reacción que contiene material de partida sin reaccionar y

dimesilato polimérico. El mesilato polimérico, HP-POLI-MS, se puede hacer reaccionar a continuación mediante una reacción de sustitución nucleófila, de tal manera que el grupo -Oms en el polímero se desplaza. En la reacción V (ii-a), se puede describir generalmente el reactivo de funcionalización como X-L-Y, en el que X es -O, L es $-(CH_2)_3-$ e Y es $-NH_2$. En la reacción V(ii-b), el reactivo de funcionalización es amoníaco, que de nuevo actúa para desplazar -Oms. La tercera reacción V(ii-c) ilustra un reactivo de funcionalización que tiene un ligante de cuatro carbonos más bien que un ligante de tres carbonos como en V(ii-a). Cada una de estas mezclas de reacción es particularmente adecuada para la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico según se describe en el presente documento, para proporcionar polímero monofuncionalizados monosustituídos esencialmente puros. Se pueden usar estos polímeros directamente, por ejemplo, para preparar agentes activos funcionalizados, hidrogeles, o cualquier otra de dichas aplicaciones adecuada, o puede funcionalizarse adicionalmente según se ha descrito anteriormente.

Esquema V



B. Etapa de purificación

El procedimiento de funcionalizar un material de partida de diol o poliol polimérico da como resultado una mezcla de productos, incluyendo un polímero monosustituído y una o más especies poliméricas multisustituídas (por ejemplo, un polímero disustituído). De esta manera, con el fin de hacer el procedimiento de la mayor utilidad práctica, el producto de la mezcla polimérica se purifica para separar el polímero monosustituído del polímero di o multisustituído, así como de cualquier diol, poliol polimérico u otra especie polimérica neutra sin reaccionar restante. Se puede usar cualquiera de numerosas técnicas de purificación.

En una realización preferida, en particular cuando la mezcla polimérica contiene especies poliméricas que tienen grupos funcionales ionizables, se emplea la cromatografía de intercambio iónico para separar los diversos constituyentes poliméricos de la mezcla de producto basándose en sus diferencias en la carga.

Se describe en el presente documento una solución mejorada de cromatografía de intercambio iónico que supera los problemas asociados con la otra comúnmente empleada, por ejemplo, el gradiente, los procedimientos de intercambio iónico usados para separar los polímeros. Este procedimiento se denomina como cromatografía de elución polimérica por gradiente, y difiere del procedimiento en muchos aspectos.

La cromatografía basada en gradiente implica cambiar la fuerza iónica de la fase móvil o eluyente para impulsar moléculas diferentemente cargadas fuera de una columna de intercambio iónico a diferentes intervalos. Generalmente, en una cromatografía en gradiente, se aplica un gradiente que cambia de un disolvente con fuerza de elución mala o baja a un disolvente con fuerza de elución buena o alta, basándose en la afinidad relativa de la columna frente a la fase móvil para un polímero particular.

En una separación por gradiente típica, se aplica una muestra a una columna y se emplea un disolvente con fuerza de elución baja, de tal manera que no se permite inicialmente que se produzca ninguna separación. Más bien, los componentes de la mezcla se recogen en la parte superior de la columna, en una etapa de concentración. A continuación se hace progresar el gradiente y se aumenta gradualmente la fuerza iónica del disolvente hasta que se alcanzan condiciones "buenas" o altas de fuerza de elución del disolvente de tal manera que los componentes de la muestra

comienzan su separación y comienzan a migrar. Las sustancias cargadas se separan mediante los materiales de la columna que transportan una carga opuesta. Las especies con mayor carga se unen a una columna de intercambio iónico más fuertemente, mientras que las especies con menos carga eluyen más rápidamente. La fuerza del eluyente se altera normalmente cambiando el pH, el tampón, y/o la concentración de sal (fuerza iónica). Las técnicas que se basan en la separación por gradiente son tediosas, consumen tiempo, usan grandes volúmenes de disolvente, y requieren el análisis de múltiples fracciones. De esta manera, los procedimientos de tipo gradiente son muy poco adecuados para procedimientos a escala comercial. Más aún, las técnicas de separación basadas en gradiente consiguen también raramente elevados niveles de pureza de cualquier polímero dado (por ejemplo, en referencia al número de diversas especies poliméricas presentes y a la polidispersabilidad del producto polimérico purificado), particularmente cuando se separan especies poliméricas con mayor peso molecular.

El procedimiento de separación por intercambio iónico proporciona separaciones superiores y la purificación de mezclas poliméricas que contienen aniones o cationes multivalentes. Más específicamente, el procedimiento es muy adecuado para las mezclas poliméricas que contienen sustancias no cargadas y cargadas que difieren en la carga, por ejemplo, el polímero que no está cargado, cargado únicamente, cargado doblemente, cargado triplemente, y así sucesivamente (es decir, dos o más especies que tienen grupos ionizables que bajo ciertas condiciones de pH, transportan diferentes cargas). Uno de dichos ejemplos es una mezcla polimérica que contiene un polímero neutro (es decir, un diol o poliol polimérico o un polímero mono o dialquilado que carece de un grupo funcional ionizable), un polímero monosustituido que tiene un único grupo ionizable, tal como un grupo amina o de ácido carboxílico, y un polímero di o multisustituido que tiene dos o más grupos funcionales ionizables. Se consigue la separación basándose en las diferencias en la carga, y, en algunas realizaciones, en las diferencias en el peso molecular. Más bien que eluyendo especies que tienen diferentes cargas a partir de una única columna (o numerosas separaciones cromatográficas en una única columna) cambiando la fuerza iónica del eluato por etapas, en forma de gradiente, el presente procedimiento implica el uso de columnas discretas y eluatos discretos. Generalmente, se usa un disolvente que tiene una concentración constante o estática a medida que se alimenta en una columna. Es decir, la alimentación de disolvente a medida que entra en la columna, es de composición constante, sin gradiente. La fuerza iónica y/o el pH del disolvente se ajustan para acomodarse a la especie polimérica que se está eluyendo de la columna.

Específicamente, el procedimiento implica el uso de más de una columna de intercambio iónico para conseguir polímeros monosustituidos de pureza ultra alta, por ejemplo, que contengan normalmente menos de un 0,3% en peso de impurezas poliméricas difuncionalizadas o multifuncionalizadas.

La primera columna(s) o la precolumna(s) se dimensionan para desorber sustancialmente todo, y lo más preferible, todo, de las especies poliméricas disustituidas y otras especies poliméricas multisustituidas que están presentes en una mezcla polimérica. Normalmente, la determinación de un tamaño apropiado para la primera columna(s) o precolumna(s) implica la etapa de establecer la capacidad de la columna. La capacidad de la columna se determina experimentalmente e implica normalmente pasar una disolución que contiene una cantidad en exceso de disolución normalizada de un tipo de especie de polímero [por ejemplo, una disolución de $\text{HO}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ó $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$] conocido por adsorber la fase estacionaria. Se añade este patrón con el fin de saturar la columna, verificada a menudo detectando la especie polimérica en el eluato recuperado de la columna. A continuación, cualquier especie no adsorbida se extrae mediante lavado de la columna, pasando normalmente agua destilada a través de la columna. A continuación, se eluyen todas las especies poliméricas adsorbidas en la columna (generalmente mediante el paso de una disolución salina), se extraen con disolvente orgánico y a continuación se pesan tras la eliminación del disolvente. Esta cantidad corresponde a la capacidad de la columna. En la extensión en la que se proporcionan dos o más columnas en serie, la capacidad global de la columna del sistema es equivalente a las capacidades añadidas de la columna de las columnas individuales.

Habiendo establecido la capacidad de la columna, únicamente se usará una columna(s) suficientemente dimensionada para adsorber sustancialmente todas las especies poliméricas di o multisustituidas (por ejemplo, polímero disustituido, especies poliméricas que comprende dos grupos $-\text{L}_{0,1}-\text{Y}$, o polímero difuncional) deseadas para eliminarse en una etapa inicial de purificación. Una columna está suficientemente dimensionada a este respecto cuando tiene una capacidad de columna mayor de la cantidad de especies poliméricas di o multisustituidas que se van a retener procedentes de una mezcla. Tal como se ha discutido anteriormente, se puede determinar la cantidad de especies poliméricas analizando una muestra de la mezcla, haciendo referencia a la Fig. 1, o a cualquier otro procedimiento conocido.

De esta manera, la capacidad de columna de la precolumna(s) usada en una primera etapa de elución puede ser una o más de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100%, y al menos un 110% de aumento de la cantidad total de las especies poliméricas en la mezcla que se va a purificar. Por ejemplo, con respecto a una primera etapa en un procedimiento para purificar una mezcla que contiene 5 g de polímero disustituido, se puede usar una primera columna de intercambio iónico que tiene capacidad para adsorber 10 g del polímero disustituido (representando por tanto un 100% de aumento de la cantidad total de especies poliméricas difuncionales que se van a adsorber en la primera columna). Adicionalmente, para una mezcla que contiene 25 g de polímero disustituido, se puede usar una primera columna de intercambio iónico que tiene la capacidad de adsorber 35 g del polímero disustituido (representando por tanto un 40% de aumento de la cantidad total de las especies poliméricas que se van a adsorber en la primera columna).

ES 2 341 960 T3

Con respecto a la segunda columna(s) o la columna(s) principal usada en la etapa de purificación, es suficiente tener una capacidad de columna sustancialmente equivalente a la cantidad de polímeros monofuncionales comprendidos dentro de las especies poliméricas que se van a retener procedentes de la mezcla (por ejemplo, polímero monosustituido, especies poliméricas que comprenden uno o más grupos $-L_{0,1}-Y$, o polímero monofuncional). Se puede usar también la segunda o la columna(s) principal que tienen mayores capacidades de columna para evitar cualquier pérdida de polímero(s) monofuncional.

Habiendo identificado las columnas apropiadas, tiene lugar la purificación. Ventajosamente, la mezcla polimérica se equilibra con los medios en fase sólida en la precolumna a medida que la mezcla fluye a través de la columna para dejar que se retenga el material de unión más fuerte (por ejemplo, aquellas especies que soportan el mayor número de cargas a las cuales la columna se dirige).

En una o más realizaciones, se usa una pluralidad de "precolumnas" (por ejemplo, 2, 3, 6 ó 4 precolumnas) conectadas en serie para eliminar las especies poliméricas multisustituidas, dimensionándose la pluralidad de precolumnas para adsorber colectivamente todas las especies poliméricas disustituidas y otras especies poliméricas multisustituidas. Normalmente, se adsorberá también alguna cantidad de especies poliméricas monosustituidas, pero no en una extensión inferior debido a que únicamente se asocian especies ionizadas con las especies poliméricas monosustituidas.

Ventajosamente, el procedimiento de purificación no requiere el uso de una etapa de destilación para concentrar las disoluciones tales como el eluato. Además, el procedimiento de purificación descrito en el presente documento es adecuado para purificar no solo polímeros de pesos moleculares relativamente pequeños (por ejemplo, 2000 Da), sino que se puede usar también para purificar polímeros que tienen pesos moleculares más elevados. De esta manera, el procedimiento de purificación es adecuados para purificar polímeros con pesos moleculares en los siguientes intervalos: entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 180.000 Da; entre aproximadamente 3.000 Da y aproximadamente 120.000 Da; entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 100.000 Da; entre aproximadamente 8.000 Da y aproximadamente 100.000 Da; entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 100.000 Da; entre aproximadamente 12.000 Da y aproximadamente 80.000 Da; y entre aproximadamente 15.000 Da y aproximadamente 80.000 Da. Adicionalmente, el equipo usado en el procedimiento de purificación no se basa en gradientes, reduciendo por tanto la necesidad de obtener muchas fracciones de eluato muy reducidas, lo que, requiere a la vez, una multitud de recipientes de recogida. Además, el presente procedimiento usa sustancialmente menos volúmenes de eluyente en comparación con los procedimientos de la técnica anterior, normalmente en el orden de menos de aproximadamente el 50% del eluyente, preferiblemente menos del 75% del eluyente, más preferiblemente menos de aproximadamente el 85% del eluyente, aún más preferiblemente menos de aproximadamente el 90% del eluyente, prefiriéndose más cantidades de eluyente menores de aproximadamente el 95% en relación con los procedimientos de la técnica anterior.

