



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 526**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03752256 .2**

96 Fecha de presentación : **09.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1537163**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Método para preparar derivados poliméricos solubles en agua que llevan un ácido carboxílico terminal.**

30 Prioridad: **09.09.2002 US 409348 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2009**

73 Titular/es: **Nektar Therapeutics AL, Corporation**  
**490 Discovery Drive**  
**Huntsville, Alabama 35806-2903, US**

72 Inventor/es: **Kozłowski, Antoni**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 315 526 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para preparar derivados poliméricos solubles en agua que llevan un ácido carboxílico terminal.

5 **Campo de la invención**

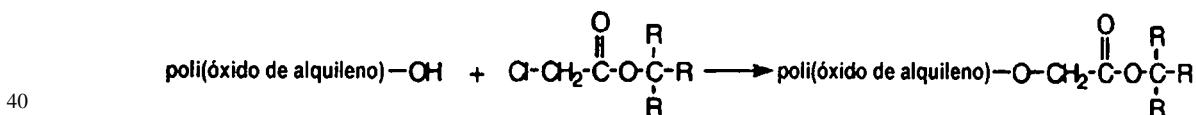
La presente invención se refiere generalmente a métodos novedosos para preparar derivados poliméricos que comprenden un ácido carboxílico terminal o un éster del mismo. Además, la invención se refiere a polímeros, conjugados de los polímeros, métodos de conjugación e intermedios así como a métodos para preparar los intermedios. Además, la invención se refiere a preparaciones farmacéuticas, métodos sintéticos y similares.

10 **Antecedentes de la invención**

La conjugación de un polímero soluble en agua tal como poli(etilenglicol) (o "PEG") con un agente biológicamente activo da como resultado un conjugado de polímero-agente activo que tiene a menudo propiedades ventajosas con respecto a la versión "no conjugada" correspondiente del agente activo. Entre otras ventajas, las formas conjugadas de agentes activos tienen vidas medias aumentadas y son menos inmunogénicas. Cuando se usa PEG para formar un conjugado de polímero-agente activo, el agente activo conjugado se denomina convencionalmente "PEGilado". Las preparaciones PEGiladas disponibles en el mercado incluyen interferón alfa-2a PEGilado PEGASYS® (Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ), interferón alfa-2b PEGilado PEG-INTRON® (Schering Corp., Kenilworth, NJ), filgrastima-PEG de NEULASTA™ (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) y pegvisomant SOMAVERT® (Pfizer, Nueva York, NY). El éxito comercial de estas preparaciones atestigua el valor de la tecnología de PEGilación.

Los polímeros que llevan un ácido carboxílico terminal son útiles, directamente o indirectamente, en reacciones de conjugación con agentes activos y otras sustancias. Por ejemplo, los ácidos carboxílicos se pueden hacer reaccionar directamente con un grupo amino o hidroxilo de un agente activo, formando de este modo un conjugado. Indirectamente, los polímeros que llevan un ácido carboxílico terminal (que actúa como un grupo electrófilo reactivo) pueden servir como un material de partida conveniente para preparar otros derivados poliméricos que llevan grupos funcionales diferentes de los ácidos carboxílicos. Los polímeros que llevan un grupo funcional diferente de un ácido carboxílico, después, pueden formar conjugados con agentes activos que llevan un grupo reactivo adecuado.

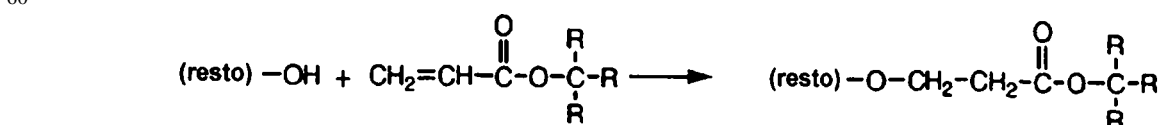
Se han descrito métodos para preparar determinados polímeros solubles en agua que llevan un ácido carboxílico terminal. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.681.567 describe la reacción de un poli(óxido de alquileo) con un haloacetato de alquilo terciario para formar de este modo un éster de alquilo terciario de un ácido carboxílico de poli(óxido de alquileo). Esquemáticamente, la reacción que usa un cloroacetato de alquilo terciario se puede representar del siguiente modo:



donde cada R es alquilo. La reacción posterior del éster con un ácido retira el resto alquilo terciario, que produce el ácido acético correspondiente. Sin embargo, este método da como resultado solamente polímeros que llevan un resto ácido acético terminal. Los derivados poliméricos sintetizados para terminar en un resto ácido acético se denominan en ocasiones polímeros "carboximetilados".

Los derivados poliméricos que llevan un ácido acético terminal se pueden hacer reaccionar adicionalmente para formar derivados poliméricos que llevan otros restos reactivos. Por ejemplo, se puede formar un de succinimidil éster de carboximetil PEG. Este succinimidil éster, sin embargo, es tan reactivo que se hidroliza prácticamente inmediatamente en solución acuosa. Por tanto, la utilidad práctica de los derivados de PEG que llevan un resto ácido acético terminal puede ser baja dada la naturaleza demasiado reactiva de estos derivados.

Otro método para preparar determinados polímeros solubles en agua que llevan un derivado de ácido carboxílico terminal se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.523.479. En esta estrategia, un resto que tiene un peso molecular de 32 a 600 y que tiene de uno a 6 grupos hidroxilo se hace reaccionar con un éster de alquilo terciario de un ácido carboxílico beta-insaturado para obtener un producto que tiene un éster terminal. Esquemáticamente, la reacción se puede representar del siguiente modo (el resto se presenta teniendo un único grupo hidroxilo y el éster de alquilo terciario de un ácido carboxílico beta-insaturado se representa por éster de alquilo terciario de ácido acrílico)



donde R es alquilo. Una etapa hidrolítica posterior transforma el éster en el ácido propanoico correspondiente.

## ES 2 315 526 T3

Aunque proporciona derivados poliméricos que carecen de un resto ácido acético reactivo, este método presenta otras desventajas. En primer lugar, el método proporciona de forma inherente solamente derivados de ácido propanoico. Además, la conversión mejor descrita del grupo hidroxilo al éster es inferior al 85%. Finalmente, solamente restos que tienen un peso molecular entre 32 y 6000 se describen en relación a la realización del método. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de proporcionar un método que pueda preparar ácidos diferentes de los derivados de ácido propanoico, dando como resultado la conversión a un éster y/o ácido superior al 85% y que se pueda usar con restos que tienen un peso molecular fuera del intervalo de 32 a 6000.

La patente de Estados Unidos N° 5.672.662 describe derivados de PEG que tienen un resto ácido propanoico o ácido butanoico terminal que se puede usar para preparar ésteres activos adecuados para conjugación con proteínas u otras moléculas que llevan grupos amino. Los ésteres activos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.672.662 muestran mayor estabilidad en solución que los ésteres activos de PEG carboximetilado y, por tanto, son más adecuados para la conjugación con moléculas biológicamente activas. El método descrito para preparar estos derivados de PEG que tiene un resto propanoico o butanoico terminal, sin embargo, implica numerosas etapas y solamente da como resultado aproximadamente el 80% de sustitución en el resto ácido carboxílico. Como una consecuencia, el método descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.672.662 requiere etapas de purificación caras y que requieren tiempo para proporcionar un producto de calidad farmacéutica.

Por tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de métodos mejorados para preparar derivados poliméricos que llevan un ácido carboxílico terminal. Además, continúa habiendo una necesidad de proporcionar polímeros novedosos que lleven un resto ácido carboxílico que sean útiles para reacciones de conjugación y funcionalización adicional. La presente invención aborda estas y otras necesidades en la técnica proporcionando, entre otras cosas, métodos novedosos para la preparación eficaz de derivados poliméricos que llevan un ácido carboxílico terminal.

### Sumario de la invención

El asunto de la presente invención son métodos de acuerdo con las reivindicaciones 1-25 y productos de acuerdo con las reivindicaciones 26-36.

En consecuencia, es un objeto principal de esta invención proporcionar un método para preparar un ácido carboxílico de un polímero soluble en agua que comprende las etapas de (a) hacer reaccionar un segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o ión tiolato con un orto éster que comprende un grupo saliente adecuado para formar un orto éster de un polímero soluble en agua; y (b) someter el orto éster de un polímero soluble en agua formado en la etapa (a) a una o más etapas de hidrólisis para proporcionar el ácido carboxílico correspondiente de un polímero soluble en agua.

Es otro objeto de la invención proporcionar un orto éster útil en el método para preparar el ácido carboxílico del polímero soluble en agua. Por tanto, este objeto de la invención comprende realizar la etapa (a) indicada en el párrafo inmediatamente precedente.

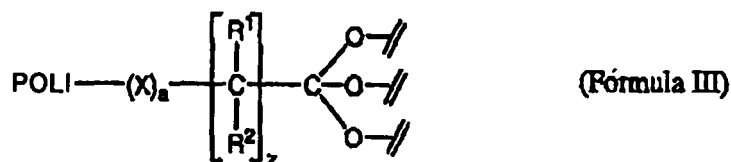
Es otro objeto más de la invención proporcionar un ácido carboxílico de un polímero soluble en agua preparado mediante un método descrito en este documento.

Es otro objeto más de la invención proporcionar geles, conjugados y composiciones farmacéuticas que comprenden un polímero descrito en este documento.

Es otro objeto de la invención proporcionar métodos para preparar cada uno de los geles, conjugados y composiciones farmacéuticas descritos en este documento.

Se indicarán objetos, ventajas y características novedosas adicionales de la invención en la siguiente descripción y, en parte, serán evidentes para los especialistas en la técnica después de lo siguiente, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención.

Entonces, en una realización de la invención se proporciona un orto éster de un polímero soluble en agua. Entre otros usos, el orto éster tiene utilidad como un intermedio en la síntesis de un polímero soluble en agua que lleva un grupo de ácido carboxílico terminal. El orto éster del polímero soluble en agua comprende preferiblemente la siguiente estructura:



## ES 2 315 526 T3

en la que:

POLI es un segmento de polímero soluble en agua;

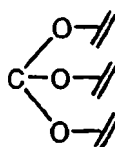
5 (a) es cero o uno;

X, cuando está presente, es un resto espaciador;

(z) es un número entero de 1 a 24;

10  $R^1$ , en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido;

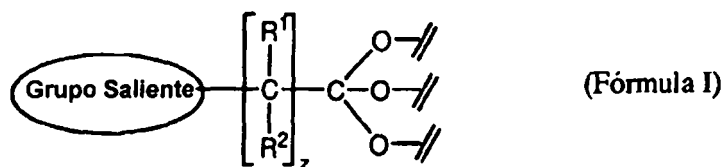
15  $R^2$ , en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido; y



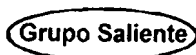
25 representa un residuo de un resto orto éster.

30 En otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar un orto éster de un polímero soluble en agua. El método comprende la etapa de hacer reaccionar, en presencia de una base, un segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un grupo hidroxilo o tior con un orto éster que comprende un grupo saliente adecuado. Se prefiere que el segmento de polímero soluble en agua tenga al menos un grupo hidroxilo y que carezca de cualquier grupo tior.

35 Típicamente, aunque no necesariamente, el orto éster que comprende un grupo saliente adecuado comprende la siguiente estructura:



50 en la que:



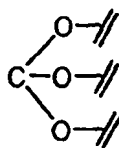
60 es el grupo saliente adecuado;

(z) es un número entero de 1 a 24;

65  $R^1$ , en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido;

R<sup>2</sup> en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido;

5



10

representa un residuo de un resto orto éster.

15 En una realización adicional de la invención se proporciona un método para preparar un ácido carboxílico de un polímero soluble en agua. El método comprende la etapa de someter un orto éster de un polímero soluble en agua a una o más etapas de hidrólisis para proporcionar el ácido carboxílico correspondiente de un polímero soluble en agua. Aunque se puede realizar una única etapa de hidrólisis, se prefiere que se realicen dos etapas de hidrólisis secuenciales. Las etapas de hidrólisis doble ilustrativas incluyen una etapa de hidrólisis con base inicial seguida de una  
20 segunda etapa de hidrólisis con base y una etapa de hidrólisis con ácido inicial seguida de una etapa de hidrólisis con base.

Para cualquier estructura que comprende un segmento de polímero soluble en agua se puede usar cualquier polí-  
25 mero que sea soluble en agua y la invención no está limitada a este respecto. Sin embargo, los segmentos de polímero soluble en agua preferidos están acabados terminalmente en un extremo. Además se prefieren segmentos de polímero soluble en agua que tengan una masa molecular promedio en masa inferior a aproximadamente 100.000 Dalton.

### Breve descripción del dibujo

30 La Figura 1 es una representación esquemática de una estrategia para preparar un polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal de acuerdo con la invención.

### Descripción detallada de la invención

35 *Visión de conjunto y definiciones*

Antes de describir detalladamente la presente invención, se tiene que entender que esta invención no está limitada a los polímeros particulares, técnicas sintéticas, agentes activos y similares ya que tales pueden variar. También se tiene que entender que la terminología usada en este documento es solamente para describir realizaciones particulares y no  
40 tiene por objeto ser limitante.

Se tiene que señalar que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo, por tanto, la referencia a un “polímero” incluye un único polímero así como dos o más del mismo o diferente  
45 polímero, la referencia a un “conjugado” se refiere a un único conjugado así como a dos o más del mismo o diferentes conjugados, la referencia a un “excipiente” incluye un único excipiente así como dos o más del mismo o diferentes excipientes y similares.

Al describir y reivindicar la presente invención se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones  
50 descritas más adelante.

“PEG”, “polietilenglicol” y “poli(etilenglicol)” como se usan en este documento, se refiere a que incluyen cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEG para usar de acuerdo con la invención comprenden la siguiente estructura “-O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-” donde (m) es de 2 a 4000. Como se usa en este documento, PEG también  
55 incluye -dependiendo de si se ha desplazado o no el o los oxígenos terminales- las siguientes estructuras similares “-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-” y “-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-” donde (m) es de 2 a 4000. Cuando el PEG comprende adicionalmente un resto enlazador (que se describirá a continuación con más detalle), los átomos que comprenden el enlazador, cuando se unen covalentemente a un segmento de polímero soluble en agua, no dan como resultado la formación de un enlace oxígeno-oxígeno (es decir, un enlace “-O-O-” o peróxido). A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se debe recordar que el término “PEG” incluye estructuras que tienen diversos grupos  
60 terminales o de “acabado” etcétera. El término “PEG” también se refiere a un polímero que contiene una mayoría, es decir, más del 50%, de subunidades monoméricas -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-. Con respecto a formas específicas, el PEG puede adoptar cualquier número de una diversidad de pesos moleculares, así como estructuras o geometrías tales como “ramificada”, “lineal”, “ahorquillada”, “multifuncional” y similares, que se describirán con más detalle más  
65 adelante.

Las expresiones “acabado” o “acabado terminalmente” se usan de forma intercambiable en este documento para referirse a un extremo o punto final de un polímero que termina con un resto de acabado. Típicamente, aunque no

necesariamente, el resto de acabado comprende un grupo hidroxilo o alcoxi  $C_{1-20}$ . Por tanto, los ejemplos de restos de acabado incluyen alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi y benciloxi) así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo y similares. Además, se consideran formas saturadas, insaturadas, sustituidas y no sustituidas de cada uno de los anteriores. Además, el grupo de acabado también puede ser un silano. El grupo de acabado puede comprender también ventajosamente un marcador detectable. Cuando el polímero tiene un grupo de acabado que comprende un marcador detectable, la cantidad o localización del polímero y/o del resto (por ejemplo, agente activo) al que se acopla el polímero de interés se puede determinar usando un detector adecuado. Tales marcadores incluyen, pero sin limitación, fluorescentes, quimioluminiscentes, restos usados en marcado con enzimas, colorimétricos (por ejemplo, colorantes), iones metálicos, restos radioactivos y similares. Los detectores adecuados incluyen fotómetros, películas, espectrómetros y similares.

“De origen no natural” con respecto a un polímero o segmento de polímero soluble en agua se refiere a un polímero que no se encuentra en su totalidad en la naturaleza. Un polímero no de origen natural o un segmento de polímero soluble en agua, sin embargo, puede contener una o más subunidades o partes de una subunidad que sean de origen natural, mientras que la estructura polimérica global no se encuentre en la naturaleza.

La expresión “soluble en agua” como en un “segmento de polímero soluble en agua” y “polímero soluble en agua” es cualquier segmento o polímero que es soluble en agua a temperatura ambiente. Típicamente, un polímero o segmento soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente el 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de luz transmitida por la misma solución después del filtrado. En una base de peso, un polímero soluble en agua o un segmento del mismo será preferiblemente al menos aproximadamente el 35% (en peso) soluble en agua, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50% (en peso) soluble en agua, aún más preferiblemente aproximadamente el 70% (en peso) soluble en agua y aún más preferiblemente aproximadamente el 85% (en peso) soluble en agua. Sin embargo, se prefiere más que el polímero soluble en agua o segmento sea aproximadamente el 95% (en peso) soluble en agua o completamente soluble en agua.

“Masa molecular” en el contexto de un polímero soluble en agua, no de origen natural de la invención tal como PEG, se refiere a la masa molecular promedio nominal de un polímero, determinada típicamente por cromatografía de exclusión de tamaño, técnicas de dispersión de luz o determinación de velocidad intrínseca en 1,2,4-triclorobenceno. Los polímeros de la invención son típicamente polidispersos, poseyendo valores de polidispersidad bajos de preferiblemente menos de aproximadamente 1,2, más preferiblemente menos de aproximadamente 1,15, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1,10, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 1,05 y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente 1,03.

“Derivado de tiol”, en el contexto de un polímero soluble en agua, se refiere a un polímero que tiene al menos un extremo que es un grupo tiol (-SH), un tiolato ( $-S^-$ ) o un tiol protegido, es decir, un grupo tiol en su forma protegida. Los grupos de protección de tiol típicos incluyen tioéter, tioéster o disulfuro. Se pueden encontrar grupos de protección ilustrativos de tioles en Greene *et al.*, “PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS”, 3ª Edición, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1999.

Como se usa en este documento, la expresión “ácido carboxílico” como en un derivado de “ácido carboxílico” es un resto que tiene un grupo funcional



[también representado como un “-COOH” o -C(O)OH]. A menos que el contexto lo indique claramente de otro modo, la expresión ácido carboxílico no solamente incluye la forma ácida, sino también ésteres correspondientes y formas protegidas. Se vuelve hacer referencia a Greene *et al.* anteriormente citado con respecto a grupos de protección adecuados para ácidos carboxílicos.

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

Las expresiones “protegido” o “grupo de protección” o “grupo protector” se refieren a la presencia de un resto (es decir, el grupo de protección) que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo particular en una molécula en determinadas condiciones de reacción. El grupo de protección variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se protege así como las condiciones de reacción que se tienen que emplear y la presencia de grupos reactivos o de protección adicionales en la molécula, si las hay. Se pueden encontrar grupos de protección conocidos en la técnica en Greene *et al.*, citado anteriormente.

## ES 2 315 526 T3

Como se usa en este documento, la expresión “grupo funcional” o cualquier sinónimo de la misma se refiere a que incluye formas protegidas de la misma.

La expresión “espaciador” o “resto espaciador” se usa en este documento para referirse a un átomo o a un conjunto de átomos usados opcionalmente para unir restos de interconexión tales como un extremo de un segmento de polímero soluble en agua y un electrófilo. Los restos espaciadores de la invención pueden ser hidrolíticamente estables o pueden incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

“Alquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo, que varía típicamente de aproximadamente 1 a 20 átomos de longitud. Tales cadenas de hidrocarburos están preferiblemente, pero no necesariamente, saturadas y pueden ser de cadena ramificada o lineal, aunque típicamente se prefiere una cadena lineal. Los grupos alquilo ilustrativos incluyen etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo y similares. Como se usa en este documento, “alquilo” incluye cicloalquilo cuando se hace referencia a tres o más átomos de carbono.

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

“Cicloalquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo cíclica saturada o insaturada, incluyendo compuestos enlazados, condensados o espirocíclicos, compuestos preferiblemente por 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8.

Los “sustituyentes no interferentes” son los grupos que, cuando están presentes en una molécula, típicamente son no reactivos con otros grupos funcionales contenidos dentro de la molécula.

El término “sustituido” como en, por ejemplo, “alquilo sustituido”, se refiere a un resto (por ejemplo, un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes no interferentes, tales como, pero sin limitación: cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo y similares; halo, por ejemplo, fluoro, cloro, bromo y yodo; ciano; alcoxi, fenilo inferior (por ejemplo, fenilo 0-2 sustituido); fenilo sustituido; y similares. “Arilo sustituido” es arilo que tiene uno o más grupos no interferentes como un sustituyente. Para sustituciones en un anillo fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta o para).

“Alcoxi” se refiere a un grupo -O-R, en el que R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (por ejemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, bencilo, etc.), preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>.

