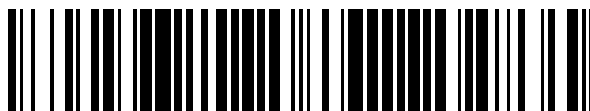


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 337**

51 Int. Cl.:

C08G 75/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2004 PCT/US2004/001190**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.07.2004 WO04063250**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2004 E 04700409 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **07.06.2017 EP 1581582**

54 Título: **Derivados tiol-selectivos de un polímero soluble en agua**

30 Prioridad:

06.01.2003 US 438555 P
14.03.2003 US 455084 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
11.08.2017

73 Titular/es:

NEKTAR THERAPEUTICS (100.0%)
201 INDUSTRIAL ROAD
SAN CARLOS, CA 94070, US

72 Inventor/es:

KOZLOWSKI, ANTONI;
GROSS, REMY, F., III y
MCMANUS, SAMUEL, P.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

DESCRIPCIÓN

Derivados tiol-selectivos de un polímero soluble en agua.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para preparar derivados tiol-selectivos de un polímero soluble en agua que es polietilén glicol.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Debido a los avances recientes en biotecnología, proteínas terapéuticas y otras biomoléculas, por ejemplo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, pueden ser preparadas actualmente a gran escala haciendo que tales biomoléculas estén disponibles más fácilmente. Desgraciadamente, la utilidad clínica de biomoléculas terapéuticas potenciales está a menudo impedida por su rápida degradación proteolítica, su inestabilidad tras la producción, el almacenamiento o la administración o por su inmunogenicidad. Debido al interés continuo en la administración de proteínas y otras biomoléculas para uso terapéutico, se han explorado varios procedimientos para superar estas deficiencias.

Uno de tales procedimientos que ha sido ampliamente explorado es la modificación de proteínas y otras biomoléculas potencialmente terapéuticas mediante la unión covalente de un polímero soluble en agua tal como polietilén glicol o "PEG" (Abuchowski, A. y col., *J. Biol. Chem.*, 252 (11), 3579 (1977); Davis, S. y col., *Clin. Exp. Immunol.*, 46, 649-652 (1981)). Se ha demostrado que las propiedades biológicas de las proteínas modificadas con PEG, referidas también como conjugados de PEG o proteínas pegiladas, están en muchos casos considerablemente mejoradas respecto a las de sus equivalentes no pegilados (Herman y col., *Macromol. Chem. Phys.*, 195, 203-209 (1994)). Se ha demostrado que las proteínas modificadas con polietilén glicol poseen tiempos mayores en la circulación del organismo debido a una resistencia incrementada a la degradación proteolítica y que poseen también una termoestabilidad incrementada (Abuchowski, A. y col., *J. Biol. Chem.*, 252, 3582-3586 (1977)). Un incremento similar de la bioeficacia se ha observado con otras biomoléculas, por ejemplo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (Chapman, A., *Adv. Drug Del. Rev.*, 54, 531-545 (2002)).

Típicamente, la unión de polietilén glicol a un fármaco o a otra superficie se lleva a cabo utilizando un derivado de PEG activado, es decir, un PEG que tiene al menos un extremo activado adecuado para reaccionar con un centro nucleofílico de una biomolécula (por ejemplo, lisina, cisteína y residuos similares de las proteínas). Los métodos utilizados más habitualmente están basados en la reacción de un PEG activado con los grupos amino de las proteínas, tales como los presentes en las cadenas laterales de lisina de las proteínas. Polietilén glicoles con grupos terminales activados adecuados para la reacción con los grupos amino de las proteínas incluyen PEG-aldehídos (Harris, J.M., Herati, R.S., *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*, 32(1), 154-155 (1991), anhídridos mixtos, ésteres de N-hidroxisuccinimida, carbonilimidazolidos y clorocianuratos (Herman, S., y col., *Macromol. Chem. Phys.*, 195, 203-209 (1994)). Aunque se ha demostrado que muchas proteínas retienen su actividad durante la modificación con PEG, en algunos casos la unión de polímeros a través de los grupos amino de la proteína puede ser indeseable, tal como cuando la derivatización de residuos de lisina específicos inactiva la proteína (Suzuki, T. y col., *Biochimica et Biophysica Acta*, 788, 248-255 (1984)). Por tanto, sería ventajoso disponer de métodos adicionales para la modificación de una proteína con PEG utilizando otro aminoácido diana para la unión, tal como cisteína. La unión a los grupos tiol de la cisteína de la proteína puede ofrecer una ventaja en cuanto a que las cisteínas son típicamente menos abundantes en las proteínas que las lisinas, reduciendo así la probabilidad de la desactivación de la proteína tras la conjugación a estos aminoácidos que contienen tiol.

Derivados de polietilén glicol que tienen un grupo terminal reactivo tiol-selectivo incluyen maleimidias, vinil sulfonas, yodoacetamidas, tioles y disulfuros. Estos derivados han sido utilizados todos ellos para el acoplamiento a las cadenas laterales de cisteína de las proteínas (Zalipsky, S., *Bioconjug. Chem.*, 6, 150-165 (1995); Greenwald, R.B. y col., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 17, 101-161 (2000); Herman, S. y col., *Macromol. Chem. Phys.*, 195, 203-209 (1994)). Sin embargo, muchos de estos reactivos no han sido explotados extensamente debido a la dificultad de su síntesis y purificación. Por ejemplo, el método de Woghiren y col. (Woghiren, C. y col., *Bioconjugate Chem.*, 4, 314-318 (1993)) requiere una serie de etapas sintéticas de transformación y purificación para formar un reactivo PEG-tiol protegido particular. En primer lugar, metoxi-PEG se hace reaccionar con cloruro de tosilo seguido por la purificación del producto de reacción para recuperar el tosilo-PEG correspondiente. El tosilo-PEG es posteriormente convertido en el PEG-tioacetato correspondiente mediante la reacción con una sal tioacetato, seguido por otra etapa de purificación. Posteriormente se lleva a cabo una alcoholisis con metanol del PEG-tioacetato, seguido por cromatografía en columna para dar lugar a la sal tiolato purificada, que es posteriormente reducida con ditiotreitolo para formar el PEG-tiol correspondiente. El PEG-tiol resultante es posteriormente purificado mediante cromatografía en columna. A continuación se prepara una forma protegida del tiol mediante la reacción del PEG-tiol con disulfuro de 4,4'-dipiridilo, seguido por purificación mediante cromatografía en columna. En suma, la metodología de Woghiren para transformar PEG en su forma tiol-protegida requiere cinco etapas de reacción diferentes y cinco etapas separadas adicionales de purificación, haciendo que este procedimiento sintético y otros procedimientos similares sean indeseables y extremadamente largos.

Otra deficiencia significativa de muchas de las vías existentes para producir derivados de PEG monofuncionales tiol específicos, es la incapacidad, a pesar de las múltiples etapas de purificación, de eliminar el PEG difuncionalizado que se produce a partir del diol que está presente en la materia prima de PEG monofuncional.

- 5 Por tanto, existe la necesidad de un método para preparar PEG-tioles activados de alta pureza y otros derivados de PEG tiol-selectivos que sea rápido y sencillo, esto es que requiera un número mínimo de etapas de reacción y purificación, a la vez que mantenga la integridad del segmento de PEG (esto es, que sea llevado a cabo bajo condiciones de reacción suaves), y que pueda proporcionar además derivados de PEG tiol-selectivos de alta pureza con un rendimiento elevado. Tal método ha sido desarrollado por los
10 solicitantes y será descrito con mayor detalle a continuación.

RESUMEN DE LA INVENCION

15 En un aspecto, según la reivindicación 1, la presente invención proporciona un método para preparar un derivado tiol-selectivo de un polímero soluble en agua (esto es, un polímero que tenga al menos un extremo que sea un grupo tiol-selectivo, es decir, un grupo que reaccione preferencialmente con tioles tales como un tiol, un tiolato o un tiol protegido). Más particularmente, el método incluye las etapas de (i) la provisión de un polímero soluble en agua que contenga un segmento polimérico soluble en agua denominado en la presente "POLI", con un extremo activado por un electrófilo (-E), denominado
20 generalmente en la presente "POLI-E", seguido por (ii) la reacción de tal polímero con una molécula reactiva que contenga un nucleófilo (-NU) y un resto tiol-selectivo bajo condiciones eficaces para estimular la reacción entre el electrófilo y el nucleófilo con el fin de formar un polímero soluble en agua que tenga un extremo tiol-selectivo, denominado en la presente "POLI-S", donde "S" en esta utilización indica un resto tiol-selectivo.

25 El resto tiol-selectivo es disulfuro.

El método comprende adicionalmente la etapa de reducción del enlace disulfuro de POLI-S para formar un polímero soluble en agua con un grupo tiol terminal (denominado en la presente "POLI-SH").

30 En una realización, por ejemplo cuando el polímero proporcionado en la etapa (i) es un polímero lineal con extremos protegidos ("capped") o un polímero activado monofuncionalmente que tiene únicamente un extremo electrofílico reactivo, la composición del producto POLI-S de la etapa (ii) contiene más de un 95% aproximadamente en moles del POLI-S sustituido monofuncionalmente deseado.

35 En otra realización relacionada más, por ejemplo cuando el polímero de partida es un polímero activado monofuncionalmente o con extremos protegidos que tiene únicamente un extremo electrofílico reactivo, el producto POLI-S de la etapa (ii) contiene menos de un 5% aproximadamente de POLI-S sustituido difuncionalmente.

40 En una realización adicional, el polímero de la etapa (i) contiene un electrófilo (-E) que es un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico activado. Tales electrófilos incluyen ácido carboxílico, amida, éster de ácido carboxílico, éster carbonato, ácido carbónico, haluro de ácido y anhídrido. En una realización específica, el polímero de la etapa (i) es un derivado N-hidroxisuccinimidil propionato o N-hidroxisuccinimidil butanoato de polietilén glicol.

45 En otra realización más, el electrófilo E es un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico activado y POLI-E, o un precursor del mismo, es purificado antes de la etapa de reacción. Los métodos de purificación preferidos incluyen métodos químicos y cromatográficos. En una realización preferida del método, el POLI-E es purificado mediante cromatografía en columna antes de la etapa de reacción. En una
50 realización más específica todavía, el POLI-E es purificado mediante cromatografía de intercambio iónico o IEC.

La molécula reactiva incluye un nucleófilo (-NU). Nucleófilos adecuados incluyen grupos amino primarios, grupos amino secundarios, hidroxil, imino, tiol, tioéster y sus equivalentes aniónicos, donde sea aplicable. En una realización particular, la molécula reactiva contiene un nucleófilo que es un grupo amino primario o
55 secundario.

La molécula reactiva es un reactivo disulfuro simétrico que contiene nucleófilos (-NU) idénticos, generalmente como grupos terminales, donde la etapa de reacción tiene como resultado la formación de un polímero simétrico con un enlace disulfuro central. En una realización específica, la molécula para la
60 reacción con el polímero electrofílicamente activado es cistamina o cisteamina. Alternativamente, la molécula reactiva es N-(2-amino-etil)3-maleimido-propionamida, opcionalmente protegida como una sal de amina.

Se describe un conjugado polímero-proteína unido por disulfuro producido mediante tal método.

65 Un polímero soluble en agua que tiene un extremo tiol-selectivo producido mediante el método anterior, denominado generalmente en la presente POLI-S. Grupos tiol-selectivos ilustrativos incluyen tiol, tiol protegido, disulfuro, maleimida, vinil sulfona, compuestos α -haloacetilo tales como yodoacetamida y yodoacetato, mercuriales, haluros de arilo, diazoacetatos y disulfuro de ortopiridilo.

Segmentos poliméricos solubles en agua incluyen polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliácridoil-morfolina, polioxazolona y polioles polioxiethylados.

El polímero es polietilén glicol (PEG).

Un polímero de la invención puede contener además un grupo protector terminal tal como alcoxi C₁-C₂₀,

preferiblemente metoxi, etoxi o benciloxi.

El polímero, por ejemplo un polímero polietilén glicol, tiene un peso molecular medio nominal seleccionado del grupo que consta de desde 200 aproximadamente hasta 100.000 daltons aproximadamente, o desde 200 aproximadamente a 60.000 daltons aproximadamente, o desde 500 aproximadamente a 40.000 daltons aproximadamente. En una realización preferida, el polímero tiene un peso molecular que varía de 20.000 aproximadamente a 40.000 daltons aproximadamente. Un polímero polietilén glicol preferido tiene un peso molecular de 20.000 daltons aproximadamente.

Los polímeros adecuados para ser utilizados en los métodos y composiciones de la invención pueden tener varias geometrías diferentes incluyendo una geometría lineal, ramificada, bifurcada y con múltiples brazos. Los polímeros que tienen una estructura lineal incluyen polímeros monofuncionales, homodifuncionales y heterodifuncionales.

En otra realización más, un segmento polimérico para ser utilizado en la invención puede contener un enlace hidrolizable.

La invención proporciona un método para preparar un derivado tiólico de un polímero soluble en agua que incluye las etapas siguientes. La etapa (i) comprende la provisión de un polímero activado electrofílicamente, denominado específicamente en la presente POLI-L_{0,1}-E (I). En la estructura precedente, POLI es un segmento polimérico soluble en agua, L es un adaptador opcional, donde L₀ indica la ausencia de adaptador y L₁ indica que tal adaptador está presente, y E es un electrófilo. La etapa (ii) comprende la reacción de POLI-L_{0,1}-E con un reactivo disulfuro simétrico, denominado más específica en la presente (NU-Y-S)₂, donde NU es un nucleófilo, Y es un grupo interpuesto entre "NU" y el grupo tiol-selectivo, en este caso un disulfuro, y S es un átomo de azufre, bajo condiciones eficaces para estimular la reacción entre E y NU para formar mediante la misma POLI-L_{0,1}-X-Y-S-S-Y-X-L_{0,1}-POLI ((POLI-L_{0,1}-X-Y-S)₂), (II), donde X es un grupo resultante de la reacción entre E y NU. Los grupos Y preferidos son seleccionados del grupo que consta de alquileo, alquileo sustituido, cicloalquileo, cicloalquileo sustituido, arilo y arilo sustituido, conteniendo de 2 aproximadamente a 10 átomos de carbono aproximadamente.

El método incluye además la etapa de (iii) reducción del enlace disulfuro presente en (POLI-L_{0,1}-X-Y-S)₂ para formar POLI-L_{0,1}-X-Y-SH, (III), donde "-SH" es un tiol.

Adaptadores L particulares contenidos en el polímero incluyen alquilo C₁-C₁₀ y alquilo C₁-C₁₀ sustituido.

En una realización, el adaptador es seleccionado del grupo que consta de (CH₂)_{1,2,3,4 y 5}.

Electrófilos E representativos incluyen ácidos carboxílicos o derivados de ácidos carboxílicos activados tales como ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, amida, éster carbonato, ácido carbónico, haluro de ácido y anhídrido. En una realización particular, E es un succinimidil éster.

Los NUs del reactivo disulfuro simétrico incluyen amino, hidroxilo, imino y tiol. En una realización específica, NU es -NH₂.

Los grupos X resultantes contenidos en POLI-L_{0,1}-X-Y-S-S-Y-X-L_{0,1}-POLI ((POLI-L_{0,1}-X-Y-S)₂) incluyen amida, carbamato, éster carbonato, éter y tioéster.

POLI comprende la estructura -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂- en la cual n varía de 10 a 4.000 aproximadamente, preferiblemente de 20 aproximadamente a 1.000 aproximadamente.

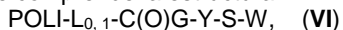
En otra realización más, POLI es con el extremo protegido polietilén glicol, L es L₀ o -CH₂- y E es N-hidroxisuccinimidil éster.

En otra realización más, el reactivo disulfuro simétrico es cistamina, donde NU es un amino primario e Y es -(CH₂)₂.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para preparar un conjugado polímero-proteína, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) la provisión de un polímero activado electrofílicamente, POLI-L_{0,1}-E, donde POLI, L y E son según se definieron previamente, (ii) la reacción de POLI-L_{0,1}-E con un reactivo disulfuro simétrico, (NU-Y-S)₂, donde NU, Y y S son según se definieron previamente, bajo condiciones eficaces para estimular la reacción entre E y NU para formar POLI-L_{0,1}-X-Y-S-S-Y-X-L_{0,1}-POLI ((POLI-L_{0,1}-X-Y-S)₂), donde X es un grupo resultante de la reacción entre E y NU, (iii) la reducción del enlace disulfuro de (POLI-L_{0,1}-X-Y-S)₂ para formar POLI-L_{0,1}-X-Y-SH, y (iv) la reacción de POLI-L_{0,1}-X-Y-SH con un grupo tiol o con un grupo tiol protegido de una proteína para formar un conjugado con la proteína, POLI-L_{0,1}-X-Y-S-S-proteína, (V).

En una realización del método anterior, la proteína es una proteína terapéutica.

Se describe un polímero activado que comprende la estructura:



En la estructura VI, G es un heteroátomo seleccionado del grupo que consta de O, -NH, -NR² donde R² es un alquilo inferior y S, y W es H o un grupo protector. Las variables restantes son según se definieron previamente. En la estructura VI, -C(O)G- es una realización particular de "X".

Los adaptadores L₁ para ser utilizados en el polímero activado incluyen adaptadores alifáticos de uno a diez átomos de carbono. Adaptadores particulares incluyen (CH₂)_{1,2,3,4 y 5}.

En una realización particular de este aspecto de la invención, POLI es un polietilén glicol protegido terminalmente, L está ausente o es -CH₂-, G es -NH y Y es (CH₂)₂.