Consecuentemente, los procedimientos descritos en el presente documento requieren solo un único recipiente de recogida, y no requieren una etapa de destilación para concentrar el eluato para permitir la extracción del producto purificado. Adicionalmente, los equipos descritos en el presente documento no requieren más de un único recipiente de recogida y no requieren medios para la destilación.

El eluato procedente de la primera columna, que contiene el polímero monosustituido y el polímero neutros, se pasa a continuación a través de la segunda (o principal) columna o columnas de intercambio iónico conectadas en serie. El polímero monosustituido se adsorbe en la segunda (o principal) columna(s), que se dimensionan con el fin de retener preferiblemente todo el polímero monosustituido. El polímero neutro pasa a través de todas las columnas y se puede recoger y posiblemente reciclar para la reutilización. Se prefiere generalmente lavar cada columna con una disolución que tenga baja fuerza iónica (por ejemplo, agua desionizada) para eliminar cualquier polímero neutro restante de la anterior.

Las personas normalmente expertas en la técnicas conocen las disoluciones que cumplen el requisito de baja fuerza iónica par cualquier sistema particular. Adicionalmente, se pueden determinar las disoluciones que cumplen el requisito de baja fuerza iónica mediante la experimentación rutinaria pasando una disolución candidata (normal, aunque no necesariamente, una disolución salina muy débil o disolución tamponada) a través de la columna(s) conocida por tener especies poliméricas cargadas y neutras contenidas en la anterior, recogiendo la disolución candidata que ha pasado a través de la columna(s), y ensayando a continuación la disolución recogida para la presencia de cualquier especie polimérica cargada. Una disolución candidata que ha pasado a través de la columna(s) sin o sustancialmente sin (por ejemplo, menos de un 1%) contenido en especies poliméricas cargadas representa una disolución que tiene baja fuerza iónica para este sistema particular.

La recuperación de especies poliméricas cargadas (si son especies poliméricas cargadas únicamente o especies poliméricas cargadas di o múltiplemente) adsorbidas en las columnas de intercambio iónico requiere normalmente la desorción. La desorción implica normalmente pasar la disolución salina que tiene alta fuerza iónica a través de la columna(s), desorbiendo por tanto las especies poliméricas cargadas. Por ejemplo, se puede lavar la segunda (o principal) columna(s) que contiene el polímero monosustituido con una disolución salina que tenga fuerza iónica alta, tal como una disolución de NaCl, para eliminar y recoger un producto polimérico monosustituido sustancialmente puro.

Las personas normalmente expertas en la técnica conocen las disoluciones salinas que tienen el requisito de fuerza iónica alta para cualquier sistema particular. Adicionalmente, se pueden determinar las disoluciones que tienen el requisito de fuerza iónica alta a través de la experimentación rutinaria pasando una disolución candidata a través de la columna(s) que tiene una cantidad conocida de especies poliméricas cargadas adsorbida en la anterior, recogiendo la disolución candidata que ha pasado a través de la columna(s), y ensayando a continuación la disolución recogida por la presencia de especies poliméricas cargadas- una disolución candidata que ha pasado a través de la columna(s) con al menos aproximadamente un 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, y lo más preferible al menos aproximadamente un 99% de la cantidad conocida de especies poliméricas cargadas contenidas en la anterior representa una disolución que tiene suficiente fuerza iónica de tal manera que la disolución desorberá el polímero difuncional a través de la primera columna o la precolumna.

Debido a que las especies poliméricas diferentemente cargadas se han separado mediante adsorción o columnas separadas, no existe necesidad de usar una disolución salina para recuperar cada especie polimérica separadamente. En vez de esto, se puede usar una disolución salina que tenga una fuerza iónica constante para eludir el producto procedente de cada columna.

Si se desea, se pueden recoger también las especies poliméricas multisustituidas absorbidas en la precolumna(s) pasando una disolución salina a través de la precolumna para impulsar la adsorción del polímero. Normalmente, la precolumna(s) se dimensionan de tal manera que aseguren la adsorción de todos los polímeros multisustituidos en la corriente de alimentación, lo que significa que se adsorberá también en la precolumna algún polímero monosustituido. De esta manera, la pureza del eluato del producto multisustituido es normalmente inferior en comparación con el producto monosustituido Eluido procedente de una o más columnas adicionales. Preferiblemente, el producto Eluido procedente de la precolumna(s) contiene no más de aproximadamente un 70 por ciento en peso de polímero monosustituido, más preferiblemente no más de aproximadamente un 50 por ciento en peso, y los más preferible no más de aproximadamente un 30 por ciento en peso. Si el producto Eluido procedente de la precolumna(s) contiene múltiples especies poliméricas multicargadas (por ejemplo, doblemente cargadas y triplemente cargadas), entonces, se puede usar un segundo paso a través del sistema de intercambio iónico para separar adicionalmente la mezcla polimérica reteniendo las especies más cargadas en las precolumnas (por ejemplo, las especies triplemente cargadas) y reteniendo menos especies muy cargadas (por ejemplo, doblemente cargadas) en la segunda columna.

Se puede usar la determinación analítica, usando una columna de HPLC que responda a la carga y al peso molecular, para determinar cuánto de cada especie está presente en una muestra, haciéndolas avanzar a través de la columna antes y después. Por "sustancialmente puro" se entiende que el polímero monosustituido contiene menos de aproximadamente un 5 por ciento en peso del porcentaje de impurezas del polímero, tal como polímero multisustituido o polímero no sustituido (es decir, neutro), preferiblemente, menos de aproximadamente un 3 por ciento en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente un 2 por ciento en peso, y lo más preferible menos de aproximadamente un 1 por ciento en peso. Una composición preferida comprenderá monoetoxi poli(etilenglicol) bloqueado en el extremo ("mPEG-OH"), en la que la composición tiene un contenido de poli(etilenglicol) diol de menos de un 0,3% en peso.

Si se desea estrechar el intervalo del peso molecular (es decir, la polidispersabilidad) del producto polimérico monosustituido, se puede usar una serie de dos o más columnas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 6 10 columnas) tras la precolumna, para atenuar el intervalo del peso molecular del polímero monosustituido adsorbido en cada columna. Se adsorberá primero el polímero monosustituidos de peso molecular más pequeño, lo que significa que aumentará el peso molecular promedio del material polimérico adsorbido en cada columna sucesiva. De esta manera, aumentando el número de columnas, se puede separar no solo el polímero monosustituido de las especies más cargadas, sino también la polidispersabilidad baja. En algunas realizaciones, la polidispersabilidad de polímero monosustituido se reduce en al menos aproximadamente 0,01, preferiblemente al menos aproximadamente 0,02, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,03, y lo más preferible al menos aproximadamente 0,05. En una realización alternativa, si el polímero monosustituido de menor peso molecular es el producto deseado, se pueden infradimensionar la segunda o la columna principal de tal manera que no se pueda adsorber de las anteriores todo el polímero monosustituido. Debido a que las especies con bajo peso molecular se unirán primero selectivamente, se adsorberá en la columna el polímero monosustituido de bajo peso molecular deseado. Adicional o alternativamente, se pueden usar diversas columnas y recoger el polímero monofuncional de bajo peso molecular procedente de la primera columna en la serie de columnas tras la precolumna.

Si la mezcla polimérica original que se somete a funcionalización contiene una cantidad relativamente pequeña de poli(ol), tal como en el caso de un material polimérico de partida que comprende un mPEG impuro (por ejemplo, un mPEG contaminado con menos de aproximadamente un 20% en peso de PEG diol), entonces, la mezcla polimérica resultante que requiere purificación puede contener polímero no neutro o únicamente una cantidad insignificante de polímero neutro si se deja proceder hasta la finalización la reacción de funcionalización. En este caso, el sistema de purificación de intercambio iónico puede comprender sólo una única columna dimensionada para adsorber todas las especies poliméricas multifuncionales (es decir, una precolumna). El eluato procedente de la precolumna contendrá entonces únicamente el producto monofuncional deseado.

Tras la purificación, si se desea, se puede modificar adicionalmente el polímero monosustituido sustancialmente puro para convertir el grupo funcional ionizable en un segundo grupo funcional, tal como hidroxilo, éster activo, carbo-

nato activo, ortoéster, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, cetona, hidrato de cetona, alqueno, acrilato, metacrilato, nitrilo amida primaria o secundaria, imida, acrilamida, sulfona activa, amida, hidrazida, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida, succinimida sustituida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, amidato, 1,3-oxazolina 2 sustituida, 1,3-(4H)-dihidrooxazinas 2-sustituidas, 1,3-tiazolina 2-sustituida, 1,3-(4H)-dihidrotiazinas 2-sustituidas, hidroxilamina, yodoacetamida, epóxido, glioxal, diona, mesilato, tosilato, y tresilato.

Durante el procedimiento de intercambio iónico, se puede vigilar el eluato procedente de cada columna usando las técnicas conocidas en la técnica, tales como midiendo la conductividad del eluato, analizando el eluato mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de elución por tamaño, cromatografía líquida de alto rendimiento, o cromatografía en capa fina, o detectando la presencia de PEG en el eluato tratando una gota de eluato con una gota de ácido poliacrílico al 1% (Aldrich, Mn 250.000) en HCl 1 N ("ensayo PAA"). Se indica la presencia de PEG por la aparición inmediata de un precipitado blanco de complejo de PBO/PAA. Este ensayo es muy específico para el esqueleto de poliéter de PEG y no está influenciado por las modificaciones en el extremo del grupo del polímero, el peso molecular, o la presencia de iones inorgánicos en la disolución analizada.

Según se entendería en la técnica, las columnas de intercambio iónico utilizadas pueden ser columnas de intercambio iónico convencionalmente usadas para separar una mezcla basada en la carga (Ion Exchange Chromatography. Principles and Method. Pharmacia Biotech 1994; "Chromatography: a laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic techniques." Heftman, E (Ed.), Van Nostrand Reinhold Co., Nueva York, 1975). Cada columna comprende unos medios de intercambio iónico y una fase móvil, o eluyente, que pasa a través de los medios de intercambio iónico. Las columnas de intercambio iónico adecuadas para el uso incluyen los medios de intercambio iónico POROS® fabricados por Applied Biosystems y los medios de intercambio iónico SEPHAROSE® fabricados por Pharmacia.

El medio de intercambio iónico, que es normalmente una resina polimérica (por ejemplo, dextrano, agarosa, celulosa, copolímero de estireno-divinilbenceno) que contiene grupos cargados, se selecciona basándose en numerosos factores, que incluyen la carga y el valor de pKa del grupo funcional ionizable presente en los polímeros que se van a separar.

Normalmente, el medio de intercambio iónico se selecciona de tal manera que proporcione una diferencia suficiente en el valor de pKa entre el grupo funcional ionizable y el medio de intercambio iónico para impulsar favorablemente la adsorción del polímero, preferiblemente una diferencia de al menos 4-5 unidades. Según se entendería, el medio de intercambio iónico comprenderá grupos cargados negativamente (es decir, un intercambiador catiónico) si el grupo funcional ionizable está cargado positivamente y comprenderá grupos cargados positivamente (es decir, un intercambiador aniónico) si el grupo funcional ionizable está cargado negativamente.

Los grupos cargados negativamente a modo de ejemplo que se pueden usar incluyen carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP), y metil sulfonato (S). Los grupos cargados positivamente a modo de ejemplo incluyen trietilamonio (TMAE), dietilaminoetil (DEAE), aminoetil cuaternario (QAE), y amonio cuaternario (Q).

Normalmente, el medio en cada columna será el mismo, pero debería usarse un medio diferente en cada columna.