Como se usa en este documento, “alqueno” se refiere a un grupo de hidrocarburo 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 y similares.

El término “alquino” como se usa en este documento se refiere a un grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado de 2 a 15 átomos de longitud, que contiene al menos un triple enlace, etinilo, n-propinilo, isopropinilo, n-butinilo, isobutinilo, octinilo, decinilo, etéctera.

“Arilo” se refiere a uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 ó 6 átomos de carbono de núcleo. Arilo incluye múltiples anillos de arilo que pueden estar condensados, como en naftilo, o no condensados, como en bifenilo. Los anillos de arilo también pueden estar condensados o no condensados con uno o más hidrocarburos cíclicos, heteroarilo o anillos heterocíclicos. Como se usa en este documento, “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 también pueden estar condensados con uno o más hidrocarburos cíclicos, anillos heterocíclicos, de arilo o heteroarilo.

“Heterociclo” o “heterocíclico” se refiere a 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 de anillo que no es un carbono. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno y nitrógeno.

“Heteroarilo sustituido” es 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.

“Electrófilo” se refiere a un ión o átomo o grupo de átomos, que pueden ser iónicos, que tienen un centro electrófilo, es decir, un centro que busca electrones, capaz de reaccionar con un nucleófilo.

“Nucleófilo” se refiere a un ión o átomo o grupo de átomos, que pueden ser iónicos, que tienen un centro nucleófilo, es decir, un centro que busca un centro electrófilo o con un electrófilo.

Un enlace “fisiológicamente escindible” o “hidrolizable” o “degradable” es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua

## ES 2 315 526 T3

no dependerá solamente del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Los enlaces hidrolíticamente inestables o débiles apropiados incluyen, pero sin limitación, éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, éter de aciloxialquilo, iminas, orto ésteres, péptidos y oligonucleótidos.

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

10 Una unión o enlace “hidrolíticamente estable” se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, no se somete a hidrólisis en condiciones fisiológicas en un alcance apreciable durante un periodo de tiempo prolongado. Los ejemplos de enlaces hidrolíticamente estables incluyen, pero sin limitación, los siguientes: enlaces carbono-carbono (por ejemplo, en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos y similares. Generalmente, un enlace hidrolíticamente estable es uno que muestra una velocidad de hidrólisis inferior a aproximadamente el 1-2% por día en condiciones fisiológicas. Las velocidades de hidrólisis de enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de los libros de textos de química convencionales.

15 Las expresiones “agente activo” y “agente biológicamente activo” se usan de forma intercambiable en este documento y están definidas para que incluyan cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de material o mezcla que proporcione algún efecto farmacológico, a menudo beneficioso, que se puede demostrar *in vivo* o *in vitro*. Esto incluye alimentos, suplementos alimenticios, nutrientes, nutricoséuticos, fármacos, vacunas, anticuerpos, vitaminas y otros agentes beneficiosos. Como se usan en este documento, estas expresiones incluyen además cualquier sustancia fisiológicamente o farmacológicamente activa que produce un efecto localizado o sistémico en un paciente.

25 “Excipiente farmacéuticamente aceptable” o “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente que se puede incluir en las composiciones de la invención y que no provoca efectos toxicológicos adversos significativos en el paciente.

30 “Cantidad farmacológicamente eficaz”, “cantidad fisiológicamente eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se usan de forma intercambiable en este documento para referirse a la cantidad de un conjugado de polímero-agente activo presente en una preparación farmacéutica que se necesita para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o conjugado en la corriente sanguínea o en el tejido diana. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el agente activo particular, los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes pretendida, las consideraciones del paciente y similares, y se pueden determinar fácilmente por un especialista en la técnica, basándose en la información proporcionada en este documento y disponible en la bibliografía pertinente.

35 “Multifuncional” en el contexto de un polímero de la invención se refiere a un polímero que tiene 3 o más grupos funcionales contenidos en el mismo, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes. Los polímeros multifuncionales de la invención contendrán típicamente aproximadamente 3-100 grupos funcionales, 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, 8, 9 ó 10 grupos funcionales dentro del polímero. Un polímero “difuncional” se refiere a un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos en el mismo, el mismo (es decir, homodifuncional) o diferentes (es decir, heterodifuncional).

40 “Ramificado”, en referencia a la geometría o estructura global de un polímero, se refiere a un polímero que tiene 2 o más “brazos” poliméricos. Un polímero ramificado puede poseer 2 brazos poliméricos, 3 brazos poliméricos, 4 brazos poliméricos, 6 brazos poliméricos, 8 brazos poliméricos o más. Un tipo particular de polímero altamente ramificado es un polímero dendrítico o dendrímero, que, para los propósitos de la invención, se considera que posee una estructura diferente a la de un polímero ramificado.

45 Un “dendrímero” o polímero dendrítico es un polímero globular, de tamaño monodisperso en el que todos los enlaces surgen radialmente a partir de un punto focal central o núcleo con un patrón de ramificación regular y con unidades de repetición que contribuyen cada una a un punto de rama. Los dendrímeros muestran determinadas propiedades de estado dendrítico tales como encapsulación de núcleo, haciendo que sean únicos con respecto a otros tipos de polímeros.

50 Un reactivo básico o ácido descrito en este documento incluye neutro, cargado o cualquier forma de sal correspondiente de los mismos.

55 El término “paciente” se refiere a un organismo vivo que padece o que es propenso a una afección que se puede prevenir o tratar mediante la administración de un conjugado como se proporciona en este documento, e incluye tanto seres humanos como animales.

60 “Opcional” y “opcionalmente” se refiere a que la circunstancia descrita posteriormente puede o no producirse, de tal forma que la descripción incluye casos en los que se produce la circunstancia y casos en los que no.

## ES 2 315 526 T3

Como se usa en este documento, el indicador “halo” (por ejemplo, fluoro, cloro, yodo, bromo, etcétera) se usa generalmente cuando el halógeno se une a una molécula, mientras que el sufijo “uro” (por ejemplo, fluoruro, cloruro, yoduro, bromuro, etcétera) se usa cuando la forma iónica se usa cuando el halógeno existe en su forma iónica independiente (por ejemplo, tal como cuando un grupo saliente sale de una molécula).

5 En el contexto de la presente descripción, se debe entender que la definición de una variable proporcionada con respecto a una estructura o fórmula se puede aplicar a la misma variable repetida en una estructura diferente, a menos que el contexto lo indique de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la definición de “POLI”, “un resto espaciador”, “(z)”, etc. con respecto a un orto éster de un polímero soluble en agua se puede aplicar igualmente a un polímero soluble en  
10 agua que lleva un ácido carboxílico.

### *El método*

Los presentes métodos para preparar un ácido carboxílico de un polímero soluble en agua tienen varias ventajas.  
15 Como se muestra en este documento, por ejemplo, se pueden proporcionar polímeros solubles en agua que llevan un resto ácido carboxílico terminal con elevada pureza. Aunque las estrategias de la técnica anterior dan como resultado una pureza relativamente baja, en este documento se muestran conversiones de al menos aproximadamente el 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente el  
20 95% y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 98% de conversión de una molécula precursora en el derivado de ácido carboxílico correspondiente. Ya que los polímeros solubles en agua que llevan un resto ácido carboxílico terminal se pueden proporcionar ahora con una pureza relativamente elevada, las etapas de purificación caras y que requieren tiempo disminuyen o se eliminan completamente.

Otra ventaja de los presentes métodos para preparar un ácido carboxílico de polímero soluble en agua es la capacidad de preparar un mayor espectro de derivados estructuralmente diversos. Los métodos descritos previamente dan como resultado necesariamente, por ejemplo, determinados derivados de ácido acético o carboximetilados (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.681.567), determinados derivados de ácido propanoico (véase las Patentes de Estados Unidos N° 5.523.479 y 5.672.662) y determinados derivados de ácido butanoico (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.672.662). Estos derivados que se han descrito previamente están limitados necesariamente a determina-  
30 das estructuras ya que los métodos usados para crear los mismos dependen de una gama relativamente estrecha de posibles reactivos adecuados para el uso con estos métodos. Ventajosamente, los presentes métodos se pueden usar con un número relativamente grande de reactivos, expandiendo de este modo en gran medida el espectro de posibles estructuras.

35 Por tanto, se proporciona un primer método para formar un orto éster de un polímero soluble en agua, que sirve como un intermedio útil para realizar adicionalmente una etapa para formación posterior de un polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal. El proceso A como se muestra en la Figura 1 ilustra una estrategia para realizar este primer método. Una estrategia para la formación posterior de un polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal (Fórmula V) se muestra como el proceso B en la Figura 1. Proporcionada solamente para la  
40 ayuda a la mejor comprensión de un método sintético presentado en este documento, la Figura 1 no se debe considerar de ningún modo como limitante de la invención. Las diversas fórmulas mostradas en la Figura 1 se describen con más detalle a continuación.

Inicialmente, el método para formar un orto éster de un polímero soluble en agua comprende la etapa de hacer  
45 reaccionar un segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o ión tiolato con un orto éster que comprende un grupo saliente adecuado (es decir, una molécula que contiene orto éster que comprende un grupo saliente adecuado). De forma conveniente y con referencia a la Figura 1, el segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o ión tiolato se prepara combinando un polímero soluble en agua que tiene al menos un grupo hidroxilo o tiol (Fórmula II) en presencia de una base adecuada. Se permite que un orto éster que comprende un  
50 grupo saliente adecuado (Fórmula I) reaccione con un polímero soluble en agua que tiene al menos un grupo hidroxilo o tiol (Fórmula II) para formar un orto éster que comprende un grupo saliente adecuado (Fórmula III).

Sin embargo, la base usada en esta estrategia tiene que ser una que formará un alcóxido (es decir,  $R-O^-$ ) o tiolato (es decir,  $R-S^-$ ) del polímero soluble en agua que tiene al menos un grupo hidroxilo o tiol, respectivamente. Por tanto, por ejemplo, la base transforma  $POLI-(X)_a-OH$  en  $POLI-(X)_a-O^-$  y  $POLI-(X)_a-SH$  en  $POLI-(X)_a-S^-$ . Se cree adicionalmente que el polímero soluble en agua, que ahora lleva un resto alcóxido o tiolato, a su vez reacciona por un mecanismo de reacción de  $S_N2$  con el orto éster que tiene un grupo saliente adecuado (Fórmula I). Como se reconocerá por los especialistas en la técnica, esta estrategia se corresponde a la síntesis de éter de Williamson y los principios y las técnicas usadas generalmente en una síntesis de éter de Williamson también se pueden aplicar en este  
60 caso.

Los ejemplos no limitantes de bases adecuadas para formar un alcóxido de un alcohol o un tiolato de un compuesto que contiene tiol incluyen sodio, hidróxido sódico, potasio, hidróxido potásico, hidruro sódico, hidruro potásico, metóxido sódico, metóxido potásico, terc-butóxido sódico, terc-butóxido potásico, carbonato sódico y carbonato potásico. Sin embargo, las bases preferidas para usar de acuerdo con esta etapa incluyen las seleccionadas del grupo que consiste en sodio, potasio, hidruro sódico, hidruro potásico, metóxido sódico, metóxido potásico, terc-butóxido sódico y terc-butóxido potásico.  
65

## ES 2 315 526 T3

Además, el segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o ión tiolato puede proporcionarse de forma conveniente por una reacción de polimerización, como se describirá con más detalle a continuación. En esta estrategia para proporcionar el segmento de polímero soluble en agua, se prefiere que el segmento de polímero soluble en agua tenga al menos un ión alcóxido.

5 Generalmente, aunque no necesariamente, un exceso del orto éster que comprende un grupo saliente adecuado (Fórmula I) se deja reaccionar con el polímero soluble en agua que lleva al menos un ión alcóxido o ión tiolato (Fórmula II). Típicamente, la cantidad de orto éster que comprende un grupo saliente adecuado (Fórmula I) representa al menos un equivalente molar para el número de grupo hidroxilo o tiol disponibles en el polímero soluble en agua que  
10 tiene al menos un grupo hidroxilo o tiol (Fórmula II). Se pueden preparar especies poliméricas heterofuncionales (es decir, especies que llevan dos o más grupos funcionales terminales diferentes) usando cantidades no estequiométricas del orto éster que comprende un grupo saliente adecuado (Fórmula I). Es decir, se forman especies heterofuncionales cuando el número total de moles de grupos hidroxilo o tiol disponibles en el polímero soluble en agua que tiene al  
15 menos un grupo hidroxilo o tiol (Fórmula II) supera el número total de moles del orto éster que comprende un grupo saliente adecuado (Fórmula I) añadido a la reacción.

El orto éster del polímero soluble en agua (Fórmula III) se puede preparar mediante otros medios y la invención no se limita simplemente al proceso A como se ilustra en la Figura 1. Por ejemplo, un orto éster que comprende al menos un sitio de iniciador adecuado para la polimerización se puede usar para hacer crecer uno o más segmentos de polímero  
20 soluble en agua. Usando esta estrategia, un orto éster que comprende al menos un sitio de iniciador (por ejemplo, un resto alcóxido) y un monómero reactivo (por ejemplo, óxido de etileno) se combinan y se deja que la reacción avance hasta que todo el monómero reactivo se agote o la reacción se termina mediante, por ejemplo, neutralización del medio de reacción. El último monómero reactivo, por ejemplo, óxido de etileno, añadido a la cadena en crecimiento puede proporcionar de forma conveniente un ión alcóxido o ión tiolato para reacción posterior con, por ejemplo, un orto éster  
25 que comprende un grupo saliente adecuado.

Específicamente, se pueden seguir las siguientes etapas para construir el segmento de polímero soluble en agua directamente en un orto éster que comprende al menos un sitio de iniciador: (i) proporcionar un orto éster que comprende al menos un sitio aniónico activo adecuado para iniciar la polimerización; (ii) poner en contacto el sitio aniónico del  
30 orto éster con un monómero reactivo capaz de polimerizar, para iniciar de este modo la polimerización del monómero reactivo en el precursor del orto éster; (iii) añadir monómeros reactivos de adicción al precursor de orto ácido para formar una o más cadenas poliméricas; (iv) permitir que dicho contacto continúe hasta que se haya alcanzado una longitud deseada de la cadena o las cadenas poliméricas; y (v) terminar la reacción para conseguir un orto éster de un polímero soluble en agua.

35 Se puede usar cualquier monómero reactivo para “dejar crecer” la cadena o cadenas poliméricas hasta que la cadena de polímero resultante sea soluble en agua. Sin embargo, se prefiere particularmente que el monómero reactivo sea óxido de etileno, proporcionando de este modo cadena o cadenas de poli(óxido de etileno). El crecimiento de la cadena o cadenas poliméricas, incluyendo la unión inicial del monómero reactivo al sitio de iniciador, se puede realizar mediante, por ejemplo, un ión alcóxido, (es decir,  $R-O^-$ ). Estas y otras técnicas se conocen por los especialistas en la técnica y se hace referencia a las mismas en, por ejemplo, Odian, Cap. 7, Principles of Polymerization, 3a Ed., McGraw-Hill, 1991.

45 El crecimiento de la cadena o cadenas de polímero continúa hasta que se consigue el peso molecular deseado. Por tanto, por ejemplo, la neutralización del medio de reacción detiene el crecimiento de la cadena o las cadenas poliméricas. Además, la adicción de un peso o una cantidad específica del monómero reactivo y permitir que la polimerización avance hasta que todo el monómero reactivo se haya agotado, da como resultado una cadena polimérica que tiene un peso molecular correspondiente. Una vez que se ha formado la cadena o las cadenas poliméricas, se puede añadir un grupo de acabado usando técnicas convencionales. Por ejemplo, un haluro de alquilo (por ejemplo, haluro de metilo o metil *p*-toluenosulfonato) se puede hacer reaccionar con el extremo expuesto (el extremo distal a la  
50 funcionalidad orto éster) de la cadena polimérica.

También se puede usar una estrategia de polimerización relacionada, aunque diferente, para proporcionar un orto éster de un polímero soluble en agua. En esta estrategia relacionada, la polimerización se realiza para formar en  
55 primer lugar una cadena polimérica que se puede transformar posteriormente en el derivado de orto éster. Por ejemplo, por tanto, una sal de alcoxi alcoholato tal como 2-metoxi etanolato sódico ( $Na^+ \cdot OCH_2CH_2OCH_3$ ) puede iniciar la polimerización de óxido de etileno siguiendo esencialmente el mismo procedimiento que se ha explicado anteriormente. Asumiendo que el monómero final añadido a la cadena polimérica abandona un grupo reactivo tal como un alcóxido (como en el caso del óxido de etileno), la cadena polimérica se puede hacer reaccionar después con un orto éster que comprende un grupo saliente adecuado. En la medida de que la cadena polimérica no abandone un grupo (por ejemplo, un alcóxido) adecuado para la unión directa a un reactivo que contiene orto éster, se pueden hacer modificaciones adicionales en la cadena polimérica de tal forma que se puede unir un orto éster.

65 El uso de una sal de alcoxi alcoholato como un iniciador del polímero da como resultado un orto éster de un polímero soluble en agua que comprende una única funcionalidad orto éster. Los polímeros que comprenden dos funcionalidades orto éster (un polímero bifuncional) pueden producirse cuando se usan sales de dialcoholato (por ejemplo,  $2Na^+ \cdot OCH_2CH_2O$ ) en lugar de sales de alcoxi alcoholato. Como se ha descrito anteriormente, también se puede realizar una etapa de acabado opcional con esta estrategia de polimerización.

## ES 2 315 526 T3

Con referencia a la Figura 1, el orto éster de un polímero soluble en agua (Fórmula III) se puede convertir en un polímero soluble en agua que lleva un carboxílico terminal (Fórmula V). La conversión en el derivado de ácido de carboxílico correspondiente se consigue ventajosamente de forma eficaz y con un gran rendimiento realizando una o más etapas de hidrólisis. La hidrólisis catalizada por ácido o la hidrólisis catalizada por ácido seguida de una hidrólisis promovida por base pueden proporcionar el polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal (Fórmula V).

Aunque la conversión en el ácido carboxílico se puede realizar en una única etapa de hidrólisis mediante hidrólisis catalizada por ácido, se considera que esta estrategia hidrolítica única es ineficaz en términos de tiempo. Se ha observado que, sin embargo, dos etapas de hidrólisis aumentan la velocidad de conversión del ácido carboxílico a partir del orto éster correspondiente.

En una estrategia de dos etapas de hidrólisis, una primera etapa de hidrólisis da como resultado que la funcionalidad orto éster se transforma en un éster (Fórmula IV). A su vez, una segunda etapa de hidrólisis convierte el éster (Fórmula IV) en el polímero correspondiente que lleva un ácido carboxílico terminal (Fórmula IV).

La primera etapa de hidrólisis debe ser hidrólisis catalizada por ácido. La funcionalidad orto éster se puede escindir mediante condiciones ácidas acuosas débiles tales como ácido *p*-toluenosulfónico (*p*-TsOH) y piridina en agua y NaHSO<sub>4</sub> y 1,2-dimetoxietano (DME) en agua a 0°C durante 20 minutos. Véase Just *et al.* (1983) Can. J. Chem. 61: 712 y Corey *et al.* (1986) Tetrahedron Lett. 27: 2199, respectivamente. Los ejemplos de otros ácidos adecuados para usar en hidrólisis catalizada por ácido incluyen, pero sin limitación, ácido fluorhídrico (HF), ácido clorhídrico (HCl), ácido bromhídrico (HBr), ácido yodhídrico (HI), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido acético (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H), ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), ácido oxálico (H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) y ácido fórmico (HCOOH).

La segunda etapa de hidrólisis es típicamente una etapa de hidrólisis promovida por base. El éster (Fórmula IV) de la primera etapa de hidrólisis se trata con una base. Para la hidrólisis promovida por base, la funcionalidad orto éster se trata con cualquier base acuosa, tal como hidróxido de litio (LiOH), hidróxido sódico (NaOH), hidróxido potásico (KOH), hidróxido de rubidio (RbOH), hidróxido de cesio [Cs(OH)<sub>2</sub>], hidróxido de estroncio [Sr(OH)<sub>2</sub>], hidróxido de bario [Ba(OH)<sub>2</sub>], hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH), hidróxido de magnesio [Mg(OH)<sub>2</sub>], hidróxido de calcio [Ca(OH)<sub>2</sub>], acetato sódico (NaCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>), acetato potásico (KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>), carbonato sódico (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), carbonato potásico (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), carbonato de litio (Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), fosfato sódico (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato potásico (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), borato sódico (Na<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>), borato potásico (Li<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), etc.

La primera y la segunda etapa opcional de hidrólisis se pueden realizar con calor aumentado para aumentar la velocidad de la reacción.