Se describen también en la presente composiciones que contienen los polímeros anteriormente descritos y sus conjugados.

En otro aspecto más, la invención proporciona un conjugado polimérico que comprende la estructura:

en la que "A" indica un agente activo y "S-A" indica el residuo de un agente activo que tiene un grupo tiol. El agente activo es una proteína.

- 5 Estos y otros objetos y características de la invención serán mucho más obvios cuando sean leídos junto con la descripción detallada siguiente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 DEFINICIONES

Los términos siguientes, según son utilizados en la presente, tienen los significados indicados. Según son utilizadas en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el", "la", incluyen los referentes en plural a no ser que el contexto lo indique claramente de otro modo.

- 15 Un "derivado tiol-selectivo", en el contexto de un polímero de la invención, significa un polímero que tiene al menos un extremo que es un grupo reactivo con tiol. De manera preferente, un grupo tiol-selectivo es uno que reacciona preferentemente con grupos tiol. Un polímero tiol-selectivo de la invención será preferiblemente bastante selectivo para los grupos tiol bajo ciertas condiciones de reacción.

- 20 "Ácido carboxílico activado" o "derivado de ácido carboxílico activado" significa un derivado funcional de un ácido carboxílico que es más reactivo que el ácido carboxílico parental, en particular con respecto a la sustitución de acilos nucleofílicos. Los ácidos carboxílicos activados incluyen, pero no se limitan a, haluros de ácido (tales como cloruros de ácido), anhídridos, amidas y ésteres.

- "PEG" o "poli(etilén glicol)", según se utiliza en la presente, tiene la intención de incluir cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEGs para ser utilizados en la presente invención comprenderán una de las dos estructuras siguientes: $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ o $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2-$, dependiendo de si el(los) oxígeno(s) terminal(es) ha(n) sido o no desplazado(s), por ejemplo, durante una transformación sintética. La variable (n) varía de 3 a 4000 y los grupos terminales y la arquitectura del PEG global pueden variar. Cuando el PEG contiene además un resto adaptador (que será descrito con mayor detalle posteriormente), los átomos que contiene el adaptador, cuando está covalentemente unido a un segmento del PEG, no tienen como resultado la formación de (i) un enlace oxígeno-oxígeno (-O-O-, un enlace peróxido) ni de (ii) un enlace nitrógeno-oxígeno (N-O, O-N). "PEG" significa un polímero que contiene una mayoría, es decir más de un 50%, de subunidades que son $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}-$. Los PEGs para ser utilizados en la invención incluyen PEGs con una variedad de pesos moleculares, estructuras o geometrías (por ejemplo, PEGs ramificados, lineales, bifurcados, dendríticos, etcétera) que serán descritos con mayor detalle posteriormente.

"PEG-diol", conocido también como alfa-omega-dihidroxiolipoli(etilén glicol), puede ser representado en forma abreviada como HO-PEG-OH, donde PEG es según se definió anteriormente.

- "Soluble en agua", en el contexto de un polímero de la invención, o un "segmento polimérico soluble en agua" es cualquier segmento o polímero que sea soluble en agua a temperatura ambiente. Típicamente, un polímero o un segmento soluble en agua transmitirá al menos un 75% aproximadamente, más preferiblemente al menos un 95% aproximadamente de luz, transmitida por la misma solución después de filtrar. En términos de peso, un polímero o un segmento del mismo soluble en agua será preferiblemente al menos un 35% (en peso) soluble en agua aproximadamente, más preferiblemente al menos un 50% (en peso) aproximadamente soluble en agua, aún más preferiblemente al menos un 70% (en peso) soluble en agua aproximadamente y todavía más preferiblemente un 85% (en peso) soluble en agua aproximadamente. Lo más preferido es, sin embargo, que el polímero o el segmento soluble en agua sea un 95% (en peso) aproximadamente soluble en agua o completamente soluble en agua.

- Un grupo "protector de los extremos" o "protegido terminalmente" es un grupo inerte o no reactivo presente en un extremo de un polímero tal como PEG. Un grupo protector terminal es uno que no experimenta fácilmente transformación química bajo las condiciones típicas de las reacciones de síntesis. Un grupo protector terminal es generalmente un grupo alcoxi, -OR, donde R es un radical orgánico compuesto por 1-20 carbonos y es preferiblemente un alquilo inferior (por ejemplo, metilo, etilo) o bencilo. "R" puede ser saturado o no saturado e incluye arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo y formas sustituidas de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, un PEG protegido terminalmente comprenderá típicamente la estructura $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$, donde R es según se definió anteriormente.

- 55 El grupo protector terminal puede contener también de forma ventajosa una marca detectable. Cuando el polímero tiene un grupo protector terminal que contiene una marca detectable, puede determinarse la cantidad o la posición del polímero y/o del resto (por ejemplo, el agente activo) al cual está acoplado el polímero, mediante la utilización de un detector adecuado. Tales marcas incluyen, sin limitación, restos fluorescentes, quimioluminiscentes, restos utilizados en el marcaje de enzimas, restos colorimétricos (por ejemplo, colorantes), iones metálicos, restos radiactivos, etcétera. El grupo protector terminal puede comprender también de manera ventajosa un fosfolípido. Cuando el polímero tiene un grupo protector terminal tal como un fosfolípido, se imparten al polímero propiedades únicas (tales como la capacidad para formar estructuras organizadas con polímeros protegidos terminalmente de manera similar).

- 60 Ejemplos de fosfolípidos incluyen, sin limitación, aquellos seleccionados de la clase de fosfolípidos denominados fosfatidilcolinas. Fosfolípidos específicos incluyen, sin limitación, aquéllos seleccionados del grupo que consta de dilauroilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dieste-

roilfosfatidilcolina, behenoilfosfatidilcolina, araquidoilfosfatidilcolina y lecitina.

"No existente de forma natural", con respecto a un polímero, significa un polímero que no se encuentra en la naturaleza en su totalidad. Un polímero no existente de forma natural puede contener sin embargo una o más subunidades o segmentos de subunidades existentes en la naturaleza, siempre que la estructura global del polímero no se encuentre en la naturaleza.

"Masa molecular", en el contexto de un polímero soluble en agua, se refiere a la masa molecular media nominal del polímero, determinada típicamente mediante cromatografía de exclusión de tamaños, mediante técnicas de dispersión de la luz o mediante la determinación de la velocidad intrínseca en 1,2,4-triclorobenceno. Los polímeros son típicamente polidispersos, poseyendo valores bajos de polidispersidad, menores de 1,20 aproximadamente, y más preferiblemente menores de 1,10.

El término "reactivo" o "activado" se refiere a un grupo funcional que reacciona fácilmente o a una velocidad práctica bajo las condiciones convencionales de la síntesis orgánica. Esto contrasta con aquellos grupos que no reaccionan o que requieren catalizadores potentes o condiciones de reacción poco prácticas para reaccionar (esto es, un grupo "no reactivo" o "inerte").

"No fácilmente reactivo" o "inerte", con referencia a un grupo funcional presente en una molécula de una mezcla de reacción, indica que el grupo permanece en gran parte intacto bajo las condiciones eficaces para producir una reacción deseada en la mezcla de reacción.

Un "grupo protector" es un resto que impide o bloquea la reacción de un grupo funcional particular de una molécula reactivo químicamente bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo reactivo químicamente que está siendo protegido así como de las condiciones de reacción que van a ser empleadas y de la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula. Grupos funcionales que pueden ser protegidos incluyen, a manera de ejemplo, grupos ácido carboxílico, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos carbonilo, etcétera. Grupos protectores de ácidos carboxílicos representativos incluyen ésteres (tal como un p-metoxibencil éster), amidas e hidracidas; de grupos amino, carbamatos (tal como *ter*-butoxicarbonilo) y amidas; de grupos hidroxilo, éteres y ésteres; de grupos tiol, tioéteres y tioésteres; de grupos carbonilo, acetales y cetales; etcétera. Tales grupos protectores son bien conocidos por los expertos en la técnica y están descritos en, por ejemplo, T.W. Greene y G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Tercera Edición, Wiley, New York, 1999 y las referencias citadas en el mismo.

Un grupo funcional en "forma protegida" se refiere a un grupo funcional portador de un grupo protector. Según se utiliza en la presente, el término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo tiene la intención de incluir las formas protegidas del mismo.

El término "adaptador" es utilizado en la presente para referirse a un átomo o a una colección de átomos utilizados opcionalmente para unir restos que se interconectan, tales como un segmento polimérico y un electrófilo. Los adaptadores de la invención son generalmente hidrolíticamente estables.

Un enlace "susceptible de ser cortado fisiológicamente" o "hidrolizable" o "degradable" es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (esto es, es hidrolizado) bajo condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a ser hidrolizado en agua dependerá no sólo del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales, sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Enlaces hidrolíticamente inestables o débiles apropiados incluyen pero no se limitan a, éster carboxilato, éster fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos, tioésteres, tiolésteres y carbonatos.

Un "enlace degradable enzimáticamente" significa un enlace que está sujeto a degradación por uno o más enzimas.

Un enlace o adaptador "hidrolíticamente estable", para los fines de la presente invención y en particular con referencia a los polímeros, se refiere a un átomo o a una colección de átomos que son hidrolíticamente estables bajo condiciones fisiológicas normales. Es decir, un enlace hidrolíticamente estable no experimenta hidrólisis bajo condiciones fisiológicas en un grado apreciable durante un extenso periodo de tiempo. Ejemplos de enlaces hidrolíticamente estables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: enlaces carbono-carbono (por ejemplo en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos, aminas, etcétera. Las tasas de hidrólisis de enlaces químicos representativos pueden encontrarse en la mayoría de libros de texto estándar de química.

"Ramificada", con referencia a la geometría o a la estructura global del polímero, se refiere a un polímero que tiene dos o más "brazos" poliméricos. Un polímero ramificado puede tener 2 brazos poliméricos, 3 brazos poliméricos, 4 brazos poliméricos, 6 brazos poliméricos, 8 brazos poliméricos o más. Un tipo particular de polímero muy ramificado es un polímero dendrítico o dendrímero, el cual se considera para los fines de la presente invención que posee una estructura distinta de la de un polímero ramificado.

"Punto de ramificación" se refiere a un punto de bifurcación que contiene uno o más átomos en el cual el polímero se divide o se ramifica a partir de una estructura lineal en uno o más brazos poliméricos adicionales.

Un "dendrímero" es un polímero globular de tamaño monodisperso en el cual todos los enlaces emergen radialmente desde un punto focal central o núcleo central con un patrón de ramificación regular y con unidades repetidas que contribuyen cada una de ellas a un punto de ramificación. Los dendrímeros muestran ciertas propiedades del estado dendrítico tales como la encapsulación del grupo central, haciendo que sean distintos de los demás tipos de polímeros.

"Sustancialmente" o "esencialmente" significa casi totalmente o completamente. Por ejemplo, un 95% o más de alguna cantidad dada.

- Un grupo "alquilo" o "alquileno", dependiendo de su posición en una molécula y del número de puntos de unión del grupo a átomos distintos de hidrógeno, se refiere a una cadena o resto hidrocarbonado, variando típicamente de 1 a 20 átomos de longitud aproximadamente. Tales cadenas hidrocarbonadas son preferiblemente, pero no necesariamente, saturadas a no ser que se indique de otro modo y pueden ser una cadena ramificada o una cadena lineal, aunque típicamente se prefiere una cadena lineal.
- 5 Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-etilpropilo, 3-metilpentilo, etcétera.
- "Alquilo inferior" o "alquileno inferior" se refiere a un grupo alquilo o alquileno según se definió anteriormente que contiene de 1 a 6 átomos de carbono y puede ser una cadena lineal o ramificada,
- 10 según está ejemplificado por metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo.
- "Cicloalquilo" o "cicloalquileno", dependiendo de su posición en una molécula y del número de puntos de unión a átomos distintos de hidrógeno, se refiere a una cadena hidrocarbonada cíclica saturada o insaturada, incluyendo compuestos policíclicos tales como compuestos cíclicos de puente, fusionados o espirocíclicos, que tienen preferiblemente de 3 a 12 átomos de carbono aproximadamente, más
- 15 preferiblemente de 3 a 8 aproximadamente.
- "Cicloalquilo inferior" o "cicloalquileno inferior" se refiere a un grupo cicloalquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono.
- "Alicíclico" se refiere a un compuesto alifático que contiene un anillo de átomos de carbono. Un grupo alicíclico es uno que contiene un grupo "cicloalquilo" o "cicloalquileno", según se definió anteriormente,
- 20 que está sustituido con uno o más alquilos o alquilenos.
- "Sustituyentes no interferentes" son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, son típicamente no reactivos con otros grupos funcionales contenidos en la molécula.
- El término "sustituido" como en el caso de, 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, por ejemplo ciclopropilo, ciclobutilo, etcétera; halo, por ejemplo, flúor, cloro, bromo y yodo; ciano; alcoxi, fenilo inferior; fenilo sustituido, etcétera. En cuanto a las sustituciones en un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (esto es, orto, meta o para).
- 25 "Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R, donde R es un alquilo o un alquilo sustituido, preferiblemente un alquilo C₁-C₂₀ (por ejemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, bencilo, etc.), preferiblemente C₁-C₇.
- Según se utiliza en la presente, "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado de 1 a 15 átomos de longitud, que contiene al menos un doble enlace, tal como etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-butenilo, isobutenilo, octenilo, decenilo, tetradecenilo, etcétera.
- El término "alquinilo", según se utiliza en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado de 2 a 15 átomos de longitud, que contiene al menos un triple enlace, etinilo, n-propinilo,
- 35 isopropinilo, n-butinilo, isobutinilo, octinilo, decinilo, etcétera.
- "Arilo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno con 5 ó 6 átomos de carbono en el núcleo central. El término arilo incluye múltiples anillos de arilo que pueden estar fusionados, como en el caso de naftilo, o no fusionados, como en el bifenilo. Los anillos de arilo pueden estar también fusionados o no fusionados con uno o más hidrocarburos cíclicos, heteroarilos o anillos heterocíclicos. Según se utiliza en la presente,
- 40 "arilo" incluye heteroarilo.
- "Heteroarilo" es un grupo arilo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, preferiblemente N, O o S, o una combinación de los mismos. Los anillos de heteroarilo pueden estar también fusionados con uno o más hidrocarburos cíclicos, heterocíclicos, arilo o anillos de heteroarilo.
- "Heterociclo" o "heterocíclico" indica uno o más anillos de 5-12 átomos, preferiblemente 5-7 átomos, con o sin insaturación o carácter aromático y que tienen al menos un átomo del anillo que no es carbono. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno y nitrógeno.
- 45 "Heteroarilo sustituido" es un heteroarilo que tiene uno o más grupos no interferentes como sustituyentes.
- "Heterociclo sustituido" es un heterociclo que tiene una o más cadenas laterales formadas a partir de sustituyentes no interferentes.
- 50 "Electrófilo" se refiere a un ión, átomo o colección de átomos que pueden ser iónicos, con un centro electrofílico, esto es un centro que es buscador de electrones, capaz de reaccionar con un nucleófilo.
- "Nucleófilo" se refiere a un ión o a un átomo o a una colección de átomos que pueden ser iónicos, con un centro nucleofílico, esto es un centro buscador de un centro electrofílico, y que es capaz de reaccionar con un electrófilo.
- 55 "Agente activo", según se utiliza en la presente, incluye cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de materia o mezcla que proporcione algún efecto farmacológico, a menudo beneficioso, que pueda ser demostrado *in vivo* o *in vitro*. Éste incluye alimentos, suplementos alimenticios, nutrientes, nutracéuticos, fármacos, vacunas, anticuerpos, vitaminas y otros agente beneficiosos. Según se utiliza en la presente, estos términos incluyen además cualquier sustancia fisiológicamente o farmacológicamente
- 60 activa que produzca un efecto localizado o sistémico en un paciente.
- "Excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que puede ser incluido en las composiciones de la invención y que no produce efectos toxicológicos adversos significativos en el paciente.
- "Cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad fisiológicamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" son términos utilizados indistintamente en la presente para indicar la cantidad de conjugado PEG-agente activo presente en una preparación farmacéutica que es necesaria para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o conjugado en el torrente sanguíneo o en el tejido diana. La cantidad precisa
- 65

dependerá de numerosos factores, por ejemplo del agente activo particular, de los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, de la población de pacientes deseada, de las consideraciones del paciente, etcétera, y puede ser determinada fácilmente por una persona experta en la técnica sobre la base de la información aquí proporcionada y disponible en la literatura relevante.

5 "Multifuncional", en el contexto de un polímero, indica un esqueleto polimérico que tiene tres o más grupos funcionales contenidos en el mismo, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes, y están presentes típicamente en los extremos del polímero. Los polímeros multifuncionales de la invención contendrán típicamente 3-100 grupos funcionales aproximadamente, o 3-50 grupos funcionales, o 3-25 grupos funcionales, o 3-15 grupos funcionales o de 3 a 10 grupos funcionales, o contendrán 3, 4, 5, 6, 7

10 ,8, 9 ó 10 grupos funcionales en el esqueleto del polímero. Un polímero "difuncional" significa un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos en el mismo, típicamente en los extremos del polímero. Cuando los grupos funcionales son iguales, se dice que el polímero es homodifuncional. Cuando los grupos funcionales son diferentes, se dice que el polímero es heterodifuncional.

15 Un reactivo básico o ácido descrito en la presente incluye cualquier forma neutra, cargada y cualquier forma de sal correspondiente del mismo.