En la Figura 2 se muestra una realización de dos columnas del sistema de intercambio iónico. Según se muestra, el sistema de intercambio iónico 10 comprende un tanque o recipiente de alimentación 12 que contiene un suministro de la disolución de la mezcla polimérica bruta que se va a separar. Normalmente, la mezcla polimérica se disolverá en agua desionizada o una disolución acuosa neutra que tiene muy baja fuerza iónica. Según se ha señalado anteriormente, la mezcla polimérica incluirá a menudo una especie polimérica neutra o no sustituida, tal como un polímero que tiene la estructura HO-POLI-OH o R'O-POLI-OR', un polímero monosustituido de fórmula HO-POLI-L-'Y' o R'O-POLI-L-Y, y un polímero disustituido de fórmula Y-L-POLI-L-Y, en el que Y, R', L y POLI son según se ha definido anteriormente.

El tanque de alimentación 12 está en comunicación fluida con una primera columna o precolumna de intercambio iónico 16 dimensionada para atrapar especies más cargadas (es decir, un polímero disustituido). La salida de la precolumna 16 está en comunicación fluida con la entrada de la segunda columna o principal de intercambio iónico 18, que se dimensiona apropiadamente para retener todas las especies poliméricas monocargadas. La salida de cada columna está en comunicación fluida con uno o más recipientes de recuperación o de recepción del producto 20, adaptado cada recipiente para recibir el eluato procedente de una o más de las columnas. Las disoluciones salinas y las disoluciones neutras usadas para lavar las columnas y/o recuperar las especies poliméricas adsorbidas se pueden alojar en uno o más recipientes del disolvente 22, que están en comunicación fluida con la entrada de una o más de las columnas.

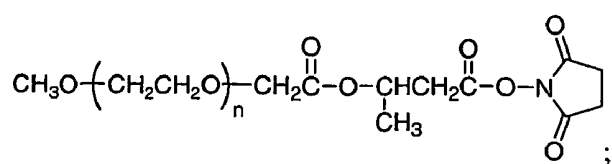
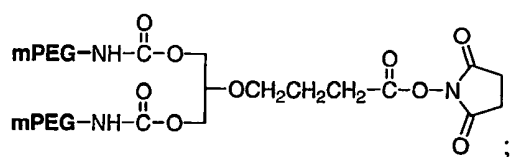
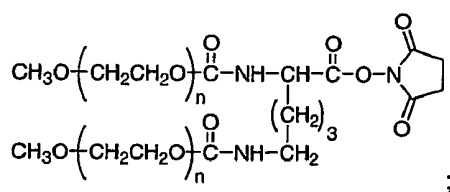
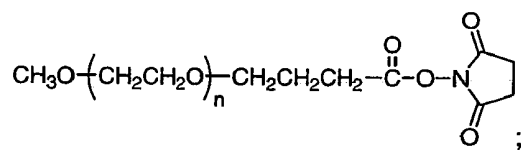
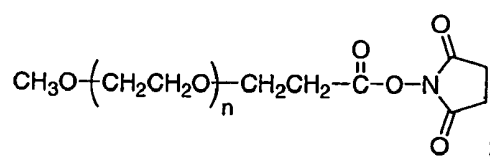
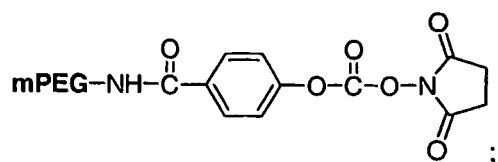
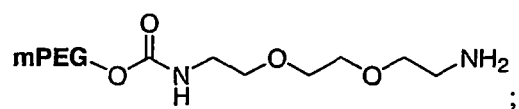
La Figura 3 ilustra una realización que comprende una precolumna 16 y una pluralidad de columnas segunda o principal 18 que se pueden usar para estrechar el intervalo del peso molecular del producto polimérico monosustituido deseado según se ha explicado anteriormente.

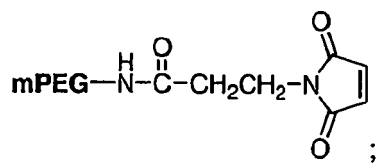
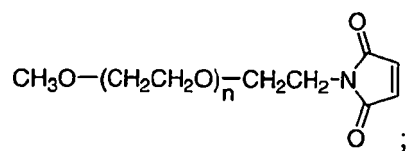
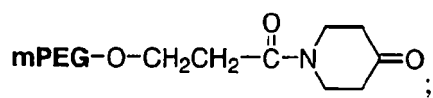
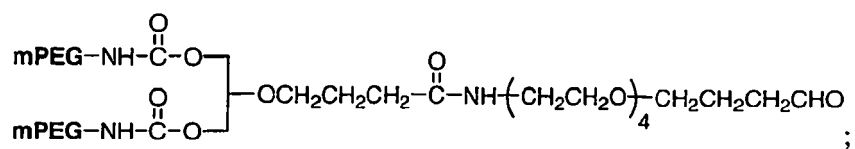
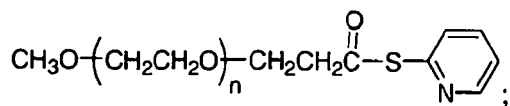
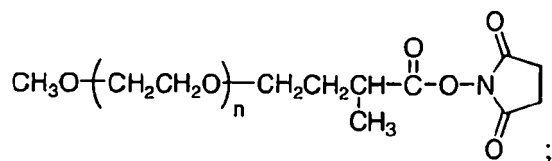
F. Productos a modo de ejemplo

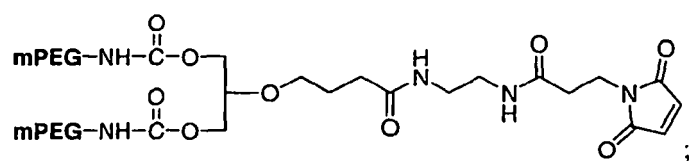
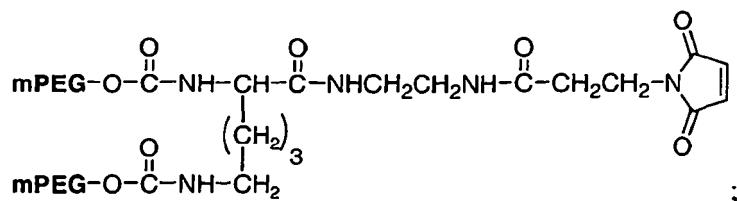
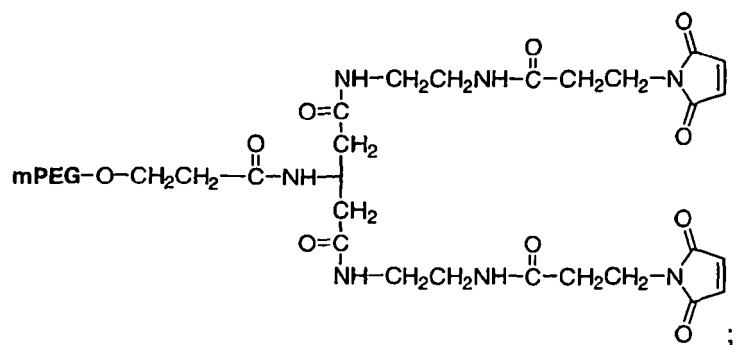
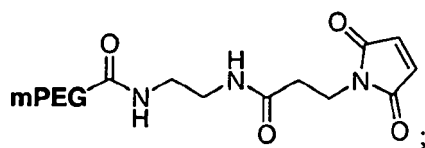
Según se ha discutido anteriormente, se pueden usar los procedimientos descritos en el presente documento en la preparación de reactivos poliméricos sustancialmente puros. Los ejemplos de dichos productos que existen como composiciones sustancialmente puras como poca o ninguna especies de poli(etilenglicol)diol incluyen los siguientes:

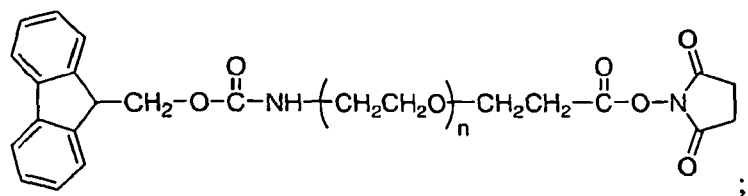
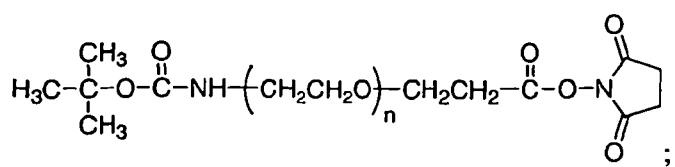
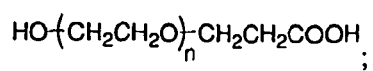
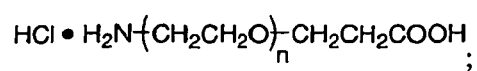
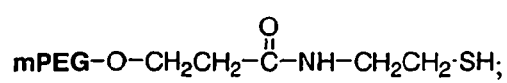
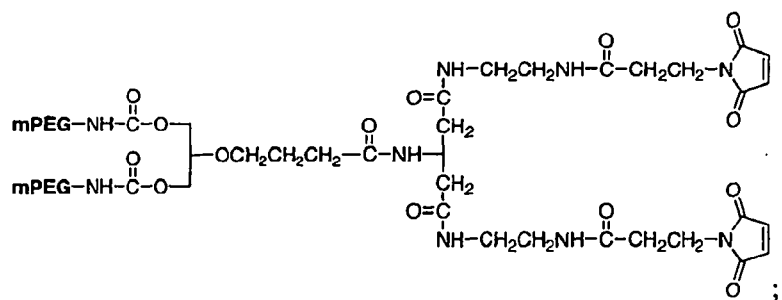
ES 2 341 960 T3

mPEG-NH₂;











60

III. Ejemplos

65

ES 2 341 960 T3

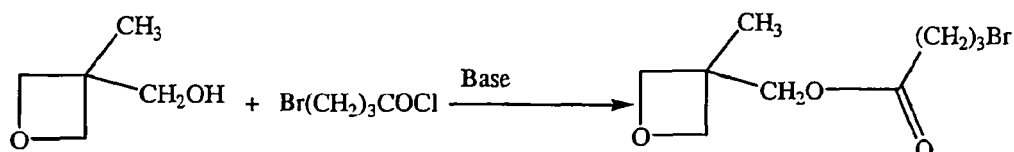
el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones que se definen en las reivindicaciones adjuntas serán aparentes a las personas expertas en la técnica a la cual la invención pertenece.

Todos los reactivos PEG referidos en los ejemplos adjuntos están comercialmente disponibles a no ser que se indique otra cosa, por ejemplo, de Nektar Therapeutics, Huntsville. Todos los datos de RMN ^1H se generaron mediante un espectrómetro de RMN de 300 ó 400 MHz fabricado por Bruker. Se llevó a cabo la Cromatografía líquida de Alto Rendimiento usando una columna de intercambio iónico o permeación en gel, del sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent), tampón fosfato acuoso como fase móvil, y un detector de índice de refracción (RI).