Las etapas del método tienen lugar en un disolvente apropiado. El especialista en la técnica puede determinar si cualquier disolvente específico es apropiado para cualquier reacción dada. Típicamente y en particular con respecto a los procesos A y B como se muestran en la Figura 1, sin embargo, el disolvente preferiblemente es un disolvente no polar o un disolvente aprótico polar. Los ejemplos no limitantes de disolventes no polares incluyen benceno, xileno, dioxano, tetrahidrofurano (THF), *t*-butil alcohol y tolueno. Los disolventes no polares particularmente preferidos incluyen tolueno, xileno, dioxano, tetrahidrofurano y *t*-butil alcohol. Los disolventes apróticos polares ilustrativos incluyen, pero sin limitación, DMSO (dimetil sulfóxido), HMPA (hexametilfosforamida), DMF (dimetilformamida), DMA (dimetilacetamida), NMP (*N*-metilpirrolidinona).

Con respecto a la hidrólisis, en particular, el agua es un disolvente preferido, aunque se pueden usar mezclas acuosas de agua con otros disolventes tales como agua y tetrahidrofurano, agua y 1,2-dimetiletano, agua y diglima, así como otros disolventes que contienen agua.

Opcionalmente, el método comprende además la etapa de recuperar el ácido carboxílico del polímero soluble en agua. Se pueden usar técnicas conocidas en la técnica para recuperar el polímero e incluyen, por ejemplo, precipitar el polímero a partir de la solución. Después se puede recoger el precipitado y opcionalmente filtrar y/o secar. Éstas y otras técnicas se pueden usar para aislar y recuperar el ácido carboxílico del polímero soluble en agua.

Además, el método incluye opcionalmente la etapa de purificar adicionalmente el ácido carboxílico del polímero soluble en agua. Una etapa de purificación de este tipo, sin embargo, generalmente no se requiere dado el grado relativamente elevado de conversión de un precursor (por ejemplo, un orto éster de un polímero soluble en agua) en el ácido carboxílico correspondiente. En cualquier caso, se pueden usar técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía para purificar el polímero.

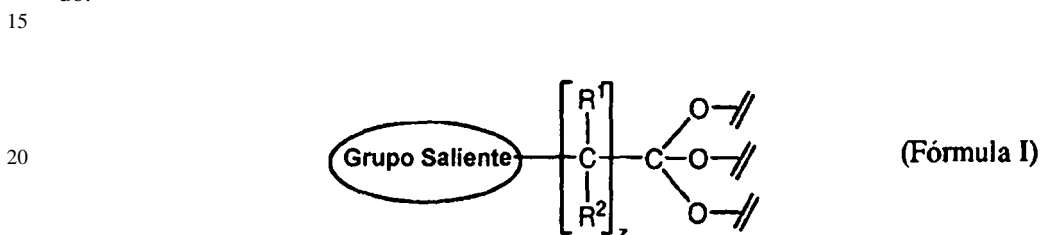
Los ácidos producidos de este modo de acuerdo con el presente método son sustancialmente puros y se pueden preparar en una estrategia de un recipiente. Con puro se quiere decir que preferiblemente más de al menos aproximadamente el 85%, más preferiblemente más de al menos aproximadamente el 90%, aún más preferiblemente más de al menos aproximadamente el 95% y mucho más preferiblemente más de al menos aproximadamente el 98% de la cantidad total (en base de peso o molar) del polímero soluble en agua que lleva un grupo hidroxilo o tiol se convierte en polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal.

## ES 2 315 526 T3

### *El orto éster de un polímero soluble en agua*

Como se ha indicado anteriormente, el método requiere el uso de un orto éster que comprende un grupo saliente adecuado. Estructuralmente, el orto éster comprende un “átomo de carbono de ramificación”. Este átomo de carbono de ramificación es un átomo de carbono unido covalentemente a tres átomos de oxígeno, que, a su vez, se unen covalentemente típicamente cada uno, a, por ejemplo, un resto alquilo. Dada la naturaleza tetravalente del carbono, el átomo de carbono de ramificación también comprende una cuarta unión covalente. En el caso de los presentes orto ésteres de la invención usados para preparar ácidos alcanóicos, la cuarta unión covalente del átomo de carbono de ramificación es a una cadena de carbono sustituida o no sustituida, tal como una cadena alquilo. Finalmente, un grupo saliente adecuado se une, directamente o mediante un resto espaciador, al extremo de la cadena de carbono que no está unida al átomo de carbono de ramificación.

A continuación se proporciona una estructura ilustrativa de un orto éster que comprende un grupo saliente adecuado.



en la que:



es el grupo saliente adecuado;

(z) es un número entero de 1 a 24;

R<sup>1</sup>, en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido;

R<sup>2</sup> en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido;



representa un residuo de un resto orto éster.

Con respecto a la Fórmula I, el grupo saliente adecuado es cualquier átomo o grupo de átomos que puede abandonar el átomo de carbono al que está unido. Específicamente, un grupo saliente adecuado es uno que se puede desplazar por un nucleófilo en aproximación. Los especialistas en la técnica pueden determinar qué átomo o grupos de átomos pueden servir como un grupo saliente adecuado. Además, la experimentación de rutina puede identificar si cualquier átomo específico o grupo de átomos puede servir como un grupo saliente adecuado. Por ejemplo, un grupo saliente propuesto en una molécula que comprende un orto éster se puede ensayar haciendo reaccionar el orto éster con un segmento de polímero soluble en agua que tiene un grupo hidroxilo; el grupo saliente propuesto es un grupo saliente adecuado si se forman cantidades detectables del orto éster correspondiente del polímero soluble en agua.

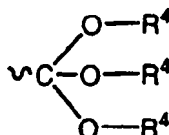
Los grupos salientes adecuados preferidos incluyen los que son primarios (por ejemplo, un halo primario), aunque también se pueden usar grupos salientes que sean secundarios. Los ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen halógenos y ésteres de sulfonato. Entre los halógenos se prefieren bromo, cloro, yodo y fluoro, siendo bromo y cloro grupos salientes de tipo halógeno particularmente preferidos. Con respecto a ésteres de sulfonato, se prefieren parti-

## ES 2 315 526 T3

cularmente metanosulfonato, trifluorometanosulfonato, triclorometanosulfonato, 2,2,2-trifluoroetanosulfonato, 2,2,2-tricloroetanosulfonato y para-toluenosulfonato, aunque también se pueden usar otros ésteres de sulfonato y grupos salientes constituidos de forma similar conocidos por los especialistas en la técnica.

- 5 Con respecto a la funcionalidad orto éster específica asociada a la Fórmula I, se puede usar cualquier funcionalidad orto éster y la invención no está limitada en este aspecto. Sin embargo, una funcionalidad orto éster ilustrativa comprende la siguiente estructura:

10



15

en la que cada  $R^4$  es un radical orgánico seleccionado independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido y uno o más átomos que se combinan con otro  $R^4$  o los restos  $R^4$  remanentes para formar una estructura anular.

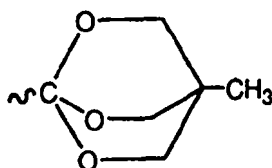
20

La funcionalidad orto éster puede ser acíclica, es decir, carecer de una estructura anular. Cuando es acíclica, se prefiere que cada  $R^4$  en la estructura que se ha definido anteriormente sea independientemente un alquilo  $C_{1-6}$  (por ejemplo, metilo, etilo o propilo) o alquilo  $C_{1-6}$  sustituido. Además, la funcionalidad orto éster puede estar en forma de una estructura “cíclica” o “anular”. En el presente contexto, se entenderá que la expresión “cíclico” incluye estructuras monocíclicas, bicíclicas y policíclicas. En versiones cíclicas, la funcionalidad orto éster está preferiblemente en forma de un anillo heterocíclico sustituido o no sustituido que comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos. Los sustituyentes preferidos para el anillo heterocíclico incluyen alquilo  $C_{1-6}$ , tal como metilo o etilo, o alquilo  $C_{1-6}$  sustituido. Los ejemplos de tales estructuras cíclicas preferidas incluyen los siguientes anillos heterocíclicos enlazados:

25

30

35

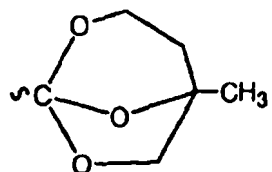


40

4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2.]octanoil, (“éster de OBO”);

45

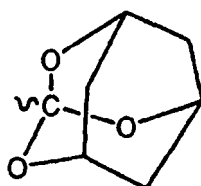
50



55

4-metil-2,7,8-trioxabicyclo[3.2.1.]octanoil, (“éster de ABO”);

60



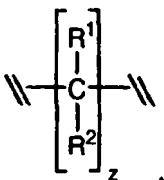
65

2,8,9-trioxatriciclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decanilo.

## ES 2 315 526 T3

Un especialista en la técnica puede imaginar fácilmente otras estructuras cíclicas que comprenden otras estructuras orto éster (tanto cíclicas como acíclicas).

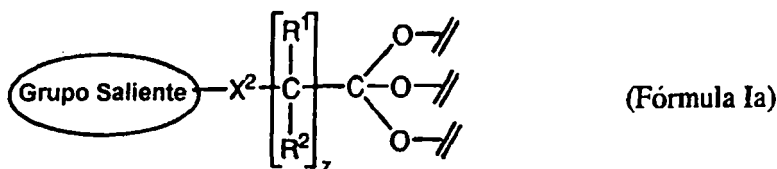
Como se puede observar con respecto a la Fórmula I, el orto éster que comprende un grupo saliente adecuado comprende una cadena de carbono de (z) carbonos definida por la siguiente estructura:



en la que (z), cada R<sup>1</sup> y cada R<sup>2</sup> son como se ha definido previamente. Preferiblemente, sin embargo, (z) es igual a uno, dos, tres, cuatro o cinco.

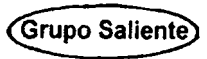
La cadena de carbono puede ser una cadena simple, lineal de átomos de carbono. Las cadenas de carbonos simples, lineales son aquellas en las que cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se definen como hidrógeno. Además, la cadena de carbono puede comprender uno o más enlaces dobles y/o triples de carbono-carbono. Además, la cadena de carbono puede estar ramificada de forma sencilla donde uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se define como un átomo o grupo de átomos diferente de hidrógeno, tal como alquilo, y todos las demás variables R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son hidrógeno. También se considera una ramificación múltiple en la que se definen múltiples casos de R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> como un átomo o grupo de átomos diferentes de hidrógeno (por ejemplo, alquilo). Sin embargo, se prefiere que las especies ramificadas incluyan solamente un único punto de ramificación. Además, se prefiere que el único punto de ramificación tenga lugar en el átomo de carbono α en (o inmediatamente adyacente a) el “átomo de carbono de ramificación” en la funcionalidad orto éster.

Opcionalmente se puede localizar un resto espaciador entre la cadena de carbono y el grupo saliente adecuado. Los orto ésteres ilustrativos que comprenden un resto espaciador de este tipo comprenden la siguiente estructura:

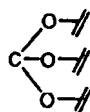


en la que:

X<sup>2</sup> es un resto espaciador y



(z), cada R<sup>1</sup>, cada R<sup>2</sup> y



son como se han definido previamente.

## ES 2 315 526 T3

El resto espaciador opcional (es decir, X<sup>2</sup>) en el orto éster que comprende un grupo saliente adecuado es cualquier átomo o serie de átomos que separan la cadena de carbono de (z) átomos del grupo saliente. Dependiendo del átomo o átomos reales que constituyen este resto espaciador, el resto espaciador puede ser hidrolíticamente estable o hidrolíticamente inestable. Si un resto específico es hidrolíticamente estable o inestable se puede determinar por un especialista en la técnica o determinar experimentalmente usando experimentación de rutina. Este resto espaciador opcional X<sup>2</sup> se puede seleccionar de los restos espaciadores que se identifican a continuación con respecto a X. En los casos en los que X<sup>2</sup> aparece dentro de la misma estructura definida comprendiendo un X o un X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> puede ser igual o diferente.

Se debe subrayar que aunque el orto éster que comprende un grupo saliente adecuado comprende una cadena de carbono de (z) átomos, la presencia de la cadena de carbono no es necesaria para proporcionar un ácido carboxílico. En consecuencia, cuando se desea un polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal diferente de un ácido alcanoico (por ejemplo, un ácido propanoico, ácido butanoico, etcétera), la cadena de carbono se omite y sustituye por, por ejemplo, un resto espaciador u otro grupo de átomos.

El orto éster que tiene un grupo saliente adecuado se puede preparar sintéticamente. Por ejemplo, se pueden preparar orto ésteres acíclicos obteniendo un imino éster (también denominado un "imidato de alquilo") mediante, por ejemplo, una reacción de Pinner. En esta estrategia, se forma un imino éster por la adición de gas de cloruro de hidrógeno anhidro a una mezcla de un nitrilo y un alcohol. El tratamiento posterior del imino éster con un alcohol proporciona el orto éster correspondiente. Véase, por ejemplo, Voss *et al.* (1984) *Helv. Chim. Acta.* 66: 2294.

Se pueden preparar orto ésteres cíclicos mediante conversión de un hidroxialquiloetano al éster carboxílico correspondiente, que, después de la redistribución, produce un orto éster enlazado. Éstas y otras estrategias para preparar orto ésteres cíclicos se describen en la bibliografía. Véase, por ejemplo: Corey *et al.* (1983) *Tetrahedron Lett.* 24(50): 5571-5574; Wipf *et al.* (1999) *Pure Appl. Chem.* 71(3): 415-421; y Greene *et al.* *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, 3a ed. págs. 437-441, John Wiley & Sons, New York, NY (1999). El grupo saliente adecuado se introduce en el orto éster incluyendo el grupo saliente en el reactivo antes de la formación del orto éster o añadiéndolo el mismo posteriormente a la formación del orto éster.

En algunos casos, el orto éster que comprende un grupo saliente adecuado está disponible en el mercado. Por ejemplo, un orto éster disponible en el mercado es trimetil 4-bromoortobutirato disponible en Sigma-Aldrich Corporation de St. Louis, MO.

*El polímero soluble en agua que tiene al menos un grupo hidroxilo o tiol*

Se puede usar cualquier polímero soluble en agua que tenga al menos un grupo hidroxilo o tiol (para proporcionar, por ejemplo, un polímero soluble en agua que tenga al menos un ión alcóxido o ión tiolato, respectivamente) de acuerdo con la invención y la invención no está limitada en este aspecto. Aunque se pueden usar polímeros solubles en agua que llevan solamente un único hidroxilo o tiol, se pueden usar polímeros que llevan dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más restos hidroxilo y/o tiol. Ventajosamente, cuando el número de restos hidroxilo o tiol en el segmento de polímero soluble en agua aumenta, el número de sitios disponibles para proporcionar restos ácido carboxílico aumenta. Los ejemplos no limitantes del límite superior del número de restos hidroxilo y/o tiol asociados al segmento de polímero soluble en agua incluyen 500, 100, 80 y 40.

El segmento de polímero soluble en agua es preferiblemente, aunque no necesariamente, un poli(etilenglicol) o "PEG" o un derivado del mismo. Se debe entender, sin embargo, que también son adecuados polímeros relacionados para el uso en la práctica de esta invención y que el uso del término "PEG" o "poli(etilenglicol)" tiene por objeto ser incluyente y no excluyente en este aspecto. En consecuencia, el término "PEG" incluye poli(etilenglicol) en cualquier de sus formas lineal, ramificada o multi-brazo, incluyendo alcoxi PEG, PEG bifuncional, PEG ahorquillado, PEG ramificado, PEG colgante o PEG con enlaces degradables en el mismo, que se describirá con más detalle más adelante.

En una forma útil en la presente invención, el PEG libre o no unido es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo:



(m') típicamente varía de cero a aproximadamente 4.000, preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 1.000.

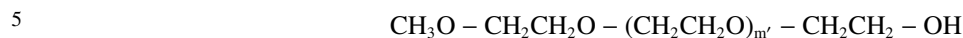
El anterior polímero, alfa-, omega-dihidroxiolipoli(etilenglicol), se puede representar de forma resumida como HO-PEG-OH donde se entiende que el símbolo -PEG- puede representar la siguiente unidad estructural:



donde (m') es como se ha definido anteriormente.

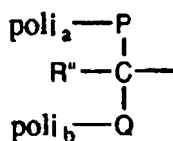
## ES 2 315 526 T3

Otro tipo de PEG útil en la presente invención es metoxi-PEG-OH, o en resumen, mPEG, donde un extremo es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo. La estructura de mPEG se proporciona a continuación:



donde (m') es como se ha descrito anteriormente.

También se pueden usar moléculas de PEG con múltiples brazos o ramificadas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos 5.932.462, como el polímero PEG. Por ejemplo, PEG puede tener la estructura:



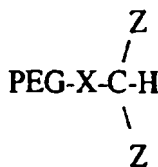
en la que:

poli<sub>a</sub> y poli<sub>b</sub> son cadenas principales de PEG (iguales o diferentes), tales como metoxi poli(etilenglicol);

R'' es un resto no reactivo, tal como H, metilo o una cadena principal de PEG; y

P y Q son enlaces no reactivos: En una realización preferida, el polímero de PEG ramificado es metoxi poli(etilenglicol) disustituido con lisina.

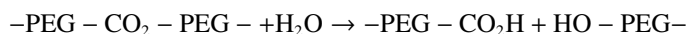
Además, el PEG puede comprender un PEG ahorquillado. Un ejemplo de un PEG ahorquillado se representa mediante la siguiente estructura:



en la que: X es un resto espaciador y cada Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida. La Solicitud Internacional N° PCT/US99/05333 describe diversas estructuras de PEG ahorquillado que se pueden usar en la presente invención. La cadena de átomos que une los grupos funcionales Z al átomo de carbono de ramificación sirven como un grupo de anclaje y puede comprender, por ejemplo, cadenas de alquilo, cadenas de éter, cadenas de éster, cadenas de amida y combinaciones de las mismas.

El polímero PEG puede comprender una molécula PEG colgante que tiene grupos reactivos tales como carboxilo, unidos covalentemente a lo largo de la longitud del PEG en vez de en el extremo de la cadena de PEG. Los grupos reactivos colgantes se pueden unir al PEG directamente o por un resto espaciador, tal como un grupo alquileo.

Además de las formas que se han descrito de PEG, el polímero también se puede preparar con uno o más enlaces débiles o degradables en el polímero, incluyendo cualquiera de los polímeros que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, se puede preparar PEG con enlaces éster en el polímero que se someten a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular:



Otros enlaces hidrolíticamente degradables, útiles como un enlace degradable dentro de una cadena principal del polímero, incluyen enlaces carbonato; enlaces imina producidos, por ejemplo, por la reacción de una amina y un

## ES 2 315 526 T3

aldehído (véase, por ejemplo, Ouchi *et al.* (1997) Polymer Preprints 38(1): 582-3); enlaces éster de fosfato formados, por ejemplo, haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que se forman típicamente por reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que se forman típicamente por la reacción entre un aldehído y un alcohol; enlaces orto éster que se forman, por ejemplo, por reacción entre un formato y un alcohol; enlaces amida  
5 formados por un grupo amina, por ejemplo, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de otra cadena de PEG; enlaces uretano formados por la reacción de, por ejemplo, un PEG con un grupo isocianato terminal y un alcohol de PEG; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, por ejemplo, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados mediante,  
10 por ejemplo, un grupo fosforoamidita, por ejemplo, en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

Se entiende por los especialistas en la técnica que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las anteriores formas de PEG.

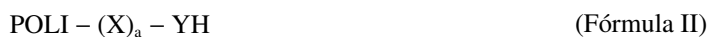
15 Muchos otros polímeros también son adecuados para la invención. Los polímeros que son no peptídicos y solubles en agua, con 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en la invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmacetilamida), poli(hidroxiálquilmacetilato), poli(sacáridos), poli( $\alpha$ -hidroxiácido), poli(vinilalcohol),  
20 polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), tal como se describe en la Patente de Estados N° 5.629.384 y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos. Éstos polímeros pueden ser lineales, o pueden estar en cualquiera de las formas que se han descrito anteriormente (por ejemplo, ramificada, ahorquillada y similares).

Aunque el peso molecular promedio nominal del polímero soluble en agua puede variar, el peso molecular promedio nominal estará típicamente en uno o más de los siguientes intervalos: de aproximadamente 100 Dalton a aproximadamente 100.000 Dalton; de aproximadamente 500 Dalton a aproximadamente 80.000 Dalton; de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 50.000 Dalton; de aproximadamente 2.000 Dalton a aproximadamente 25.000 Dalton; de aproximadamente 5.000 Dalton a aproximadamente 20.000 Dalton. Los pesos moleculares promedios nominales ejemplares para el segmento de polímero soluble en agua incluyen aproximadamente 1.000 Dalton,  
30 aproximadamente 5.000 Dalton, aproximadamente 10.000 Dalton, aproximadamente 15.000 Dalton, aproximadamente 20.000 Dalton, aproximadamente 25.000 Dalton y aproximadamente 30.000 Dalton.