"Alcohol poliolefínico" se refiere a un polímero que contiene un esqueleto polimérico de olefina, tal como polietileno, con múltiples grupos hidroxilo colgantes unidos al esqueleto del polímero. Un ejemplo de alcohol poliolefínico es alcohol polivinílico.

20 Según se utiliza en la presente, "no peptídico" se refiere a un esqueleto polimérico sustancialmente libre de enlaces peptídicos. Sin embargo, el polímero puede incluir un pequeño número de enlaces peptídicos separados a lo largo de las subunidades monoméricas repetidas tal como, por ejemplo, no más de 1 enlace peptídico aproximadamente por 50 unidades monoméricas aproximadamente.

25 El término "paciente" se refiere a un organismo vivo que padezca o que sea susceptible de padecer una condición que pueda ser prevenida o tratada por la administración de un polímero, típicamente, pero no necesariamente, en forma de un conjugado polímero-agente activo, e incluye humanos y animales.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita a continuación puede tener lugar o no, de tal manera que la descripción incluye casos en los que la circunstancia tiene lugar y casos en los que la circunstancia no tiene lugar.

30 Por "residuo" se indica la porción de una molécula que permanece después de la reacción con una o más moléculas. Por ejemplo, el residuo de una molécula biológicamente activa de un conjugado polimérico corresponde típicamente a la porción de la molécula biológicamente activa hasta el enlace covalente, pero excluyendo el mismo, resultante de la reacción de un grupo reactivo de la molécula biológicamente activa con un grupo reactivo de un reactivo polimérico. El término "conjugado" tiene la intención de referirse a la entidad formada como resultado de la unión covalente de una molécula, por ejemplo una molécula biológicamente activa o cualquier superficie reactiva, a una molécula de polímero reactivo, preferiblemente un poli(etilén glicol) reactivo.

"Cisteamina" se refiere a 2-aminoetanotiol o $H_2N-(CH_2)_2-SH$.

"Cistamina" se refiere a 2,2'-ditiobis(etilamina) o $(H_2N-(CH_2)_2-S)_2$.

40

MÉTODO PARA PREPARAR DERIVADOS TIOL-SELECTIVOS DE POLÍMEROS SOLUBLES EN AGUA

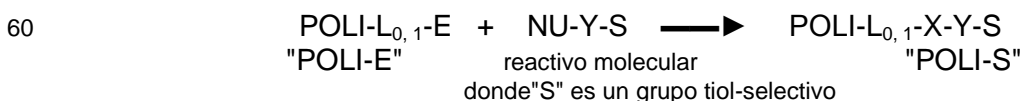
VISIÓN GENERAL DEL MÉTODO

45 La presente invención proporciona un método para preparar derivados poliméricos solubles en agua adecuados para reaccionar con los grupos tiol de las proteínas o de otros agentes activos. En el método, un segmento polimérico soluble en agua que tiene al menos un extremo electrofílico reactivo se hace reaccionar con una molécula reactiva bifuncional (es decir, una molécula reactiva que tiene al menos dos grupos funcionales según se describe más adelante) que contiene un resto nucleófilo (para reaccionar con el extremo electrofílico del polímero) y un resto tiol-selectivo. El resto tiol-selectivo es disulfuro. La

50 reacción se lleva a cabo bajo condiciones eficaces para promover la reacción entre el extremo electrofílico del polímero y el núcleo nucleofílico de la molécula reactiva, para formar una unión covalente entre el polímero y la molécula reactiva. La reacción tiene como resultado la formación de un polímero activado que tiene un extremo que es selectivo para reaccionar con un tiol (por ejemplo, un tiol, un tiol protegido,

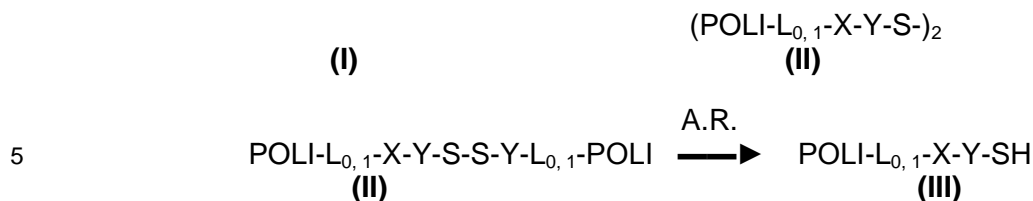
55 disulfuro, maleimida, vinil sulfona, yodoacetamida o disulfuro de ortopiridilo), dependiendo de la molécula reactiva particular empleada. A continuación se presenta un esquema generalizado de la reacción.

1. Esquema Generalizado de la Reacción:

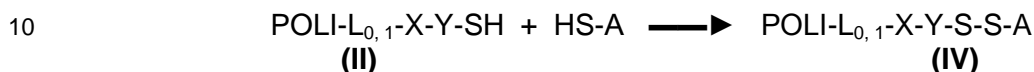


65 2. Realización Específica Ejemplar





donde A.R. es un agente reductor y Z, POLI, L, Y, X, NU son según se definen en la presente.



donde A es un agente activo.

15 En su forma más simplificada, el método puede proporcionar derivados activados de polietilén glicol con un extremo tiol-selectivo en una etapa de reacción. En los casos en los que la molécula reactiva posee un nucleófilo que compite con el resto tiol-selectivo por la reacción con el extremo electrofílico del polímero, por ejemplo cuando el nucleófilo es un grupo amino y el resto que contiene azufre es un tiol o un tiolato, como en el caso del reactivo ejemplar, cisteamina, puede ser necesaria la protección del grupo tiol de la molécula reactiva para impedir la reacción del polímero en el centro tiol del reactivo. Alternativamente, si las velocidades de reacción de los dos restos competidores son significativamente diferentes, la reacción puede ser llevada a cabo bajo condiciones en las que el centro nucleofílico de la molécula reactiva reaccione selectivamente o preferencialmente con el electrófilo del polímero. Los productos de reacción no deseados resultantes de la reacción entre el tiol o el tiolato y el electrófilo dado pueden ser posteriormente eliminados mediante etapas adicionales de purificación/separación.

25 En las secciones siguientes se proporciona una descripción detallada concerniente a los polímeros activados electrofílicamente y a los reactivos moleculares adecuados.

30 La molécula reactiva es un disulfuro simétrico que tiene dos grupos nucleofílicos idénticos para reaccionar con el grupo electrofílico del polímero. Este procedimiento es ventajoso porque no existe competición entre nucleófilos potencialmente diferentes de la molécula reactiva. Así, bajo condiciones de reacción adecuadas (por ejemplo, cuando se emplea al menos un exceso molar de dos veces de polímero electrofílicamente activado - suficiente para reaccionar con todos los grupos nucleofílicos del disulfuro simétrico), se forma un sólo producto polimérico activado.

35 Las moléculas reactivas simétricas ejemplares poseerán un enlace disulfuro (-S-S-) central dondelos átomos de azufre están conectados cada uno de ellos a grupos Y idénticos tales como un grupo alquileo, alquileo sustituido, cicloalquileo, cicloalquileo sustituido, arilo o arilo sustituido que poseen un nucleófilo (NU) tal como un amino, hidroxilo, tiol, imino, tioéster, etcétera, unido covalentemente a los mismos, "(NU-Y-S)₂". Una de tales moléculas reactivas simétricas preferidas es cistamina. La reacción de un polímero activado electrofílicamente con un reactivo disulfuro simétrico tal como cistamina, tiene como resultado la formación de un polímero disulfuro simétrico con segmentos poliméricos idénticos que se extienden desde cada uno de los átomos de azufre del enlace disulfuro central. En los Ejemplos (Ejemplos 1-3) se proporcionan reacciones ilustrativas llevadas a cabo con diferentes polímeros activados electrofílicamente y el reactivo cistamina. El polímero activado electrofílicamente se hace reaccionar típicamente con una molécula reactiva bifuncional bajo condiciones de reacción muy suaves (por ejemplo, a temperatura ambiente), lo cual ofrece otra ventaja de este procedimiento. Además, los rendimientos típicos son mayores del 70%, preferiblemente mayores del 80%, más preferiblemente mayores del 90% y a menudo incluso mayores del 95%.

45 Debido a la simetría del polímero disulfuro resultante, el corte por la acción de un agente reductor tal como ditiotreitolo, tiene como resultado la formación de dos moles del derivado polimérico tiol-selectivo correspondiente ("POLI-S").

50 Los polímeros preferidos (POLI-Es) para ser utilizados en la presente invención incluyen ácido metoxi-PEG propanoico y ácido metoxi-PEG butanoico y las formas activadas de los mismos. En las estructuras (11), (13) y (18) descritas en la presente se proporcionan derivados poliméricos particularmente preferidos que tienen un extremo tiol-selectivo.

55 En otra realización preferida, los derivados poliméricos de la invención son preparados a partir de un ácido polimérico o de materiales de partida equivalentes a un ácido polimérico, donde el ácido polimérico es purificado antes de la reacción con el nucleófilo. Un ácido polimérico o un equivalente de un ácido polimérico es un polímero soluble en agua de la invención con al menos un grupo funcional o un extremo que es un ácido carboxílico o un equivalente de un ácido carboxílico tal como un derivado activado de un ácido carboxílico. La utilización o la preparación de un ácido polimérico proporciona una ventaja adicional en cuanto a que permite una fácil eliminación de las impurezas PEG-diol o derivadas de PEG-diol que pueden estar presentes en el material de partida polimérico, dependiendo de su origen.

60 A menudo, los polietilén glicoles de partida, tales como PEG activado electrofílicamente, según son utilizados en muchas realizaciones de la invención, contienen cantidades detectables de la impureza PEG-diol, que varían a menudo desde un 0,5% hasta más de un 30% en peso. Cualquier cantidad de impureza diol puede ser un problema, ya que el diol (y sus productos de reacción) puede ser

extremadamente difícil de eliminar/separar. Adicionalmente, debido a su reactividad, el PEG-diol (y más particularmente sus productos de conversión) puede reaccionar con el agente bioactivo durante la reacción de acoplamiento, teniendo como resultado la formación de una mezcla de productos conjugados. La mezcla de conjugados resultante puede ser difícil de analizar, esto es, de determinar el grado de impurezas derivadas del diol presentes. Además, la separación del producto conjugado deseado de los productos conjugados derivados del diol puede ser extremadamente difícil y, en algunos casos, puede ser imposible de conseguir. En particular, polímeros solubles en agua de alto peso molecular tales como metoxi-PEG-OH (por ejemplo, con un peso molecular mayor de 30.000 daltons aproximadamente) pueden contener hasta un 30 por ciento en peso o más de diol, dependiendo del origen y/o del método para producir el PEG de partida. Según se discutió anteriormente, tales impurezas de diol y derivadas de diol pueden ser especialmente problemáticas cuando se arrastran a través de una serie de transformaciones sintéticas y/o de una reacción de conjugación. La utilización de un ácido polimérico, tal como en el método de la invención, permite la purificación, por ejemplo mediante cromatografía, del material de partida POLI-E (o de su precursor equivalente) y la formación final de la formulación del polímero tiol-selectivo que está esencialmente libre de impurezas de PEG-diol reactivo o de derivados de PEG-diol reactivos.

Los solicitantes han reconocido que la separación de impurezas relacionadas con PEG-diol al principio de una reacción o de una serie de reacciones que dan lugar a la formación de un derivado polimérico reactivo o finalmente a la formación de un conjugado polimérico, es ventajosa, ya que la separación/purificación en esta etapa se lleva a cabo más fácilmente cuando se compara con la separación de diferentes especies de conjugados poliméricos.

Alternativamente, como procedimiento para eliminar o convertir en inertes las impurezas derivadas de mPEG-diol, el polímero soluble en agua proporcionado en la etapa (i), POLI-E, puede ser preparado a partir de un PEG-OH libre de dioles preparado a partir de benciloxi-PEG según se describe en la Patente de EE.UU. copropiedad N° 6.448.639. En este procedimiento, el material de partida benciloxi-PEG-OH es preparado preferencialmente mediante polimerización de óxido de etileno en el ión bencilóxido, Bz-O⁻, teniendo como resultado benciloxi PEGs monofuncionales de alta pureza que contienen PEG-diol. Después de convertir todos los grupos PEG-OH en éteres de metilo inertes y de eliminar los grupos benciloxi en etapas posteriores, el método proporciona metoxi-PEG-OH puro libre de dioles. Al utilizar este método, el PEG-diol es convertido en su forma éter no reactiva, convirtiéndolo en un componente inerte de la composición resultante.

En suma, el método proporcionado en la presente (i) evita múltiples etapas de reacción tediosas, (ii) no requiere necesariamente múltiples etapas de protección/desprotección, (iii) se lleva a cabo bajo condiciones suaves de tal manera que el segmento polimérico no es particularmente susceptible a ser dañado, (iv) tiene como resultado rendimientos elevados del producto, típicamente mayores del 90%, y (v) proporciona una nueva clase de derivados poliméricos que tienen un extremo tiol-selectivo. La metodología sintética global, los reactivos, los derivados poliméricos, las composiciones y los conjugados de la invención serán descritos en mayor profundidad a continuación.

REACTIVOS POLIMÉRICOS, POLI-L₀, 1-E

El Segmento Polimérico, POLI

Lo siguiente describe el segmento polimérico denominado en la presente POLI, aplicable a los polímeros activados electrofílicamente del método. Los derivados poliméricos activados electrofílicamente útiles en la presente invención contienen en general al menos un electrófilo acoplado a un segmento polimérico soluble en agua. El electrófilo puede estar unido covalentemente de manera directa al segmento polimérico o, alternativamente, puede estar acoplado al esqueleto del polímero a través de un grupo adaptador L.

POLIs representativos de el método de la reivindicación 14 incluyen poli(alquilén glicoles) tales como poli(etilén glicol), poli(propilén glicol) ("PPG"), copolímeros de etilén glicol y propilén glicol, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmecrilamida), poli(hidroxiálquilmecrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina y poli(N-acrililormorfolina). POLI puede ser un homopolímero, un copolímero alternante, un copolímero aleatorio, un copolímero de bloque, un tripolímero alternante, un tripolímero aleatorio o un tripolímero de bloque de cualquiera de los anteriores. El segmento polimérico soluble en agua es preferiblemente, aunque no necesariamente, un poli(etilén glicol) "PEG" o un derivado del mismo.

El segmento polimérico puede tener cualquiera de varias geometrías diferentes, por ejemplo POLI puede ser lineal, ramificado o bifurcado. Muy típicamente, POLI es lineal o ramificado, teniendo por ejemplo 2 brazos poliméricos.

Cualquier polímero soluble en agua que tenga al menos un extremo activado electrofílicamente puede ser utilizado para preparar un polímero tiol-selectivo de acuerdo con el método de la invención. Aunque en la presente se utilizan y se ilustran típicamente polímeros solubles en agua portadores únicamente de un solo extremo reactivo activado electrofílicamente, pueden utilizarse polímeros portadores de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más extremos reactivos adecuados para la conversión en un polímero tiol-selectivo según se muestra en la presente. De manera ventajosa, a medida que aumenta el número de hidroxilos o de otros restos reactivos en el segmento polimérico soluble en agua, aumenta el número de lugares disponibles para introducir un grupo electrofílico. Ejemplos no limitantes del límite superior del número de restos hidroxilo y/o electrofílicos asociados con el segmento

polimérico soluble en agua incluyen de 1 aproximadamente a 500 aproximadamente, de 1 aproximadamente a 100 aproximadamente, de 1 aproximadamente a 80 aproximadamente, de 1 aproximadamente a 40 aproximadamente, de 1 aproximadamente a 20 aproximadamente y de 1 aproximadamente a 10 aproximadamente.

- 5 Volviendo ahora al POLI preferido, PEG incluye poli(etilén glicol) en cualquiera de sus formas lineal, ramificada o de múltiples brazos, incluyendo PEG de extremos protegidos ("capped"), PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante y PEG conteniendo uno más enlaces degradables que separan las subunidades monoméricas, los cuales serán descritos con más detalle a continuación.
- 10 POLI puede tener los extremos protegidos, donde PEG está protegido terminalmente con un grupo inerte protector de los extremos. Los PEGs protegidos terminalmente preferidos son aquellos que tienen un resto protector terminal tal como alcoxi, alcoxi sustituido, alqueniiloxi, alqueniiloxi sustituido, alquiniloxi, alquiniloxi sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido. Los grupos protectores terminales preferidos son alcoxi C₁-C₂₀ tal como metoxi, etoxi y benciloxi. El grupo protector terminal puede contener también de manera ventajosa un fosfolípido. Fosfolípidos ejemplares incluyen fosfatidil colinas, tales como
- 15 dilauroilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diesteroilfosfatidilcolina, behenoilfosfatidilcolina, araquidoilfosfatidilcolina y lecitina.
- Haciendo referencia ahora a cualquiera de las estructuras que comprenden un segmento polimérico POLI, POLI puede corresponder a, o comprender, lo siguiente:

20
$$^{\text{Z}}\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{ o }^{\text{Z}}\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}^{\text{Z}}$$

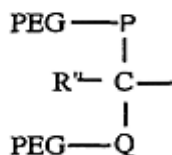
- donde n varía de 3 aproximadamente a 4.000 aproximadamente, o de 10 aproximadamente a 4.000 aproximadamente, y Z es o incluye un grupo funcional que puede ser un grupo reactivo o un grupo protector terminal. Ejemplos de Z incluyen hidroxilo, amino, éster, carbonato, aldehído, acetal, aldehído
- 25 hidrato, cetona, cetilo, cetona hidrato, alqueniilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, hidrazida, urea, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxi, benciloxi, silano, lípido, fosfolípido, biotina y fluoresceína, incluyendo formas activadas y protegidas de los mismos cuando sea aplicable. Los preferidos son grupos funcionales tales N-hidroxisuccinimidil éster, 1-hidroxibenzotriazolil carbonato, amina, vinilsulfona, maleimida, N-succinimidil
- 30 carbonato, hidrazida, succinimidil propionato, succinimidil butanoato, succinimidil succinato, succinimidil éster, glicidil éter, oxicarbonilimidazol, p-nitrofenil carbonato, aldehído, ortopiridil-disulfuro y acrilol.

