

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 308 032**

51 Int. Cl.:

C08G 65/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2003 PCT/US2003/041705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2004 WO04060966**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2003 E 03800397 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **12.10.2016 EP 1578841**

54 Título: **Derivados poliméricos de ácido maleámico y sus bioconjugados**

30 Prioridad:

31.12.2002 US 437251 P
05.05.2003 US 468340 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
24.04.2017

73 Titular/es:

NEKTAR THERAPEUTICS (100.0%)
455 Mission Bay Boulevard South, Suite 100
San Francisco California 94158, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

DESCRIPCION

Derivados poliméricos de ácido maleámico y sus bioconjugados**5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere generalmente al campo de la química de polímeros, y más específicamente a productos conjugados de agentes activos químicamente estables preparados a partir de polímeros solubles en agua con funcionalidad maleimida o ácido maleámico tales como polietilenglicol, y a métodos para sintetizar, caracterizar, y utilizar tales reactivos poliméricos y productos conjugados.

Antecedentes de la invención

Debido a los recientes avances en biotecnología, las proteínas terapéuticas y otras biomoléculas, p. ej. anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, se pueden preparar ahora a gran escala, haciendo más ampliamente disponibles tales biomoléculas. Desafortunadamente, la utilidad clínica de biomoléculas terapéuticas potenciales es impedida a menudo por su rápida degradación proteolítica, baja biodisponibilidad, inestabilidad tras la fabricación, el almacenamiento o la administración, o por su inmunogenecidad. Debido al continuo interés en la administración de proteínas y otras biomoléculas para su uso terapéutico, se han explorado diferentes enfoques para superar estas deficiencias.

Un enfoque que ha sido explorado ampliamente es la modificación de proteínas y otras moléculas potencialmente terapéuticas mediante unión covalente de un polímero soluble en agua tal como polietilenglicol o "PEG" (Abuchowski, A., et al, J. Biol. Chem. 252 (11), 3579 (1977); Davis, S., et al., Clin. Exp. Immunol., 46, 649-652 (1981). Se ha demostrado, en muchos casos, que propiedades biológicas de las proteínas modificadas con PEG, también referidas como productos conjugados de PEG o proteínas pegiladas son mejoradas considerablemente sobre las de sus contrapartes no pegiladas (Herman, et al., Macromol. Chem. Phys., 195, 203-209 (1994). Se ha demostrado que las proteínas modificadas con polietilenglicol poseen mayores tiempos de circulación en el organismo debido al aumento de resistencia a la degradación proteolítica, y también poseen un aumento de termoestabilidad (Abuchowski, A., et al., J. Biol. Chem., 252, 3582-3586 (1977). Se observa un aumento similar de la bioeficacia con otras biomoléculas, p. ej. anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (Chapman, A., Adv. Drug Del. Rev. 54, 531-545 (2002)).

Típicamente, el anclaje de polietilenglicol a un fármaco u otra superficie se completa utilizando un derivado de PEG activado, es decir, un PEG que tiene al menos un extremo activado adecuado para la reacción con un centro nucleofílico de una biomolécula (p. ej., lisina, cisteína y restos de proteínas similares). Son empleados más comúnmente los métodos basados en la reacción de un PEG activado con los grupos amino de una proteína, tales como aquellos presentes en las cadenas laterales de la lisina de las proteínas. Los polietilenglicoles que tienen grupos terminales activados adecuados para la reacción con los grupos amino de las proteínas incluyen PEG-aldehídos (Harris, J. M., Herati, R.S., Polym Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem), 32(1), 154-155 (1991), anhídridos mixtos, ésteres de N-hidroxisuccinimida ésteres, carbonilimidazolidas, y clorocianuratos (Herman, S., et al., Macromol. Chem. Phys. 195, 203-209 (1994)). Si bien se ha demostrado que muchas proteínas conservan la actividad durante la modificación con PEG, en algunos casos, la unión del polímero a través de los grupos amino de la proteína puede no ser deseable, por ejemplo cuando la transformación de los restos de lisina específicos inactiva la proteína (Suzuki, T., et al., Biochimica et Biofisica Acta 788, 248-255 (1984)). Por otra parte, puesto que la mayoría de las proteínas poseen varios grupos amino disponibles/accesibles, los productos conjugados poliméricos formados son típicamente mezclas de especies mono-pegiladas, di-pegiladas, tri-pegiladas etcétera, lo que puede dificultar y también el consumo de tiempo para caracterizarlas y separarlas. Adicionalmente, tales mezclas con frecuencia no se preparan reproduciblemente, lo que puede ocasionar problemas durante la producción a gran escala para la aprobación reguladora y la posterior comercialización.