Se considera que el PEG y otros polímeros solubles en agua como se describen en este documento son típicamente biocompatibles y no inmunogénicos. Con respecto a la biocompatibilidad, se considera que una sustancia es  
35 biocompatible si los efectos beneficiosos asociados al uso de la sustancia sola o con otra sustancia (por ejemplo, agente activo) junto con tejidos vivos (por ejemplo, administración a un paciente) pesa más que cualquier efecto perjudicial como se evalúa por un clínico, por ejemplo, un médico. Con respecto a la no inmunogenicidad, se considera que una sustancia no es inmunogénica si el uso de la sustancia sola o con otra sustancia junto con tejidos vivos no produce ninguna respuesta inmune (por ejemplo, la formación de anticuerpos) o, si una respuesta inmune se produce,  
40 de tal forma que una respuesta de este tipo no se considera clínicamente significativa o importante cuando se evalúa por un clínico. Se prefiere particularmente que los polímeros descritos en este documento, así como conjugados de agentes activos y los polímeros y segmentos solubles en agua descritos en este documento sean biocompatibles y no inmunogénicos.

45 Los especialistas en la técnica entenderán que la anterior discusión con respecto a polímeros sustancialmente solubles en agua en ningún modo es exhaustiva y es meramente ilustrativa y que se consideran todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades que se han descrito anteriormente. Como se usa en este documento, la expresión "polímero soluble en agua" se refiere generalmente a una molécula entera, que puede comprender grupos funcionales tales como grupos hidroxilo, grupos tiol, funcionalidades orto éster, etcétera. La expresión  
50 segmento de polímero soluble en agua se reserva generalmente para el uso en la discusión de estructuras moleculares específicas en las que un polímero o una parte del mismo es solo una parte de la estructura molecular global.

Un ejemplo de un polímero soluble en agua preferido que lleva un resto hidroxilo o tiol comprende la siguiente  
55 estructura:



60 en la que POLI es un segmento de polímero soluble en agua;

(a) es cero o uno;

X, cuando está presente, es un resto espaciador; e

65 Y es O o S.

## ES 2 315 526 T3

El reconocer ciertos casos en los que un segmento de polímero soluble en agua (es decir, un "POLI") se define como que contiene un resto hidroxilo o tiol (por ejemplo,  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{H}$  o  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})-\text{H}$ , respectivamente), se entiende que el resto "-YH" de Fórmula II representa el resto hidroxilo o tiol de "POLI" y no la interpretación irracional de, por ejemplo, " $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{H}-\text{YH}$ ". Alternativamente,  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{H}$ , por ejemplo, está incluido en Fórmula II cuando POLI se define como " $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ " (a) es uno, X es "- $\text{CH}_2\text{CH}_2-$ " e Y es "-O-". Por tanto, dada la posibilidad de que pueda haber más de un único modo de que cualquier molécula individual se incluya en una fórmula dada, se tiene que dar la debida consideración para determinar si una molécula en cuestión está o no incluida en una fórmula dada.

Un segmento soluble en agua particularmente preferido que lleva un único grupo hidroxilo comprende la siguiente estructura:



en la que:

(m) es de 2 a 4000; y

$\text{R}^5$  es un grupo de acabado tal como H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido. Se prefiere especialmente que  $\text{R}^5$  sea un alquilo inferior tal como metilo, aunque también se pueden usar bencilo y otros grupos de acabado conocidos por los especialistas en la técnica.

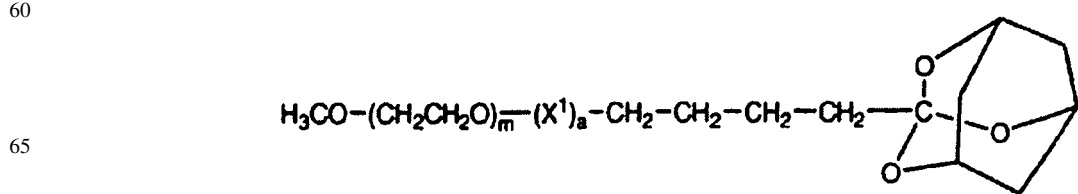
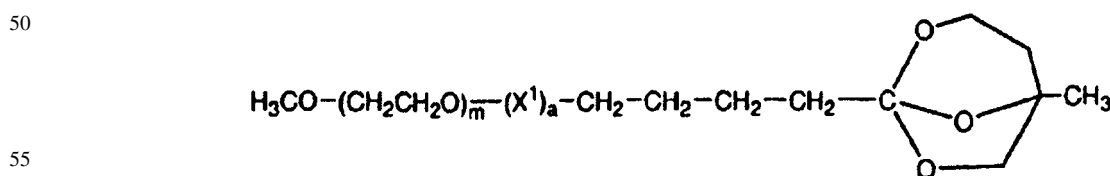
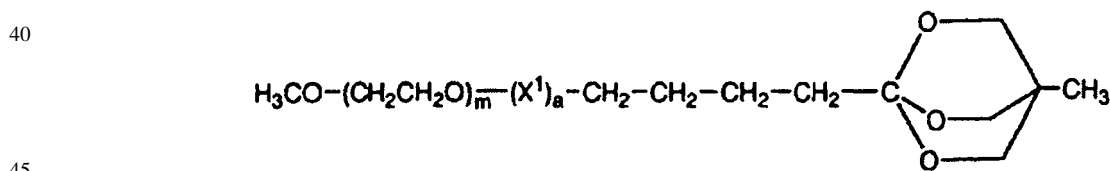
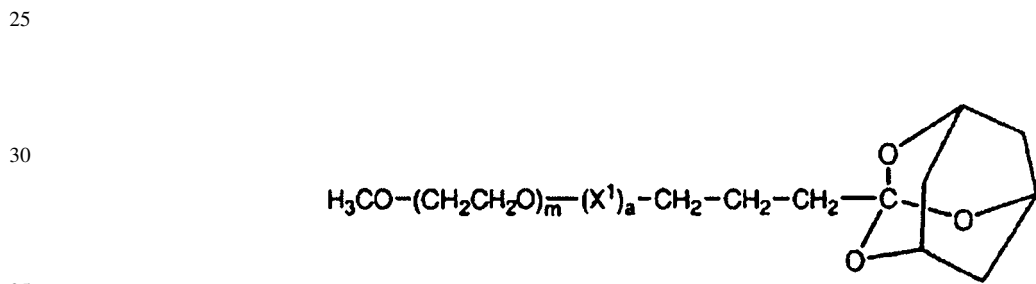
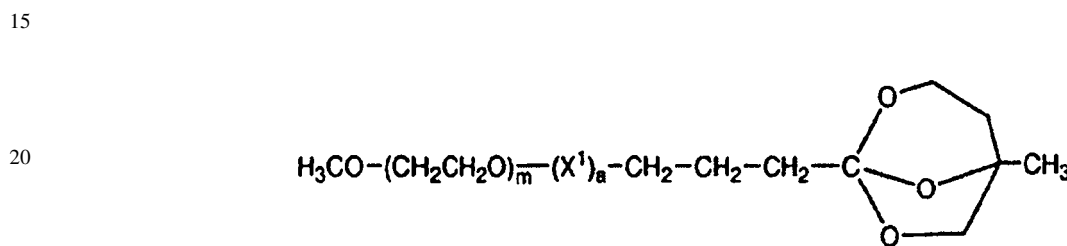
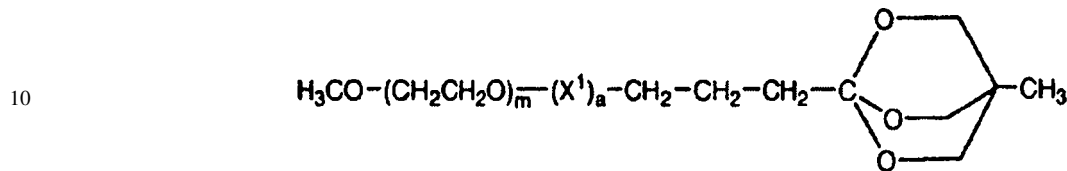
Sin embargo, para los propósitos de la presente descripción, una serie de átomos no es un resto espaciador cuando la serie de átomos está inmediatamente adyacente a un polímero y la serie de átomos es otro monómero de tal forma que el resto espaciador propuesto representaría una mera extensión de la cadena polimérica. Por ejemplo, dada la estructura parcial "POLI-X-" y POLI se define como " $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ " en la que (m) es de 2 a 4000 y X se define como un resto espaciador, el resto espaciador no se puede definir como "- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ", ya que una definición de este tipo representaría meramente una extensión del polímero. Sin embargo, en un caso de este tipo, se podría definir un resto espaciador aceptable como "- $\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ".

Los restos espaciadores ejemplares incluyen, pero sin limitación, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -O-C(O)-NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>h</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, grupo cicloalquilo bivalente, -O-, -S-, un aminoácido, -N(R<sup>6</sup>)-, y combinaciones de dos o más de cualquiera de los anteriores, donde R<sup>6</sup> es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido, (h) es de cero a seis y (j) es cero a 20. Otros restos espaciadores específicos tienen las siguientes estructuras: -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)- y -O-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)-, en las que los valores en subíndice después de cada metileno indican el número de metilenos contenidos en la estructura, por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub> significa que la estructura puede contener 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 metilenos.

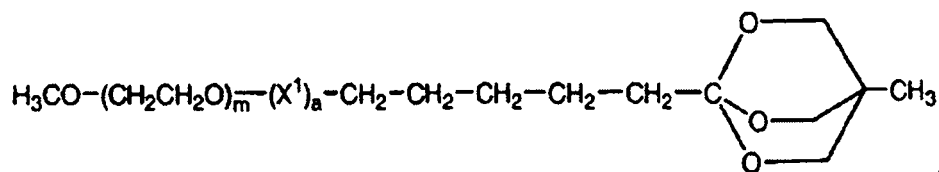
En el presente contexto de un aminoácido incluido en las estructuras proporcionadas en este documento, se debe recordar que el aminoácido está conectado al resto de la estructura por uno, dos, tres o más sitios. Por ejemplo, se puede producir un resto espaciador cuando se une un aminoácido al resto de la molécula por dos uniones covalentes. Además, se puede producir una estructura de ramificación cuando se une un aminoácido al resto de la molécula por tres sitios. Por tanto, la estructura de aminoácido cambia necesariamente ligeramente debido a la presencia de una o más uniones covalentes (por ejemplo, la retirada de un átomo de hidrógeno del aminoácido para alojar un enlace covalente). En consecuencia, la referencia a un "aminoácido", por lo tanto, incluye el aminoácido que contiene uno o más enlaces con otros átomos. El aminoácido se puede seleccionar del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Tanto las formas D como L de los aminoácidos se consideran.

*El orto éster de un polímero soluble en agua*

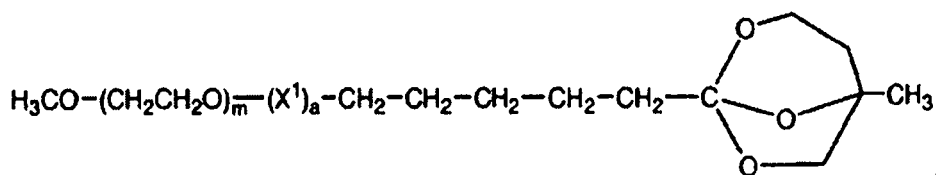
La presente invención proporciona polímeros solubles en agua que comprenden una funcionalidad orto éster. Como se ha descrito anteriormente, tanto las formas acíclicas como cíclicas de la funcionalidad orto éster están incluidas. A continuación se muestran orto ésteres cíclicos ilustrativos de polímeros solubles en agua de la invención:



5

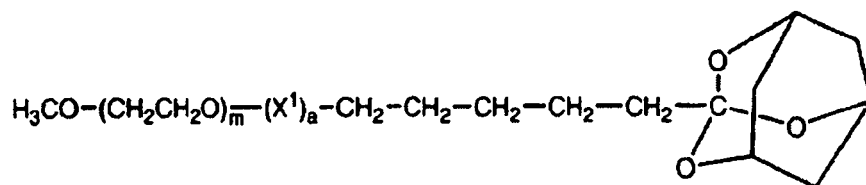


10



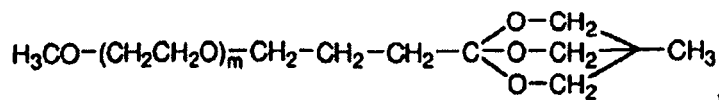
20

25



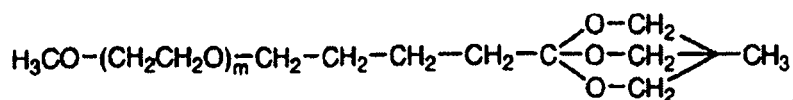
30

35

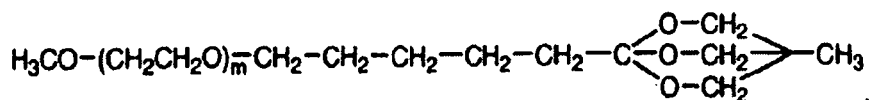


40

45

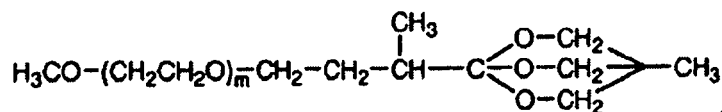


50



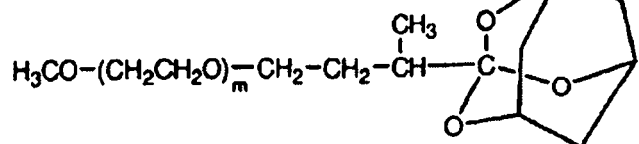
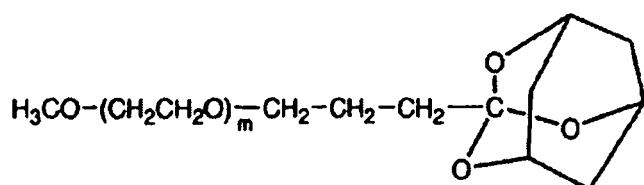
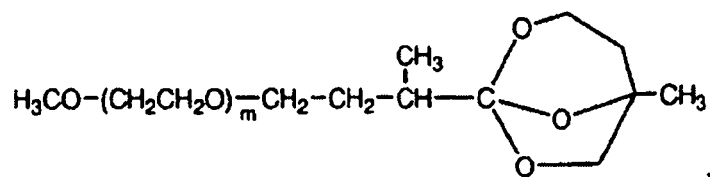
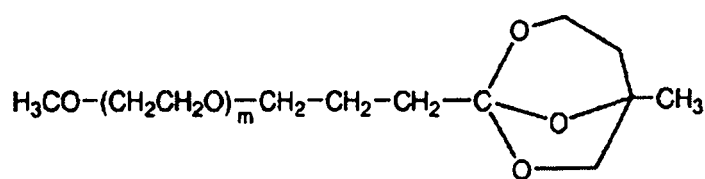
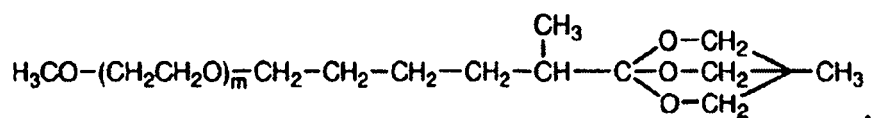
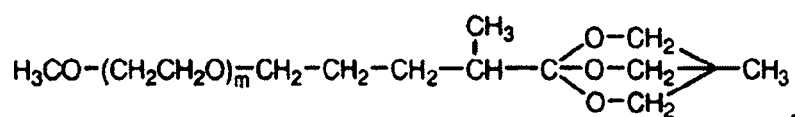
55

60

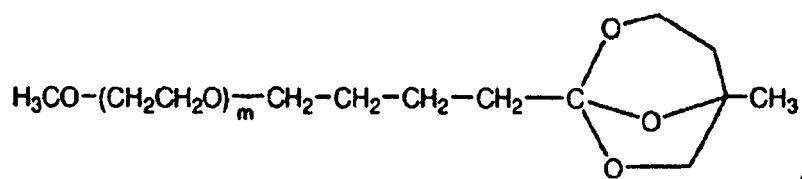


65

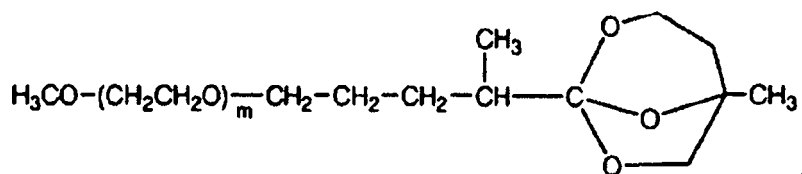
ES 2 315 526 T3



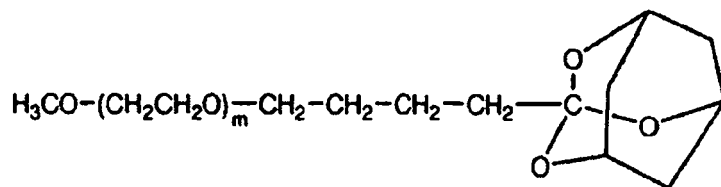
5



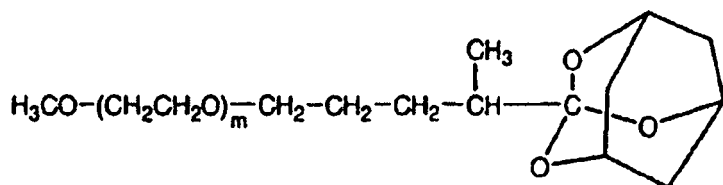
10



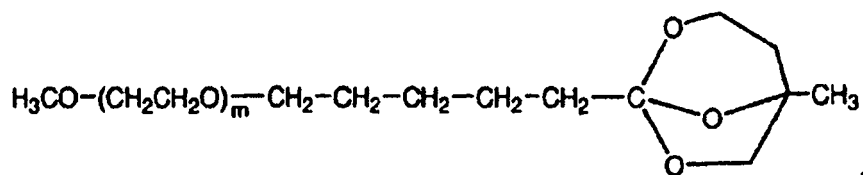
20



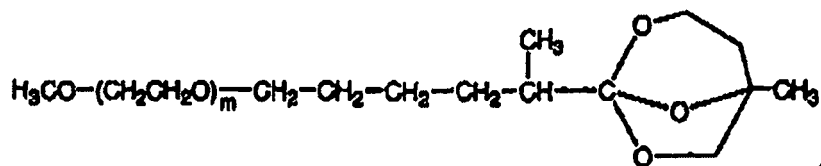
30



40

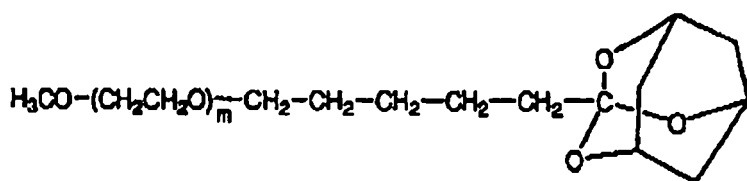


50

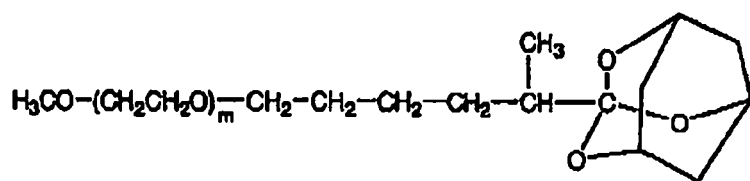


60

65



10 y



20 en las que (m) es de 2 a 4000, (a) es cero o uno y X<sup>1</sup>, cuando está presente, es un resto espaciador. Por supuesto, también son posibles otros polímeros solubles en agua que comprenden un resto orto éster y de acuerdo con la presente invención.

25 *El polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal o un éster del mismo*

De acuerdo con los presentes métodos, se puede preparar cualquier número de polímeros que lleven un ácido carboxílico terminal o un éster del mismo y la invención no está limitada en este aspecto. En consecuencia, la invención incluye ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanóicos y los ésteres correspondientes de un polímero formado por un método como se proporciona en este documento.

30 Para cualquier ácido carboxílico dado se puede formar el éster correspondiente usando técnicas convencionales. Por ejemplo, el polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal se puede someter a condensación catalizada por ácido con un alcohol, proporcionando de este modo el éster correspondiente. Una estrategia para conseguir esto es el uso del método denominado comúnmente una reacción de esterificación de Fischer. Otras técnicas para formar un éster deseado se conocen por los especialistas de la técnica.

35 Además, el polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal se puede modificar para formar derivados reactivos útiles de ácidos alcanóicos usando metodología conocida en la técnica. Por ejemplo, el ácido carboxílico se puede derivatizar adicionalmente para formar haluros de acilo, pseudohaluros de acilo, tales como acil cianuro, acil isocianato y acil acida, sales neutras, tales como sales de metal alcalino o metal alcalinotérreo (por ejemplo, sales de calcio, sodio y bario), ésteres, anhídridos, amidas, imidas, hidrazidas y similares. En una realización preferida, el ácido carboxílico se esterifica para formar un N-succinimidil éster, *o*-, *m*-, o *p*-nitrofenil éster, 1-benzotriazol éster, imidazolil éster o N-sulfosuccinimidil éster. Por ejemplo, el ácido carboxílico se puede convertir en el N-succinimidil éster correspondiente haciendo reaccionar el ácido carboxílico con dicitclohexil carbodiimida (DCC) o diisopropil carbodiimida (DIC) en presencia de una base.