- El reactivo polimérico (y el producto correspondiente) pueden poseer una estructura lineal similar a una pesa o bifuncional, por ejemplo, en la cual dos electrófilos están interconectados por un POLI central, por ejemplo, PEG. Más específicamente, tal POLI puede ser representado por la estructura E1-PEG-E2,
- 35 donde E1 y E2 son electrófilos seleccionados independientemente según se describe en la presente. Preferiblemente, E1 y E2 son iguales. En el Ejemplo 3 se proporcionan PEGs ejemplares que entran dentro de esta clasificación, por ejemplo (15) y (16). Ejemplos adicionales están proporcionados en la Patente de EE.UU. N° 5.900.461. En una realización preferida, particularmente en lo referente a los polímeros tiol-selectivos de la invención, o a sus precursores, el grupo funcional Z puede corresponder a
- 40 "L₀-₁-X-Y-S" para proporcionar un polímero tiol-selectivo homobifuncional que tiene grupos idénticos a cada lado del segmento polimérico, por ejemplo, S-Y-X-L₀-₁-POLI-L₀-₁-X-Y-S, VIII.

- Estos y otros grupos funcionales Z están descritos en las referencias siguientes: N-succinimidil carbonato (ver, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N°s 5.281.698, 5.468.478), amina (ver, por ejemplo, Buckmann y col., Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky y col., Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (ver, por ejemplo, Andresz y col., Makromol. Chem. 179:301 (1978)), succinimidil propionato y succinimidil butanoato (ver, por ejemplo, Olson y col. en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp. 170-181, Harries & Zalipsky Eds., ACS, Washington, DC, 1997; ver también la Patente de EE.UU. N° 5.672.662), succinimidil succinato (ver, por ejemplo, Abuchowski y col., Cancer Biochem. Biophys., 7:175 (1984) y Joppich y col., Makromol. Chem. 180:1381 (1979)), succinimidil éster (ver, por ejemplo, la
- 50 Patente de EE.UU. N° 4.670.417), benzotriazol carbonato (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.650.234), glicidil éter (ver, por ejemplo, Pitha y col., Eur. J. Biochem. 94:11 (1979), Elling y col., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991)), oxicarbonilimidazol (ver, por ejemplo, Beauchamp y col., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli y col., J. Controlled Release 1:251 (1985)), p-nitrofenil carbonato (ver, por ejemplo, Veronese y col., Appl. Biochem. Biotech. 11:141 (1985) y Sartore y col., Appl. Biochem. Biotech. 27:45 (1991)), aldehído (ver, por ejemplo, Harris y col., J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), Patente de EE.UU. N° 5.824.784, Patente de EE.UU. N° 5.252.714), maleimida (ver, 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)), ortopiridil-disulfuro (ver, por ejemplo, Woghiren y col., Bioconj. Chem. 4:314 (1993)), acrilol (ver, por ejemplo, Sawhney y col., Macromolecules 26:581 (1993)), vinilsulfona (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.900.461).

- De nuevo, los tipos de POLI descritos tienen la intención de incluir segmentos poliméricos lineales y también segmentos poliméricos ramificados o bifurcados. En un caso donde el segmento polimérico sea ramificado, la estructura de POLI puede corresponder, por ejemplo, a los brazos poliméricos que forman parte de la estructura global de POLI. Alternativamente, en un caso donde POLI posea una estructura bifurcada, POLI puede corresponder, por ejemplo, a la porción lineal del segmento polimérico anterior al punto de ramificación.

POLI incluye también moléculas de PEG ramificadas que tienen 2 brazos, 3 brazos, 4 brazos, 5 brazos, 6



brazos, 7 brazos, 8 brazos o más. Los polímeros ramificados utilizados para preparar los polímeros tiol-selectivos de la invención pueden poseer de 2 a 300 extremos reactivos más o menos. Los preferidos son segmentos poliméricos ramificados con 2 ó 3 brazos poliméricos. Un POLI ramificado ilustrativo, según se

5

describe en la Patente de EE.UU. N° 5.932.462, corresponde a la estructura:

En esta representación, R'' es un resto no reactivo, tal como H, metilo o un PEG, y P y Q son enlaces no reactivos. En una realización preferida, el segmento polimérico de PEG ramificado es metoxi poli(etilén glicol) disustituido con lisina.

10

En la configuración ramificada particular anterior, el segmento polimérico ramificado posee un sólo sitio reactivo que se extiende desde el punto de ramificación "C" para posicionar el grupo electrofílico reactivo del reactivo polimérico o el grupo X del producto polimérico tiol-selectivo. PEGs ramificados tales como éstos para ser utilizados en la presente invención tendrán típicamente menos de 4 brazos de PEG y, más preferiblemente, tendrán 2 ó 3 brazos de PEG. Tales PEGs ramificados ofrecen la ventaja de tener un

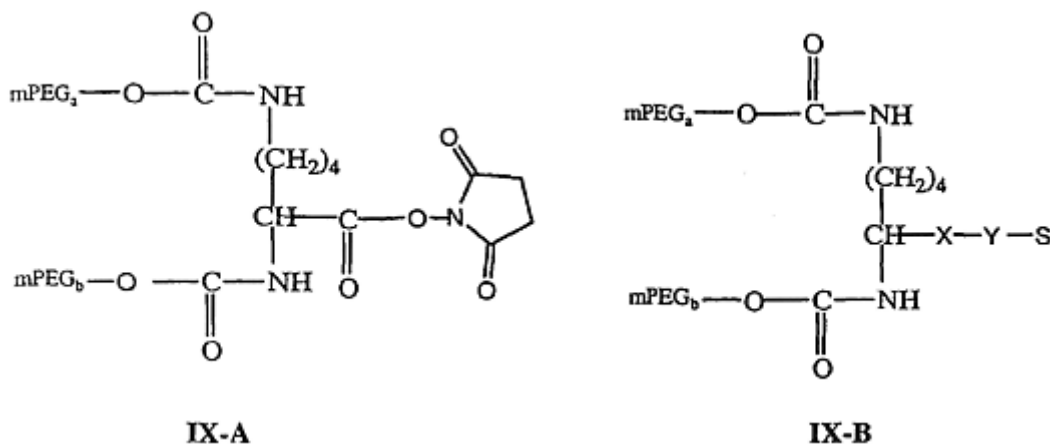
15

único sitio reactivo acoplado con una nube polimérica mayor, más densa que sus PEG lineales equivalentes. Polímeros ramificados ilustrativos portadores de grupos electrofílicos tales como éstos están disponibles comercialmente en Nektar (Huntsville, Alabama) e incluyen mPEG2-N-hidroxisuccinimida.

Un reactivo polimérico ramificado ilustrativo y el polímero tiol-selectivo de la invención correspondiente

tienen, respectivamente, las estructuras mostradas a continuación:

20



donde X, Y y S son según se describen en la presente. En la estructura IX-B, X puede corresponder a -C(O)-G, donde G es -NH.

25

Los polímeros ramificados para ser utilizados en la preparación de un polímero incluyen adicionalmente los representados de manera más general por la fórmula R(POLI)_n, donde R es una molécula central o nuclear a partir de la cual se extienden 2 o más brazos de POLI tal como PEG. La variable n representa el número de brazos de POLI, donde cada uno de los brazos del polímero puede estar protegido terminalmente de forma independiente o, alternativamente, poseer un grupo funcional reactivo en su extremo. Típicamente, al menos un brazo polimérico posee un grupo funcional terminal. En tales realizaciones de la invención de múltiples brazos, cada brazo de PEG posee típicamente un electrófilo en su extremo (o el producto de reacción correspondiente entre el electrófilo y el nucleófilo, según se describió previamente). PEGs ramificados tales como los representados de forma general por la fórmula R(PEG)_n anterior poseen de 2 brazos poliméricos a 300 brazos poliméricos aproximadamente (esto es, n varía de 2 a 300 aproximadamente). Preferiblemente, tales PEGs ramificados poseen de 2 a 25 brazos poliméricos aproximadamente, más preferiblemente de 2 a 20 brazos poliméricos aproximadamente e incluso más preferiblemente, de 2 a 15 brazos poliméricos aproximadamente o menos. Los más preferidos son los polímeros de múltiples brazos que tienen 3, 4, 5, 6, 7 u 8 brazos.

30

35

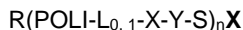
40

Las moléculas del núcleo central preferidas de los PEG ramificados según se describió anteriormente son polioles. Tales polioles incluyen polioles alifáticos de 1 a 10 átomos de carbono y de 1 a 10 grupos hidroxilo, incluyendo etilén glicol, alcano dioles, alquil glicoles, alquilidén alquil dioles, alquil cicloalcano dioles, 1,5-decalindiol, 4,8-bis(hidroximetil)tridecane, cicloalquilidén dioles, dihidroxialcanos, trihidroxialcanos, etcétera. Pueden emplearse también polioles cicloalifáticos, incluyendo azúcares de cadena lineal o de anillo cerrado y alcoholes de azúcar tales como manitol, sorbitol, inositol, xilitol, quebraquitol, treitol, arabitol, eritritol, adonitol, ducitol, facosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, ramnosa, galactosa, glucosa, fructosa, sorbosa, manosa, piranosa, altrosa, talosa, tagitosa, piranosidos, sacarosa,

45

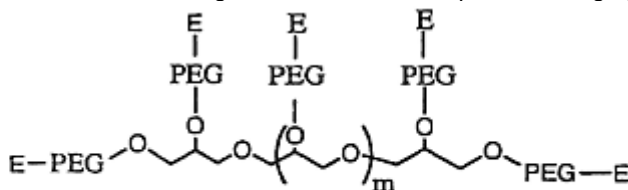
lactosa, maltosa, etcétera. Polioles alifáticos adicionales incluyen derivados de gliceraldehído, glucosa, ribosa, manosa, galactosa y los estereoisómeros relacionados. Otros polioles centrales que pueden ser utilizados incluyen éter corona, ciclodextrinas, dextrinas y otros carbohidratos tales como almidones y amilosa. Los polioles preferidos incluyen glicerol, pentaeritritol, sorbitol y trimetilolpropano.

5 Una estructura de múltiples brazos representativa correspondiente a un polímero tiol-selectivo de la invención está mostrada a continuación, donde n varía preferiblemente de 3 aproximadamente a 8 aproximadamente.



10

Polímeros de múltiples brazos adicionales para ser utilizados en la preparación de un polímero tiol-selectivo incluyen PEGs de múltiples brazos disponibles en Nektar (Huntsville, Alabama). Los polímeros de múltiples brazos activados electrofílicamente preferidos para ser utilizados en el método de la invención corresponden a la estructura siguiente, en la cual E representa un grupo electrofílico.

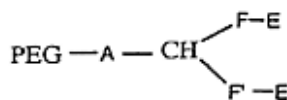


XI-A

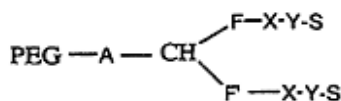
15 PEG es $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$, y m es seleccionado del grupo que consta de 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Por supuesto, el producto polimérico tiol-selectivo correspondiente posee la estructura mostrada anteriormente con la excepción de que el electrófilo E está sustituido por "-X-Y-S" (XI-B).

Alternativamente, el segmento polimérico puede poseer una estructura global bifurcada. Un ejemplo de un PEG bifurcado corresponde a la estructura generalizada siguiente, en la que la primera estructura representa un PEG bifurcado activado electrofílicamente y la segunda estructura representa un producto

20



XII-A



XII-B

polimérico tiol-selectivo bifurcado:

donde PEG es cualquiera de las formas de PEG descritas en la presente, A es un grupo adaptador, preferiblemente un enlace hidrolíticamente estable tal como oxígeno, azufre o $-\text{C}(\text{O})\text{-NH}-$, F y F' son grupos separadores hidrolíticamente estables que están presentes de manera opcional y las demás variables correspondientes a E, X, Y y S son según se definieron anteriormente. Las descripciones generales y específicas de los valores posibles para X, Y y S son ambas aplicables a la estructura anterior.

25

Adaptadores y grupos separadores ejemplares correspondientes a A, F y F' están descritos en la Solicitud Internacional N° PCT/US99/05333 y son útiles para formar segmentos poliméricos de este tipo para utilización en la presente invención. F y F' son grupos separadores que pueden ser iguales o diferentes.

30

En una realización particular de lo anterior, PEG es mPEG, A corresponde a $-\text{C}(\text{O})\text{-NH}-$ y F y F' son ambos metileno o $-\text{CH}_2-$. Este tipo de segmento polimérico es útil para reaccionar con dos agentes activos, donde los dos agentes activos están colocados separados a una distancia precisa o predeterminada, dependiendo de la selección de F y F'.

35

En cualquiera de las estructuras representativas proporcionadas en la presente, uno o más enlaces degradables pueden estar contenidos en el segmento polimérico para permitir la generación *in vivo* de un conjugado de PEG unido por disulfuro que tiene una cadena de PEG más pequeña que en el conjugado administrado inicialmente. Enlaces apropiados susceptibles de ser cortados fisiológicamente incluyen, pero no se limitan a, éster, éster carbonato, carbamato, sulfato, fosfato, aciloxialquil éter, acetal y cetal. Tales enlaces, cuando están contenidos en un segmento polimérico dado, serán preferiblemente estables tras su almacenaje y tras su administración inicial. Más particularmente, según se describió de manera general anteriormente, dos o más segmentos poliméricos conectados por un enlace hidrolizable pueden ser representados por la estructura siguiente: PEG1-W-PEG2 (donde PEG1 y PEG2 pueden ser iguales o diferentes) y W representa un enlace débil, hidrolizable. Estas estructuras poliméricas contienen brazos de PEG o porciones de brazos de PEG que son eliminables (esto es, susceptibles de ser cortados) *in vivo*.

40

45

PEGs representativos adicionales con estructuras lineales o ramificadas para ser utilizados en la preparación de los conjugados de la invención pueden ser adquiridos a Nektar Therapeutics (anteriormente Shearwater Corporation, Huntsville, Alabama). Estructuras ilustrativas están descritas en el catálogo de Shearwater 2001 titulado "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications".

En general, la masa molecular media nominal del segmento polimérico soluble en agua, POLI, variará. La masa molecular media nominal de POLI entra típicamente dentro de uno o más de los rangos siguientes: de 100 daltons aproximadamente a 100.000 daltons aproximadamente; de 500 daltons aproximadamente a 80.000 daltons aproximadamente; de 1.000 daltons aproximadamente a 50.000 daltons aproximadamente; de 2.000 daltons aproximadamente a 25.000 daltons aproximadamente; de 5.000 daltons aproximadamente a 20.000 daltons aproximadamente. Masas moleculares medias nominales ejemplares para el segmento polimérico soluble en agua POLI incluyen 1.000 daltons aproximadamente, 5.000 daltons aproximadamente, 10.000 daltons aproximadamente, 15.000 daltons aproximadamente, 20.000 daltons aproximadamente, 25.000 daltons aproximadamente, 30.000 aproximadamente y 40.000 daltons aproximadamente. Los POLIs de bajo peso molecular poseen masas moleculares de 250, 500, 750, 1000, 2000 ó 5000 daltons aproximadamente. Derivados tiol-selectivos ejemplares comprenden PEGs con un peso molecular seleccionado del grupo que consta de 5.000 daltons, 20.000 daltons y 40.000 daltons, como los proporcionados en los Ejemplos 1-3.

En una realización particular de la invención, un derivado tiol-selectivo activado según se proporciona en la presente posee un segmento de PEG que tiene una de las masas moleculares medias nominales siguientes: 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000 y 40.000 daltons.

Por lo que respecta al número de subunidades, los PEGs para ser utilizados en la invención contendrán un número de subunidades (-OCH₂CH₂-) que están dentro [del rango siguiente](#): de 10 a 4000 subunidades

20 GRUPOS ELECTROFÍLICOS DEL POLÍMERO ("E")

Un polímero para ser utilizado en el método contiene al menos un electrófilo o grupo electrofílico (-E) adecuado para reaccionar con un nucleófilo tal como el contenido en la molécula reactiva tiol-selectiva. Electrófilos ejemplares incluyen ésteres activados (por ejemplo, N-hidroxisuccinimidil (NHS) éster o 1-hidroxibenzotriazolil éster), carbonatos activos (por ejemplo, N-hidroxisuccinimidil carbonato, para-nitrofenilcarbonato y 1-hidroxibenzotriazolil carbonato), acetal, aldehído, aldehído hidrato, anhídridos activos tales como anhídridos ácidos, haluro de ácido, haluro de arilo, cetona, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, imidoéster, etcétera. Particularmente preferidos son los ésteres activados tales como los NHS ésteres. En suma, un segmento polimérico que tiene la estructura generalizada POLI-L₀, 1-E, puede poseer cualquier grupo electrofílico en al menos un extremo, donde los electrófilos ejemplares incluyen los descritos anteriormente.