Ejemplo 1

*m*PEG (20.000 Da)-Ácido butanoico

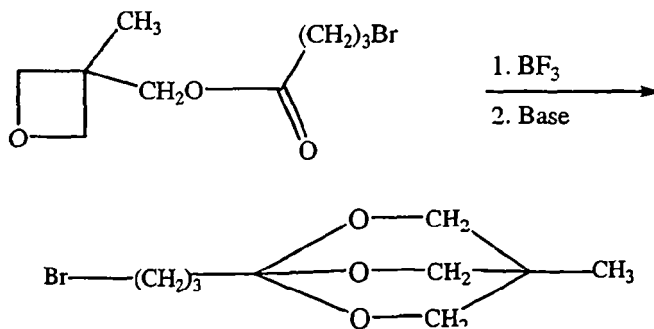
A. 4-Bromobutirato éster de 3-metil-3-hidroximetiloxetano (PM = 251,12)



Se disolvió 3-Metil-3-hidroximetiloxetano (10,2 g, 0,1 moles) [Sigma-Aldrich Corporation de San Luis, MO] en diclorometano anhidro (200 ml) y se añadió piridina (9,8 ml, 0,12 moles). Se enfrió la disolución a 0°C y se añadió cloruro de 4-bromobutirilo (18,5 g, 0,1 moles) [Sigma-Aldrich Corporation de San Luis, MO] disuelto en diclorometano anhidro (50 ml) gota a gota durante 20 minutos. Se agitó la mezcla durante la noche en atmósfera de argón. A continuación, se lavó la mezcla de reacción con agua y se secó con sulfato de magnesio anhidro. A continuación se eliminó mediante destilación a presión reducida. Resultado 23,6 g RMN (d_6 -DMSO): 1,26 ppm (s, 3H), 2,07 ppm (m, 2H), 2,51 ppm (t, 2H), 3,56 ppm (t, 2H), 4,14 ppm (s, 2H), 4,24 ppm (d, 2H), 4,38 ppm (d, 2H).

B. 1-(3-Bromopropil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo [2,2,2]octano (PM= 251,12)

(OBO éster del ácido 4-bromobutanoico)



Se disolvió 4-bromobutirato éster de 3-metil-3-hidroximetiloxetano bruto (20,1 g, 0,08 moles) en diclorometano anhidro (100 ml), se enfrió la disolución a 0°C y se añadió trifluoruro dietil eterato de boro (2,5 ml, 0,022 moles). Se agitó la mezcla durante 4 horas a 0°C. se añadió trietilamina (12 ml), se agitó la mezcla durante 15 minutos, y se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida. Se disolvió el producto bruto en etil éter (180 ml) y se filtró la disolución para eliminar las impurezas sólidas. A continuación, se eliminó mediante destilación el éter y se destiló el producto a presión reducida (kugelrohr, 110-115°C, 0,05 mm de Hg). Rendimiento 15, 0 g. RMN (d_6 -DMSO): 0,74 ppm (s, 3H), 1,68 ppm (m, 2H), 1,88 ppm (m, 2H), 3,52 ppm (t, 2H), 3,81 ppm (s, 6H).

C. PEG (20.000 Da)-Ácido butanoico

Una disolución de PEG comercialmente disponible (PMn = 20.300 Da, polidispersabilidad 1,040) (50,0 g, 0,005 equivalentes) en tolueno (300 ml) se secó azeotrópicamente eliminando mediante destilación 50 ml de tolueno. Se añadieron una disolución 1,0 M de terc-butoxido de potasio en terc-butanol (5,0 ml, 0,005 moles) y 1-(3-bromopropil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2] octano (0,65 g, 0,0025 moles) y se agitó la mezcla durante la noche a 70°C en atmósfera de argón. A continuación se añadieron una disolución 1,0 M de terc-butoxido de potasio en terc-butanol (18,0 ml, 0,018 moles) y metil p-toluenosulfonato (4,4 g, 0,0239 moles) y se agitó la mezcla durante la noche a 45°C en atmósfera de argón. Se eliminó mediante destilación el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en agua destilada (450 ml). Se ajustó el pH de la disolución a 2 con ácido fosfórico al 5% y se agitó la disolución durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se volvió a ajustar el pH a 12 con hidróxido de sodio 1 M y se

ES 2 341 960 T3

agitó la disolución durante 2 horas manteniendo el pH a 12 mediante la adición periódica de hidróxido de sodio 1 M. Se ajustó el pH a 3 con ácido fosfórico al 5% y se extrajo el producto con diclorometano. Se secó el extracto con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a etil éter. El producto precipitado se eliminó mediante filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 44,7 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,72 ppm (q, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 2,24 ppm (t, $\text{-CH}_2\text{-COO-}$), 3,24 ppm (s, -OCH_3), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

D. Purificación

Se determinó que el producto procedente de © anterior era una mezcla de especies poliméricas. Un cromatograma de HPLC desveló que el producto de la mezcla polimérica procedente de C incluía PEG (20.000 Da)-ácido dibutanoico (26,1%), mPEG (20.000 Da)-ácido butanoico (50,4%), y PEG (20.000 Da) dimetil éter (23,5%). Se llevó a cabo una purificación para obtener mPEG (20.000 Da)-ácido butanoico purificado.

Se disolvió la anterior mezcla de productos procedente de C en agua destilada (4470 ml) y se pasó la disolución resultante a través de una primera columna cromatográfica (precolumna) rellena con 300 ml de gel de intercambio aniónico: DEAE SEPHAROSE® Fast Flow (Pharmacia). Esta cantidad de gel de intercambio aniónico fue únicamente capaz de retener aproximadamente un 35% de PEG ácidos presentes en la mezcla polimérica procedente de la etapa C. Se determinó previamente la capacidad de la columna en experimentos de laboratorio a pequeña escala. El cromatograma de intercambio aniónico desveló que el eluato contenía únicamente mPEG (20.000 Da)-ácido butanoico y PEG (20.000 Da) dimetil éter. PEG (20.000 Da)-ácido dibutanoico y una porción de mPEG (20.000 Da)-ácido butanoico se adsorbieron por el gel en la precolumna.

A continuación, se aplicó el eluato recogido procedente de la precolumna a una segunda columna (columna principal) que contenía 1000 ml de gel DEAE SEPHAROSE® Fast Flow. La cantidad de gel de intercambio aniónico en la columna fue suficiente para retener todo el mPEG (20.000 Da)-ácido butanoico presente en el eluato procedente de la primera columna. Se determinó previamente la capacidad de la columna en experimentos de laboratorio a pequeña escala. Un cromatograma de intercambio aniónico mostró que el eluato procedente de la segunda columna o principal contenía únicamente PEG (20.000 Da) dimetil éter.

La cromatografía de intercambio aniónico mostró que el único polímero adsorbido en la segunda columna era mPEG (20.000 Da)-ácido butanoico, que se eluyó usando disolución de NaCl al 5% (1500 ml).

Se ajustó el pH del eluato procedente de la segunda columna o principal a 3 mediante la adición de ácido fosfórico al 5% y se extrajo el producto con diclorometano. Se secó el extracto con sulfato de magnesio anhidro, se eliminó el agente de secado, y se añadió la disolución seca a etil éter para precipitar el producto purificado. Se eliminó mediante filtración el producto precipitado y se secó a presión reducida. Rendimiento 14,4 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,72 ppm (q, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$), 2,24 ppm (t, $\text{-CH}_2\text{-COO-}$), 3,24 ppm (s, -OCH_3), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

Cromatografía de intercambio aniónico: mPEG (20.000 Da)-ácido butanoico 100%. (no se detectaron otras especies poliméricas). Cromatografía de permeación en gel: $\text{PMn} = 20.700$ Da, polidispersabilidad 1,010.

El producto eluido procedente de la primera columna (precolumna) contenía algún mPEG (20.000 Da)-ácido butanoico y el PEG (20.000 Da)-ácido dibutanoico.

Ejemplo 2

mPEG (20.000 Da)-Amina

Una disolución de PEG comercialmente disponible ($\text{PMn} = 20.300$ Da) (50,0 g, 0,005 equivalentes) en tolueno (300 ml) se secó azeotrópicamente eliminando mediante destilación 50 ml de tolueno. Se añadieron diclorometano (60 ml), trietilamina (1,40 ml, 0,0100 moles), y cloruro de metanosulfonilo (0,35 ml, 0,00452 moles, 90,4% de la cantidad estequiométrica) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se filtró la mezcla y se eliminaron mediante destilación los disolventes a presión reducida. Se disolvió el residuo en tolueno anhidro (250 ml) y se añadió metóxido de sodio (disolución al 25 en metanol, 23,0 ml). Se agitó la mezcla durante la noche a 70°C en atmósfera de argón, se filtró y se eliminaron mediante destilación los disolventes a presión reducida. Se disolvió el producto bruto en 500 ml de agua destilada. Se añadió NaCl (40 g) y se ajustó el pH de la disolución a 7,2 con ácido fosfórico al 5%. Se extrajo el producto con diclorometano. Se secó el extracto en sulfato de magnesio anhidro, se filtró, y se eliminó mediante destilación el disolvente a presión reducida. Rendimiento 43,4 g. El análisis de RMN mostró que el 79% de los grupos de PEG-OH se convirtieron en grupos de PEG-OCH₃.

El PEG (20.000 Da) parcialmente metilado obtenido (20,0 g) se disolvió en tolueno (150 ml) y la disolución se secó azeotrópicamente eliminando mediante destilación 50 ml de tolueno. Se añadieron diclorometano (25 ml), trietilamina (0,60 ml), y cloruro de metanosulfonilo (0,30 ml) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se filtró la mezcla y se eliminaron mediante destilación los disolventes a presión reducida. A continuación se disolvió el producto en diclorometano (30 ml) y se añadieron 500 ml de alcohol isopropílico. El producto precipitado se eliminó mediante filtración y se secó a presión reducida dando 19,5 g de producto. El análisis de RMN mostró que el producto contenía un 79% de grupos PEG-OCH₃ y un 21% de grupos PEG-metanosulfonato.

ES 2 341 960 T3

A continuación se disolvió el producto en 350 ml de hidróxido de amonio (30%) y se agitó la disolución durante 70 horas a temperatura ambiente. Se extrajo la mezcla resultante de productos de metoxi-PEG-amina con diclorometano. Se secó el extracto con sulfato de magnesio anhidro y se eliminó mediante destilación el disolvente a presión reducida. Se volvió a disolver el producto en diclorometano (30 ml) y se precipitó con 500 ml de alcohol isopropílico. Rendimiento 15,2 g.

Análisis de las proporciones relativas de las especies poliméricas mediante cromatografía de intercambio catiónico: PEG (20.000 Da)-diamina 4,7%, mPEG (20.000 Da)-amina 30,4%, PEG (20.000 Da) dimetil éter 64,9%.

Se disolvió la anterior mezcla en agua destilada (81500 ml) y se pasó la disolución resultante a través de una primera columna cromatográfica (precolumna) rellena con 40 ml de resina de intercambio catiónico POROS® 50 HS (Applied Biosystems). Esta cantidad de gel de intercambio catiónico fue únicamente capaz de retener aproximadamente un 10% de las PEG aminas presentes en la mezcla polimérica. Se determinó previamente la capacidad de la columna en experimentos de laboratorio a pequeña escala.

La cromatografía de intercambio catiónico mostró que el eluato procedente de la precolumna contenía únicamente mPEG (20.000 Da)-amina y PEG (20.000 Da) dimetil éter. PEG (20.000 Da)-diamina y parte de mPEG (20.000)-amina se adsorbieron por la resina en la precolumna.

A continuación, se aplicó el eluato procedente de la precolumna a la segunda columna (columna principal) que contenía 300 ml de resina POROS® 50 HS. La cantidad de gel de intercambio catiónico en la columna fue suficiente para retener todo la mPEG (20.000 Da)-amina presente en el eluato procedente de la primera columna. Se determinó previamente la capacidad de la columna en experimentos de laboratorio a pequeña escala. La cromatografía de intercambio catiónico mostró que el eluato procedente de la segunda columna (o principal) contenía únicamente PEG (20.000 Da) dimetil éter, dejando únicamente el polímero monofuncionalizado deseado en la segunda columna (o principal). La mPEG (20.000 Da)-amina, adsorbida en la segunda columna (o principal), se eluyó a continuación usando una disolución de NaCl al 5% (600 ml).

Se ajustó el pH del eluato de la segunda columna (o principal) a 11 con hidróxido de sodio 0,5 M y se extrajo el producto con diclorometano. Se secó el extracto en sulfato de sodio anhidro, se filtró, y se añadió a etil éter. Se aisló el producto precipitado mediante filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 3,1 g.

RMN (d_6 -DMSO): 2,64 ppm (t, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

El análisis mediante cromatografía de intercambio catiónico desveló que el producto seco recogido contenía un 100% de mPEG (20.000 Da)-amina, libre de cantidades detectables de polímero neutro o difuncionalizado.