#### *Condiciones de almacenamiento generales*

50 Los polímeros que llevan un ácido carboxílico terminal o un éster del mismo, así como cualquier intermedio en su formación (por ejemplo, orto ésteres de polímeros solubles en agua), se pueden almacenar en una atmósfera inerte, tal como con argón o con nitrógeno. De este modo, los procesos potencialmente degradativos asociados a, por ejemplo, oxígeno atmosférico, se evitan o reducen completamente. En algunos casos, para evitar la degradación oxidativa, se pueden añadir antioxidantes, tales como hidroxil tolueno butilado (BHT), al producto final antes del almacenamiento. Además, se prefiere minimizar la cantidad de humedad asociada a las condiciones de almacenamiento para disminuir las potenciales reacciones de daño asociadas a agua. Además, se prefiere mantener las condiciones de almacenamiento en oscuridad para evitar determinados procesos degradativos que implican luz. Por tanto, las condiciones de almacenamiento preferidas incluyen una o más de las siguientes: almacenamiento en argón seco u otro gas inerte seco; almacenamiento a temperaturas inferiores a aproximadamente -15°C; almacenamiento en ausencia de luz; y almacenamiento con una cantidad adecuada (por ejemplo, aproximadamente 50-500 partes por millón) de un antioxidante tal como BHT.

#### *Método de conjugación*

65 Los polímeros que se han descrito anteriormente que llevan un ácido carboxílico terminal, opcionalmente en una forma activada, son útiles para la conjugación con agentes biológicamente activos o superficies que comprenden al menos un grupo adecuado para la reacción con un ácido carboxílico o la forma activada opcional. Los grupos ejem-

plares adecuados para la reacción con un ácido carboxílico incluyen grupos amino (por ejemplo, aminas primarias), hidrazinas, hidrazidas y alcoholes. A menudo, el polímero que lleva un resto ácido carboxílico terminal se puede conjugar directamente con el agente o la superficie activa. Sin embargo, en ocasiones es necesario formar una versión "activada" del ácido carboxílico para aumentar la reactividad del agente o la superficie biológicamente activa.

Los métodos para activar ácidos carboxílicos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, disolver el polímero soluble en agua que lleva un ácido carboxílico terminal en cloruro de metileno y añadir posteriormente N-hidroxisuccinimida y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) para formar una versión activada de N-succinimidil éster del ácido carboxílico. Otras estrategias para activar un ácido carboxílico se conocen por los especialistas en la técnica.

Típicamente, el polímero soluble en agua que lleva el ácido carboxílico o el éster del mismo se añade al agente activo o la superficie en una cantidad equimolar (con respecto al número deseado de grupos adecuados para la reacción con el ácido carboxílico o el éster del mismo) o en un exceso molar. Por ejemplo, el polímero se puede añadir al agente activo diana con una proporción molar de aproximadamente 1:1 (polímero: agente activo), 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1 ó 10:1. Se permite que la reacción de conjugación avance hasta que no tenga lugar sustancialmente ninguna conjugación adicional, lo que se puede determinar generalmente controlando el progreso de la reacción a lo largo del tiempo. El avance de la reacción se puede controlar retirando alícuotas de la mezcla de reacción en diversos momentos y analizando la mezcla de reacción por SDS-PAGE o espectrometría de masa MALDI-TOF o cualquier otro método analítico adecuado. Una vez que se ha alcanzado un nivel con respecto a la cantidad de conjugado o la cantidad de polímero no conjugado remanente, se asume que la reacción está completada. Típicamente, la reacción de conjugación necesita de minutos a varias horas (por ejemplo, de 5 minutos a 24 horas o más). La mezcla de producto resultante preferiblemente, pero no necesariamente, se purifica para separar el exceso de reactivos, los reactivos no conjugados (por ejemplo, agente activo), especies multi-conjugadas no deseadas y polímero libre o no reaccionado. Los conjugados resultantes se pueden caracterizar después adicionalmente usando métodos analíticos tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel y/o cromatografía.

#### *Caracterización/separación*

Con respecto a conjugados de polímero-agente activo, los conjugados se pueden purificar para obtener/aislar diferentes especies conjugadas. Alternativamente, y más preferiblemente para polímeros de menor peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 20 kiloDalton, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 kiloDalton), la mezcla de productos se puede purificar para obtener la distribución de segmentos de polímero soluble en agua por agente activo. Por ejemplo, la mezcla de producto se puede purificar para obtener un promedio de uno a cinco PEG por agente activo (por ejemplo, proteína), típicamente un promedio de aproximadamente 3 PEG por agente activo (por ejemplo, proteína). La estrategia para la purificación de la mezcla de reacción de conjugado final dependerá de varios factores, incluyendo, por ejemplo, el peso molecular del polímero empleado, el agente activo particular, el protocolo de dosificación deseado y la actividad residual y las propiedades *in vivo* del conjugado o los conjugados individuales.

Si se desea, se pueden aislar conjugados que tengan diferentes pesos moleculares usando cromatografía de filtración en gel. Es decir, la cromatografía de filtración en gel se usa para fraccionar proporciones de polímero a agente activo numeradas de formas diferentes (por ejemplo, 1-mero, 2-mero, 3-mero, etc., donde "1-mero" indica 1 polímero a agente activo, "2-mero" indica 2 polímeros a agente activo, etcétera), basándose en sus pesos moleculares diferentes (donde la diferencia se corresponde esencialmente al peso molecular promedio de los segmentos de polímero soluble en agua). Por ejemplo, en una reacción ejemplar donde una proteína de 100 kDa se conjuga de forma aleatoria con un ácido alcanoico de PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, la mezcla de reacción resultante contendrá probablemente proteína modificada (PM 100 kDa), proteína mono-pegilada (PM 120 kDa), proteína di-pegilada (PM 140 kDa), etcétera. Mientras que esta estrategia se puede usar para separar PEG y otros conjugados poliméricos que tienen diferentes pesos moleculares, esta estrategia es generalmente ineficaz para separar isómeros posicionales que tengan diferentes sitios de unión al polímero dentro de la proteína. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de filtración en gel para separar entre sí mezclas de PEG 1-mero, 2-mero, 3-mero, etc., aunque cada una de las composiciones de PEG-mero recuperadas puede contener PEG unidos a diferentes grupos amino reactivos (por ejemplo, restos lisina) dentro del agente activo.

Las columnas de filtración en gel adecuadas para realizar este tipo de separación incluyen Superdex™ y Sephadex™ disponibles en Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). La selección de una columna particular dependerá del intervalo de fraccionamiento deseado. La elución se realiza generalmente usando un tampón adecuado, tal como fosfato, acetato o similares. Las fracciones recogidas se pueden analizar por varios métodos diferentes, por ejemplo, (i) densidad óptica (OD) a 280 nm para contenido de proteína, (ii) análisis proteico de albúmina sérica bovina (BSA), (iii) ensayo de yodo para contenido de PEG [Sims *et al.* (1980) *Anal. Biochem*, 107: 60-63] y (iv) electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS PAGE), seguido de tinción con yoduro de bario.

La separación de isómeros posicionales se realiza por cromatografía de fase inversa usando una columna C18 de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) (Amersham Biosciences o Vydac) o por cromatografía de intercambio iónico usando una columna de intercambio iónico, por ejemplo, una columna de intercambio iónico Sepharose™ disponible en Amersham Biosciences. Se puede usar cualquier estrategia para separar isómeros de polímero-agente activo que tengan el mismo peso molecular (isómeros posicionales).

*Condiciones de almacenamiento para conjugados de polímero-agente activo*

Después de la conjugación, y opcionalmente etapas de separación adicionales, la mezcla de conjugado se puede concentrar, filtrar a esterilidad y almacenar a una temperatura baja, típicamente de aproximadamente -20°C a aproximadamente -80°C. Alternativamente, el conjugado se puede liofilizar, con o sin tampón residual y almacenar como un polvo liofilizado. En algunos casos es preferible intercambiar un tampón usado para conjugación, tal como acetato sódico, por un tampón volátil, tal como carbonato de amonio o acetato de amonio, que se pueda retirar fácilmente durante la liofilización, de tal forma que el polvo liofilizado esté completamente ausente del tampón residual. Alternativamente se puede usar una etapa de intercambio de tampón usando un tampón de formulación, de tal forma que el conjugado liofilizado esté en una forma adecuada para la reconstitución en un tampón de formulación y, finalmente, para administración a un mamífero.

*Agentes activos y superficies*

Los polímeros solubles en agua que llevan un ácido carboxílico o éster del mismo presentados en este documento se puede unir, covalentemente o no covalentemente, a varias entidades, incluyendo películas, superficies de separación y purificación química, soportes sólidos, superficies metálicas, tales como oro, titanio, tantalio, niobio, aluminio, acero y sus óxidos, óxido de silicio, macromoléculas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, etcétera) y moléculas pequeñas. Adicionalmente, los polímeros también se pueden usar en sensores bioquímicos, conmutadores bioelectrónicos y compuertas. Los polímeros también se pueden emplear como vehículos para síntesis peptídica, para la preparación de superficies recubiertas con polímero e injertos de polímero para preparar conjugados de polímero-ligando para reparto por afinidad, para preparar hidrogeles reticulados o no reticulados y para preparar aductos de polímero-cofactor para biorreactores.

Un agente biológicamente activo para el uso en el acoplamiento a un polímero como se presenta en este documento puede ser uno cualquier o más de los siguientes. Los agentes adecuados se pueden seleccionar de, por ejemplo, hipnóticos y sedantes, psicotónicos, tranquilizantes, fármacos respiratorios, anticonvulsivantes, relajantes musculares, agentes antiparkinson (antagonistas de dopamina), analgésicos, antiinflamatorios, fármacos anti ansiedad (ansiolíticos), supresores del apetito, agentes antimigraña, contractores musculares, antiinfecciosos (antibióticos, antivirales, antifúngicos, vacunas) antiartríticos, antimaláricos, antieméticos, antiepilépticos, broncodilatadores, citoquinas, factores de crecimiento, agentes anticancerosos, agentes antitrombóticos, antihipertensivos, fármacos cardiovasculares, antiarrítmicos, antioxidantes, agentes antiasmáticos, agentes hormonales incluyendo anticonceptivos, simpaticomiméticos, diuréticos, agentes de regulación de lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasitarios, anticoagulantes, neoplásicos, antineoplásicos, hipoglucémicos, agentes nutricionales y suplementos, suplementos de crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico y agentes de contraste.

Más particularmente, el agente activo puede entrar dentro de una de varias clases estructurales, incluyendo, pero sin limitación, moléculas pequeñas (preferiblemente moléculas pequeñas insolubles), péptidos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, grasas, electrolitos y similares. Preferiblemente, un agente activo para el acoplamiento a un polímero como se describe en este documento posee un grupo amino nativo o, alternativamente, está modificado para contener al menos un grupo amino reactivo adecuado para la conjugación con un polímero descrito en este documento.

Los ejemplos específicos de agentes activos adecuados para la unión covalente incluyen, pero sin limitación, asparaginasa, amdoxovir (DAPD), antida, becapermin, calcitoninas, cianovirina, denileucina diftotox, eritropoyetina (EPO), agonistas de EPO (por ejemplo, péptidos de aproximadamente 10-40 aminoácidos de longitud y que comprenden una secuencia núcleo particular como se describe en el documento WO 96/40749), dornasa alfa, proteína estimulante de eritropoyesis (NESP), factores de coagulación tales como Factor V, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XII, Factor XIII, factor von Willebrand; cerasa, cerezima, alfa-glucosidasa, colágeno, ciclosporina, defensinas alfa, defensinas beta, exedina-4, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de alfa-1 proteínasa, elcatonina, factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), fibrinógeno, filgrastima, hormonas de crecimiento, hormona de crecimiento humana (hGH), hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), GRO-beta, anticuerpo de GRO-beta, proteínas morfogénicas óseas, tales como proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 6, OP-1; factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblasto básico, ligando de CD-40, heparina, albúmina sérica humana, heparina de bajo peso molecular (LMWH), interferones tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, interferón de consenso; interleucinas y receptores de interleucina tales como receptor de interleucina-1, interleucina-2, proteínas de fusión de interleucina-2, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-3, interleucina-4, receptor de interleucina-4, interleucina-6, interleucina-8, interleucina-12, receptor de interleucina-13, receptor de interleucina-17; lactoferrina y fragmentos de lactoferrina, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), insulina, pro-insulina, análogos de insulina (por ejemplo, insulina mono-acilada como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.922.675), amilina, péptido C, somatostatina, análogos de somatostatina incluyendo ocreotida, vasopresina, hormona foliculo estimulante (FSH), vacuna de influenza, factor de crecimiento similar a insulina (IGF), insulintropina, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), activadores de plasminógeno tales como alteplasa, uroquinasa, reteplasa, estreptoquinasa, pamiteplasa, lanoteplasa y teneteplasa; factor de crecimiento de nervios (NGF), osteoprotegerina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento tisular, factor de crecimiento transformante 1, factor de crecimiento de endotelio vascular, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento glial (GGF), receptores de células T, moléculas/antígenos

de CD, factor de necrosis tumoral (TNF), proteína quimiotáctica de monocitos 1, factores de crecimiento endotelial, hormona paratiroidea (PTH), péptido similar a glucagón, somatotropina, timosina alfa 1, rasburicasa, inhibidor de timosina alfa 1 IIB/IIIA, timosina beta 10, timosina beta 9, timosina beta 4, antitripsina alfa-1, compuestos fosfodiesterasa (PDE), VLA-4 (antígeno muy tardío 4), inhibidores de VLA-4, bisfosfonatos, anticuerpo de virus sincitial respiratorio, gen regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (Adnasa), proteína aumentadora de permeabilidad/bactericida (BPI) y anticuerpo anti-CMV. Los anticuerpos monoclonales ilustrativos incluyen etanercept (una proteína de fusión dimérica que consiste en la parte de unión a ligando extracelular del receptor de TNF de 75 kD unido a la parte Fc de IgG1), abciximab, afeliomomab, basiliximab, daclizumab, infliximab, ibritumomab tiuxetano, mitumomab, muromonab-CD3, conjugado de yodo 131-tositumomab, olizumab, rituximab, trastuzumab (herceptina) y adalimumab.

Los agentes adicionales adecuados para la unión covalente incluyen, pero sin limitación, adefovir, alosestrón, amifostina, amiodarona, ácido aminocaprónico, aminohipurato sódico, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico ácido aminosalicílico, amsacrina, anagrelida, anastrozol, aripiprazol, asparaginasa, antraciclinas, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, busrelina, busulfán, cabergolina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucina, cilastatina sódica, cisplatino, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, camptotecinas, ácido 13-cis retinoico; ácido todo trans retinoico, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, deferoxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilstilbestrol, docetaxel, doxorubicina, dutasterida, epirubicina, estramustina, etopósido, exemestano, ezetimiba, fexofenadina, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, fondaparinux, fulvestrant, gamma-hidroxibutirato, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecano, itraconazol, goserelina, letrozol, leucovorina, levamisol, lisinopril, lovotiroxina sódica, lomustina, mecloretamina, medroxioprogesterona, megestrol, melfalano, mercaptopurina, bitartrato de metaraminol, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, naloxona, nicotina, nilutamida, nitisinona, ocreotida, oxaliplatino, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, prednisona, procarbazona, proclorperazina, ondansetrón, oxaliplatino, raltitrexed, sirolimo, estreptoamicina, tacrolimo, pimecrolimo, tamoxifeno, tegaserod, temozolomida, tenipósido, testosterona, tetrahidrocannabinol, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecano, treprostínilo, tretinoína, valdecocixib, celecoxib, rofecoxib, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, voriconazol, dolasetrón, granisetrón; formoterol, fluticasona, leuprolida, midazolam, alprazolam, anfotericina B, podofilotoxinas, antivirales nucleósidos, hidrazonas de aroilo, sumatriptán; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davercina, acitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiramicina, midecamicina, loratadina, desloratadina, leucomicina, miocamicina, rokitamicina, andazitromicina y swinolida A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trovafloxacina, alatrofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, lomefloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, pefloxacina, amifloxacina, fleroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina y sitafloxacina; aminoglucósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramicina, tobramicina, amikacina, kanamicina, neomicina y estreptomycinina, vancomicina, teicoplanina, ramoplanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato; polimixinas tales como polimixina B, capreomicina, bacitracina, penemos; penicilinas incluyendo agentes sensibles a penicilasa como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a penicilasa como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos de microorganismos gram negativos como ampicilina, amoxicilina y hetacilina, cilina y galampicilina; penicilinas antipseudomonas como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina; cefalosporinas como cefpodoxima, cefprozil, ceftbuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefadrina, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxilo, cefaloglicina, cefuroxima, ceforandina, cefotaxima, cefatrizina, cefacetila, cefepima, cefixima, cefonicida, cefoperazona, cefotetano, cefmetazol, ceftazidima, loracarbef y moxalactamo, monobactamos como aztreonam; y carbapenemos tales como imipenem, meropenem y ertapenem, isetionato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaína, sulfato de metaproterenol, diprepiionato de beclometasona, acetamida de triamcinolona, acetona de budesonida, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolina sódica y tartrato de ergotamina; taxanos tales como paclitaxel; SN-38 y tirfostinas.

Las moléculas pequeñas preferidas para el acoplamiento a un polímero como se describen en este documento son las que tienen al menos un grupo amino de origen natural. Las moléculas preferidas como tales incluyen aminohipurato sódico, anfotericina B, doxorubicina, ácido aminocaproico, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, bitartrato de metaraminol, pamidronato disódico, daunorrubicina, levotiroxina sódica, lisinopril, cilastatina sódica, mexiletina, cefalexina, deferoxamina y amifostina.

Los péptidos o las proteínas preferidas para el acoplamiento a un polímero como se describen en este documento incluyen EPO, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN de consenso, Factor VIII, Factor IX, GCSF, GMCSF, hGH, insulina, FSH y PTH.

Los anteriores agentes biológicamente activos ejemplares incluyen, cuando sea aplicable, análogos, agonistas, antagonistas, inhibidores, isómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Con referencia a péptidos y proteínas, la invención tiene por objeto incluir formas sintéticas, recombinantes, nativas, glicosiladas y no glicosiladas, así como fragmentos biológicamente activos de los mismos.

#### *Composiciones farmacéuticas*

La presente invención también incluye preparaciones farmacéuticas que comprenden un conjugado como se proporciona en este documento en combinación con un excipiente farmacéutico. Generalmente, el propio conjugado estará en una forma sólida (por ejemplo, un precipitado), que se puede combinar con un excipiente farmacéutico adecuado que puede estar en forma sólida o líquida.

## ES 2 315 526 T3

Los excipientes ejemplares incluyen, pero sin limitación, los seleccionados del grupo que consiste en carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos.

5 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 un excipiente. Los excipientes de carbohidratos específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol y similares.

15 El excipiente también puede incluir una sal inorgánica o un tampón tal como ácido cítrico, cloruro sódico, cloruro potásico, sulfuro sódico, nitrato potásico, fosfato sódico monobásico, fosfato sódico dibásico y combinaciones de los mismos.

20 La preparación también puede incluir un agente antimicrobiano para evitar o impedir crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol benzilo, cloruro de cetilpiridinio, clorbutanol, fenol, alcohol feniletilo, nitrato de fenilmercurio, timersol y combinaciones de los mismos.

25 Un antioxidante también puede estar presente en la preparación. Los antioxidantes se usan para evitar la oxidación, evitando de este modo el deterioro del conjugado u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para el uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosfórico, monotioglicerol, propil galato, bisulfito sódico, sulfoxilato de formaldehído sódico, metabisulfito sódico y combinaciones de los mismos.

30 Un tensioactivo puede estar presente como un excipiente. Los tensioactivos ejemplares incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80" y pluronics tales como F68 y F88 (que están ambos 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 liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, zinc y otros cationes adecuados de este tipo.

35 Los ácidos o las bases pueden estar presentes como un excipiente en la preparación. Los ejemplos no limitantes de ácidos que se pueden usar incluyen los ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, pero sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido sódico, acetato sódico, hidróxido de amonio, hidróxido potásico, acetato de amonio, acetato potásico, fosfato sódico, fosfato potásico, citrato sódico, formato sódico, sulfato sódico, sulfato potásico, fumerato potásico y combinaciones de los mismos.