Adaptadores del Polímero, L

En la mayoría de los casos, el segmento polimérico está unido directamente al electrófilo. Alternativamente, el segmento polimérico está unido al electrófilo a través de un adaptador intermedio, L. Cuando se utiliza tal adaptador, el mismo es representado de manera general en la presente como L₁, significando que tal adaptador está presente. Cuando tal adaptador está ausente, es representado de manera general en la presente como L₀. Los adaptadores para ser utilizados en la presente invención son típicamente alquilo C₁-C₁₀ o alquilo C₁-C₁₀ sustituido. Un adaptador particularmente preferido, es un grupo metileno, -CH₂-, aunque puede emplearse de manera similar cualquier alquilo inferior lineal o cualquier alquilo inferior ramificado o sus equivalentes sustituidos.

Polímeros Activados Electrofílicamente Purificados

Particularmente adecuados para ser utilizados en el presente método son los reactivos PEG activados electrofílicamente tales como ácidos carboxílicos purificados cromatográficamente o sus equivalentes funcionales, tales como mPEG-succinimidil propionato, mPEG-succinimidil butanoato, mPEG-CM-HBA-NHS, mPEG2-NHS, etcétera, disponibles en Nektar, Huntsville, Alabama. En virtud de su grupo funcional ácido, tales PEGs activados electrofílicamente son más fácilmente purificados antes que después de la reacción con una molécula reactiva bifuncional, NU-Y-S, para permitir la separación de las impurezas de PEG-diol o derivadas de diol. La purificación de POLI-E puede ser llevada a cabo mediante cualquiera de los varios métodos de purificación comúnmente empleados en la técnica, aunque se prefieren los métodos de separación basados en agentes químicos y los métodos cromatográficos. Uno de tales métodos cromatográficos preferidos es la cromatografía de intercambio iónico o IEC. La IEC es útil para la separación de cualquier molécula cargada, tal como PEG-ácido. Las condiciones de la cromatografía de intercambio iónico típica pueden ser fácilmente determinadas por una persona con experiencia en la técnica, tales como la columna particular, el rango de pH empleado, la fuerza iónica, la elección del tampón, el gradiente, etcétera.

En algunos casos se utiliza cromatografía de permeación en gel o GPC para determinar la pureza de los reactivos y derivados que contienen PEG. Así, en un caso, puede utilizarse GPC para determinar el grado de impurezas de PEG-diol o derivadas de diol en un material de partida de PEG dado o en un reactivo de PEG dado. Una vez que se ha confirmado la presencia y la cantidad de PEG-diol mediante, por ejemplo, GPC, el material de partida PEG o el derivado, tal como un PEG-ácido, es posteriormente purificado mediante cromatografía de intercambio iónico para eliminar las impurezas de PEG-diol o relacionadas con PEG-diol, de tal manera que la composición de PEG resultante está sustancialmente libre de tales impurezas de PEG bifuncional.

Tales reactivos de PEG activado electrofílicamente son preferiblemente sustancialmente puros, esto es, carecen de impurezas de PEG-diol o derivadas de PEG-diol difuncional reactivo. Preferiblemente, el material de partida, POLI-L_{0,1-E}, contendrá menos de un 10% aproximadamente de tal impureza, preferible menos del 5% aproximadamente de tal impureza y, más preferiblemente, menos del 2% aproximadamente o ninguna cantidad detectable de tal impureza. Por consiguiente, esto significa que el polímero funcionalizado tiol-específico resultante, POLI-S, contiene preferiblemente al menos un 90% o al menos un 95% o al menos un 98% o más del producto basado en el polímero deseado que carece de cantidades significativas de impurezas de polietilén glicol difuncionalizado derivadas de PEG-diol. Ciertas impurezas de polímero difuncionalizado de este tipo, particularmente los ditioles o los ditioles protegidos correspondientes resultantes del arrastre de tales impurezas cuando se lleva a la práctica el método de la invención, pueden ser muy difíciles de eliminar. Tales impurezas reactivas, si se arrastran a través del esquema de reacción hasta el derivado polimérico activado final, pueden reaccionar posteriormente con los restos de acoplamiento diana tales como los grupos que contienen tiol de las proteínas o de otros agentes activos, proporcionando conjugados poliméricos adicionales a los deseados.

15 MOLÉCULA REACTIVA TIOL-SELECTIVA

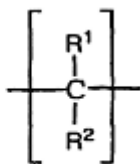
De acuerdo con el método de la invención, POLI-L_{0,1-E} se hace reaccionar con una molécula reactiva que contiene un nucleófilo (-NU) para que reaccione con el grupo electrofílico del polímero activado y un grupo tiol-selectivo tal como se describió anteriormente. En general, una molécula reactiva para ser utilizada en la invención poseerá la estructura NU-Y-S en la que NU es un nucleófilo, Y es un grupo interpuesto entre NU y S, y S es un grupo tiol-selectivo.

"Y"

Y es típicamente, pero no necesariamente, lineal por naturaleza. La longitud total del grupo Y variará típicamente entre 1 y 20 átomos aproximadamente, o de 2 a 15 átomos aproximadamente, donde por longitud se indica el número de átomos de una cadena individual, sin contar los sustituyentes. Por ejemplo, -CH₂- cuenta como un átomo con respecto a la longitud total del adaptador, -CH₂CH₂O- cuenta como 3 átomos de longitud. Preferiblemente, Y tiene una longitud de 1 aproximadamente a 20 átomos aproximadamente, o de 2 aproximadamente a 15 átomos aproximadamente, o de 1 aproximadamente a 6 átomos aproximadamente, y es hidrolíticamente estable.

Grupos Y representativos pueden ser cualquiera de los siguientes: -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-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-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-C(O)-NH-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-, -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-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-, un grupo cicloalquileo o un grupo cicloalquileo sustituido, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂- y combinaciones de dos o más de cualquiera de los anteriores.

Grupos Y preferidos para ser utilizados en la invención incluyen, por ejemplo, alquileo, alquileo sustituido, cicloalquileo, cicloalquileo sustituido, arilo y arilo sustituido. Y contiene típicamente de 2 aproximadamente a 10 átomos de carbono aproximadamente y, opcionalmente, puede contener átomos



I-15

no interferentes adicionales. Los grupos Y ilustrativos poseen la estructura: en la cual R¹ y R² en cada caso son cada uno de ellos independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alquilenocicloalquilo, cicloalquileo, cicloalquileo sustituido y alquilenocicloalquilo sustituido. Preferiblemente, Y contiene de dos a diez átomos de carbono aproximadamente. Grupos Y ejemplares incluyen metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂-CH₂-), propileno (-CH₂-CH₂-CH₂-), butileno (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), pentileno (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 2-metilpropilo, equivalentes sustituidos, etcétera. En una realización particular de la estructura anterior, R¹ y R² son ambos H.

Otro grupo Y preferido posee la estructura: -(CH₂)_{1,2,3,4,5}-NH-C(O)-CH₂CH₂-.

Grupo Tiol-Selectivo, "S"

El grupo tiol-selectivo es tiol.

A continuación se proporciona una estructuras correspondiente a este grupo "S" ejemplar, en las cuales una línea discontinua indica un punto de unión a la porción Y de la molécula. A-SH indica un agente activo que posee un grupo tiol.

Grupo Tiol-selectivo
HS -----

Conjugados A-SH correspondiente
-----S-S-A

El Nucleófilo

La porción nucleófilo de la molécula reactiva es cualquier nucleófilo comúnmente conocido en la técnica. Los nucleófilos preferidos incluyen grupos amino primarios, grupos amino secundarios, hidroxilo, imino, tiol, tioéster, etcétera. Los grupos amino secundarios poseerán típicamente como sustituyente un grupo alquilo inferior tal como metilo, etilo.

Por tanto, las moléculas reactivas moleculares para ser utilizadas en la invención poseen cualquier combinación de grupos NU, Y y S proporcionados en la presente. Los reactivos moleculares preferidos incluyen cistamina, un compuesto amino disulfuro simétrico ilustrativo. Reacciones llevadas a cabo con el reactivo molecular ejemplar, cistamina, están proporcionadas en los Ejemplos 1-3

CONDICIONES DE REACCIÓN

La reacción entre el grupo electrofílico del polímero y el nucleófilo del reactivo molecular se lleva a cabo típicamente, aunque no necesariamente, bajo condiciones de reacción suaves, dependiendo por supuesto del electrófilo y del nucleófilo particulares que estén experimentando la reacción. Típicamente, tales reacciones se llevan a cabo a temperaturas alrededor de 100°C o menos, o a 65°C o menos, o a 40°C o menos, o a 25°C aproximadamente o menos. La etapa de reacción se lleva a cabo típicamente en un solvente orgánico tal como acetona, acetonitrilo, hidrocarburos clorados tales como cloroformo y diclorometano, hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno o xileno, tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido.

Las condiciones de reacción particulares (solvente, relaciones molares de los reactivos, temperatura, atmósfera, tiempos de reacción), serán fácilmente determinadas por las personas expertas en la técnica, dependiendo de la elección de los reactivos particulares y de los productos deseados. El curso o el progreso de la reacción puede ser monitorizado mediante cualquiera de diferentes técnicas analíticas comunes tales como cromatografía en capa fina o ¹H RMN.

Se emplea como reactivo molecular un reactivo disulfuro simétrico tal como cistamina, el producto polimérico resultante es un polímero simétrico que tiene un enlace disulfuro central. Polímeros solubles en agua simétricos representativos con un enlace disulfuro central están proporcionados como las estructuras (10) y (12), aunque muchas estructuras alternativas con estas características básicas pueden preverse fácilmente, sobre la base de las descripciones de la reacción y de los grupos POLI, L₁, E, NU, Y y S proporcionados en la presente. El disulfuro polimérico simétrico es posteriormente convertido en el polímero terminado en tiol correspondiente, por ejemplo (11) y (13), etcétera, por reducción con un agente reductor adecuado tal como ditiotreitolo, Sn/HCl, Na/xileno, amonio, hidruro de litio aluminio, borohidruro de sodio o cualquier otro agente reductor conocido en la técnica.

POLÍMEROS TIOL-SELECTIVOS

Se describen polímeros tiol-selectivos que tienen las características y los componentes descritos anteriormente. En general, un polímero tiol-selectivo de la invención posee la estructura siguiente: POLI-L₀-₁-X-Y-S, donde las variables L, X, Y y S han sido descritas previamente. Todos los POLIs, adaptadores, grupos Y y grupos S ejemplares anteriores están incluidos en la estructura generalizada de un polímero tiol-selectivo de la invención anterior. Preferiblemente, X, un grupo funcional resultante de la reacción del electrófilo del reactivo polimérico y el nucleófilo presente en el reactivo molecular, es una amida (-C(O)-NH-) o un uretano (-O-C(O)-NH-). En algunos casos, el grupo funcional X es designado en la presente como "-G₁-C(O)-G₂-", donde G₁ y G₂ son cada uno de ellos independientemente un heteroátomo tal como O, NH o S. En una realización, G₁ está ausente e Y corresponde a C(O)-G. Preferiblemente, G₂ es -NH. Los disulfuros poliméricos simétricos de la invención poseen la estructura generalizada: (POLI-L₀-₁-X-Y-S)₂, II, que incluye todos los POLIs, adaptadores y grupos Y descritos en la presente.

ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS POLIMÉRICOS

Los tiol-selectivos puede ser almacenados bajo una atmósfera inerte, tal como bajo argón o bajo nitrógeno. Es también preferible minimizar los polímeros a la humedad. Por tanto, las condiciones de almacenamiento preferidas son bajo argón seco o bajo otro gas inerte seco a temperaturas inferiores a -15°C aproximadamente. Se prefiere el almacenamiento en condiciones de baja temperatura, ya que las velocidades de las reacciones colaterales indeseables son más lentas a temperaturas más bajas. La

porción PEG puede reaccionar lentamente con oxígeno para formar peróxidos a lo largo de la porción PEG de la molécula. La formación de peróxidos puede llevar finalmente al corte de la cadena, incrementando así la polidispersidad de los reactivos PEG proporcionados en la presente. En vista de lo anterior, se prefiere adicionalmente almacenar los polímeros en oscuridad.

5

CONJUGADOS DEL POLÍMERO ACTIVADO CON TIOL

Se describen conjugados formados por la reacción de cualquiera de los polímeros tiol-selectivos aquí descritos. En particular, los polímeros tiol-selectivos son útiles para ser conjugados con agentes activos o con superficies que tengan al menos un grupo tiol o amino disponible para reaccionar. Los conjugados poseerán la estructura correspondiente a los grupos funcionales formados por la reacción de cualquiera de los grupos tiol-selectivos aquí descritos, con un tiol accesible contenido en el agente activo.

10

Por ejemplo, un conjugado puede poseer la estructura siguiente: POLI-L₀,1-X-Y-S-S-agente activo, IV, donde S-S- es un enlace disulfuro.

15

En los casos en los que el agente activo es un agente biológicamente activo o una molécula pequeña que contiene solamente un grupo tiol reactivo, la composición resultante puede contener de manera ventajosa únicamente una sola especie de conjugado polimérico, debido al número relativamente bajo de grupos sulfhidrilo contenidos típicamente en una proteína y accesibles para la conjugación. En algunos casos, una proteína o una molécula pequeña u otro agente activo es manipulado para que posea un grupo tiol en una posición conocida, y tendrá como resultado de forma similar una composición conteniendo únicamente una sola especie de conjugado polimérico. Este procedimiento es referido de manera general como modificación específica de sitio.

20

Un residuo de cisteína para el acoplamiento a un polímero activado puede existir de forma natural (esto es, está presente en la proteína en su forma nativa) o puede ser insertado en la secuencia nativa en lugar de un aminoácido existente de forma natural utilizando técnicas estándar de ingeniería genética. Como los grupos tiol son menos numerosos en las proteínas que otros sitios típicos de unión al polímero tales como los grupos amino, la unión covalente de un derivado polimérico puede tener como resultado una pegilación más selectiva de la proteína diana. Es decir, los derivados poliméricos pueden permitir un mayor control del conjugado polimérico resultante - en cuanto al número de derivados poliméricos unidos a la proteína parental (conjugados monosustituídos frente a di-sustituídos, frente a tri-sustituídos, etc.) y en cuanto a la posición de la unión del polímero.

25

30

Las características generalizadas de los conjugados han sido descritas con detalle anteriormente. Los agentes activos que son unidos covalentemente a un polímero tiol-selectivo incluyen cualquiera de varios tipos de moléculas, entidades, superficies, etcétera, como será obvio a partir de lo siguiente.

35

MOLÉCULAS Y SUPERFICIES DIANA

Los polímeros tiol-selectivos pueden ser unidos, covalentemente o no covalentemente, a varias entidades incluyendo películas, superficies para la separación y la purificación química, soportes sólidos, superficies de metal/óxido de metal tal como oro, titanio, tántalo, niobio, aluminio, acero y sus óxidos, óxido de silicio, macromoléculas y moléculas pequeñas. Adicionalmente, los polímeros y métodos de la invención pueden ser también utilizados en sensores bioquímicos, conmutadores bioelectrónicos y barreras. Los polímeros y métodos de la invención pueden ser también empleados en la preparación de transportadores para la síntesis de péptidos, para la preparación de superficies revestidas con polímeros y de injertos poliméricos, para preparar conjugados polímero-ligando para separación por afinidad, para preparar hidrogeles entrecruzados o no entrecruzados y para preparar aductos polímero-cofactor para biorreactores.

40

45

Un agente biológicamente activo para ser utilizado en la provisión de un conjugado de la invención puede ser uno cualquiera o más de los siguientes. Los agentes adecuados pueden ser seleccionados de, por ejemplo, hipnóticos y sedantes, energizantes psíquicos, tranquilizantes, fármacos respiratorios, anticonvulsivantes, relajantes musculares, agentes antiparkinsonianos (antagonistas de dopamina), analgésicos, antiinflamatorios, fármacos contra la ansiedad (ansiolíticos), supresores del apetito, agentes antimigrañosos, contracturantes musculares, antiinfecciosos (antibióticos, antivirales, antifúngicos, vacunas), antiartríticos, agentes antimalaria, antieméticos, antiepilépticos, broncodilatadores, citoquinas, factores de crecimiento, agentes anticancerosos, agentes antitrombóticos, antihipertensivos, fármacos cardiovasculares, antiarítmicos, antioxidantes, agentes antiasmáticos, agentes hormonales incluyendo anticonceptivos, simpatomiméticos, diuréticos, agentes reguladores de los lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasitarios, anticoagulantes, neoplásicos, antineoplásicos, hipoglucemiantes, agentes nutricionales y suplementos, suplementos para el crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico y agentes de contraste.

50

55

Más particularmente, el agente activo puede entrar dentro de una de varias clases estructurales, incluyendo, pero sin limitarse a, molécula pequeñas (preferiblemente moléculas pequeñas insolubles), péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, polisacáridos, esteroides, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, grasas, electrolitos, etcétera. Preferiblemente, un agente activo para ser acoplado a un polímero posee un grupo sulfhidrilo nativo o menos preferiblemente un grupo amino nativo o, alternativamente, es modificado para que contenga al menos un grupo sulfhidrilo reactivo o un grupo amino adecuado para el acoplamiento.