Ejemplo 3

mPEG (20.000 Da)-Sal de sodio del ácido carboxílico

Una disolución de PEG comercialmente disponible ($\text{PMn} = 20.300$ Da, polidispersabilidad 1,040) (50,0 g, 0,005 equivalentes) en tolueno (300 ml) se secó azeotrópicamente eliminando mediante destilación 50 ml de tolueno. Se añadieron diclorometano (60 ml), trietilamina (1,20 ml, 0,093 moles), y cloruro de metanosulfonilo (0,30 ml, 0,00388 moles, 77,5% de la cantidad estequiométrica) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se filtró la mezcla y se eliminaron mediante destilación los disolventes a presión reducida. Se disolvió el residuo en tolueno anhidro (250 ml) y se añadió metóxido de sodio (disolución al 25% en metanol, 21, ml). Se agitó la mezcla durante la noche a 70°C en atmósfera de argón. A continuación se filtró la mezcla y se eliminaron los disolventes mediante destilación a presión reducida. Se disolvió el producto bruto en 500 ml de agua destilada, se añadió NaCl (40 g) y se ajustó el pH de la disolución a 7,2 con ácido fosfórico al 5%. Se extrajo el producto con diclorometano. Se secó el extracto con sulfato de magnesio anhidro y se eliminó mediante destilación el disolvente a presión reducida. Rendimiento 44,1 g. El análisis de RMN mostró que el 66% de los grupos PEG-OH se convirtieron en grupos PEG-OCH₃.

El PEG (20.000 Da) parcialmente metilado (40,0 g) obtenido anteriormente se disolvió en tolueno (150 ml) y la disolución se secó azeotrópicamente eliminando mediante destilación 50 ml de tolueno. A continuación se añadió una disolución 1,0 M de terc-butoxido de potasio en terc-butanol (8,2 ml, 0,0082 moles, un exceso de 6,0 veces) a la mezcla de reacción anterior. A continuación se añadieron bromoacetato de etilo (1,13 ml, 0,0102 moles, un exceso de 7,5 veces) y se agitó la mezcla durante la noche a 50°C en atmósfera de argón. Se eliminó mediante destilación el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en agua destilada (500 ml). Se ajustó el pH de la disolución a 12,10 con hidróxido de sodio 1 M, y se agitó la disolución durante la noche, manteniendo el pH a 12,10 mediante la adición periódica de hidróxido de sodio 1 M. Se ajustó el pH a 1,0 con ácido clorhídrico 1,0 M y se extrajo el producto con diclorometano. Se secó el extracto con sulfato de sodio anhidro, se concentró, y se añadió a etil éter.

El producto precipitado se eliminó mediante filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 34,7 g. RMN (d_6 -DMSO), 3,21 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,01 ppm (s, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$).

ES 2 341 960 T3

Análisis mediante cromatografía de intercambio aniónico. PEG (20.000 Da)-ácido dicarboxílico (11,5%), mPEG (20.000 Da)-ácido carboxílico (45,0%), PEG (20.000 Da) dimetil éter (43,5%). El análisis de RMN mostró que el producto contenía un 66% de grupos PEG-OCH₃ y un 34% de grupos PEG-ácido carboxílico.

5 Se disolvió la anterior mezcla en agua destilada (3500 ml) y se eluyó la disolución resultante a través de una primera columna cromatográfica (precolumna9 empacada con 200 ml de gel de intercambio aniónico: DEAE SEPHAROSE® Fast Flow (Farmacia).

10 El análisis cromatográfico de intercambio aniónico desveló que el eluato contenía únicamente mPEG (20.000 Da) ácido carboxílico y PEG (20.000 Da) dimetil éter. Todo el PEG (20.000 Da)-ácido dicarboxílico y parte del mPEG (20.000 Da)-ácido carboxílico se adsorbieron (retuvieron) por el gel en la precolumna.

15 A continuación, se aplicó la disolución a la segunda columna (columna principal) que contenía 800 ml de gel DEAE SEPHAROSE® Fast Flow La cromatografía de intercambio aniónico desveló que el eluato procedente de la columna contenía únicamente PEG (20.000 Da) dimetil éter. El mPEG (20.000 Da)-ácido carboxílico, absorbido (retenido) en la columna, se eluyó usando una disolución de NaCl al 5% (1100 ml).

20 A continuación se ajustó el pH del eluato a 7 y se extrajo el producto con diclorometano se secó el extracto con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a etil éter para precipitar el polímero de ácido monocarboxílico purificado. El producto precipitado se eliminó mediante filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 13,2 g. RMN (d₆-DMSO): 3,21 ppm (s, -OCH₃), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,01 ppm (s, -CH₂-COO-).

25 La cromatografía de intercambio aniónico desveló que el producto recuperado era un 100% de mPEG (20.000 Da)-ácido carboxílico, sin ninguna cantidad detectable de PEG (20.000 Da) dimetil éter o PEG (20.000 Da)-ácido dicarboxílico.

Ejemplo 4

30 *mPEG-20.000 Da libre de diol*

35 Se disolvió mPEG (20.000 Da)-sal de sodio del ácido carboxílico (10,0 g, 0,00050 moles) en 150 ml de tolueno y se eliminó el disolvente mediante destilación para eliminar las trazas de agua. Se disolvió el producto seco en tetrahidrofurano anhidro (100 ml) a 40-45°C y se añadió hidruro de aluminio litio (disolución 1,0 M en tetrahydrofurano, 1,5 ml, 0,0015 moles).

40 Se agitó la mezcla a 45°C durante la noche en atmósfera de arón. Se añadió acetato de etilo (0,5 ml), se agitó la mezcla 30 min, a continuación se enfrió la mezcla a aproximadamente 30°C y se añadió agua (0,06 ml) y se agitó la mezcla 10 min, y finalmente, se añadió agua (0,18 ml), se agitó la mezcla 15 min, y a continuación se filtró para eliminar la sal de aluminio precipitada. Se añadió al filtrado alcohol isopropílico (500 ml), y el producto precipitado se eliminó mediante filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 8,7 g. RMN (d₆-DMSO): 3,21 ppm (s, 3H, -OCH₃); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); 4,57 ppm (t, 1H; -OH).

45 El análisis de HPLC mostró que el producto es mPEG-20.000 con una pureza del 100% y libre de diol. Cromatografía de permeación en gel. PMn = 20.800 Da, polidispersabilidad 1,018.

Ejemplo 5

50 *PEG (10.000 Da)-α-hidroxi-ω-propilamina*

55 Se enfrió una mezcla de PEG de peso molecular 10.000 Da (20,0 g; 0,00400 equivalentes), agua destilada (20,0 g) e hidróxido de potasio (0,4 g) a 0-5°C en un baño de hielo. Se añadió lentamente acrilonitrilo (0,5 g; 0,00942 moles), y se agitó la disolución durante 2 horas a 0-5°C. se añadió NaCl (2 g) y se ajustó el pH de la disolución a 7,0 con ácido fosfórico. A continuación, se extrajo el producto de reacción con diclorometano y se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida dando 18,7 g de producto sólido de color blanco. El análisis de RMN mostró que el producto contenía un 75% de grupos PEG-OH y un 25% de grupos PEG-OCH₂CH₂CN. Se disolvió el producto en 150 ml de alcohol etílico y se añadió catalizador de paladio (10% en peso de carbono activado; 2 g). Se hidrogenó la mezcla a 65°C a 800 psi (5516 kPa) de hidrógeno. A continuación se filtró la mezcla y se eliminó el disolvente a vacío dando 16,4 g de producto de color blanco. El análisis de RMN mostró que el producto contenía un 77% de grupos PEG-OH y un 23% de grupos PEG-OCH₂CH₂CH₂NH₂.

65 *Análisis mediante cromatografía de intercambio catiónico*

PEG (10.000 Da)-dipropilamina 5,3%

PEG (10.000 Da)-α-hidroxi-ω-propilamina 35,4%, y PEG (10.000 Da) 59,3%.

ES 2 341 960 T3

Se disolvió la anterior mezcla en agua destilada (1500 ml) y se filtró la disolución resultante a través de una primera columna cromatográfica (precolumna) rellena con 30 ml de resina de intercambio catiónico POROS® 50 HS (Applied Biosystems).

- 5 El análisis cromatográfico de intercambio catiónico mostró que el filtrado contenía únicamente PEG (10.000 Da)- α -hidroxi- ω -propilamina y PEG (10.000 Da). Toda la PEG (10.000 Da)-dipropilamina y parte la PEG (10.000 Da)- α -hidroxi- ω -propilamina se adsorbieron (retuvieron) por la resina en la precolumna.

- 10 A continuación, se aplicó la disolución a la segunda columna (columna principal) que contenía 250 ml de resina POROS® 50 HS. La cromatografía de intercambio catiónico mostró que el eluato procedente de la columna contenía únicamente PEG (10.000 Da). A continuación se eluyó la PEG (10.000 Da)- α -hidroxi- ω -propilamina, adsorbida en la columna, usando disolución de NaCl al 5% (350 ml). Se ajustó el pH del eluato a 11 con hidróxido de sodio 0,5 M y se extrajo el producto con diclorometano. Se secó el extracto con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a etil éter. El producto precipitado se eliminó mediante filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 4,6 g.
- 15 RMN (d_6 -DMSO): 1,76 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2,80 ppm (t, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,58 ppm (t, $-\text{OH}$).

Cromatografía de intercambio catiónico

- 20 PEG (10.000 Da)- α -hidroxi- ω -propilamina 100%.

Ejemplo 6

- 25 *PEG (10.000 Da)- α -hidroxi- ω -propilmaleimida*

- Se disolvió la PEG (10.000 Da)- α -hidroxi- ω -propilamina procedente del Ejemplo 5 (4,0 g, 0,0004 moles) en disolución saturada acuosa de NaHCO_3 (30 ml) y se enfrió la mezcla a 0°C. Se añadió N-metoxicarbonilmaleimida (0,3 g) con agitación vigorosa. Tras agitar durante 10 minutos, se añadió agua (10 ml) y se agitó la mezcla 50 minutos más. Se ajustó el pH a 3,0 con ácido sulfúrico 0,5 N y se añadió aproximadamente un 15% en peso de NaCl. Se extrajo el producto de reacción con diclorometano, se secó el extracto con sulfato de magnesio anhidro, y se eliminó mediante destilación el disolvente a presión reducida hasta sequedad. Se disolvió el producto bruto en 6 ml de diclorometano y se precipitó con 100 ml de alcohol isopropílico dando 3,6 g de polvo de color blanco tras el secado a presión reducida. RMN (d_6 -DMSO): 1,88 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ -maleimida), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,58 ppm (t, $-\text{OH}$), 7,03 ppm (s, $\text{CH}=\text{CH}$ maleimida).
- 30
- 35

Ejemplo 7

- 40 *mPEG (20.000 Da)-N-hidroxisuccinimidil éster del ácido propiónico libre de diácido*

- Se enfrió una mezcla de metoxi-PEG (o M-PEG-OH) de 20.000 Da de peso molecular que contenía un 6% en peso de PEG-diol que tenía un peso molecular de aproximadamente 40.000 Da (Ho-PEG-OH) (25,0 g), agua destilada (25,0 ml) e hidróxido de potasio (0,5 g) a 0-5°C en un baño de hielo. Se añadió lentamente acetonitrilo (3,4 g), y se agitó la disolución durante 2,5 horas a 0-5°C. Se ajustó el pH de la disolución a 7,0 mediante la adición de ácido fosfórico. Se extrajo el producto con diclorometano (200, 70, y 50 ml). Se secó la capa orgánica con sulfato de magnesio y se añadió a etil éter frío. Se eliminó el producto precipitado mediante filtración y se secó a vacío dando 23,5 g mPEG (20.000 Da) nitrilo. RMN (d_6 -DMSO): 2,74 ppm (t, $-\text{CH}_2\text{CN}$), 3,21 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).
- 45
- 50

- Se agitó a temperatura ambiente durante 36 horas una mezcla de mPEG nitrilo procedente de la etapa anterior (23,5 g) y ácido clorhídrico concentrado (117,5 g). Se diluyó la disolución con un litro de agua y se extrajo con diclorometano (200, 150, y 100 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados dos veces con agua, se secaron con sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Rendimiento de la mPEG amida 21,5 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,26 ppm (t, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$), 3,21 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).
- 55

- Se disolvió la mPEG amida procedente de la etapa anterior (16,0 g) en 1150 ml de agua destilada, se añadieron 100 g de hidróxido de potasio, y se agitó la disolución durante 22 horas a temperatura ambiente. Se añadió cloruro de sodio (150 g), y se extrajo la disolución con diclorometano. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con ácido fosfórico al 5%, agua (dos veces), y se secaron con sulfato de sodio. Se concentró la disolución y se precipitó el producto mediante adición de etil éter. Se recogió el producto, en gran parte mPEG (20.000 Da) ácido propiónico, mediante filtración y se secó a vacío. Rendimiento del ácido 14,0 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,43 ppm (t, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 3,21 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).
- 60
- 65

La cromatografía de intercambio aniónico mostró que el producto contenía: PEG (40.000 da)-ácido dipropiónico (6%), mPEG (20.000 Da)-ácido propiónico (91%), y mPEG (20.000 Da) (3%).