45 Las preparaciones farmacéuticas incluyen todos los tipos de formulaciones y en particular las que son adecuadas para inyección, por ejemplo, polvos que se pueden reconstituir así como suspensiones y soluciones. La cantidad del conjugado (es decir, el conjugado formado entre el agente activo y el polímero que se describe en este documento) en la composición variará dependiendo de varios factores, pero óptimamente será una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacena en un recipiente de dosis unitaria (por ejemplo, un vial). Además, la preparación farmacéutica se puede alojar en una jeringa. Una dosis terapéuticamente eficaz se puede determinar experimentalmente mediante administración repetida de cantidades crecientes del conjugado para determinar qué cantidad produce un criterio de valoración clínicamente deseado.

50 La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la actividad del excipiente y las necesidades particulares de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina por experimentación de rutina, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que varían de bajas a altas) examinando la estabilidad y otros parámetros y determinando después el intervalo en el que se consigue un rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos.

60 Sin embargo, generalmente, el excipiente estará presente en la composición en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 5%-98% en peso, más preferiblemente de aproximadamente el 15-95% en peso del excipiente, prefiriéndose concentraciones inferiores al 30% en peso.

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

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se administran típicamente, aunque no necesariamente, mediante inyección y por lo tanto, son generalmente soluciones o suspensiones líquidas inmediatamente antes de la

administración. La preparación farmacéutica también puede adoptar otras formas tales como jarabes, cremas, pomadas, comprimidos, polvos y similares. Otros modos de administración también están incluidos, tales como pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosa, oral, intratecal, subcutánea, intra-arterial, etcétera.

5 Como se ha descrito anteriormente, los conjugados se pueden administrar inyectados por vía parenteral por inyección intravenosa, o menos preferiblemente, por inyección intramuscular o por inyección subcutánea. Los tipos de formulación adecuados para la administración parenteral incluyen soluciones preparadas para la inyección, polvos secos para la combinación con un disolvente antes del uso, suspensiones preparadas para la inyección, composiciones insolubles secas para la combinación con un vehículo antes del uso y emulsiones y concentrados de líquido para dilución antes de la administración, entre otros.

#### *Métodos de administración*

15 La invención también proporciona un método para la administración de un conjugado como se proporciona en este documento a un paciente que padece una afección que responde a tratamiento con el conjugado. El método comprende administrar, generalmente por inyección, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado (preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica). El método de administración se puede usar para tratar cualquier afección que se pueda remediar o prevenir mediante la administración del conjugado particular. Los especialistas en la técnica entenderán qué condiciones puede tratar eficazmente un conjugado específico. La dosis real que se tiene que administrar variará dependiendo de la edad, el peso y el estado general del sujeto, así como la gravedad de la afección que se está tratando, el juicio del profesional de asistencia sanitaria y el conjugado que se está administrando. Los especialistas en la técnica conocen cantidades terapéuticamente eficaces y/o se describen en los textos de referencia y la bibliografía pertinente. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz variará de aproximadamente de 0,001 mg a 100 mg, preferiblemente en dosis de 0,01 mg/día a 75 mg/día y más preferiblemente en dosis de 0,10 mg/día a 25 50 mg/día.

Las dosificaciones unitarias de cualquier conjugado dado (de nuevo, proporcionadas preferiblemente como parte de una preparación farmacéutica) se pueden administrar en una diversidad de protocolos de dosificación dependiendo del juicio del clínico, las necesidades del paciente, etc. El protocolo de dosificación específico se conocerá por los especialistas en la técnica o se puede determinar experimentalmente usando métodos de rutina. Los protocolos de dosificación ejemplares incluyen, pero sin limitación, la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces diariamente, una vez diariamente, tres veces semanalmente, dos veces semanalmente, una vez semanalmente, dos veces al mes, una vez al mes y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se haya conseguido el criterio de valoración clínico, la dosificación de la composición se detiene.

35 Una ventaja de la administración de los conjugados de la presente invención es que se pueden escindir partes individuales de polímero soluble en agua. Un resultado de este tipo es ventajoso cuando el aclaramiento del cuerpo es potencialmente un problema debido al tamaño del polímero. Óptimamente, la escisión de cada parte de polímero soluble en agua se facilita mediante el uso de enlaces fisiológicamente escindibles y/o enzimáticamente degradables tales como enlaces uretano, amida, carbonato o que contienen éster. De este modo, el aclaramiento del conjugado (por escisión de partes individuales de polímero soluble en agua) se puede modular seleccionando el tamaño molecular del polímero y el tipo de grupo funcional que proporcionaría las propiedades de aclaramiento deseadas. El especialista en la técnica puede determinar el tamaño molecular apropiado del polímero así como el grupo funcional de escisión. Por ejemplo, el especialista en la técnica, usando experimentación de rutina, puede determinar un tamaño molecular apropiado y el grupo funcional escindible preparando en primer lugar una diversidad de derivados poliméricos con diferentes pesos de polímero y grupos funcionales escindibles y obteniendo de después el perfil de aclaramiento (por ejemplo, por muestreo periódico de sangre u orina) administrando el derivado polimérico a un paciente y tomando muestras periódicas de sangre y/u orina. Una vez que se ha obtenido una serie de perfiles de aclaramiento para cada conjugado ensayado se puede identificar un conjugado adecuado.

50 Se tiene que entender que mientras que la invención se ha descrito en relación a las realizaciones específicas preferidas de la misma, la anterior descripción así como la parte experimental que sigue tienen por objeto ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica a la que se refiere la invención.

#### **Parte experimental**

##### **Ejemplos**

60 La práctica de la invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de síntesis orgánica y similares, que se comprenden por el especialista en la técnica y se explican en la bibliografía. En los siguientes ejemplos se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etcétera), pero se puede producir cierto error experimental y desviación. A menos que se indique de otro modo, la temperatura es en grados Celsius y la presión es o prácticamente presión atmosférica al nivel del mar. Todos los reactivos se obtuvieron del mercado al menos que se indique de otro modo. Todas las RMN se obtuvieron de un espectrómetro de RMN de 300 ó 400 Mhz fabricado por Bruker (Billerica, MA). La referencia a un "orto éster de OBO" se corresponde a ésteres que comprenden el 4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2]octanoilo.

## ES 2 315 526 T3

### Ejemplo 1

#### Formación de 4-Bromobutirato éster de 3-metil-3-hidroximetiloxetano (PM = 251,12)

5 Se disolvió 3-metil-3-hidroximetiloxetano (10,2 g, 0,1 mol) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) en diclorometano anhidro (200 ml). Después, a la solución se le añadió piridina (9,8 ml, 0,12 mol). Después, la solución se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota cloruro de 4-bromobutirilo (18,5 g, 0,1 mol) (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO) disuelto en diclorometano anhidro (50 ml) durante 20 minutos. La mezcla se agitó durante una noche en una atmósfera de argón. Después, la mezcla de reacción se lavó con agua y se secó con sulfato de magnesio anhidro.  
10 Después, el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. Rendimiento de 23,6 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,26 ppm (s, 3H), 2,07 ppm (m, 2H), 2,51 ppm (t, 2H), 3,56 ppm (t, 2H), 4,14 ppm (s, 2H), 4,24 ppm (d, 2H), 4,38 ppm (d, 2H).

### 15 Ejemplo 2

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

El producto del Ejemplo 1 (4-bromobutirato éster de 3-metil-3-hidroximetiloxetano en bruto, 20,1 g, 0,08 mol) se  
20 disolvió en diclorometano anhidro (100 ml), la solución se enfrió a 0°C y se añadió dietileterato de trifluoruro de boro (2,5 ml, 0,022 mol). Después, la mezcla se agitó durante cuatro horas a 0°C. Se añadió trietilamina (12 ml), la mezcla se agitó durante 15 minutos y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en éter etílico (180 ml) y después la solución se filtró para retirar las impurezas sólidas. Después, el éter se retiró por  
25 destilación y el producto se destiló a presión reducida (tubo de bolas, 110-115°C, 0,05 mm de Hg). Rendimiento de 15,0 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,74 ppm (s, 3H), 1,68 ppm (m, 2H), 1,88 ppm (m, 2H), 3,52 ppm (t, 2H), 3,81 ppm (s, 6H).

### Ejemplo 3

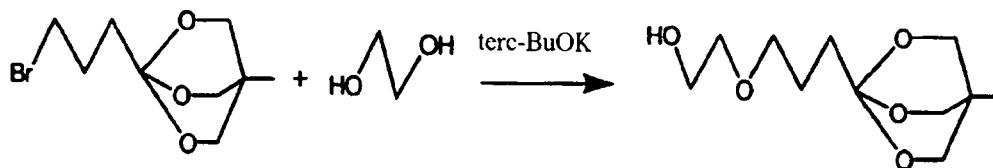
30

#### Síntesis de un Precursor de Ácido PEG-Butanoico Útil en una Reacción de Polimerización

Una mezcla de etilenglicol anhidro (120 g, 1,93 mol), una solución 1,0 M de terc-butóxido potásico en terc-butanol  
35 (70 ml, 0,070 mol) y el producto del Ejemplo 2 [1-(3-bromopropil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2]octano (15 g, 0,060 mol)] se agitó durante una noche a 70°C en una atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se añadió a 600 ml de agua destilada. El producto se extrajo tres veces con diclorometano (150 ml, 125 ml y 125 ml). Los extractos combinados se secaron con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se retiró por  
40 destilación a presión reducida. Después, el producto (Compuesto 1) se sometió a destilación al vacío (tubo de bolas,  $t = 120$ -130°C, 0,05 mm de Hg). Rendimiento de 6,2 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,74 ppm (s, 3H), 1,59 ppm (m, 4H), 3,34 ppm (m, 4H), 3,45 ppm (t, 2H), 3,80 ppm (s, 6H), 4,54 ppm (t, 1H).

Esquemáticamente, la reacción puede representarse como se indica a continuación:

45



50

Compuesto 1

55

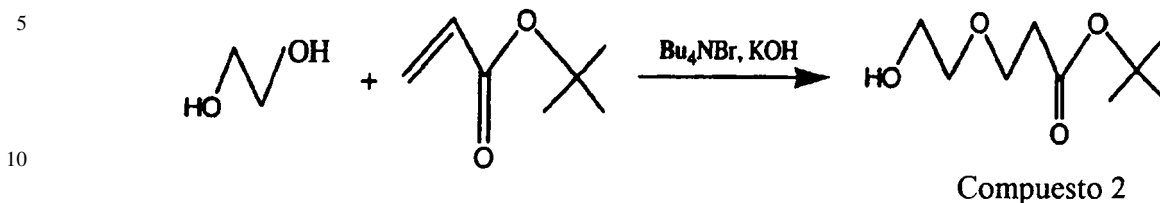
### Ejemplo 4

#### Síntesis de un Precursor de Ácido PEG-Propanoico Útil en una Reacción de Polimerización

60 Se añadió gota a gota acrilato de terc-butilo (130 g, 1,01 mol) durante 3 horas a una mezcla de etilenglicol anhidro (62 g, 1,0 mol), bromuro de tetrabutilamonio (9,6 g) y KOH (en polvo, 2,2 g) y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Los productos volátiles se retiraron por destilación a presión reducida (evaporador rotatorio, 60°C) y la mezcla se disolvió en 250 ml de diclorometano. La solución se lavó con  
65 250 ml de agua destilada, se secó con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. Después, el producto (Compuesto 2) se sometió a destilación al vacío (tubo de bolas,  $t = 95$ -100°C, 0,05 mm de Hg). Rendimiento de 36,6 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,40 ppm (s, 9H), 2,42 ppm (t, 2H), 3,39 ppm (m, 2H), 3,46 ppm (m, 2H), 3,59 ppm (s, 2H), 4,55 ppm (t, 1H).

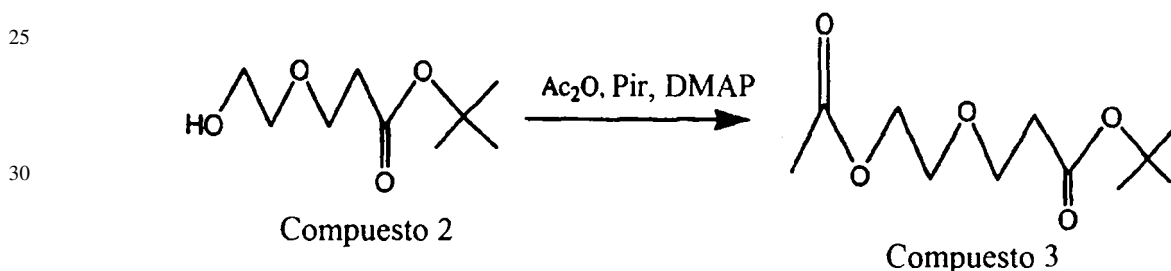
## ES 2 315 526 T3

Esquemáticamente, la reacción puede representarse como se indica a continuación:



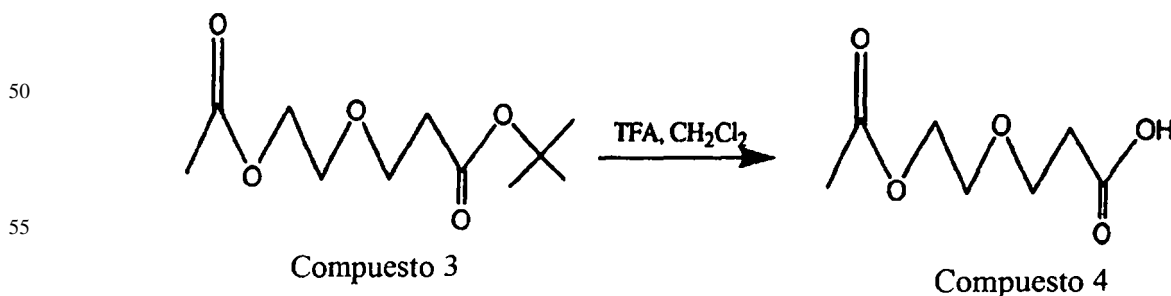
15 Una mezcla del Compuesto 2 (36,6 g, 0,19 mol), piridina (52 ml, 0,64 mol), anhídrido acético (52 ml, 0,55 mol) y dimetilaminopiridina (DMAP, 1,0 g) se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después, los productos volátiles se retiraron por destilación a presión reducida (evaporador rotatorio,  $t = 65^{\circ}\text{C}$ ) y el producto (Compuesto 3) se sometió a destilación al vacío (tubo de bolas,  $100\text{-}110^{\circ}\text{C}$ ,  $0,05\text{ mm}$  de Hg). Rendimiento de 40,9 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,40 ppm (s, 9H), 2,02 ppm (s, 3H), 2,42 ppm (t, 2H), 3,58 ppm (m a, 4H), 4,08 ppm (m, 2H).

20 Esquemáticamente, la reacción puede representarse como se indica a continuación:



35 Al Compuesto 3 (30,0 g, 0,19 mol) se le añadió ácido trifluoroacético (40 ml) y la solución se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, los productos volátiles se retiraron por destilación a presión reducida (evaporador rotatorio,  $t = 60^{\circ}\text{C}$ ) y el producto se disolvió en 400 ml de diclorometano. La solución se lavó dos veces con una solución al 5% de NaCl, se secó con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para proporcionar el Compuesto 4. Rendimiento de 19,1 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 2,01 ppm (s, 3H), 2,44 ppm (t, 2H), 3,57 ppm (m, 2H), 3,61 ppm (t, 2H) 4,09 ppm (m, 2H).

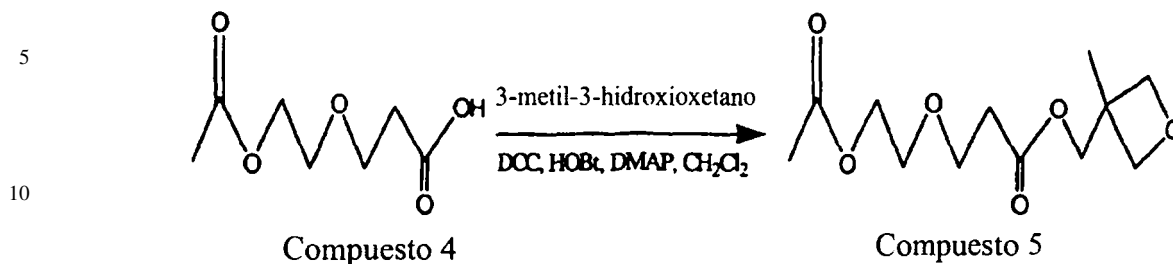
45 Esquemáticamente, la reacción puede representarse como se indica a continuación:



60 A una solución del Compuesto 4 (19,1 g, 0,108 mol) se le añadieron 3-metil-3-hidroxioxetano (17,6 g, 0,172 mol), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, 1,6 g) y DMAP (3,6 g) en diclorometano anhidro (500 ml), junto con 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC, solución 1,0 M en diclorometano, 114 ml, 0,114 mol) a  $0^{\circ}\text{C}$  y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después, la mezcla se filtró para retirar la 1,3-diciclohexilurea precipitada y la solución se lavó con 250 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 5%. Después, el diclorometano se retiró por destilación a presión reducida (evaporador rotatorio) y el producto (Compuesto 5) se sometió a destilación al vacío (tubo de bolas,  $125\text{-}135^{\circ}\text{C}$ ,  $0,05\text{ mm}$  de Hg). Rendimiento de 18,5 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,26 ppm (s, 3H), 2,00 ppm (s, 3H), 2,59 ppm (t, 2H), 3,57 ppm (m, 2H), 3,66 ppm (t, 2H), 4,08 ppm (m, 2H), 4,14 ppm (s, 2H), 4,23 ppm (d, 2H), 4,38 ppm (d, 2H).

## ES 2 315 526 T3

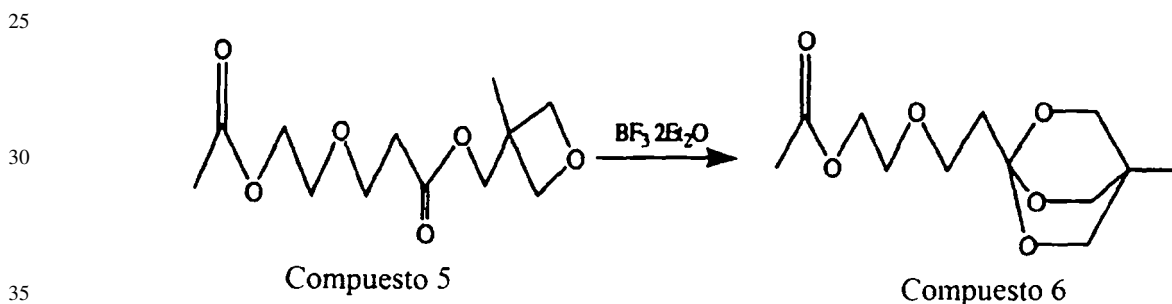
Esquemáticamente, la reacción puede representarse como se indica a continuación:



15 Después, el compuesto 5 (15,0 g, 0,08 mol) se disolvió en diclorometano anhidro (75 ml), la solución se enfrió a 0°C y se añadió dietileterato de trifluoruro de boro (1,65 ml). Después, la mezcla se agitó durante 3 horas a 0°C. Se añadió trietilamina (7,5 ml), la mezcla se agitó durante 10 minutos y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El producto en bruto (Compuesto 6) se disolvió en éter etílico (150 ml) y la solución se filtró para retirar las impurezas sólidas. Después, el éter se retiró por destilación. Rendimiento de 12,9 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,74 ppm (s, 3H), 1,83 ppm (t, 2H), 2,00 ppm (s, 3H), 3,46 ppm (t, 2H), 3,52 ppm (m, 2H), 3,80 ppm (s, 2H), 3,52 ppm (t, 6H), 4,07 ppm (m, 2H).

20

Esquemáticamente, la reacción puede representarse como se indica a continuación:

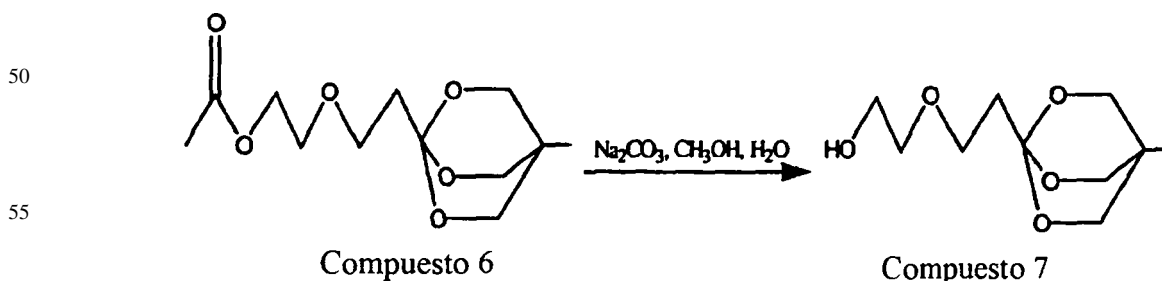


Una mezcla del compuesto 6 (12 g), alcohol etílico (80 ml) y una solución acuosa al 50% de hidróxido potásico (8 g) se agitó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Después, el disolvente se retiró por destilación a presión reducida (evaporador rotatorio). El producto en bruto se disolvió en 400 ml de diclorometano y la solución se lavó con una solución acuosa al 5% de cloruro sódico. Después, la solución se secó con  $MgSO_4$  anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida (evaporador rotatorio), dando 8,0 g de un producto líquido incoloro (Compuesto 7). RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,74 ppm (s, 3H), 1,83 ppm (t, 2H), 3,35 ppm (m, 2H), 3,46 ppm (m, 4H), 3,80 ppm (s, 6H), 3,52 ppm (t, 6H), 4,54 ppm (t, 1H).