60

65

Ejemplos específicos de agentes activos incluyen, pero no se limitan a, asparriginasa, amdoxovir (DAPD), antida, becaplermina, calcitoninas, cianovirina, denileucina diftotox, eritropoyetina (EPO), agonistas de EPO (por ejemplo, péptidos de 10-40 aminoácidos de longitud aproximadamente y que contienen una secuencia central particular, según está descrito en WO 96/40749), dornasa alfa, proteína estimulante de la eritropoyesis (NESP), factores de coagulación tales como Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XII, Factor XIII, Factor de von Willebrand; ceredasa, cerezima, alfa-glucosidasa, colágeno, ciclosporina, alfa defensinas, beta defensinas, exedina-4, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de proteínasa alfa-1, elcatonina, factor estimulante de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF), fibrinógeno, filgrastim, hormonas de crecimiento, hormona de crecimiento humana (hGH), hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), GRO-beta, anticuerpo hacia GRO-beta, proteínas morfogénicas del hueso tales como la proteína morfogénica del hueso 2, proteína morfogénica del hueso 6, OP-1; factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, ligando CD-40, heparina, seroalbúmina humana, heparina de bajo peso molecular (LMWH), interferones tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, interferón de consenso; interleuquinas y receptores de interleuquinas tales como el receptor de interleuquina-1, interleuquina-2, proteínas de fusión de interleuquina-2, antagonista del receptor de interleuquina-1, interleuquina-3, interleuquina-4, receptor de interleuquina-4, interleuquina-6, interleuquina-8, interleuquina-12, receptor de interleuquina-13, receptor de interleuquina-17; lactoferrina y fragmentos de lactoferrina, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), insulina, proinsulina, análogos de insulina (por ejemplo insulina monoacilada según está descrito en la Patente de EE.UU. 5.922.765), amilina, péptido C, somatostatina, análogos de somatostatina incluyendo octreótido, vasopresina, hormona estimulante del folículo (FSH), vacuna de la gripe, factor de crecimiento similar a insulina (IGF), insulintropina, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), activadores del plasminógeno tales como alteplasa, uroquinasa, reteplasa, estreptoquinasa, pamiteplasa, lanoteplasa y tenecteplasa; factor de crecimiento nervioso (NGF), osteoprotegerina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento tisular, factor de crecimiento transformante-1, factor de crecimiento endotelial vascular, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento glial (GGF), receptores de células T, moléculas/antígenos CD, factor de necrosis tumoral (TNF), proteína quimioatrayente de monocitos-1, factores de crecimiento endotelial, hormona paratiroidea (PTH), péptido similar al glucagón, somatotropina, timosina alfa 1, inhibidor de timosina alfa 1 IIb/IIIa, timosina beta 10, timosina beta 9, timosina beta 4, antitripsina alfa-1, compuestos de fosfodiesterasa (PDE), VLA-4 (antígeno-4 muy tardío), inhibidores de VLA-4, bisfosfonatos, anticuerpo hacia el virus respiratorio sincitial, gen del regulador transmembranal de la fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (ADNasa), proteína bactericida/incrementadora de la permeabilidad (BPI) y anticuerpo anti-CMV. Anticuerpos monoclonales ejemplares incluyen etanercept (una proteína de fusión dimérica que consta de la porción de unión al ligando extracelular del receptor de TNF humano de 75 kD unida a la porción Fc de IgG1), abciximab, afeliomomab, basiliximab, daclizumab, infliximab, ibritumomab tiuxetán, mitumomab, muromonab-CD3, conjugado de tositumomab con yodo 131, olizumab, rituximab y trastuzumab (herceptina).

Agentes adicionales adecuados para ser unidos covalentemente a un polímero incluyen, pero no se limitan a, amifostina, amiodarona, ácido aminocaproico, aminohipurato de sodio, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, amsacrina, anagrelida, anastrozol, asparriginasa, antraciclinas, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfán, cabergolina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucina, cilastatina de sodio, cisplatino, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, camptotecinas, ácido retinoico 13-cis, ácido retinoico todo trans, dacarbacina, dactinomicina, daunorrubicina, deferoxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estramustina, etopósido, exemestano, fexofenadina, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutámido, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, itraconazol, goserelina, letrozol, leucovorina, levamisol, lisinopril, lovotiroxina de sodio, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, metaraminol bitartrato, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, naloxona, nicotina, nilutamida, octreótido, oxaliplatino, pamidronato, pentostatina, pilcamicina, porfímero, prednisona, procarbazona, proclorperazina, ondansetrón, raltitrexed, sirolimus, estreptozotocina, tacrolimus, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tetrahidrocannabinol, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, tretinoína, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, dolasetrón, granisetrón; formoterol, fluticasona, leuprólido, midazolam, alprazolam, anfotericina B, podofilotoxinas, antivirales nucleósidos, aroil hidrazonas, sumatriptán; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davericina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, leucomicina, miocamicina, roquitamicina, andacitromicina y swinólido A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, trovafloxacino, alatrofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, enoxacino, grepafloxacino, gatifloxacino, lomefloxacino, espafloxacino, temafloxacino, pefloxacino, amifloxacino, fleroxacino, tosufloxacino, prulifloxacino, irloxacino, pazufloxacino, clinafloxacino y sitafloxacino; aminoglucósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amicacina, kanamicina, neomicina y estreptomycin, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato; polimixinas tales como polimixina B, capreomicina, bacitracina, penems; penicilinas incluyendo agentes sensibles a penicilinas como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a penicilinas como meticilina, oxacilina,

cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos contra microorganismos gram negativos como ampicilina, amoxicilina y hetacilina, cilina y galampicilina; penicilinas antipseudomonas como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina; cefalosporinas como cefpodoxima, cefprozilo, cefbuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradrina, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxilo, cefaloglicina, cefuroxima, ceforanida, cefotaxima, cefatricina, cefacetrilo, cefepima, cefixima, cefonicida, cefoperazona, cefotetán, cefmetazol, ceftazidima, loracarbef y moxalactam, monobactamas como aztreonam; y carbapenems tales como imipenem, meropenem, pentamidina, isetioato, albuterol sulfato, lidocaína, metaproterenol sulfato, beclometasona diprepionato, triamcinolona acetamida, budesonida acetónido, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolín sódico y ergotamina tartrato; taxanos tales como paclitaxel, SN-38 y tirfostinas.

Péptidos o proteínas preferidos para ser acoplados a un polímero tiol-selectivo incluyen EPO, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN de consenso, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, IL-2, Remicade (infiximab), Rituxan (rituximab), Enbrel (etanercept), Synagis (palivizumab), Reopro (abciximab), Herceptina (trastuzimab), tPA, Cerizima (imiglucerasa), vacuna contra la Hepatitis B, rADNasa, inhibidor de proteinasas alfa-1, GCSF, GMCSF, hGH, insulina, FSH y PTH.

Los agentes biológicamente activos ejemplares anteriores tienen la intención de incluir, cuando sea aplicable, análogos, agonistas, antagonistas, inhibidores, isómeros y sales de los mismos farmacéuticamente aceptables. Con referencia a los péptidos y proteínas, la invención tiene la intención de incluir formas sintéticas, recombinantes, nativas, glucosiladas y no glucosiladas, así como fragmentos de los mismos biológicamente activos. Las proteínas biológicamente activas anteriores tienen la intención de incluir adicionalmente variantes que tengan uno o más aminoácidos sustituidos (por ejemplo, cisteína), eliminados o similares, siempre que la proteína variante resultante posea al menos un cierto grado de la actividad de la proteína parental (nativa).

Los conjugados o los métodos descritos en la presente pueden extenderse también a formulaciones en forma de hidrogel.

MÉTODOS DE CONJUGACIÓN

Las condiciones de conjugación adecuadas son aquellas condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración de reactivos, solvente, etcétera, suficientes para llevar a cabo la conjugación entre un reactivo polimérico y un agente activo. Como se conoce en la técnica, las condiciones específicas dependen de, entre otras cosas, el agente activo, el tipo de conjugación deseado, la presencia de otros materiales en la mezcla de reacción, etcétera. Las condiciones suficientes para efectuar la conjugación en cualquier caso particular pueden ser determinadas por una persona con experiencia habitual en la técnica tras la lectura de la descripción de la presente, por referencia a la literatura relevante y/o mediante experimentación rutinaria.

Condiciones de conjugación ejemplares incluyen la realización de la reacción de conjugación a un pH de 6 aproximadamente a 10 aproximadamente y, por ejemplo, a un pH de 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ó 10 aproximadamente. La reacción se deja proceder durante un tiempo de 5 minutos aproximadamente a 72 horas aproximadamente, preferiblemente de 30 minutos aproximadamente a 48 horas aproximadamente, y más preferiblemente de 4 horas aproximadamente a 24 horas aproximadamente o menos. Las temperaturas para las reacciones de conjugación están típicamente, aunque no necesariamente, en el rango de 0°C aproximadamente a 40°C aproximadamente; la conjugación se lleva a cabo a menudo a temperatura ambiente o a una temperatura inferior. Las reacciones de conjugación se llevan a cabo a menudo en un tampón tal como un tampón fosfato o acetato o en un sistema similar.

Con respecto a la concentración de los reactivos, un exceso del reactivo polimérico es típicamente combinado con el agente activo. En algunos casos, sin embargo, se prefiere tener cantidades estequiométricas del número de grupos reactivos del reactivo polimérico respecto a la cantidad de agente activo. Proporciones ejemplares de reactivo polimérico respecto al agente activo incluyen relaciones molares de 1:1 aproximadamente (reactivo polimérico:agente activo), 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1 ó 10:1. La reacción de conjugación se deja proceder hasta que sustancialmente no haya más conjugación, lo cual puede ser generalmente determinado monitorizando el progreso de la reacción a lo largo del tiempo.

El progreso de la reacción puede ser monitorizado recogiendo alícuotas de la mezcla de reacción a varios puntos de tiempo y analizando la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE o mediante espectrometría de masas MALDI-TOF o mediante cualquier otro método analítico adecuado. Una vez que se ha alcanzado una meseta con respecto a la cantidad de conjugado formado o con respecto a la cantidad de polímero restante no conjugado, se asume que la reacción ha sido completa. Típicamente, la reacción de conjugación dura desde minutos hasta varias horas (por ejemplo, desde 5 minutos hasta 24 horas o más).

La mezcla de productos resultantes es preferiblemente, pero no necesariamente, purificada para separar el exceso de reactivos, los reactivos no conjugados (por ejemplo, el agente activo), las especies multiconjugadas no deseadas y el polímero libre o no reaccionado. Los conjugados resultantes pueden ser luego caracterizados adicionalmente utilizando métodos analíticos tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel y/o cromatografía.

Más preferiblemente, un polímero tiol-selectivo de la invención es conjugado típicamente a un agente activo que contiene sulfhidrilos a pHs que varían de 6-9 aproximadamente (por ejemplo, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5 ó 9), más preferiblemente a pHs de 7-9 aproximadamente, e incluso más preferiblemente a pHs de 7 a

8 aproximadamente. En general, se emplea un ligero exceso molar de reactivo polimérico, por ejemplo un exceso molar de 1,5 a 15 veces, preferiblemente un exceso molar de 2 veces a 10 veces. Los tiempos de reacción varían generalmente desde 15 minutos aproximadamente a varias horas, por ejemplo 8 horas o más, a temperatura ambiente. Para los grupos sulfhidrido impedidos estéricamente, los tiempos de reacción requeridos pueden ser significativamente mayores. Como los polímeros de la invención son tiol-selectivos, la conjugación tiol-selectiva se lleva a cabo preferiblemente a pHs alrededor de 7.

SEPARACIÓN

10 Opcionalmente, los conjugados producidos mediante la reacción de un polímero tiol-selectivo con un agente biológicamente activo son purificados para obtener/aislar diferentes especies, por ejemplo especies de PEG, o para eliminar los productos colaterales de la reacción no deseables.

15 Si se desea, los conjugados de PEG con diferentes pesos moleculares pueden ser aislados utilizando cromatografía de filtración en gel. Aunque este procedimiento puede ser utilizado para separar conjugados de PEG con diferentes pesos moleculares, este procedimiento es generalmente ineficaz para separar isómeros posicionales que tengan diferentes sitios de pegilación dentro de la proteína. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel puede ser utilizada para separar mezclas de 1-meros, 2-meros, 3-meros, etc., de PEG, aunque cada una de las composiciones de PEG-meros recuperadas puede contener PEGs unidos a diferentes grupos reactivos dentro de la proteína.

20 Las columnas de filtración en gel adecuadas para llevar a cabo este tipo de separación incluyen columnas de Superdex™ y Sephadex™ disponibles en Amersham Biosciences. La selección de una columna particular dependerá del rango de fraccionamiento deseado. La elución se lleva a cabo generalmente utilizando un tampón no basado en aminos, tal como fosfato, acetato o similar. Las fracciones recogidas pueden ser analizadas mediante varios métodos diferentes, por ejemplo, (i) DO a 280 nm para determinar el contenido de proteínas, (ii) análisis de la proteína BSA, (iii) análisis de yodo para determinar el contenido de PEG (Sims, G.E.C. y col., Anal. Biochem. 107, 60-63, 1980) o alternativamente, (iv) procesando un gel de SDS-PAGE seguido por tinción con yoduro de bario.

25 La separación de los isómeros posicionales puede ser realizada mediante cromatografía de fase reversa utilizando, por ejemplo, una columna C18 para RP-HPLC (Amersham Biosciences o Vydac) o mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de intercambio iónico, por ejemplo una columna de intercambio iónico de Sepharose™ disponible en Amersham Biosciences. Cada uno de los procedimientos puede ser utilizado para separar los isómeros de PEG-biomolécula que tengan el mismo peso molecular (isómeros posicionales).

30 Dependiendo del uso deseado para los conjugados de PEG resultantes, después de la conjugación y opcionalmente de las etapas de separación adicionales, la mezcla de conjugados puede ser concentrada, esterilizada por filtración y almacenada a bajas temperaturas, de -20°C aproximadamente a -80°C aproximadamente. Alternativamente, el conjugado puede ser liofilizado, con o sin tampón residual, y almacenado como un polvo liofilizado. En algunos casos, es preferible cambiar el tampón utilizado para la conjugación, tal como acetato de sodio, por un tampón volátil tal como carbonato de amonio o acetato de amonio, que puede ser eliminado fácilmente durante la liofilización, de tal manera que la formulación en polvo del conjugado de proteína liofilizada carezca de tampón residual. Alternativamente, puede utilizarse una etapa de intercambio de tampones utilizando un tampón de formulación, de tal manera que el conjugado liofilizado esté en una forma adecuada para ser reconstituida en un tampón de formulación y finalmente administrada a un mamífero.

45

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

50 Se describen preparaciones farmacéuticas que comprenden un conjugado como el proporcionado en la presente en combinación con un excipiente farmacéutico. Generalmente, el propio conjugado estará en forma sólida (por ejemplo, un precipitado) o en solución, las cuales pueden ser combinadas con un excipiente farmacéutico adecuado que puede estar en forma sólida o líquida.

Excipientes ejemplares incluyen, sin limitación, los seleccionados del grupo que consta de carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, surfactantes, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos.

55 Un carbohidrato tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar pueden estar presentes como excipiente. Excipientes carbohidratados específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, etcétera; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, etcétera; polisacáridos tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, etcétera; y alditoles tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol, etcétera.

60 El excipiente puede incluir también una sal inorgánica o un tampón tal como ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y combinaciones de los mismos.

65 La preparación puede incluir también un agente antimicrobiano para prevenir o detener el crecimiento microbiano. Ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio,

clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timerosol y combinaciones de los mismos.

En la preparación puede estar presente también un antioxidante. Los antioxidantes son utilizados para prevenir la oxidación, impidiendo de este modo el deterioro del conjugado o de los demás componentes de la preparación. Antioxidantes adecuados para ser utilizados en la presente invención incluyen, por ejemplo, ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio y combinaciones de los mismos.

Puede estar presente un surfactante como excipiente. Surfactantes ejemplares incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80" y pluronics tales como F68 y F88 (ambos están disponibles en BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposómica), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides tales como colesterol y agentes quelantes tales como EDTA, zinc y otros cationes adecuados similares.

En la preparación pueden estar presentes ácidos o bases como excipientes. Ejemplos no limitantes de ácidos que pueden ser utilizados incluyen aquellos ácidos seleccionados del grupo que consta de ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos. Ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consta de hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio y combinaciones de los mismos.

Las preparaciones farmacéuticas incluyen todos los tipos de formulaciones y, en particular, aquellas que son adecuadas para inyección, por ejemplo polvos que pueden ser reconstituidos así como suspensiones y soluciones. La cantidad de conjugado (esto es, el conjugado formado entre el agente activo y el polímero descrito en la presente) en la composición variará dependiendo de varios factores, pero óptimamente será una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición esté almacenada en un recipiente de dosis unidad (por ejemplo, un vial). Además, la preparación farmacéutica puede ser almacenada en una jeringa. La dosis terapéuticamente eficaz puede ser determinada experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades crecientes del conjugado con el fin de determinar qué cantidad produce un resultado final clínicamente deseado.

La cantidad de cualquier excipiente individual de la composición variará dependiendo de la actividad del excipiente y de las necesidades particulares de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual es determinada mediante experimentación rutinaria, esto es preparando composiciones que contengan cantidades variables del excipiente (que varíen desde una cantidad baja hasta una cantidad elevada), examinando la estabilidad y otros parámetros y determinando posteriormente el rango en el cual se consigue un funcionamiento óptimo sin efectos adversos significativos.

En general, sin embargo, el excipiente estará presente en la composición en una cantidad que varía desde el 1% aproximadamente al 99% en peso aproximadamente, preferiblemente del 5% al 98% en peso aproximadamente, más preferiblemente del 15% al 95% en peso aproximadamente del excipiente, siendo las concentraciones inferiores al 30% en peso las más preferidas.