ES 2 341 960 T3

Se disolvió la mezcla anterior en agua destilada (2.000 ml) y se filtró la disolución resultante a través de la primera columna cromatográfica (precolumna) rellena con 50 ml de gel de intercambio aniónico: DEAE SEPHAROSE® Fast Flow (Pharmacia).

5 El análisis cromatográfico de intercambio aniónico mostró que el filtrado contenía únicamente mPEG (20.000 Da)-ácido propiónico y PEG (20.000 Da). Todo el PEG (40.000 Da)-ácido dipropiónico y parte del mPEG (20.000 Da)-ácido propiónico se adsorbieron (retuvieron) por el gel.

10 A continuación, se aplicó la disolución en la segunda columna (columna principal) que contenía 600 ml de gel DEAE SEPHAROSE® Fast Flow. La cromatografía de intercambio aniónico mostró que el eluato procedente de la columna contenía únicamente PEG (20.000 Da). Se eluyó el mPEG (20.000 Da)-ácido propiónico, adsorbido en la columna, usando una disolución de NaCl al 5% (1100 ml). Se ajustó el pH del eluato a 7 y se extrajo el producto con diclorometano. Se secó el extracto con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a etil éter. El producto precipitado se eliminó mediante filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 12,0 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,43 ppm (t, -CH₂COOH), 3,21 ppm (s, -OCH₃), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

20 Cromatografía de intercambio aniónico: mPEG (20.000 Da)-ácido propiónico 100%. No se detectó PEG (40.000 Da)-ácido dipropiónico. Se disolvió mPEG (20.000 Da) ácido propiónico libre de diácido (4,0 g, 0,20 mmol) en diclorometano (20 ml) y se añadió N-hidroxisuccinimida (0,21 mmol). Se enfrió la disolución a 0°C, se añadió gota a gota una disolución de dicitlohexilcarbodiimida (0,20 mmol) en 4 ml de diclorometano, y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción, se concentró, y se precipitó mediante la adición de etil éter. Rendimiento del producto final: 3,8 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,81 ppm (s, NHS), 2,92 ppm (t, -CH₂-COO-), 3,21 ppm (s, -OCE₃), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

25 Una persona experta en la técnica recordará muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención a la cual pertenece esta invención que tiene el beneficio de las enseñanzas presentadas en la anterior descripción.

Referencias citadas en la descripción

30 Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

35 Documentos de patente citados en la descripción

- US 6448369 B [0009]
- US 5650234 A [0080]
- EP 0614666 A1 [0013] [0014]
- US 5824784 A [0080]
- 40 • EP 1283233 A1 [0015]
- US 5252714 A [0080]
- JP 8165343 A [0016]
- US 5900461 A [0080]
- 45 • US 6448369 B1 [0017]
- US 5932462 A [0086]
- WO 2004060965 A2 [0018]
- US 6362254 B [0088]
- US 5281698 A [0080]
- US 5629984 A [0093]
- 50 • US 5468478 A [0080]
- US 6602498 B [0132]
- US 5672662 A [0080]
- 55 • US 4670417 A [0080]

Documentos de patente no citados en la descripción

- Odian, Principles of Polymerization. Wiley, 1991 [0008]
- 60 • F. E. Bailey, Jr.; J. V. Koleske. Poly(ethylene oxide). Academic Press, 1976 [0008]
- Greene *et al.* PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS. John Wiley and Sons, Inc., 1999 [0041]
- 65 • Buckmann *et al.* Makromol. Chem., 1981, vol. 182, 1379 [0080]
- Zalipsky *et al.* Eur. Polym. J., 1983, vol. 19, 1177 [0080]

ES 2 341 960 T3

- **Andresz et al.** *Makromol. Chem.*, 1978, vol. 179, 301 [0080]
- **Olson et al.** Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications. *ACS*, 1997, 170-181 [0080]
- 5 • **Abuchowski et al.** *Cancer Biochem. Biophys.*, 1984, vol. 7, 175 [0080]
- **Joppich et al.** *Makromol. Chem.*, 1979, vol. 180, 1381 [0080]
- **Pitha et al.** *Bur. J. Biochem.*, 1979, vol. 94, 11 [0080]
- 10 • **Elling et al.** *Biotech. Appl. Biochem.*, 1991, vol. 13, 354 [0080]
- **Beauchamp et al.** *Anal. Biochem.*, 1983, vol. 131, 25 [0080]
- 15 • **Tondelli et al.** *J. Controlled Release*, 1985, vol. 1, 251 [0080]
- **Veronese et al.** *Appl. Biochem. Biotech.*, 1985, vol. 11, 141 [0080]
- **Sartore et al.** *Appl. Biochem. Biotech.*, 1991, vol. 27, 45 [0080]
- 20 • **Harris et al.** *J. Polym. Sci. Chem. Ed.*, 1984, vol. 22, [0080]
- **Goodson et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 343 [0080]
- 25 • **Romani et al.** *Chemistry of Peptides and Proteins*, 1984, vol. 2, 29 [0080]
- **Kogan.** *Synthetic Comm.*, 1992, vol. 22, 2417 [0080]
- **Woghiren et al.** *Bioconj. Chem.*, 1993, vol. 4, 314 [0080]
- 30 • **Sawhney et al.** *Macromolecules*, 1993, vol. 26, 581 [0080]
- **Ouchi et al.** *Polymer Preprints*, 1997, vol. 38 (1), 582-3 [0091]
- 35 • Chromatography: a laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic techniques. Ion Exchange Chromatography. Principles and Method. Pharmacia Biotech. *Van Nostrand Reinhold Co*, 1975 [0160]

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para formar un polímero funcionalizado, que comprende

- (a) proporcionar un polímero no peptídico y soluble en agua que comprende dos grupos hidroxilo;
- (b) hacer reaccionar el polímero no peptídico y soluble en agua que comprende dos grupos hidroxilo en una o más etapas de reacción, con uno o más reactivos de funcionalización que son reactivos con un grupo hidroxilo para efectuar la introducción de un grupo funcional, Y, para formar una mezcla que comprende:
 - (i) el polímero no peptídico no sustituido y soluble en agua procedente de la etapa (a),
 - (ii) un polímero monosustituido que comprende un grupo Y único, y
 - (iii) un polímero disustituido que comprende dos grupos Y,en condiciones eficaces para formar:
 - (i) entre 8 y 45 por ciento del polímero monosustituido; y
 - (ii) no más del 40 por ciento del polímero disustituido; y
 - (iii) una relación de polímero monosustituido a polímero disustituido que es de 2:1 a 40:1; y
- (c) purificar la mezcla procedente de la etapa (b) para proporcionar un polímero monosustituido sustancialmente libre de las especies poliméricas no sustituidas y disustituidas.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que la etapa (b) se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar no más del 25% del polímero disustituido.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1 en el que dicho polímero no peptídico y soluble en agua es lineal o ramificado.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicho polímero no peptídico y soluble en agua se selecciona entre: poli(alquilenglicol), alcohol poli(olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacárido), poli(α -hidroxiácido), alcohol poli(vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), y los copolímeros, terpolímeros, y sus mezclas.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicho polímero no peptídico y soluble en agua es un diol.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 5, en el que dicho polímero no peptídico y soluble en agua es poli(etilenglicol).

7. Un procedimiento según la Reivindicación 5, en el que cada uno de los grupos hidroxilo se localiza en un extremo del polímero.

8. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico y soluble en agua proporcionado en (a) está en un disolvente seleccionado entre: un disolvente orgánico, agua, una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua, y una mezcla de agua y un disolvente orgánico inmiscible.

9. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que dicho disolvente orgánico se selecciona entre:

hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos clorados, amidas, ésteres, éteres, cetonas, y organonitrilos.

10. Un procedimiento según la Reivindicación 8, en el que dicho disolvente orgánico se selecciona entre:

tolueno, xilenos, benceno, diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, dimetoxietano, tetrahidrofurano, dioxano, dimetilformamida, acetona, y sus mezclas.

11. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el peso molecular del polímero está entre 100 Da y 100.000 Da.

12. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el peso molecular del polímero está entre 500 Da y 60.000 Da.

13. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el peso molecular del polímero está entre 5.000 y 40.000 Da.

14. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha reacción se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar no más de un 12 por ciento del polímero disustituido.

15. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha reacción se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar no más de un 8 por ciento del polímero disustituido.

16. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha reacción se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar no más de un 5 por ciento del polímero disustituido.

17. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha reacción se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar no más de un 2 por ciento del polímero disustituido.

18. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha reacción se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar no más de un 1 por ciento del polímero disustituido.

19. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha reacción se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar una relación de polímero monosustituido a polímero disustituido que es de 4:1 a 20:1.

20. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha reacción se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar una relación de polímero monosustituido a polímero disustituido que es de 10:1 a 18:1.

21. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que Y es un grupo funcional protegido, y la etapa (b) comprende adicionalmente, tras dicha etapa de reacción, desproteger dicho grupo funcional.

22. Un procedimiento según la Reivindicación 21, en el que Y es un ácido carboxílico protegido y dicha desprotección comprende hidrolizar dicho ácido carboxílico protegido para formar por tanto un ácido carboxílico.

23. Un procedimiento según la Reivindicación 22, en el que dicho ácido carboxílico protegido se selecciona entre: ésteres, tioésteres, amidas, amidatos, tioamidatos, e hidrazidas.

24. Un procedimiento según la Reivindicación 22, en el que dicho ácido carboxílico protegido es un ortoéster.

25. Un procedimiento según la Reivindicación 21, en el que Y es una amina protegida.

26. Un procedimiento según la Reivindicación 25, en el que Y es un carbonitrilo o amida primaria y dicha etapa de desprotección comprende reducir el carbonitrilo o la amida primaria para formar por tanto una amina.

27. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha etapa de reacción comprende una reacción sustitución nucleófila o de adición nucleófila.

28. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que Y se selecciona entre: hidrato de aldehído, hidrato de cetona, amina, hidrazida, tiol, ácido carboxílico, amida primaria, amida secundaria, amidato, 1,3-oxazolina 2-sustituida, 1,3-(4H)-dihidrooxazinas 2-sustituidas, 1,3-tiazolina 2-sustituida, 1,3-(4H)-dihidrotiazinas 2 sustituidas, ditiopiridina, vinilpiridina, hidroxilamina, y oxima.

29. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que uno del uno o más reactivos de funcionalización tiene la estructura $X-(CR_1R_2)_m-Y$, en la que:

X es un grupo que reacciona con un hidroxilo, opcionalmente en forma aniónica, o con un átomo de carbono al cual el hidroxilo se une, en una reacción de sustitución nucleófila o de adición nucleófila,

R_1 y R_2 son cada uno independientemente tanto H como alquilo, y
m varía entre 0 y 10.