Un método para evitar estos problemas es emplear un reactivo polimérico selectivo para el sitio que se dirige a grupos funcionales distintos de las aminas. Una diana particularmente atractiva es el grupo tiol, que en las proteínas está presente en el aminoácido cisteína. Las cisteínas son típicamente menos abundantes en las proteínas que las lisinas, reduciendo de este modo la probabilidad de desactivación de la proteína tras la conjugación con estos aminoácidos que contienen tiol. Por otra parte, la conjugación con los sitios de la cisteína se puede llevar a cabo con frecuencia de una manera bien definida, conduciendo a la formación de productos conjugados poliméricos de especie sencilla.

Los derivados de polietilenglicol que tienen un grupo terminal reactivo selectivo para el tiol incluyen maleimidias, vinilsulfonas, yodoacetamidas, tioles, y disulfuros, siendo las maleimidias los más corrientes. Todos estos derivados se han utilizado para el acoplamiento a las cadenas laterales de la cisteína de las proteínas (Zalipsky, S. Bioconjug. Chem. 6, 150-165 (1995); Greenwald, R. B. et al. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17, 101-161 (2000); Herman, S., et al., Macromol. Chem. Phys. 195, 203-209 (1994)). Sin embargo, muchos de estos reactivos no se han explotado ampliamente debido a la dificultad de su síntesis y purificación.

Los derivados de polietilenglicol que tienen un grupo maleimida terminal son uno de los tipos más populares de reactivos selectivos para sulfhidrilo, y son adquiribles comercialmente de varias fuentes. Si

bien no es ampliamente apreciado o reconocido, los Solicitantes han reconocido que muchas PEG-maleimidias manifiestan desafortunadamente inestabilidad hidrolítica durante el almacenamiento, la conjugación, o ambos para un candidato a fármaco. Más concretamente, se ha observado un grado sustancial de hidrólisis del anillo de maleimida, antes y después de la conjugación. Esta inestabilidad puede dar como resultado la formación de especies múltiples de productos conjugados de fármacos en una composición de productos conjugados de fármacos. Probablemente las diferentes especies de productos conjugados de fármacos poseen actividades biológicas similares, pero pueden diferir en sus propiedades farmacocinéticas. Esto es particularmente desventajoso para las composiciones destinadas a la administración al paciente, puesto que las composiciones de fármacos resultantes pueden ser mezclas mal definidas de especies de productos conjugados de fármacos cuyos perfiles de seguridad y acumulación concretos son desconocidos. Por otra parte, debido a diferentes factores que tienen efecto sobre las tasas de hidrólisis, la inconsistencia entre las composiciones por lotes de los productos conjugados de fármacos puede presentar un problema adicional.

Otro problema potencial que ha sido observado por los solicitantes es la despegilación de los productos conjugados preparados a partir de PEG-maleimidias para producir mezclas de fármaco alterado e impurezas de PEG sueltas. Por estas razones, los Solicitantes han encontrado que las PEG-maleimidias pueden ser reactivos no deseables para el acoplamiento a grupos tiol en fármacos diana u otros agentes activos. Intentos previos para estudiar este problema se han centrado en el aumento de la estabilidad una maleimida polimérica haciéndola menos propensa a la hidrólisis (es decir, apertura del anillo). Véase por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. US 2003/0065134.