Estos excipientes farmacéuticos anteriores junto con otros excipientes están descritos en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams (1995), en "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), y en Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª Edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

Las preparaciones farmacéuticas son típicamente, aunque no necesariamente, administradas mediante inyección y son por tanto generalmente soluciones o suspensiones líquidas inmediatamente antes de la administración. La preparación farmacéutica puede estar también en otras formas tales como jarabes, cremas, ungüentos, tabletas, polvos, etcétera. Otros modos de administración están también incluidos, tales como la administración pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosal, oral, intratecal, subcutánea, intraarterial, etcétera.

Según se describió previamente, los conjugados pueden ser administrados inyectados parenteralmente mediante inyección intravenosa o, menos preferiblemente, mediante inyección intramuscular o subcutánea. Los tipos de formulación adecuados para administración parenteral incluyen soluciones listas para inyección, polvos secos para ser combinados con un solvente antes de su utilización, suspensiones listas para inyección, composiciones insolubles deshidratadas para ser combinadas con un vehículo antes de su utilización y emulsiones y concentrados líquidos para ser diluidos antes de la administración, entre otros.

MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

Se describe un método para administrar un conjugado como el proporcionado en la presente a un paciente que padezca una condición que sea sensible al tratamiento con el conjugado. El método comprende la administración, generalmente mediante inyección, de una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado (proporcionado preferiblemente como parte de una preparación farmacéutica). El método de administración puede ser utilizado para tratar cualquier condición que pueda ser remediada o prevenida

por la administración del conjugado particular. Las personas con experiencia habitual en la técnica apreciarán qué condiciones puede tratar eficazmente un conjugado específico. La dosis real para ser administrada variará dependiendo de la edad, el peso y la condición general del sujeto, así como de la gravedad de la condición que vaya a ser tratada, de la opinión del profesional sanitario y del conjugado que esté siendo administrado. Las cantidades terapéuticas eficaces son conocidas por los expertos en la técnica y/o están descritas en los textos de referencia y en la literatura pertinente. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz variará de 0,001 mg a 100 mg aproximadamente, preferiblemente en dosis de 0,01 mg/día a 75 mg/día y, más preferiblemente, en dosis de 0,10 mg/día a 50 mg/día.

La dosificación unidad de cualquier conjugado dado (de nuevo suministrado preferiblemente como parte de una preparación farmacéutica) puede ser administrada en una variedad de pautas de dosificación dependiendo de la opinión del médico, de las necesidades del paciente, etcétera. La pauta de dosificación específica será conocida por las personas con experiencia habitual en la técnica o podrá ser determinada experimentalmente utilizando métodos de rutina. Pautas de dosificación ejemplares incluyen, sin limitación, la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes y cualquier combinación de las mismas. Una vez que se ha conseguido el resultado clínico final, se interrumpe la dosificación de la composición.

Una ventaja de la administración de los conjugados es que porciones individuales del polímero soluble en agua pueden ser cortadas. Tal resultado es ventajoso cuando la eliminación del organismo es potencialmente un problema debido al tamaño del polímero. Óptimamente, el corte de cada porción del polímero soluble en agua es facilitado por la utilización de enlaces susceptibles de ser cortados fisiológicamente y/o degradables enzimáticamente tales como enlaces que contengan uretano, amida, carbonato o éster. De esta forma, la eliminación del conjugado (mediante el corte de porciones individuales del polímero soluble en agua) puede ser modulada seleccionando el tamaño molecular del polímero y el tipo de grupo funcional que proporcionarían las propiedades de eliminación deseadas. Una persona con experiencia habitual en la técnica puede determinar el tamaño molecular apropiado del polímero así como el grupo funcional susceptible de ser cortado. Por ejemplo, una persona con experiencia habitual en la técnica, utilizando experimentación de rutina, puede determinar el tamaño molecular apropiado y el grupo funcional susceptible de ser cortado, preparando en primer lugar una variedad de derivados poliméricos con diferentes pesos del polímero y diferentes grupos funcionales susceptibles de ser cortados, y obteniendo luego el perfil de eliminación (por ejemplo mediante la toma de muestras de sangre o de orina periódicamente) administrando el derivado polimérico a un paciente y recogiendo periódicamente muestras de sangre y/u orina. Una vez que se ha obtenido una serie de perfiles de eliminación para cada conjugado analizado, puede identificarse un conjugado adecuado.

Los ejemplos siguientes ilustran, pero no tienen la intención de limitar de ninguna manera, el ámbito de la presente invención.

EJEMPLOS

40 Materiales y Métodos

Los datos de ^1H RMN fueron obtenidos utilizando un espectrómetro de 400 MHz fabricado por Bruker. Los reactivos PEG referidos en los ejemplos adjuntos están disponibles en Nektar Therapeutics, Huntsville, AL.

45 **1. Preparación de mPEG-5K ácido propiónico, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS).**

El reactivo de PEG, mPEG-5K ácido propiónico, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), fue sintetizado según sigue.

50 *A. M-PEG(5.000)-Nitrilo (1)*

M-PEG-OH (metoxi-PEG, PM = 5.000 daltons, 50 g, conteniendo un 4% en peso de PEG-diol de alto peso molecular, según se determinó mediante cromatografía de permeación en gel (GPC)) fue disuelto en agua destilada (50,0 ml), a lo que se añadió hidróxido de potasio (1,0 g). La solución fue enfriada a 0-5°C en un baño de hielo. Se añadió lentamente acrilonitrilo (6,8 g) y la solución se agitó durante 2,5 horas a 0-5°C. El pH de la solución fue ajustado a 7 mediante la adición de dihidrógeno fosfato de sodio. El producto fue extraído tres veces con diclorometano (250, 100 y 50 ml). Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de magnesio, filtradas, concentradas y el producto fue precipitado por la adición a éter etílico a 0-5°C. El precipitado fue extraído por filtración y secado bajo vacío. Rendimiento 47,0 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,74 ppm (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CN}$); 3,21 ppm (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

65 *B. M-PEG(5.000)-Amida (2)*

Una mezcla de M-PEG(5.000)-nitrilo, (1), (47,0 g) y ácido clorhídrico concentrado (235 g) fue agitada a temperatura ambiente durante 48 horas. La solución fue diluida con dos litros de agua y extraída con

diclorometano (300, 200 y 100 ml). Los extractos orgánicos combinados fueron lavados dos veces con agua, secados sobre sulfato de sodio, filtrados y concentrados hasta sequedad mediante evaporación rotatoria.

5 Rendimiento 43,0 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,26 ppm (t, 2H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CONH}_2$); 2,43 ppm (t, 2H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{COOH}$); 3,21 ppm (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

C. M-PEG(5.000)-Ácido Propiónico, (alfa-metoxi, omega-ácido propiónico de PEG) (3)

10 Se disolvió M-PEG(5.000)-amida, (2), (32,0 g) en 2300 ml de agua destilada, a lo que se añadieron 200 g de hidróxido de potasio y la solución fue agitada durante 22 horas a temperatura ambiente. Se añadió cloruro de sodio (300 g), y la solución fue extraída tres veces cada una de ellas con 300 ml de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados fueron lavados con ácido oxálico al 5%, agua (dos veces) y secados sobre sulfato de sodio. La solución fue concentrada y el producto precipitado por la adición a éter etílico. El producto M-PEG(5.000)-ácido propiónico, (3), fue recogido por filtración y secado bajo vacío.

15 Rendimiento 28,0 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,43 ppm (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$); 3,21 ppm (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

20 Eliminación de Impurezas Difuncionales: Se disolvió el M-PEG(5.000)-ácido propiónico, (3), conteniendo un 4% en peso de PEG(10.000)-ácido dipropiónico (22 g) (derivado de la reacción de la impureza de PEG-diol contenida en el material de partida) en 2200 ml de agua desionizada y la solución resultante fue aplicada a una columna de cromatografía de DEAE Sephadex A-25 en forma de tetraborato. Se aplicó un gradiente iónico gradual de cloruro de sodio (a incrementos desde 2 a 14 mM) y comenzó la recogida de las fracciones (60 ml de cada una aproximadamente). Las fracciones 4-25 contenían M-PEG(5.000)-ácido propiónico puro. La dos fracciones siguientes no contenían PEG, mientras que las fracciones 28-36 contenían PEG(10.000)-ácido dipropiónico puro. Las fracciones que contenían M-PEG(5.000)-ácido propiónico puro fueron combinadas y concentradas (hasta 100 ml aproximadamente). Se añadió cloruro de sodio (10 g), se ajustó el pH a 3 y se extrajo el producto con diclorometano. La capa orgánica fue secada sobre MgSO_4 y el solvente fue eliminado por destilación bajo presión reducida para dar 18,4 g de producto.

30 El análisis mediante HPLC mostró que el producto era M-PEG(5.000)-ácido propiónico 100% puro (carente de cualquier otra impureza).

35 D. M-PEG(5.000)-Ácido Propiónico, éster NHS, (alfa-metoxi, omega-ácido propiónico succinimidil éster de PEG ("metoxi-PEG-SPA")), (4)

M-PEG(5.000)-ácido propiónico (14,4 g), (3), fue disuelto en diclorometano (60 ml) para formar una solución a la que se añadió N-hidroxisuccinimida (0,36 g). La solución fue enfriada a 0°C y se añadió a la misma gota a gota una solución de dicitohexilcarbodiimida (0,72 g) en 10 ml de diclorometano. La solución fue agitada durante una noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción fue filtrada, concentrada, y el producto fue precipitado por la adición a éter etílico.

40 Rendimiento de producto final (4): 14,0 g. RMN (d_6 -DMSO): 2,81 ppm (s, 4H, NHS); 2,92 ppm (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}-$); 3,21 ppm (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

45 **2. Preparación de mPEG-20K ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS)**

El reactivo de PEG, mPEG-20K ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), fue sintetizado según sigue.

50 A. M-PEG(20K)-Metanosulfonato (5)

M-PEG-OH (PM = 20.000 daltons, 60 g, conteniendo un 6% en peso de PEG-diol de alto peso molecular (determinado mediante cromatografía de permeación en gel (GPC))) fue disuelto en 300 ml de tolueno y destilado azeotrópicamente durante 1 hora bajo una atmósfera de argón. A continuación la solución fue enfriada hasta temperatura ambiente. Se añadieron a la solución 24 ml de diclorometano anhidro y 0,62 ml de trietilamina (0,0044 moles). Se añadieron gota a gota 0,28 ml de cloruro de metanosulfonilo (0,0036 moles). La solución fue agitada a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante una noche. Posteriormente se añadió carbonato de sodio (30 g) y la mezcla se agitó durante 1 hora. La solución fue filtrada y los solventes fueron eliminados por destilación bajo presión reducida. Rendimiento 27,5 g.

60 ^1H RMN (d_6 -DMSO): 3,17 ppm (s, 3H, CH_3 -metanosulfonato), 3,24 ppm (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,30 ppm (m, $-\text{CH}_2$ -metanosulfonato).

B. M-PEG(20.000)-Ácido Butanoico (8)

65 Malonato de etilo (3,4 ml, 0,022 equivalentes) disuelto en 200 ml de dioxano fue añadido gota a gota a hidruro de sodio (0,536 g, 0,022 equivalentes) y tolueno (100 ml) en un matraz de fondo redondo bajo nitrógeno. A la mezcla anterior se añadió M-PEG(20K)-metanosulfonato (5) (40 g, 0,0020 moles) disuelto en

100 ml de tolueno. La mezcla resultante fue sometida a reflujo durante una noche. La mezcla de reacción fue luego concentrada hasta la mitad de su volumen original, extraída con 50 ml de una solución acuosa de NaCl al 10%, extraída con 50 ml de ácido clorhídrico acuoso al 1% y se combinaron los extractos acuosos. Las capas acuosas recogidas fueron extraídas con diclorometano (150 ml x 3) y la capa orgánica fue secada sobre sulfato de magnesio durante 3 horas, filtrada y evaporada hasta sequedad.

Rendimiento: 36 g de M-PEG-ácido malónico, éster dietílico, **(6)**. RMN (d_6 -DMSO): 1,17 ppm (t, 6H, $-CH_3$); 1,99 ppm (cuarteto, 2H, $-CH_2-CH$); 3,21 ppm (s, 3H, $-OCH_3$); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); 4,10 ppm (quinteto, 4H, $-OCH_2-CH_3$).

El M-PEG-ácido malónico, éster dietílico **(6)** (36 g) fue disuelto en 480 ml de hidróxido de sodio 1 N que contenía 24 g de cloruro de sodio y la mezcla fue agitada durante una hora. El pH de la mezcla fue ajustado a 3,0 mediante la adición de ácido clorhídrico 6 N, y la mezcla fue extraída con diclorometano (300 ml y 200 ml). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de magnesio, filtrada, concentrada y vertida en éter etílico frío. El producto M-PEG(20.000)-ácido malónico **(7)** fue extraído por filtración y secado bajo vacío.

Rendimiento: 32 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,0 ppm (q, 2H, $-CH_2CH_2-CH-$); 2,90 ppm (t, 2H, $-CH_2CH-$); 3,21 ppm (s, 3H, $-OCH_3$); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); 12,1 ppm (s, 2H, $-COOH$).

El M-PEG-ácido malónico, **(7)**, (30 g) fue disuelto en 240 ml de dioxano y sometido a reflujo durante 8 horas, posteriormente fue concentrado hasta sequedad. El residuo fue disuelto en 200 ml de agua, extraído con diclorometano (140 ml y 100 ml), secado sobre sulfato de magnesio y la solución fue concentrada mediante evaporación rotatoria. El residuo fue precipitado por la adición a éter etílico frío.

Rendimiento: 22 g de M-PEG(20.000)-ácido butanoico **(8)**. 1H RMN (d_6 -DMSO): 1,72 ppm (quinteto, 2H, $-CH_2CH_2CH_2-COOH$); 2,40 ppm (t, 4H, $-CH_2CH_2CH_2-COOH$); 3,21 ppm (s, 3H, $-OCH_3$); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG). El análisis mediante HPLC mostró que el producto contenía un 94% en peso de M-PEG(20.000)-ácido butanoico y un 6% en peso de PEG-ácido dibutanoico derivado del PEG-diol de peso molecular más elevado contenido en el material de partida.

Para eliminar la especie de PEG reactiva de peso molecular mas elevado, el M-PEG(20K)-ácido butanoico que contenía un 6% en peso de PEG-ácido dibutanoico (22 g) fue disuelto en 2200 ml de agua desionizada y aplicado a una columna de DEAE Sephadex A-50 en forma de tetraborato. Se aplicó un gradiente iónico gradual de cloruro de sodio (a incrementos desde 1 a 4 mM) y se recogieron las fracciones. Las fracciones, que contenían M-PEG(20.000)-ácido butanoico puro, fueron combinadas y recogidas. Las fracciones que eluyeron posteriormente y que contenían PEG-ácido dibutanoico puro fueron desechadas. Las fracciones combinadas que contenían M-PEG(20.000)-ácido butanoico puro fueron concentradas (hasta 200 ml aproximadamente). Se añadió cloruro de sodio (20 g), se ajustó el pH a 3 y se extrajo el producto con diclorometano. El extracto fue secado ($MgSO_4$) y el solvente fue eliminado por destilación bajo presión reducida para dar lugar a 13,6 g de producto.

El análisis mediante HPLC mostró que el producto era M-PEG(20.000)-ácido butanoico **(8)** 100% puro libre de especies de PEG de peso molecular más elevado.

C. M-PEG(20.000)-Ácido Butanoico, NHS éster **(9)**

El M-PEG(20.000)-ácido butanoico **(8)** (13,6 g), fue disuelto en diclorometano (40 ml) y se añadió N-hidroxisuccinimida (0,094 g) a la solución. La solución fue enfriada a 0°C y se añadió gota a gota a la misma una solución de dicitlohexilcarbodiimida, DCC, (0,196 g) en 10 ml de diclorometano. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción fue filtrada, concentrada y precipitada por la adición a éter dietílico.

Rendimiento de producto final: 13,1 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,83 ppm (quinteto, 2H, $-CH_2CH_2CH_2-COO-$); 2,70 ppm (t, 2H, $-CH_2-COO-$); 2,81 ppm (4H, NHS); 3,21 ppm (s, 3H, $-OCH_3$); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG).

EJEMPLO 1

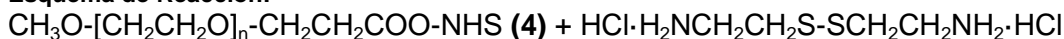
Preparación de mPEG(5K)-Tiol, M-PEG(5K)- $CH_2CH_2CONHCH_2CH_2SH$ **(11)**

Se preparó metoxi-PEG-5K-tiol con una elevada pureza y con un alto rendimiento a partir de un PEG activado electrofílicamente ejemplar, mPEG-5K ácido propiónico, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) (referido también como mPEG-5K succinimidil propionato), disponible comercialmente en Shearwater Corporation, actualmente Nektar Therapeutics (Catálogo 2001 de Shearwater, Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications), Huntsville, Alabama.

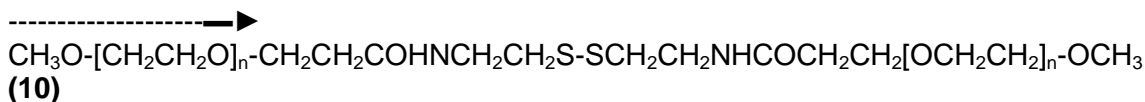
La preparación de mPEG-5K succinimidil propionato está descrita de forma general en la Patente de EE.UU. N° 5.672.662 (Shearwater Polymers) y en las secciones de "Materiales y Métodos" anteriores.