30. Un procedimiento según la Reivindicación 16, en el que uno del uno o más reactivos de funcionalización tiene la estructura $X-(CR_1R_2)_m-Y$, en la que:

X es un grupo que reacciona con un hidroxilo, opcionalmente, opcionalmente en forma aniónica, o con un átomo de carbono al cual el hidroxilo se une, en una reacción de sustitución nucleófila o de adición nucleófila,

R_1 y R_2 son cada uno independientemente tanto H como alquilo,
m varía entre 0 y 10, e

Y tiene la estructura $-C(O)-O-R_p$, en la que R_p es un grupo alquilo o alquilo sustituido.

31. Un procedimiento según la Reivindicación 29, en el que X se selecciona entre: un grupo saliente, un grupo vinilo sustituido, y un grupo vinilo no sustituido.

32. Un procedimiento según la Reivindicación 31, en el que X es un halógeno o un éster de sulfonato.

33. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que comprende la etapa de alquilar el polímero no peptídico que comprende dos grupos hidroxilo antes de la etapa (b), o alquilar la mezcla formada en la etapa (b) antes de o posteriormente a la etapa de purificación (c).

34. Un procedimiento según la Reivindicación 33, en el que dicha etapa de alquilación comprende tratar la mezcla con un agente alquilante seleccionado entre: dialquilsulfato, alquil sulfonato, diazoalcano, haluro de alquilo, N,N'-dimetilformamida dialquil acetal, 3-alquil-1-p-toliltriazeno, hidróxido de trimetilanilinio, fluoroborato de trialquilo-xonio, hexafluorofosfonato de trimetilsulfonio, y tricloroacetimidato de alquilo.

35. Un procedimiento según la Reivindicación 33, en el que dicha alquilación es eficaz para convertir grupos hidroxilo en dicha mezcla en -OR', en el que R' es un radical orgánico que tiene 1-20 átomos de carbono.

36. Un procedimiento según la Reivindicación 35, en el que R' se selecciona entre: metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, y bencilo.

37. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente antes de la etapa (b), convertir una porción de dichos hidroxilos poliméricos en un grupo saliente, Y, para formar por tanto una primera mezcla que comprende el polímero no peptídico y soluble en agua procedente de la etapa (a), un polímero monosustituido que comprende un único grupo Y, y un polímero disustituido que comprende dos grupos Y, en condiciones eficaces para formar no más de un 45 por ciento del polímero disustituido.

38. un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que Y es un grupo funcional ionizable y dicha etapa de purificación comprende purificar la mezcla mediante cromatografía de intercambio iónico.

39. Un procedimiento según la Reivindicación 38, en el que dicha etapa de purificación comprende:

pasar la mezcla formada en la etapa (b) a través de una primera columna de intercambio iónico para proporcionar un eluato, en el que dicha etapa de paso de la mezcla se lleva a cabo en condiciones eficaces para adsorber sustancialmente todo de dicho polímero disustituido en la primera columna;

pasar el eluato a través de una segunda columna de intercambio iónico en condiciones eficaces para adsorber sustancialmente todo del polímero monosustituido en dicha segunda columna;

lavar la segunda columna con agua o una disolución que tenga baja fuerza iónica para eliminar el polímero no sustituido, y

pasar una disolución que tenga fuerza iónica alta a través de la segunda columna para desorber el polímero monosustituido.

40. Un procedimiento según la Reivindicación 39, en el que dichas condiciones en dicha etapa de elución comprenden una columna suficientemente dimensionada para adsorber sustancialmente todo de dicho polímero disustituido.

41. Un procedimiento según la Reivindicación 39, en el que dichas condiciones en dicha etapa de purificación comprenden una o más columnas principales suficientemente dimensionadas para adsorber sustancialmente todo de dicho polímero monosustituido.

42. Un procedimiento según la Reivindicación 39, en el que:

dicha segunda columna de intercambio iónico está conectada en serie a una o más columnas de intercambio iónico adicionales, y dicha etapa de lavado comprende adicionalmente lavar dicha segunda y una o más columnas de intercambio iónico adicionales, y dicha etapa de paso del eluato comprende adicionalmente pasar la disolución que tiene fuerza iónica alta a través de dicha segunda y una o más columnas adicionales.

43. Un procedimiento según la Reivindicación 38, en el que dicha etapa de purificación comprende:

pasar la mezcla formada en la etapa (b) a través de una primera columna de intercambio iónico para proporcionar un eluato, en el que dicha etapa de paso de la mezcla se lleva a cabo en condiciones eficaces para adsorber sustancialmente todo de dicho polímero disustituido en la primera columna;

pasar dicho eluato a través de una segunda columna de intercambio iónico conectada en serie a una o más columnas de intercambio iónico adicionales en condiciones eficaces para adsorber una fracción del polímero monosustituido en dicha segunda columna;

lavar la segunda columna y una o más columnas de intercambio iónico adicionales con una disolución que tenga baja fuerza iónica para eliminar el polímero no sustituido; y

pasar una disolución que tenga fuerza iónica alta a través de la segunda y una o más columnas de intercambio iónico adicionales para desorber el polímero monosustituido,

44. Un procedimiento según la Reivindicación 1 que comprende:

(a) proporcionar un polímero que comprende una fórmula HO-POLI-OH, en el que POLI es un polímero no peptídico y soluble en agua;

(b) opcionalmente, convertir HO-POLI-OH en una mezcla que comprende HO-POLI-OH, HO-POLI-Z, y Z-POLI-Z, en el que Z es un grupo saliente, en condiciones eficaces para formar no más de un 45 por ciento de Z-POLI-Z;

(c) hacer reaccionar HO-POLI-OH de la etapa (a) o la mezcla de la etapa (b) con un reactivo de funcionalización que comprende la estructura X-L_{0,1}, en la que:

X es un grupo que reacciona con un hidroxilo, opcionalmente en forma aniónica, o con un átomo de carbono al cual el hidroxilo o el grupo saliente se une,

L_{0,1} es un ligante opcional, e

Y es un grupo ionizable, opcionalmente como un grupo ionizable protegido, para formar una mezcla que comprende:

HO-POLI-OH,

HO-POLI-L_{0,1}-Y, e

Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y,

en condiciones eficaces para formar:

(i) entre un 8 y un 45 por ciento del polímero monosustituido; y

(ii) no más de un 40 por ciento de Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y; y

(iii) una relación de polímero monosustituido a polímero disustituido que es de 2:1 a 40:1;

(d) opcionalmente, alquilar la mezcla procedente de la etapa b o de la etapa (c), y

(e) purificar la mezcla procedente de la etapa (c) o de la etapa (d) mediante cromatografía de intercambio iónico para proporcionar un polímero sustancialmente puro que comprende un único grupo -L_{0,1}-Y, tras la desprotección del grupo funcional Y, si es necesaria la desprotección.

45. Un procedimiento según la Reivindicación 44, en el que la etapa (c) se lleva a cabo en condiciones eficaces para formar no más de un 25% de Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y.

46. Un procedimiento según la Reivindicación 44, en el que X es un halógeno o un éster de sulfonato.

47. Un procedimiento según la Reivindicación 44, en el que dicha etapa de purificación comprende:

pasar la mezcla procedente de la etapa (c) o de la etapa (d) a través de una primera columna de intercambio iónico para proporcionar un eluato, en el que dicha etapa de paso de la mezcla se lleva a cabo en condiciones eficaces para adsorber sustancialmente todas las especies poliméricas que comprenden los dos grupos -L_{0,1}-Y en la primera columna;

pasar el eluato a través de una segunda columna de intercambio iónico en condiciones eficaces para adsorber sustancialmente todas las especies poliméricas que tienen un único grupo -L_{0,1}-Y en dicha segunda columna;

lavar la segunda columna con una disolución que tenga baja fuerza iónica para eliminar únicamente las especies poliméricas que no contienen grupos -Y; y

pasar una disolución que tenga fuerza iónica alta a través de la segunda columna para desorber las especies poliméricas que tienen un único grupo -L_{0,1}-Y.

ES 2 341 960 T3

48. Un procedimiento según la Reivindicación 47, en el que el ligante opcional, $L_{0,1}$, está presente y es estable frente a la hidrólisis.

49. un procedimiento según la Reivindicación 47, en el que el ligante opcional, $L_{0,1}$, está presente y tiene una estructura $-(CR_1R_2)_m-$, en la que R_1 y R_2 son cada uno independientemente H o alquilo, y m varía entre 0-10.

50. Un procedimiento según la Reivindicación 47, en el que Y es una amina o un ácido carboxílico.

51. Un procedimiento según la Reivindicación 47, en el que dicha etapa de alquilación comprende tratar la mezcla con un agente alquilante seleccionado entre: dialquilsulfato, alquil sulfonato, diazoalcano, haluro de alquilo, N,N'-dimetilformamida dialquil acetal, 3-alquil-1-p-tolotriazeno, hidróxido de trimetilanilinio, fluoroborato de trialquiloxonio, hexafluorofosfonato de trimetilsulfonio, y tricloroacetimidato de alquilo.

52. Un procedimiento según la Reivindicación 47, en el que dicha etapa de alquilación es eficaz para convertir los grupos hidroxilo en dicha mezcla en $-OR'$, en el que R' se selecciona entre: alquilo C_1-C_{20} , alquilo C_1-C_{20} sustituido, alquilenilo C_1-C_{20} -arilo, y alquilenilo C_1-C_{20} -arilo sustituido.

53. Un procedimiento según la Reivindicación 52, en el que R' se selecciona entre: metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, y bencilo.

54. Un procedimiento según la Reivindicación 47, en el que X es un nucleófilo efectivo para desplazar $-Z$.

55. Un procedimiento según la Reivindicación 54, en el que Z es un grupo saliente seleccionado entre: halógeno y ésteres de sulfonato.

56. Un procedimiento según la Reivindicación 49, en el que

X se selecciona entre; grupos salientes, grupos vinilo sustituidos, y grupos vinilo no sustituidos,

m es 1-3, y

Y es un ácido carboxílico protegido.

57. Un procedimiento según la Reivindicación 56, en el que el grupo de ácido carboxílico protegido se selecciona entre: nitrilo, amida, éster de alquilo, y ortoéster.

58. Un procedimiento según la Reivindicación 47, en el que:

X se selecciona entre: grupos salientes, grupos vinilo sustituidos, y grupos vinilo no sustituidos

m es 1-3, y

Y es carbonitrilo.

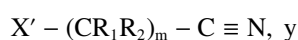
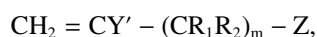
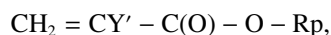
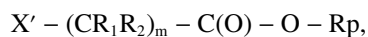
59. Un procedimiento según la Reivindicación 47, en el que:

X es un halógeno

m es 0, y

Y es p-tolilsulfonilo, metilsulfonilo, trifluorometilsulfonilo, o trifluoroetilsulfonilo.

60. Un procedimiento según la Reivindicación 49, en el que el reactivo de funcionalización se selecciona entre:



en el que:

X' es halógeno o éster de sulfonato,

Z es un ortoéster,

ES 2 341 960 T3

Y' es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, o alcoxi sustituido, y

Rp es alquilo o alquilo sustituido

5 61. Un procedimiento según la Reivindicación 44, en el que dicha conversión comprende hacer reaccionar HO-POLI-OH con X'-SO₂-R₃, en el que R₃ es alquilo, alquilo sustituido, arilo, o arilo sustituido, y X' es Br o Cl.

62. Un procedimiento según la Reivindicación 61, en el que R₃ es p-tolilo, metilo, trifluorometilo, o trifluoroetilo.

10 63. Un procedimiento según la Reivindicación 44, que comprende adicionalmente, tras dicha etapa de purificación, transformar Y del polímero sustancialmente puro en un resto reactivo diferente.