De este modo, los solicitantes se han dado cuenta de la necesidad continuada en la técnica para el desarrollo de nuevos PEG activados útiles para el acoplamiento una moléculas activas biológicamente, deseablemente en una manera selectiva para el sitio, que superan la carencia de reactivos poliméricos selectivos para tiol disponibles en la actualidad y que son estables durante el almacenamiento y el acoplamiento. Esta invención satisface esas necesidades.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona reactivos poliméricos selectivos para tiol y sus productos conjugados que (i) son estables durante el almacenamiento y acoplamiento, (ii) son resistentes a la hidrólisis, y (iii) manifiestan un aumento de resistencia a la des-pegilación, permitiendo de ese modo la formación de composiciones de productos conjugados de fármacos químicamente estables y bien definidos sustancialmente que se van a describir con mayor detalle más abajo.

La presente invención está basada en el reconocimiento por los Solicitantes de la necesidad de una alternativa a los reactivos de maleimida poliméricos convencionales. En respuesta a esta necesidad, los Solicitantes han ideado un enfoque que es completamente contrario a otros enfoques empleados hasta la fecha. Es decir, en lugar de utilizar un enfoque acostumbrado e intentar evitar la hidrólisis del anillo de maleimida, los Solicitantes han forzado en cambio intencionadamente la apertura del anillo de maleimida, para proporcionar reactivos poliméricos y productos conjugados donde la "maleimida" es convertida en su forma de anillo abierto de ácido succinámico estable.

Más concretamente, en un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método donde un grupo maleimida de un polímero soluble en agua es convertido a la fuerza (intencionadamente) en su forma de ácido maleámico, antes de o más convencionalmente después del acoplamiento a un agente activo. De este modo, se proporciona una composición polimérica de ácido maleámico o ácido succinámico que posee: (i) componentes bien definidos, y (ii) una disminución de la tendencia a la hidrólisis, particularmente en comparación con sus contrapartes de succinimida derivadas de maleimida.

Más específicamente, en un aspecto, la invención proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1.

El anillo de maleimida se abre a la fuerza vía reacción de hidrólisis. Típicamente, la hidrólisis de apertura del anillo se lleva a cabo en presencia de una base que puede estar en solución o en un soporte sólido. Los pH para realizar la hidrólisis se encuentran en un intervalo de aproximadamente 7,5 – 11.

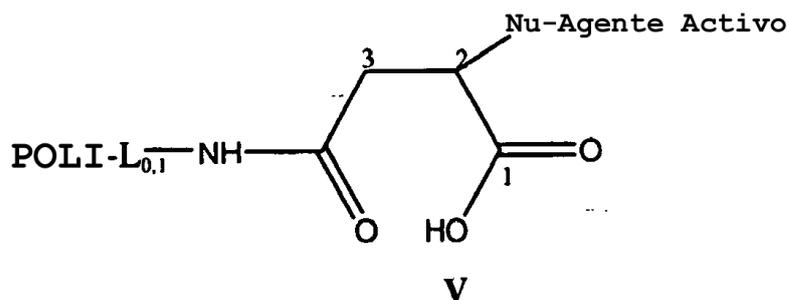
En una realización preferida, la hidrólisis se lleva a cabo en condiciones eficaces para proporcionar una composición de producto conjugado de ácido succinámico polimérico químicamente estable.

En una realización del método, la reacción de hidrólisis se lleva a cabo hasta que se forma al menos aproximadamente 95% del producto conjugado de ácido succinámico polimérico, basándose en la conversión de la forma de anillo cerrado. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo hasta que se forma al menos aproximadamente 95%, o 98% o esencialmente 100% de producto conjugado de ácido succinámico polimérico, es decir, donde el producto conjugado de polímero-maleimida tiene esencialmente el anillo completamente cerrado.