40

45

Esquemáticamente, la reacción puede representarse como se indica a continuación:



### 60 Ejemplo 5

*Formación de Ácido PEG<sub>(3,500 Da)</sub>- $\alpha$ -hidroxi- $\omega$ -butanoico, Orto Éster de OBO Usando el Compuesto 1 como Iniciador para la Polimerización*

65 El Compuesto 1 (0,564 g, 0,00243 mol), tetrahidrofurano (THF, 200 ml) y una solución de 0,3 mol/l de naftaleno potásico-tetrahidrofurano (10 ml, 0,00300 mol) se añadieron a un reactor de vidrio y la mezcla se agitó durante 3 minutos en una atmósfera de argón. A esta solución se le añadió óxido de etileno (8,8 g, 0,20 mol) y la mezcla de

## ES 2 315 526 T3

reacción se agitó durante 44 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se purgó con argón y se añadió tampón fosfato 0,1 M (pH = 8, 100 ml). La capa de THF se separó y se desechó. El naftaleno se retiró de la solución por extracción en éter etílico. Después, el producto se extrajo con diclorometano (3 x 50 ml). El extracto se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. Rendimiento de 7,2 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,73 ppm (s,  $-CH_3$  de OBO, 3H), 1,57 ppm (m,  $-CH_2-CH_2-CO-$ , 4H), 3,51 ppm (s, estructura PEG), 3,80 ppm (s,  $CH_2$  de OBO, 6H), 4,58 ppm (t, OH, 1H).

### Ejemplo 6

#### Formación de Ácido $PEG_{(3,500 Da)}$ - $\alpha$ -hidroxi- $\omega$ -butanoico

El producto del Ejemplo 5 (es decir, ácido  $PEG_{(3,500 Da)}$ - $\alpha$ -hidroxi- $\omega$ -butanoico, orto éster de OBO, 7,0 g) se disolvió en agua destilada (100 ml). El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el pH se ajustó de nuevo a 12 mediante la adición de hidróxido sódico 1 M y la solución se agitó durante dos horas mientras se mantenía a un valor de pH igual a 12 mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1 M. Después, el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5%, después de lo cual el producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a éter etílico. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 6,6 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (c,  $CH_2-CH_2-COO-$ , 2H) 2,24 ppm (t,  $-CH_2-COO-$ , 2H), 3,51 ppm (s, estructura PEG), 4,58 ppm (t,  $-OH$ , 1H).

### Ejemplo 7

#### Formación de Ácido $mPEG_{(3,500 Da)}$ -butanoico, Orto Éster de OBO

Una mezcla del producto del Ejemplo 5 (es decir, ácido  $PEG_{(3,500 Da)}$ - $\alpha$ -hidroxi- $\omega$ -butanoico, orto éster de OBO, 7,0 g, 0,002 mol), tolueno (100 ml), una solución 1,0 M de terc-butóxido potásico en terc-butanol (10 ml, 0,01 mol) y p-toluenosulfonato de metilo (1,49 g, 0,008 mol) se agitó durante una noche a 45°C. Los disolventes se retiraron por destilación a presión reducida (evaporador rotatorio). El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se añadió a éter etílico frío. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 6,2 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,73 ppm (s,  $-CH_3$  de OBO, 3H), 1,57 ppm (m,  $-CH_2-CH_2-CO-$ , 4H), 3,24 ppm (s,  $-OCH_3$ , 3H), 3,51 ppm (s, estructura PEG), 3,80 ppm (s,  $CH_2$  de OBO, 6H).

### Ejemplo 8

#### Formación de Ácido $mPEG_{(3,500 Da)}$ -butanoico

El producto del Ejemplo 7 (ácido  $mPEG_{(3,500 Da)}$ -butanoico, orto éster de OBO, 6,0 g) se disolvió en agua destilada (60 ml). El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el pH se ajustó de nuevo a 12 con hidróxido sódico 1 M y la solución se agitó durante 2 horas. El pH de 12 se mantuvo mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1 M. Después de dos horas de agitación y manteniendo un valor de pH de 12, el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5% y el producto se extrajo con diclorometano. Después, el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a éter etílico. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 5,6 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (c,  $CH_2-CH_2-COO-$ , 2H) 2,24 ppm (t,  $-CH_2-COO-$ , 2H), 3,24 ppm (s,  $CH_3O-$ , 3H), 3,51 ppm (s, estructura PEG).

### Ejemplo 9

#### Formación de Ácido $PEG_{(5,000 Da)}$ - $\alpha$ -hidroxi- $\omega$ -propanoico, Orto Éster de OBO Usando el Compuesto 7 como Iniciador para la Polimerización

El Compuesto 7 (0,53 g, 0,00243 mol), tetrahidrofurano (THF, 200 ml) y una solución de 0,3 mol/l de naftaleno potásico-tetrahidrofurano (10 ml, 0,00300 mol) se añadieron a un reactor de vidrio y la mezcla se agitó durante tres minutos en una atmósfera de argón. A esta solución se le añadió óxido de etileno (12,2 g, 0,277 mol) y la mezcla de reacción se agitó durante 44 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se purgó con argón y se añadió tampón fosfato 0,1 M (pH = 8, 100 ml). La capa de THF se separó y después se desechó. El naftaleno se retiró de la solución por extracción con éter etílico. Después, el producto se extrajo con diclorometano (3 x 50 ml). El extracto se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. Rendimiento de 11,7 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,73 ppm (s,  $-CH_3$ , 3H), 1,82 ppm (t,  $-CH_2-CO-$ , 2H), 3,51 ppm (s, estructura PEG), 3,80 ppm (s,  $CH_2$  de OBO, 6H), 4,57 ppm (t,  $-OH$ , 1H).

## ES 2 315 526 T3

### Ejemplo 10

#### *Formación de Ácido PEG<sub>(5,000 Da)</sub>- $\alpha$ -hidroxi- $\omega$ -propanoico*

5 El producto del Ejemplo 9 (ácido PEG<sub>(5,000 Da)</sub>- $\alpha$ -hidroxi- $\omega$ -propanoico, orto éster de OBO, 5,0 g) se disolvió en agua destilada (75 ml). El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el pH se ajustó de nuevo a 12 con hidróxido sódico 1 M y la solución se agitó durante dos horas. El pH de la solución se mantuvo a un pH igual a 12 mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1 M. Después de dos horas de agitación y manteniendo el pH a 12, el pH de la solución se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5% y después el producto se extrajo con diclorometano. Después, el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a éter etílico. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 4,4 g. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 2,43 ppm (t, -CH<sub>2</sub>-COO-, 2H), 3,51 ppm (s, estructura PEG), 4,58 ppm (t, -OH, 1H).

15

### Ejemplo 11

#### *Formación de Ácido mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-propanoico, Orto Éster de OBO*

20 Una mezcla del producto del Ejemplo 9 (ácido PEG<sub>(5,000 Da)</sub>- $\alpha$ -hidroxi- $\varepsilon$ -propanoico, orto éster de OBO, 4,0 g, 0,0008 mol), tolueno (50 ml), solución 1,0 M de terc-butóxido potásico en terc-butanol (8 ml, 0,008 mol) y p-toluenosulfonato de metilo (1,49 g, 0,008 mol) se agitó durante una noche a 50°C. Después, los disolventes se retiraron por destilación a presión reducida (evaporador rotatorio). Después, el producto en bruto se disolvió en diclorometano y se añadió a éter etílico frío. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 3,6 g. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 0,73 ppm (s, -CH<sub>3</sub>, 3H), 1,82 ppm (t, -CH<sub>2</sub>-CO-, 2H), 3,24 ppm (s, CH<sub>3</sub>O-, 3H), 3,51 ppm (s, estructura PEG), 3,80 ppm (s, CH<sub>2</sub> de OBO, 6H).

25

### Ejemplo 12

#### *Formación de Ácido mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-propanoico*

30 El producto del Ejemplo 11 (ácido mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-propanoico, orto éster de OBO, 6,0 g) se disolvió en agua destilada (60 ml). El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el pH se ajustó de nuevo a 12 con hidróxido sódico 1 M y la solución se agitó durante dos horas. Se mantuvo un pH de 12 mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1 M. Después de dos horas de agitación y manteniendo a un pH de 12, el pH de la solución se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5% y después el producto se extrajo con diclorometano. Después, el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a éter etílico. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 5,6 g. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 2,43 ppm (t, -CH<sub>2</sub>-COO-, 2H), 3,24 ppm (s, CH<sub>3</sub>O-, 3H), 3,51 ppm (s, estructura PEG).

35

### Ejemplo 13

#### *Formación de Ácido mPEG<sub>(20,000 Da)</sub>-butanoico*

45 Una solución de mPEG<sub>(20,000 Da)</sub> (2,0 g, 0,0001 mol) (NOF Corporation) en tolueno (30 ml) se secó azeotrópicamente mediante retirada por destilación 15 ml de tolueno. Se añadieron una solución 1,0 M de terc-butóxido potásico en terc-butanol (0,80 ml, 0,0008000 mol) y el producto del Ejemplo 2 [1-(3-bromopropil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo [2,2,2]octano, 0,15 g, 0,0005973 mol] y la mezcla se agitó durante una noche a 70°C en una atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en agua destilada (40 ml). El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el pH se ajustó de nuevo a 12 con hidróxido sódico 1 M y la solución se agitó durante dos horas manteniendo el pH a 12 mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1 M. Después, el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5% y el producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a éter etílico. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 1,6 g. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,72 ppm (c, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-), 2,24 ppm (t, -CH<sub>2</sub>-COO-), 3,24 ppm (s, -OCH<sub>3</sub>), 3,51 ppm (s, estructura PEG). Cromatografía de intercambio aniónico: ácido mPEG<sub>(20,000)</sub>-butanoico al 98,6%, m-PEG-20K al 1,4%.

50

### Ejemplo 14

#### *Formación de 4-Bromohexanoato Éster de 3-Metil-3-hidroximetiloxetano (PM = 251,12)*

55

Se disolvió 3-metil-3-hidroximetiloxetano (20,5 g, 0,201 mol) en diclorometano anhidro (250 ml) y se añadió piridina (20,0 ml, 0,12 mol). La solución se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota cloruro de 4-bromohexanoilo (42,7

## ES 2 315 526 T3

g, 0,200 mol) disuelto en diclorometano anhidro (50 ml) durante 20 minutos. Después, la mezcla se agitó durante una noche en una atmósfera de argón. Después, la mezcla de reacción se lavó con agua y se secó con sulfato de magnesio anhidro. Después, el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. Rendimiento de 56,8 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,26 ppm (s, 3H), 2,07 ppm (m, 2H), 2,51 ppm (t, 2H), 3,56 ppm (t, 2H), 4,14 ppm (s, 2H), 4,24 ppm (d, 2H), 4,38 ppm (d, 2H).

### Ejemplo 15

#### 10 Formación de 1-(3-Bromopentil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2]octano

El producto del Ejemplo 14 (4-bromohexanoato éster de 3-metil-3-hidroxi metiloxetano en bruto, 20,1 g, 0,08 mol) se disolvió en diclorometano anhidro (100 ml), la solución se enfrió a 0°C y se añadió dietiléterato de trifluoruro de boro (2,5 ml, 0,022 mol). Después, la mezcla se agitó durante 4 horas a 0°C. Se añadió trietilamina (12 ml), la mezcla se agitó durante 15 minutos y después el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. Después, el producto en bruto se disolvió en éter etílico (180 ml) y la solución se filtró para retirar las impurezas sólidas. Después, el éter se retiró por destilación y el producto se destiló a presión reducida (tubo de bolas, 110-115°C, 0,05 mm de Hg). Rendimiento de 15,0 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,74 ppm (s, 3H), 1,68 ppm (m, 2H), 1,88 ppm (m, 2H), 3,52 ppm (t, 2H), 3,81 ppm (s, 6H).

### Ejemplo 16

#### 25 Formación de Ácido mPEG<sub>(2,000 Da)</sub>-hexanoico

Una solución de mPEG<sub>(2,000 Da)</sub> (2,0 g, 0,0010 mol) (NOF Corporation) en tolueno (30 ml) se secó azeotrópicamente mediante retirada por destilación de 15 ml de tolueno. Se añadieron una solución 1,0 M de terc-butóxido potásico en terc-butanol (0,60 ml, 0,0006000 mol) y el producto del Ejemplo 16 [1-(3-bromopentil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2]octano, 0,15 g, 0,0005973 mol] y la mezcla se agitó durante una noche a 70°C en una atmósfera de argón. Después, el disolvente se retiró por destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en agua destilada (40 ml). El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el pH se ajustó de nuevo a 12 con hidróxido sódico 1 M y la solución se agitó durante 2 horas mientras se mantenía el pH igual a 12 mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1 M. Después, el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5% y el producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a éter etílico. El precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 1,6 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (c,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$ ) 2,24 ppm (t,  $\text{-CH}_2\text{-COO-}$ ), 3,24 ppm (s,  $\text{-OCH}_3$ ), 3,51 ppm (s, estructura PEG).

### 40 Ejemplo 17

#### Formación de mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-O-CH[CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH]<sub>2</sub>

Una solución de mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-O-CH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> (2,0 g, 0,0004 mol) (preparada a partir de mesilato de mPEG<sub>(5,000 Da)</sub> y 1,3-dibenciloxi-2-propanol de acuerdo con el método descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos US 2001/0011115) en tolueno (30 ml) se secó azeotrópicamente mediante la retirada por destilación de 15 ml de tolueno. Se añadieron una solución 1,0 M de terc-butóxido potásico en terc-butanol (2,4 ml, 0,0024 mol) y 1-(3-bromopropil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2]octano, 0,60 g, 0,0024 mol) (preparado como se ha descrito en el Ejemplo 2) y la mezcla se agitó durante una noche a 70°C en una atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en agua destilada (30 ml). El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el pH se ajustó de nuevo a 12 con hidróxido sódico 1 M y la solución se agitó durante 1,5 horas mientras se mantenía un pH igual a 12 mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1 M. Después, el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5% y el producto se extrajo con diclorometano. Después, el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a éter etílico. El precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 1,6 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (c,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$ ) 2,24 ppm (t,  $\text{-CH}_2\text{-COO-}$ ), 3,24 ppm (s,  $\text{-OCH}_3$ ), 3,51 ppm (s, estructura PEG).

### 60 Ejemplo 18

#### Formación de Ácido mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-butanoico

Una solución de mPEG<sub>(5,000 Da)</sub> (2,0 g, 0,0004 mol) (NOF Corporation) en tolueno (20 ml) se secó azeotrópicamente mediante la retirada por destilación del disolvente a sequedad a presión reducida. El material secado se disolvió en 15 ml de tolueno anhidro. Se añadieron una solución 1,0 M de terc-butóxido potásico en terc-butanol (1,2 ml, 0,0012 mol) y 4-bromoortobutirato de trimetilo (Sigma-Aldrich, 0,25 g, 0,0011 mol) y la mezcla se agitó durante una noche a 70°C en una atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida y el residuo se disolvió

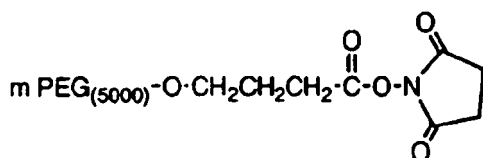
## ES 2 315 526 T3

en agua destilada (40 ml). El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el pH se ajustó de nuevo a 12 con hidróxido sódico 1 M y la solución se agitó durante 2 horas manteniendo un pH igual a 12 mediante la adición periódica de hidróxido sódico 1 M. El pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5% y el producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y se añadió a éter etílico. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento de 1,5 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (c,  $\underline{CH}_2$ -CH<sub>2</sub>-COO-), 2,24 ppm (t, -CH<sub>2</sub>-COO-), 3,24 ppm (s, -OCH<sub>3</sub>), 3,51 ppm (s, estructura PEG).

### 10 Ejemplo 19

#### *Formación de Butanoato de mPEG-succinimidilo*

El producto del Ejemplo 18 (ácido mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-butanoico) se disuelve en cloruro de metileno para formar una solución. Después, se disuelven N-hidroxisuccinimida y N,N-diciclohexilcarbodiimida en 2 ml de cloruro de metileno y la mezcla se añade a la solución, que después se agita durante una noche. Después, la mezcla se filtra y el filtrado se concentra al vacío. El producto se precipita mediante la adición del filtrado a isopropanol y después se recoge por filtración y se seca al vacío. El producto se representa como se indica a continuación:



### Ejemplo 20

#### 30 *Formación de Lisozima PEGilada*

La lisozima sirve como un modelo de proteína útil para reacciones de conjugación. Por consiguiente, otras proteínas de agente activo pueden sustituirse por lisozima en este Ejemplo.

Se añade solución de lisozima (4 ml, 3 mg/ml) en 50 ml de tampón a pH 6,5 (fosfato sódico 50 mM/NaCl 50 mM) a 20 mg de N-succinimidil éster del ácido mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-butanoico (el producto del Ejemplo 19, butanoato de mPEG-succinimidilo). El progreso de la reacción se controla por electroforesis capilar durante el transcurso de seis horas para controlar la reacción. Después de las seis horas, la electroforesis capilar muestra evidencia de lisozima PEGilada.

### 40 Ejemplo 21

#### *Formación de Lisozima PEGilada*

La lisozima sirve como un modelo de proteína útil para reacciones de conjugación. Por consiguiente, otras proteínas de agente activo pueden sustituirse por lisozima en este Ejemplo.

El producto del Ejemplo 18 (ácido mPEG<sub>(5,000 Da)</sub>-butanoico) se disuelve en 20 ml de cloruro de metileno a temperatura ambiente y se forma una solución. Después, la solución se trata con 1,3-diisopropilcarbodiimida, 4-dimetilaminopiridina y lisozima a 0°C. Después, la solución de reacción se calienta a temperatura ambiente después de varias horas y se mantiene a la temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. Después, la mezcla de reacción se lava con ácido clorhídrico, se seca y se evapora para producir el producto conjugado.

## REIVINDICACIONES

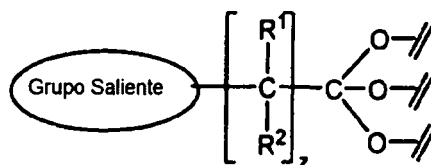
1. Un método para preparar un orto éster de un polímero soluble en agua que comprende la etapa de hacer reaccionar un segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o un ión tiolato con un orto éster compuesto por un grupo saliente adecuado.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el segmento de polímero soluble en agua tiene al menos un ión alcóxido y se prepara por una reacción de polimerización.

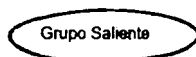
3. El método de la reivindicación 1, en el que el segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o un ión tiolato se prepara por combinación de un segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un resto hidroxilo o tiol con una base adecuada.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la base adecuada se selecciona del grupo que consiste en sodio, potasio, hidruro sódico, hidruro potásico, metóxido sódico, metóxido potásico, terc-butóxido sódico y terc-butóxido potásico.

5. El método de la reivindicación 1, en el que el orto éster compuesto por un grupo saliente adecuado comprende la siguiente estructura:



en la que:

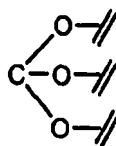


es el grupo saliente adecuado;

(z) es un número entero de 1 a 24;

R<sup>1</sup>, en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido;

R<sup>2</sup>, en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido; y



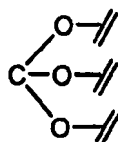
representa un residuo de un resto orto éster.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el grupo saliente adecuado se selecciona del grupo que consiste en halógenos y ésteres de sulfonato.

7. El método de la reivindicación 5, en el que el grupo saliente adecuado se selecciona del grupo que consiste en bromo, cloro y yodo.

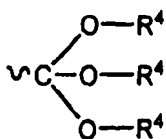
8. El método de la reivindicación 5, en el que el grupo saliente adecuado se selecciona del grupo que consiste en metanosulfonato, trifluorometanosulfonato, triclorometanosulfonato, 2,2,2-trifluoroetanosulfonato, 2,2,2-tricloroetanosulfonato y para-toluenosulfonato.

9. El método de la reivindicación 5, en el que el resto



está compuesto por la siguiente estructura:

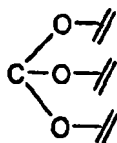
5



10 en la que cada  $\text{R}^4$  es un radical orgánico seleccionado independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

10. El método de la reivindicación 5, en el que el resto

15

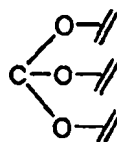


20

está en forma de una estructura cíclica.