64. Un procedimiento según la Reivindicación 44, en el que dicho resto reactivo comprende un grupo funcional
15 seleccionado entre: hidroxilo, éster activo, carbonato activo, ortoéster, acetal, aldehído, hidrato de aldehído, cetona, hidrato de cetona, oxima, alqueno, acrilato, metacrilato, nitrilo, amida primaria o secundaria, imida, acrilamida, sulfona activa, amina, hidrazida, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida, succinimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, amidato, 1,3-oxazolina 2-sustituida, 1,3-(4H)-dihidrooxazinas 2 sustituidas, 1,3-tiazolina 2-sustituida, 1,3-(4H)-dihidrotiazinas 2 sustituidas, hidroxilamina, yodoacetamida, disulfuro de ortopiridilo, epóxido, glioxal, diona, mesilato, tosilato, y tresilato.

20 65. Un procedimiento según la Reivindicación 44, en el que Y es un grupo funcional protegido y dicho procedimiento comprende adicionalmente desproteger el grupo funcional antes de dicha purificación.

66. Un procedimiento según la Reivindicación 60, en el que la mezcla en la etapa (a) comprende CH₃O-POLI-OCH₃, en combinación con H₃CO-POLI-L_{0,1}-Y e Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1} Y, en el que L es un ligante opcional e Y es un
25 grupos funcional.

67. Un procedimiento según la Reivindicación 66, en el que la mezcla comprende no más de un 40% en peso de HO-POLI-OH e Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y en combinación.

30 68. Un procedimiento según la Reivindicación 67, en el que la mezcla comprende no más de un 10% en peso de HO-POLI-OH e Y-L_{0,1}-POLI-L_{0,1}-Y en combinación.

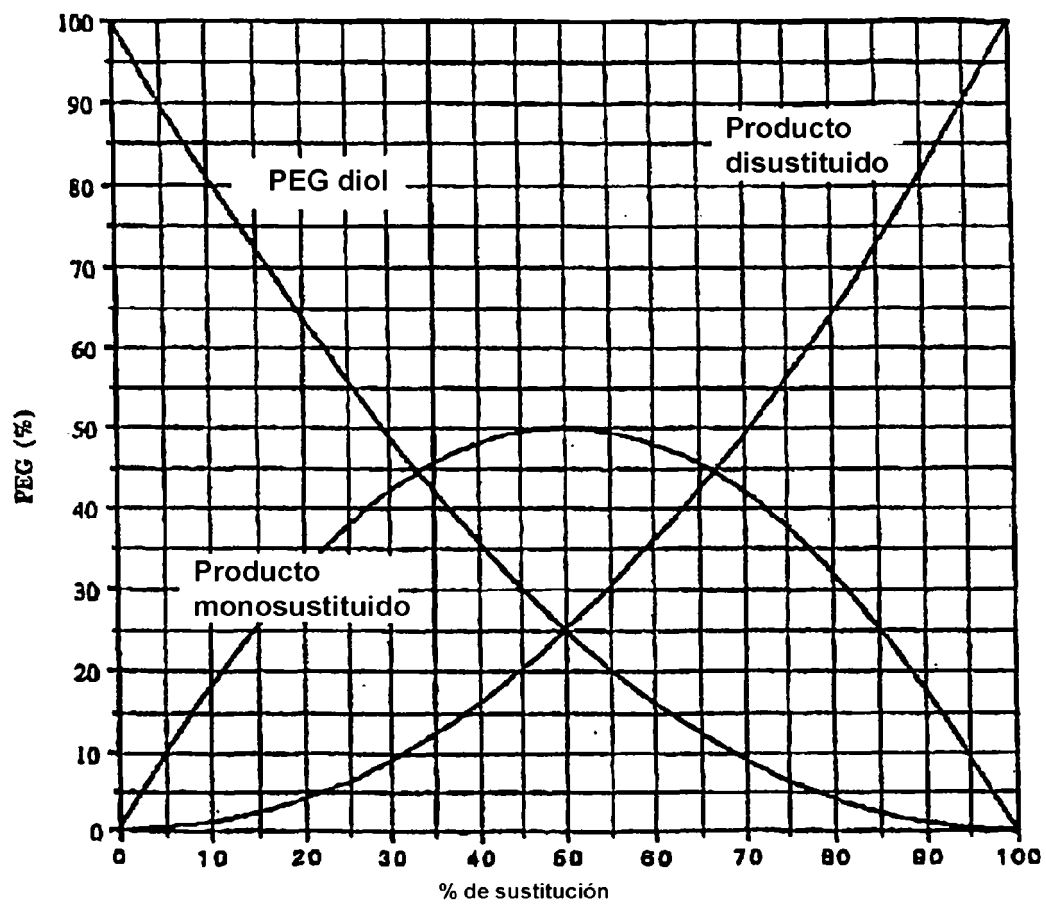


FIG. 1

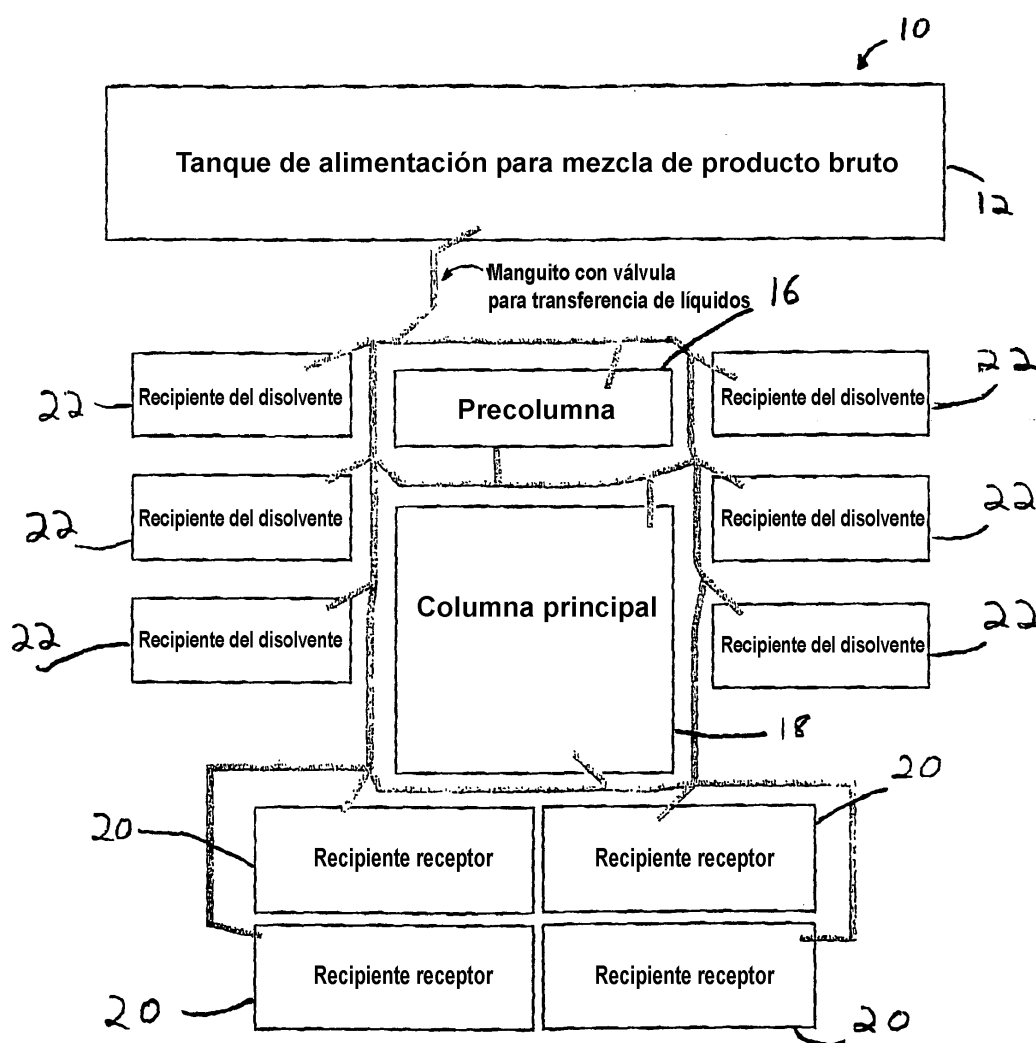


FIG. 2

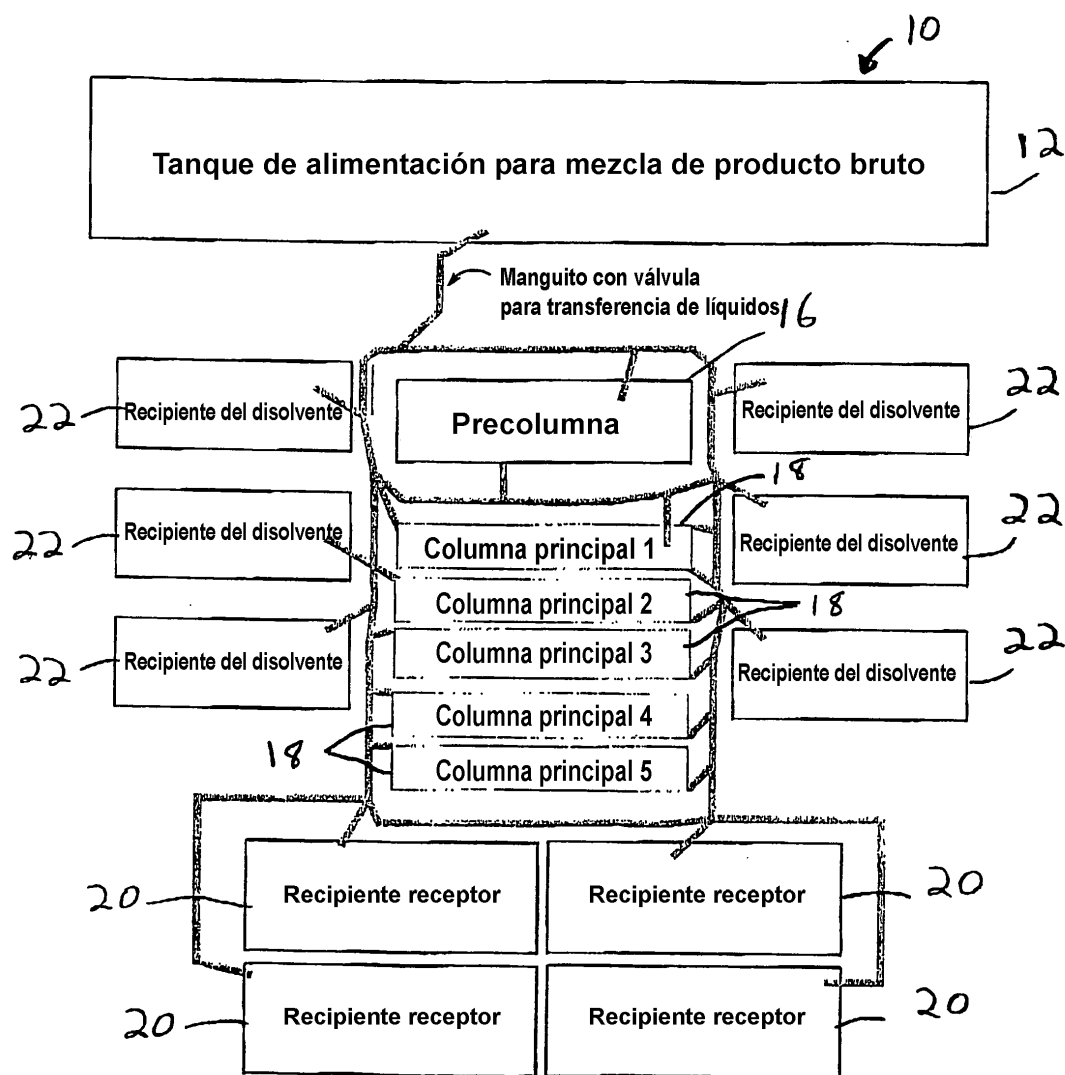


FIG. 3