Síntesis de M-PEG(5.000)-Tiol **(11)**

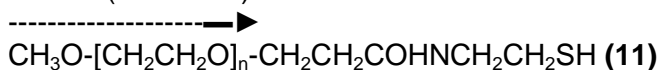
Esquema de Reacción:



TEA (trietilamina)



5 DTT (ditiotreititol)



10 Se disolvió M-PEG-ácido propiónico, NHS éster, (4), (PM = 5.268, 10,0 g, 1,898 mmoles) en diclorometano (100 ml), a lo que se añadió dihidroclorato de cistamina (0,2278 g, 1,012 mmoles) y trietilamina (0,66 ml). La solución fue agitada durante una noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. El análisis mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) mostró que la mezcla de reacción contenía el producto deseado (10) (disulfuro simétrico que tenía un peso molecular de 10.000 aproximadamente) con un 97,53% de rendimiento y M-PEG(5.000)-ácido propiónico con un rendimiento del 2,14%.

15 Posteriormente se añadieron ditiotreititol (DTT) (0,88 g, 0,005705 moles) y trietilamina (0,5 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas a temperatura ambiente bajo argón. A continuación se añadió 2,6-di-ter-butil-4-metilfenol (BHT) (0,05 g) y el solvente fue eliminado por destilación bajo presión reducida. El producto tiol bruto (11) fue disuelto en diclorometano (20 ml) y precipitado con alcohol isopropílico a 0-5°C. El rendimiento después de desecar fue de 8,80 g.

20 Análisis mediante GPC: Producto deseado: M-PEG(5.000)-tiol, (11), 96,05% de rendimiento; M-PEG(5.000)-ácido propiónico, 0,57% de rendimiento; dímero no reducido, (10), 3,07%. RMN (d_6 -DMSO): 1,52 ppm (t, 1H, -SH); 2,31 ppm (t, 2H, -CH₂-CO-); 2,66 ppm (dt, 2H, -CH₂-S-); 3,21 ppm (s, 3H, -OCH₃); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); 8,05 ppm (t, 1H, -NH-).

25 El producto intermedio disulfuro ejemplar, (10), y el producto PEG-tiol reducido, (11), fueron ambos preparados con un elevado rendimiento y con una pureza elevada utilizando un esquema de reacción sencillo que requería únicamente dos etapas. El reactivo ejemplar, cistamina, está disponible comercialmente y el grupo amino de la misma es fácilmente sustituido por el grupo succinimidil del producto carbonilo. La utilización ejemplar de una cantidad estequiométrica del reactivo simétrico con dos grupos amino reactivos terminales, hace que la reacción sea "más limpia" debido a la formación de únicamente un producto de sustitución no contaminado por un exceso de reactivo. El producto PEG-tiol resultante es adecuado para acoplarse a un grupo tiol reactivo, por ejemplo uno contenido en un fármaco o en un residuo de cisteína de una proteína, para formar el conjugado de PEG correspondiente. Los enlaces de PEG (esto es, la porción adaptadora de la molécula que conecta la cadena o el esqueleto de PEG con un grupo tiol reactivo de un fármaco o de otra especie) descritos en la presente son estables y proporcionan una clase nueva de polímeros solubles en agua no existentes en la naturaleza adecuados que pueden ser fácilmente sintetizados y que pueden ser utilizados para modificar o pegar selectivamente proteínas u otras moléculas reactivas sin necesidad de múltiples etapas sintéticas, de etapas de protección-desprotección y de múltiples purificaciones.

EJEMPLO 2

Preparación de m-PEG(20K)-Tiol, CH₃O(CH₂CH₂O)_n(20K)-CH₂CH₂CH₂CONHCH₂CH₂SH (13)

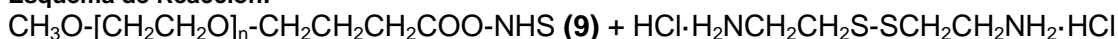
45 Se preparó metoxi-PEG-20K-tiol con una pureza elevada y con un alto rendimiento a partir de otro PEG activado electrofílicamente ejemplar, mPEG-20K-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) (referido también como mPEG-20K succinimidil butanoato), disponible comercialmente en Shearwater Corporation, actualmente Nektar Therapeutics (Catálogo 2001 de Shearwater, Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications), Huntsville, Alabama.

50 La preparación de mPEG-5K succinimidil butanoato está descrita de forma general en la Patente de EE.UU. N° 5.672.662 (Shearwater Polymers) y en las secciones de "Materiales y Métodos" anteriores.

Síntesis de m-PEG(20.000)-Tiol (13)

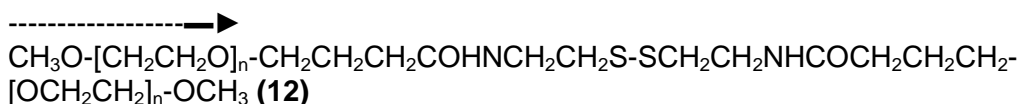
55

Esquema de Reacción:

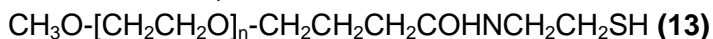
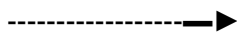


TEA

60



DTT



5 Se disolvió M-PEG(20K)-ácido butanoico, NHS éster **(9)** (PM = 20.000 daltons, 10,0 g, 0,500 mmoles) en diclorometano (100 ml) y se añadieron cistamina diclorhidrato (0,0564 g, 0,251 mmoles) y trietilamina (0,167 ml). La solución fue agitada durante una noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. El análisis mediante GPC mostró que la mezcla de reacción contenía el producto deseado (un dímero con un peso molecular de 40.000 aproximadamente, **(12)**), con un 98,5% de pureza y un 1,5% de M-PEG(20.000)-ácido butanoico.

10 Se añadieron ditiotreitól (DTT) (0,23 g, 1,500 mmoles) y trietilamina (0,5 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. A continuación se añadió BHT (0,05 g) y se eliminó el solvente por destilación bajo presión reducida. El producto bruto fue disuelto en diclorometano (20 ml) y precipitado con alcohol isopropílico a 0-5°C.

15 Rendimiento después de desecar 9,20 g. Análisis mediante HPLC: M-PEG(20K)-Tiol **(13)** 96,0%, M-PEG(20.000)-ácido butanoico 1,5%, dímero no reducido 2,5%.

20 De manera similar al Ejemplo 1 anterior, este ejemplo demuestra la preparación de otro PEG-tiol representativo más (así como su precursor disulfuro correspondiente). La síntesis es sencilla, requiriendo solamente dos etapas de reacción: la sustitución del grupo amino nucleofílico representativo de la cistamina en el carbono del carbonilo electrofílico del reactivo de PEG ilustrativo, **(9)**, seguido por la reducción del disulfuro para producir el PEG-tiol correspondiente. La utilización de un reactivo disulfuro simétrico simplifica la síntesis, haciendo innecesaria la purificación del producto PEG-tiol. El PEG-tiol se forma con un alto rendimiento (mayor del 90%, de hecho mayor del 95%) y es adecuado para el acoplamiento con grupos tiol reactivos, por ejemplo contenidos en los residuos de cisteína de proteínas terapéuticas o introducidos mediante medios químicos en una proteína o polipéptido, o presentes en moléculas pequeñas o en otros agentes activos.

EJEMPLO 3

30 Preparación de PEG(40K)-Di-Tiol, HSCH₂CH₂NH(O)CCH₂O-PEG-40K-CH₂C(O)BNCH₂CH₂SH **(18)**

El PEG-40K-di-tiol **(18)** fue preparado a partir de un reactivo de PEG bifuncional, PEG-40K-ácido dicarboxílico, según se muestra a continuación.

35 A. PEG(40.000)-Ácido Di-Carboxílico, Éster Etilico **(14)**

Se disolvió HO-PEG-OH (PM = 40.000 daltons, 50 g, 2,50 mequivalentes de hidroxilo) en 750 ml de tolueno y se destiló azeotrópicamente durante 1 hora bajo una atmósfera de argón. Se destilaron 150 ml de tolueno de la mezcla de reacción. A continuación la solución fue enfriada a 40°C y se añadió una solución 1,0 M de ter-butóxido de potasio en ter-butanol (4,0 ml, 4 mmoles), seguido por la adición de bromoacetato de etilo (1,4 g, 8,4 mmoles). La mezcla de reacción fue agitada durante una noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. El solvente fue eliminado por destilación bajo presión reducida y el producto bruto fue disuelto en diclorometano y añadido a éter etílico. El producto precipitado fue aislado por filtración y secado bajo presión reducida. Rendimiento 42,3 g.

45 B. PEG(40.000)-Ácido Di-Carboxílico **(15)**

Una solución de 40,0 gramos (1,0 mmoles) de PEG(40.000)-ácido di-carboxílico, éster etílico **(14)** en 400 ml de NaOH 1 M, fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación el pH de la mezcla fue ajustado a 2 y el producto fue extraído con diclorometano. Los solventes fueron luego eliminados por destilación bajo presión reducida. El producto bruto fue disuelto en diclorometano (100 ml) y añadido a éter etílico (900 ml). El producto precipitado fue aislado por filtración y secado bajo presión reducida. Análisis mediante HPLC: PEG(40.000)-Ácido Di-Carboxílico 86,5%, PEG(40.000)-Ácido Mono-Carboxílico 13,0%, HO-PEG(40.000)-OH 0,5%.

55 Rendimiento 33,1 g. ¹H RMN (d₆-DMSO): 3,51 ppm (s, esqueleto de de PEG); 4,02 ppm (4H, -OCH₂COO-).

El producto obtenido (30 g) fue disuelto en 3000 ml de agua desionizada y aplicado a una columna de cromatografía de DEAE Sephadex A-50 en forma de tetraborato. Se aplicó un gradiente iónico gradual de cloruro de sodio (a incrementos desde 2 a 10 mM) y se recogieron las fracciones. Las fracciones positivas para el test de PAA, esto es, que contenían PEG(40.000)-ácido di-carboxílico, fueron combinadas y concentradas (hasta 300 ml aproximadamente). Se añadió cloruro de sodio (30 g), se ajustó el pH a 3 y se extrajo el producto con diclorometano. El extracto fue secado (MgSO₄) y el solvente fue eliminado por destilación bajo presión reducida para dar 21,6 g de producto, **(15)**. El producto **(15)** demostró ser un diácido puro, esto es, un 100% de PEG(40.000)-ácido di-carboxílico, mediante HPLC.

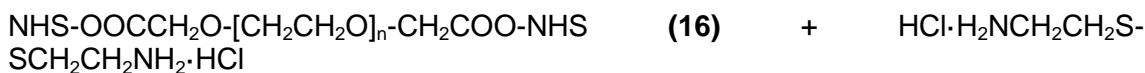
65 C. PEG(40.000)-Ácido Di-Carboxílico, NHS éster, **(16)**

El PEG(40.000)-ácido di-carboxílico (**15**) (20 g) fue disuelto en diclorometano (200 ml), a lo que se añadió N-hidroxisuccinimida (0,138 g). La solución fue enfriada a 0°C, se añadió a la misma gota a gota una solución de dicitohexilcarbodiimida (0,290 g) en 5 ml de diclorometano y se agitó la solución a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción fue filtrada, concentrada y precipitada por la adición a éter etílico. Rendimiento del producto final, (**16**): 18,3 g.

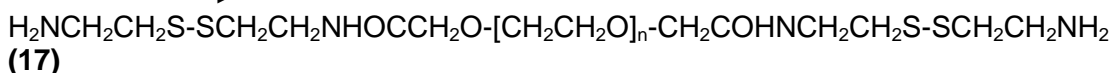
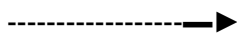
¹H RMN (d₆-DMSO): 2,83 ppm (8H, NHS); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); 4,61 ppm (4H, -OCH₂COO-).

*D. PEG(40.000)-Di-Tiol (**18**)*

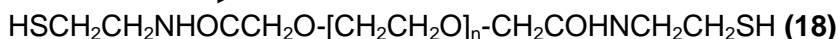
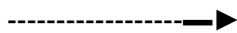
10 **Esquema de Reacción:**



15 base



20 DTT



25 Se disolvió PEG(40.000)-ácido di-carboxílico, NHS éster (**16**) (PM = 40.000, 18,0 g, 0,900 mequivalentes) en diclorometano (150 ml) y se añadieron cistamina diclorhidrato (1,01 g, 4,5 mmoles) y trietilamina (1,70 ml). La solución fue agitada durante una noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. La solución fue concentrada y añadida a 900 ml de alcohol isopropílico a temperatura ambiente. El producto precipitado fue extraído por filtración y secado bajo presión reducida.

30 El análisis mediante RMN mostró que se había consumido todo el NHS éster y que se había formado el producto disulfuro deseado (**17**). El producto fue disuelto en diclorometano (150 ml), se añadieron ditiotretitol (DTT) (0,84 g, 5,446 mmoles) y trietilamina (2,0 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. A continuación se añadió BHT (0,09 g) y se eliminó el solvente por destilación bajo presión reducida. El residuo - un producto ditiol bruto (**18**) - fue disuelto en diclorometano (40 ml) y precipitado con alcohol isopropílico a temperatura ambiente. Rendimiento después de desecar 14,3 g.

¹H RMN (d₆-DMSO): 1,07 ppm (t, 2H, -SH); 2,66 ppm (dt, 4H, -CH₂-S-); 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); 3,90 ppm (s, 4H, -OCH₂CO-); 8,05 ppm (t, 2H, -NH-).

REIVINDICACIONES

1.- Un método para preparar un derivado tiol-selectivo de un polímero soluble en agua, donde dicho método comprende las etapas de:

- 5 (i) provisión de un polímero activado electrofílicamente, POLI-L_{0,1}-E, donde:
 POLI es polietilén glicol que comprende de 10 a 4000 subunidades de la fórmula (-OCH₂CH₂-),,
 L es un adaptador opcional,
 E es un electrófilo, y
- 10 (ii) reacción de dicho POLI-L_{0,1}-E con un reactivo disulfuro simétrico, (NU-Y-S)₂, donde:
 NU es un nucleófilo,
 Y es seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, cicloalquileo, cicloalquileo sustituido, arilo y arilo sustituido, conteniendo de 2 aproximadamente a 10 átomos de carbono aproximadamente, y
 S es un átomo de azufre,
 bajo condiciones eficaces para promover la reacción entre E y NU para formar así POLI-L_{0,1}-X-Y-S-S-Y-X-L_{0,1}-POLI((POLI-L_{0,1}-X-Y-S)₂), donde X es un grupo resultante de la reacción entre E y UN y
- 20 (iii) reducción del enlace disulfuro de (POLI-L_{0,1}-X-Y-S)₂ para formar POLI-L_{0,1}-X-Y-SH.

2.- El método de la reivindicación 1, donde L₁ es un adaptador seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₀ y alquilo C₁-C₁₀ sustituido.

25 3.- El método de la reivindicación 2, donde L₁ es un adaptador seleccionado del grupo que consiste en (CH₂)_{1,2,3,4 y 5}.

30 4.- El método de la reivindicación 1, donde E es un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico activado.

5.- El método de la reivindicación 1, donde E es seleccionado del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico activado, haluro de ácido y anhídrido activo.

35 6.- El método de la reivindicación 5, donde E es un N-hidroxisuccinimidil éster.

7.- El método de la reivindicación 1, donde NU es seleccionado del grupo que consiste en amino, hidroxil, imino y tiol.

40 8.- El método de la reivindicación 1, donde NU es -NH₂.

9.- El método de la reivindicación 1, donde X es seleccionado del grupo que consiste en amida, carbamato, éster carbonato, éter y tioéster.

45 10.- El método de la reivindicación 1, donde POLI es un polietilén glicol que tiene la estructura H₃CQ-(CH₁CH₂O)_nCH₂CH₂- donde n varía de 10 a 4.000 aproximadamente.

11.- El método de la reivindicación 1, donde POLI está protegido ("capped") terminalmente.

50 12.- El método de la reivindicación 10, donde L está ausente (L₀) o es -CH₂-, y E es N-hidroxisuccinimidil éster o 1-hidroxibenzotriazolil carbonato.

13.- El método de la reivindicación 12, donde dicho reactivo disulfuro simétrico es cistamina, donde NU es un amino primario e Y es -(CH₂)₂-.

55 14.- Un método para preparar un conjugado polímero-proteína, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 60 (i) la provisión de un polímero activado electrofílicamente, POLI-L_{0,1}-E, donde:
 POLI es un segmento polimérico soluble en agua,
 L es un adaptador opcional,
 E es un electrófilo,
- 65 (ii) la reacción de dicho POLI-L_{0,1}-E con un reactivo disulfuro simétrico, (NU-Y-S)₂, donde:
 NU es un nucleófilo,
 Y es seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₂-C₁₀, alquilo C₂-C₁₀ sustituido, arilo y arilo sustituido, y
 S es un átomo de azufre,
 bajo condiciones eficaces para promover la reacción entre E y NU para formar así POLI-L_{0,1}-

ES 2 352 337 T5

X-Y-S-S-Y-X-L_{0,1}-POLI((POLI-L_{0,1}-X-Y-S-)₂), donde X es un grupo resultante de la reacción entre E y NU,

(iii) la reducción del enlace disulfuro de (POLI-L_{0,1}-X-Y-S-)₂ para formar POLI-L_{0,1}-X-Y-SH y

(iv) la reacción de POLI-L_{0,1}-X-Y-SH con un grupo tiol o con grupo tiol protegido de una proteína para formar un conjugado de la proteína, POLI-L_{0,1}-X-Y-S-S-proteína.

5

15.- El método de la reivindicación 14, donde dicha proteína es una proteína terapéutica.