11. El método de la reivindicación 10, en el que el resto

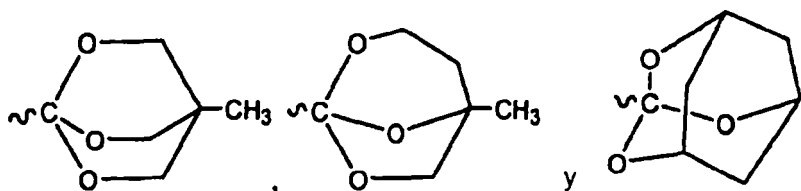
25



30

se selecciona del grupo que consiste en

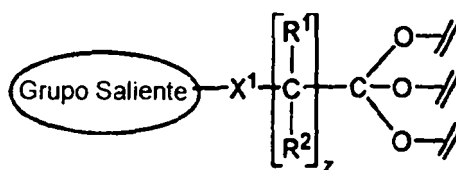
35



40

12. El método de la reivindicación 5, en el que el orto éster compuesto por un grupo saliente adecuado comprende la siguiente estructura:

45



50

55 en la que:



60

es el grupo saliente adecuado;

$\text{X}^1$  es un resto espaciador;

65

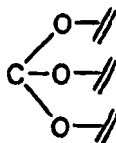
(z) es un número entero de 1 a 24;

$\text{R}^1$ , en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido;

## ES 2 315 526 T3

R<sup>2</sup>, en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido; y

5



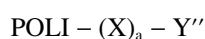
10

representa un residuo de un resto orto éster.

13. El método de la reivindicación 5, en el que el resto orto éster compuesto por un grupo saliente adecuado se prepara por una reacción de polimerización realizada sobre una molécula iniciadora que tiene un resto orto éster.

15

14. El método de la reivindicación 1, en el que el segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o un ión tiolato está compuesto por la siguiente estructura:



20

en la que POLI es un segmento de polímero soluble en agua;

(a) es cero o uno;

25

X, cuando está presente, es un resto espaciador; e

Y es O o S.

30

15. El método de la reivindicación 14, en el que el segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o un ión tiolato está compuesto por la siguiente estructura:



35

en la que:

(m) es de 2 a 4000;

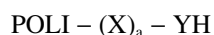
Y es O o S; y

40

R<sup>5</sup> es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

16. El método de la reivindicación 3, en el que el segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un grupo hidroxilo o tiol está compuesto por la siguiente estructura:

45



en la que:

50

POLI es un segmento de polímero soluble en agua;

(a) es cero o uno;

X, cuando está presente, es un resto espaciador; e

55

Y es O o S.

17. El método de la reivindicación 16, en el que el segmento de polímero soluble en agua tiene un grupo hidroxilo y está compuesto por la siguiente estructura:

60



en la que:

65

(m) es de 2 a 4000; y

R<sup>5</sup> es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

## ES 2 315 526 T3

18. El método de la reivindicación 17, en el que el segmento de polímero soluble en agua que tiene un grupo hidroxilo está compuesto por la siguiente estructura:



5

en la que (m) es de 2 a 4000.

19. Un método para preparar un ácido carboxílico de un polímero soluble en agua que comprende las etapas de

10

(a) hacer reaccionar un segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos unión alcóxido o un ión tiolato con un orto éster compuesto por un grupo saliente adecuado para formar un orto éster de un polímero soluble en agua; y

15

(b) someter el orto éster de un polímero soluble en agua formado en la etapa (a) al menos a una etapa de hidrólisis para proporcionar el ácido carboxílico correspondiente de un polímero soluble en agua.

20. El método de la reivindicación 19, en el que el segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un ión alcóxido o un ión tiolato se prepara por combinación de un segmento de polímero soluble en agua que tiene al menos un resto hidroxilo o tiol con una base adecuada.

20

21. El método de la reivindicación 19, que comprende adicionalmente la etapa de recuperar el ácido carboxílico del polímero soluble en agua.

22. El método de la reivindicación 19, que comprende adicionalmente la etapa de purificar el ácido carboxílico del polímero soluble en agua.

25

23. El método de la reivindicación 19, en el que la conversión del orto éster del polímero soluble en agua en el ácido carboxílico del polímero soluble en agua es de aproximadamente el 85% o mayor.

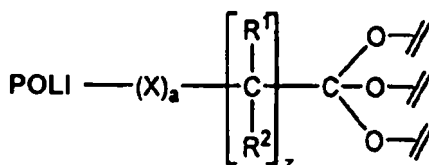
30

24. El método de la reivindicación 19, en el que al menos una etapa de hidrólisis comprende dos etapas de hidrólisis.

25. El método de la reivindicación 24, en el que las dos etapas de hidrólisis comprenden una etapa de hidrólisis de ácido inicial seguido de una hidrólisis de base.

35

26. Un polímero que comprende la siguiente estructura:



40

45 en la que:

POLI es un segmento de polímero soluble en agua;

(a) es cero o uno;

50

X, cuando está presente, es un resto espaciador;

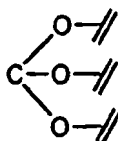
(z) es un número entero de 1 a 24;

55

R<sup>1</sup>, en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido;

R<sup>2</sup>, en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido; y

60



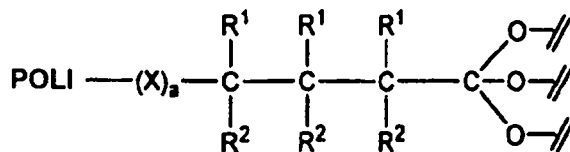
65

representa un residuo de un resto orto éster cíclico.

ES 2 315 526 T3

27. El polímero de la reivindicación 26, en el que (z) es igual a tres y el polímero está compuesto por la siguiente estructura:

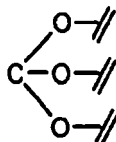
5



10

en la que POLI, X, (a), cada R<sup>1</sup>, cada R<sup>2</sup> y

15

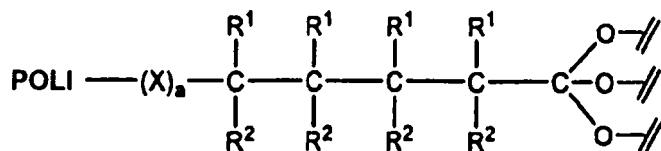


20

son como se han definido anteriormente.

28. El polímero de la reivindicación 26, en el que (z) es igual a cuatro y el polímero está compuesto por la siguiente estructura:

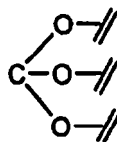
25



30

en la que POLI, X, (a); cada R<sup>1</sup>, cada R<sup>2</sup> y

35

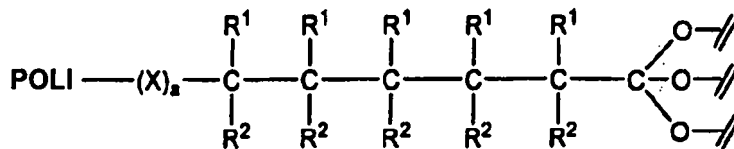


40

son como se han definido anteriormente.

29. El polímero de la reivindicación 26, en el que (z) es igual a cinco y el polímero está compuesto por la siguiente estructura:

45

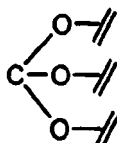


50

55

en la que POLI, X, (a), cada R<sup>1</sup>, cada R<sup>2</sup> y

60



65

son como se han definido anteriormente.

## ES 2 315 526 T3

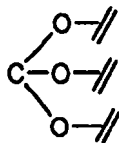
30. El polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 27-29 en el que el R<sup>1</sup> unido al carbono  $\alpha$  del carbono del resto orto éster es alquilo, todas las demás variables R<sup>1</sup> son H y todas las variables R<sup>2</sup> son H.

31. El polímero de la reivindicación 26, en el que (a) es igual a cero.

32. El polímero de la reivindicación 26, en el que (a) es igual a uno.

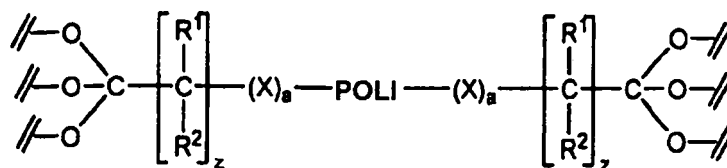
33. El polímero de la reivindicación 32, en el que X se selecciona independientemente del grupo que consiste en -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>h</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-, -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)- y -O-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)-, grupo cicloalquilo bivalente, un aminoácido, -N(R<sup>6</sup>)- y combinaciones de dos o más de cualquiera de los anteriores, donde R<sup>6</sup> es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido, (h) es de cero a seis y (j) es de cero a 20.

34. El polímero de la reivindicación 26, en el que el resto

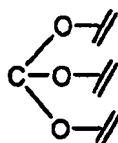


es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.

35. El polímero de la reivindicación 26, que comprende la siguiente estructura:



en la que POLI, cada X, cada (a), cada R<sup>1</sup>, cada R<sup>2</sup> y cada

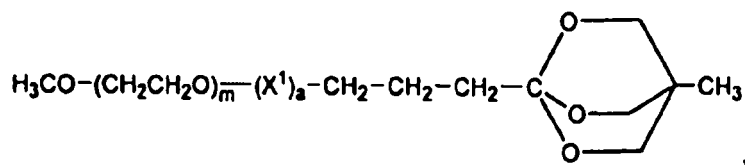


son como se han descrito anteriormente.

ES 2 315 526 T3

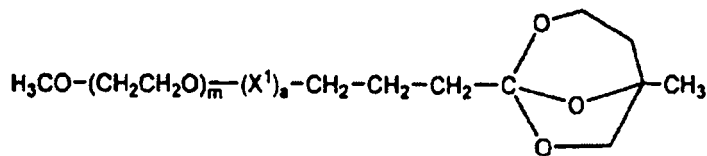
36. El polímero de la reivindicación 26, seleccionado del grupo que consiste en

5



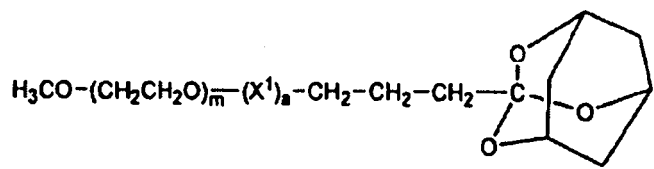
10

15



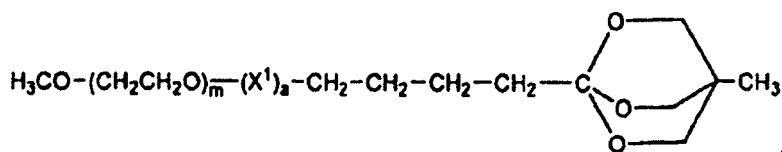
20

25



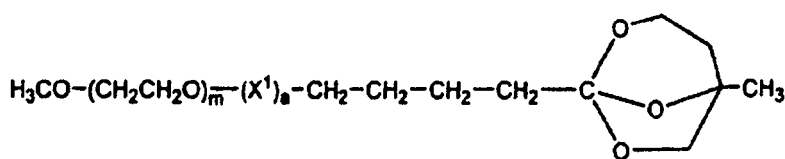
30

35



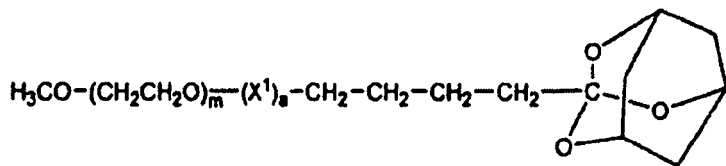
40

45



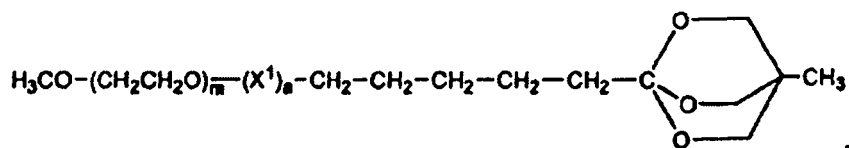
50

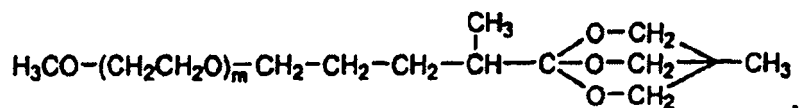
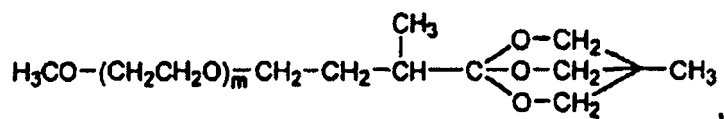
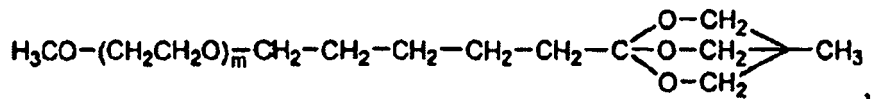
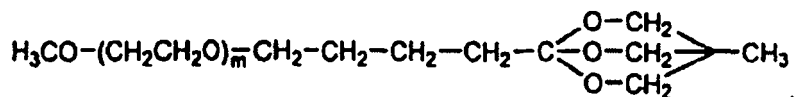
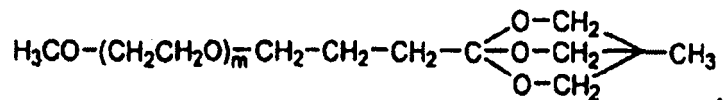
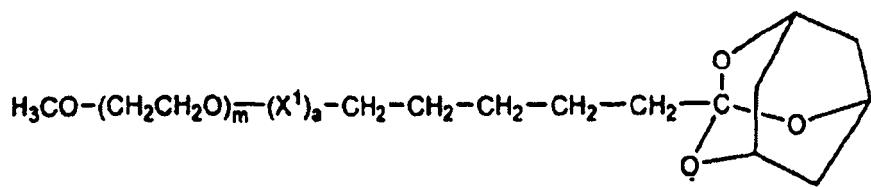
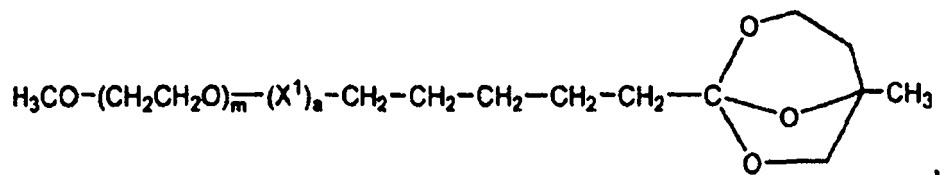
55



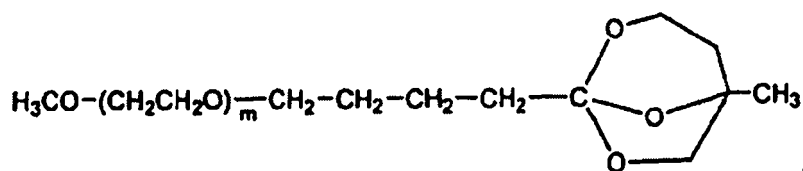
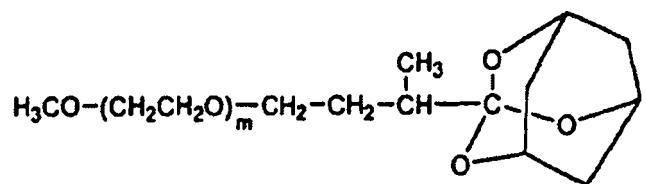
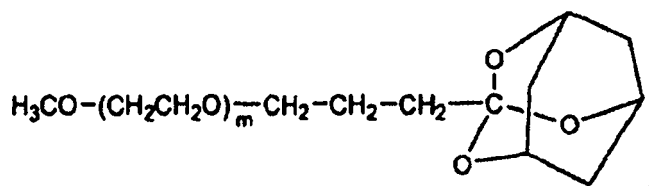
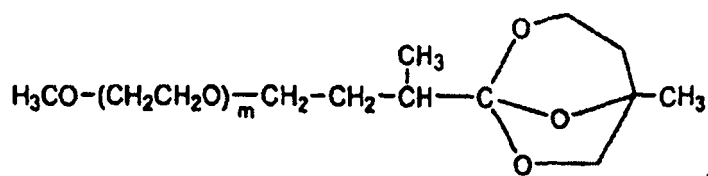
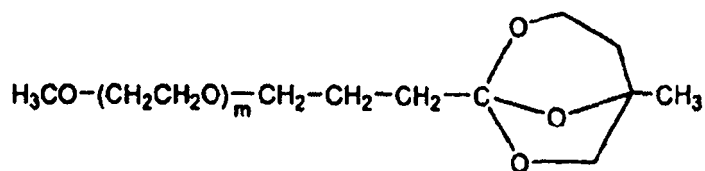
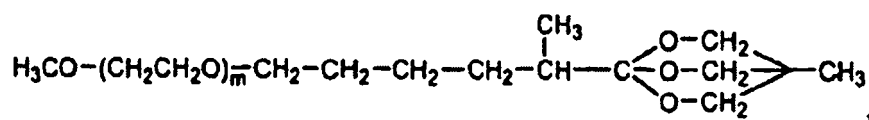
60

65



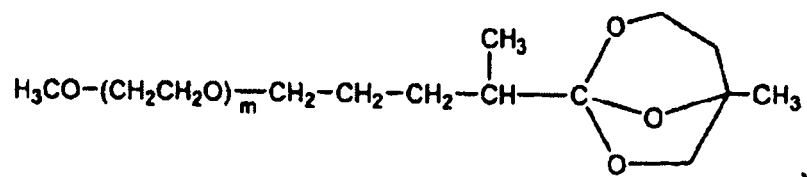


ES 2 315 526 T3

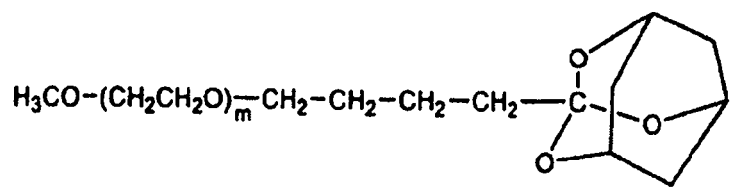


ES 2 315 526 T3

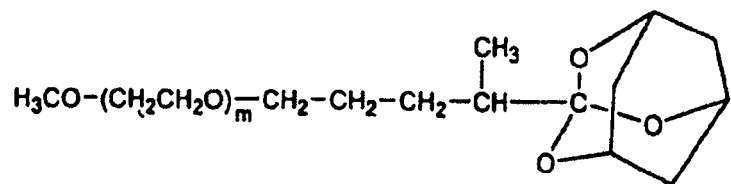
5



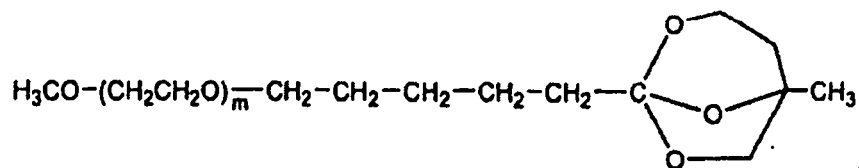
10



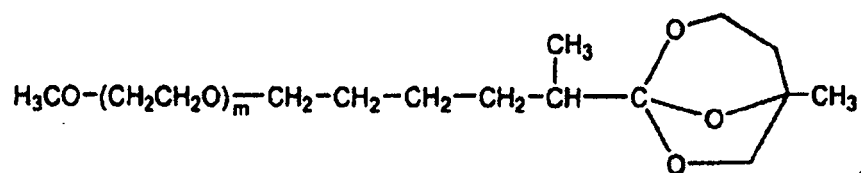
20



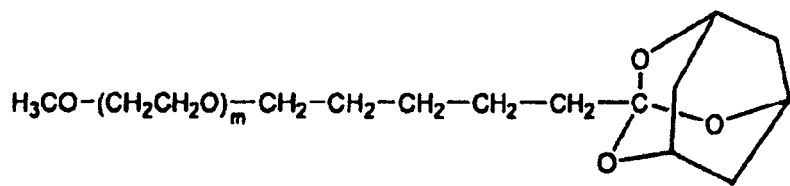
30



40



50

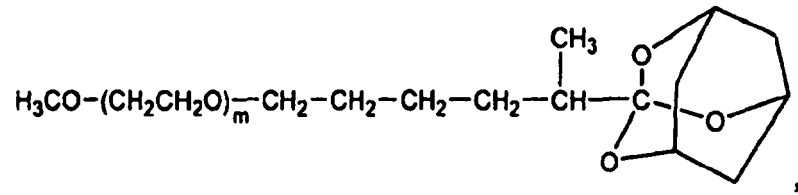


60

65

y

5



10

donde (m) es de 2 a 4000, (a) es cero o uno y X<sup>1</sup>, cuando está presente, es un resto espaciador.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65