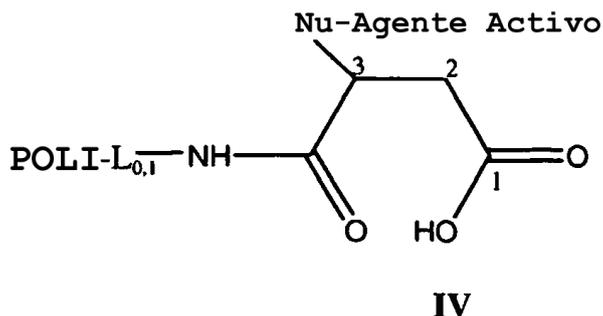
Los polímeros solubles en agua para su uso en la invención incluyen poli(óxido de alqueno), polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), polioxazolina, poliacrililormorfina, y poli(poliol oxietilado). Un polímero soluble en agua preferido es el polietilenglicol.

En un aspecto más, en la presente memoria se proporciona una composición de producto conjugado de ácido succinámico polimérico preparada por el método descrito antes.

En otro aspecto más, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende:



y/o



donde la composición esta de acuerdo con la reivindicación 29.

5

En otro aspecto más, la invención proporciona una proteína transformada con un polímero soluble en agua, donde el polímero está acoplado a la proteína vía grupos succinimida unidos covalentemente a los grupos sulfhidrilo de la cisteína o a los grupos amino de la lisina, y sustancialmente todos los grupos succinimida están presentes en una forma de anillo abierto.

10

Estos y otros objetos y características de la invención se harán más plenamente cuando se lea junto con las siguientes figuras y la descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

15

La FIG. 1 ilustra una reacción ejemplar de un polímero de maleimida y de un polímero de ácido maleámico con un grupo tiol de un agente activo representativo, en este caso, una proteína, para formar un producto conjugado de ácido succinámico polimérico de la invención;

20

La FIG. 2 ilustra una reacción ejemplar de un polímero de maleimida y de un polímero de ácido maleámico con un grupo amino de un agente activo representativo, en este caso, una proteína, para formar un producto conjugado de ácido succinámico polimérico de la invención;

La FIG.3 es un gráfico del logaritmo de la concentración de una maleimida conectada a un polímero ramificado ilustrativo a lo largo del tiempo como se describe en detalle en el Ejemplo 2.

Descripción detallada de la invención

25

Antes de describir la presente invención en detalle, se debe entender que esta invención no está limitada a los polímeros concretos, las técnicas sintéticas, los agentes activos, y similares como tales pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria es para describir únicamente las realizaciones concretas, y no se pretende que sea limitante.

30

Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones descritas más abajo.

Definiciones

Los siguientes términos según se utilizan en la presente memoria tienen los significados indicados.

35

Según se utiliza en la memoria, y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el", "la", incluyen sus referentes plurales a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.

"PEG" o "poli(etilenglicol)" según se utiliza en la presente memoria, se pretende que abarque cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEG para su uso en la presente invención comprenderán una de las dos siguientes estructuras: $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ o

40

$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$, dependiendo de si el oxígeno o los oxígenos terminales han sido desplazados o no, p. ej., durante una transformación sintética. La variable (n) oscila de 3 a 3000, y los grupos terminales y la arquitectura del PEG global pueden variar. Cuando PEG comprende adicionalmente un radical conector (que se va a describir con mayor detalle más abajo), los átomos que comprenden el conector,

cuando se unen covalentemente a un segmento PEG, no dan como resultado la formación de (i) un enlace oxígeno-oxígeno (-O-O-, una conexión peróxido), o (ii) un enlace nitrógeno-oxígeno (NO, O-N). "PEG" significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más de 50%, de subunidades que son -CH₂CH₂O-. Los PEG para su uso en la invención incluyen PEG que tienen una variedad de pesos moleculares, estructuras o geometrías (p. ej., PEG ramificados, lineales, ahorquillados, dendríticos, y similares), que se van a describir con más detalle más abajo.

"PEG diol", también conocido como alfa-,omega-dihidroxiolpoli(etilenglicol), puede estar representado en forma breve como HO-PEG-OH, donde PEG se define como antes.

"Soluble en agua", en el contexto de un polímero de la invención o un "segmento polimérico soluble en agua" es cualquier segmento o polímero que es soluble en agua a temperatura ambiente. Típicamente, un polímero o segmento soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de luz, transmitida por la misma solución después de filtrar. En una base en peso, un polímero soluble en agua o segmento del mismo será al menos aproximadamente 35% (en peso) soluble en agua, más preferiblemente al menos aproximadamente 50% (en peso) soluble en agua, aún más preferiblemente aproximadamente 70% (en peso) soluble en agua, y aún más preferiblemente aproximadamente 85% (en peso) soluble en agua. Es muy preferido, no obstante, que el polímero o segmento soluble en agua sea aproximadamente 95% (en peso) soluble en agua o completamente soluble en agua.

Un grupo "de protección terminal" o "protegido terminalmente" es un grupo inerte o no reactivo presente en un extremo de un polímero tal como PEG. Un grupo de protección terminal es uno que no experimenta fácilmente transformación química en condiciones de reacción de síntesis típicas. Un grupo de protección terminal es generalmente un grupo alcoxi, -OR, donde R es un radical orgánico que comprende 1-20 carbonos y es preferiblemente alquilo inferior (p. ej., metilo, etilo) o bencilo. "R" puede ser saturado o insaturado, e incluye arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo, y formas sustituidas de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, un PEG protegido terminalmente comprenderá típicamente la estructura "RO-(CH₂CH₂O)_n-", donde R se define como antes. Alternativamente, el grupo de protección terminal puede comprender también ventajosamente una marca detectable. Cuando el polímero tiene un grupo de protección terminal que comprende una marca detectable, la cantidad o localización del polímero y/o el radical (p. ej., agente activo) al que está acoplado el polímero, se puede determinar utilizando un detector adecuado. Tales marcas incluyen, sin limitación, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, radicales utilizados en marcaje enzimático, colorimétrico (p. ej., colorantes), iones metálicos, radicales radiactivos, y similares. El grupo de protección terminal puede comprender también ventajosamente un fosfolípido. Cuando el polímero tiene un grupo de protección terminal tal como un fosfolípido, se confieren al polímero propiedades únicas (tal como la capacidad para formar estructuras organizadas con polímeros similarmente protegidos terminalmente). Los fosfolípidos ilustrativos incluyen, sin limitación, aquellos seleccionados de la clase de fosfolípidos denominados fosfatidilcolinas. Los fosfolípidos específicos incluyen, sin limitación, aquellos seleccionados del grupo que consisten en dilauroilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diesteroilfosfatidilcolina, behenoilfosfatidilcolina, araquidilfosfatidilcolina, y lecitina.

"De origen no natural" con respecto a un polímero de la invención significa un polímero que en su totalidad no se encuentra en la naturaleza. Un polímero de origen no natural de la invención puede contener no obstante una o más subunidades o segmentos de subunidades que son de origen natural, de manera que la estructura polimérica global no se encuentra en la naturaleza.

"Masa molecular" en el contexto de un polímero soluble en agua de la invención tal como PEG, hace referencia a la masa molecular media nominal un polímero, determinada típicamente mediante cromatografía de exclusión por tamaños, técnicas de dispersión de luz, o determinación de la velocidad intrínseca en 1,2,4-triclorobenceno. Los polímeros de la invención son típicamente polidispersos, poseyendo bajos valores de polidispersidad de menos de aproximadamente 1,20.

El término "reactivo" o "activado" hace referencia a un grupo funcional que reacciona fácilmente o a una velocidad práctica en condiciones convencionales de síntesis orgánica. Esto está en contraste con aquellos grupos que no reaccionan o requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción poco prácticas para que reaccionen (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

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

Un "grupo protector" es un radical que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo concreto en una molécula bajo ciertas condiciones de reacción: El grupo protector variará dependiendo del grupo químicamente reactivo que esté siendo protegido así como de las condiciones de reacción que se van a emplear y de la presencia de reactivos o grupos protectores adicionales de la molécula. Los grupos funcionales que se pueden proteger incluyen, a modo de ejemplo, grupos ácido carboxílico, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos carbonilo y similares. Los grupos protectores para ácidos carboxílicos representativos incluyen ésteres (tales como un p-metoxibencilico), amidas e hidrazidas; para los grupos amino, carbamatos (tales como terc-butoxicarbonilo) y amidas; para los grupos hidroxilo, éteres y ésteres; para los grupos tiol, tioéteres y tioésteres; para los grupos carbonilo, acetales y cetales; y similares. Tales grupos protectores son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en T.W. Greene y G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Tercera Edición, Wiley, New York, 1999, y referencias allí citadas.

Un grupo funcional en "forma protegida" hace referencia a un grupo funcional que porta un grupo protector. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo abarque las formas protegidas del mismo.

El término "conector" se utiliza en la presente memoria para referirse a un átomo o una colección de átomos utilizados para conectar radicales de interconexión, tales como un segmento polimérico y una maleimida. Los conectores de la invención son hidrolíticamente estables generalmente.

Un enlace "escindible fisiológicamente" o "hidrolizable" o "degradable" es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (es decir, es hidrolizado) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo general de conexión que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes anclados a estos átomos centrales. Las conexiones hidrolíticamente inestables o débiles apropiadas incluyen pero no están limitadas a éster carboxilato, éster fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquileter, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos, tioésteres, tiolésteres, y carbonatos.

Una "conexión degradable enzimáticamente" significa una conexión que es sujeto de degradación por una o más enzimas.

Una conexión o un conector "hidrolíticamente estable", para los fines de la presente invención, y en particular en referencia a los polímeros de la invención, hace referencia a un átomo o a una colección de átomos, que es hidrolíticamente estable en condiciones fisiológicas normales. Esto es, una conexión hidrolíticamente no experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas en un grado apreciable a lo largo de un período de tiempo prolongado. Los ejemplos de las conexiones hidrolíticamente estables incluyen pero no están limitadas a las siguientes: enlaces carbono-carbono (p. ej., en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos, aminas, y similares. Las tasas de hidrólisis de los enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de los libros de texto de química normalizados.

"Ramificado" en referencia a la geometría o estructura global de un polímero hace referencia 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 distinta de la del polímero ramificado.

"Punto de ramificación" hace referencia a un punto de bifurcación que comprende uno o más átomos en los cuales un polímero se divide o ramifica a partir de una estructura lineal en uno más brazos poliméricos adicionales.

Un "dendrímero" un polímero de tamaño monodisperso, globular en el que todos los enlaces emergen radialmente de un punto focal central o núcleo con un patrón de ramificación regular y con unidades repetitivas que aportan un punto de ramificación. Los dendrímeros muestran algunas propiedades del estado dendrítico tales como la encapsulación del núcleo, haciéndolos únicos entre otros tipos de polímeros.

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

Un grupo "alquilo" o "alquileo", dependiendo de su posición en una molécula y del número de puntos de unión del grupo a átomos distintos de hidrógeno, hace referencia a una cadena o radical hidrocarbonado, que oscila típicamente de aproximadamente 1 a 20 átomos de longitud. Tales cadenas hidrocarbonadas son preferiblemente pero no necesariamente saturadas a no ser que se indique y pueden ser cadenas ramificadas o lineales, aunque se prefiere típicamente la cadena lineal. Los grupos alquilo ilustrativos incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares.

"Alquilo inferior" o "alquileo inferior" hace referencia a un grupo alquilo o alquileo como se ha definido antes que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y pueden ser de cadena lineal o ramificada, como se ilustra mediante metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo.

"Cicloalquilo" o "cicloalquileo", dependiendo de su posición en una molécula y del número de puntos de unión a átomos distintos de hidrógeno, hace referencia a una cadena hidrocarbonada cíclica saturada o insaturada, incluyendo compuestos policíclicos tales como compuestos unidos mediante puentes, fusionados o espiro cíclicos, preferiblemente constituidos por 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente 3 a aproximadamente 8.

"Cicloalquilo inferior" o "cicloalquileo inferior" hace referencia a un grupo cicloalquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono.

"Alcíclico" hace referencia a cualquier compuesto alifático que contiene un anillo de átomos de carbono. Un grupo alcíclico es uno que contiene un grupo "cicloalquilo" o "cicloalquileo" como se ha definido antes que está sustituido con uno o más alquilos o alquilenos.

"Sustituyentes que no interfieren" son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, son típicamente no reactivos con otros grupos funcionales contenidos en la molécula.

El término "sustituido" como por ejemplo, en "alquilo sustituido", hace referencia a un radical (p. ej., un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes que no interfieren, tales como, pero no limitados a: cicloalquilo C₃-C₈, p. ej., ciclopropilo, ciclobutilo, y similares; halo, p. ej., flúor, cloro, bromo, y yodo; ciano; alcoxi, fenilo; fenilo sustituido; y similares. Para las sustituciones en un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta, o para).

"Alcoxi" hace referencia a un grupo -O-R, donde R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C₁-C₂₀ (p. ej., metilo, etilo, propilo, bencilo, etc.), preferiblemente C₁-C₇.

Según se utiliza en la presente memoria, "alquileo" hace referencia a un grupo hidrocarbonado

- ramificado o no ramificado de 1 a 15 átomos de longitud, que contiene al menos un enlace doble, tal como etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-butenilo, isobutenilo, octenilo, decenilo, tetradecenilo, y similares.
- El término "alquinilo" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado de 2 a 15 átomos de longitud, que contiene al menos un enlace triple, etinilo, n-propinilo, isopropinilo, n-butinilo, isobutinilo, octinilo, decinilo, y etcétera.
- "Arilo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 o 6 átomos de carbono núcleo. Arilo incluye anillos arílicos múltiples que pueden estar fusionados, como en naftilo o no fusionados, como en bifenilo. Los anillos arílicos también pueden estar fusionados o no fusionados con uno o más anillos hidrocarbonados, heteroarílicos, o heterocíclicos cíclicos. Según se utiliza en la presente memoria, "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 heteroarílicos también pueden estar fusionados con uno o más anillos hidrocarbonados, heterocíclicos, arílicos, o heteroarílicos cíclicos.
- "Heterociclo" o "heterocíclico" significa uno o más anillos de 5-12 átomos, preferiblemente 5-7 átomos, con o sin insaturación o carácter aromático y que tiene al menos un átomo anular que no es un carbono. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno, y nitrógeno.
- "Heteroarilo sustituido" es heteroarilo que tiene uno o más grupos que no interfieren como sustituyentes.
- "Heterociclo sustituido" es un heterociclo que tiene una o más cadenas laterales formadas a partir de sustituyentes que no interfieren.
- "Electrófilo" hace referencia a un ión, átomo, o colección de átomos que pueden ser iónicos, que tienen un centro electrofílico, es decir, un centro que es buscador de electrones, capaz de reaccionar con un nucleófilo.
- "Nucleófilo" hace referencia a un ión o átomo o colección de átomos que pueden ser iónicos, que tienen un centro nucleofílico, es decir, un centro que es buscador de un centro electrofílico, y capaz de reaccionar con un electrófilo.
- "Agente activo" según se utiliza en la presente memoria incluye cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de materia o mezcla que proporciona algún efecto farmacológico, a menudo beneficioso, que puede ser demostrado in-vivo o in vitro. Esto incluye alimentos, suplementos alimenticios, nutrientes, productos nutracéuticos, fármacos, vacunas, anticuerpos, vitaminas, y otros agentes beneficiosos. Según se utiliza en la presente memoria, estos términos incluyen adicionalmente cualquier sustancia fisiológicamente o farmacológicamente activa que produce un efecto localizado o sistémico en un paciente.
- "Excipiente farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéuticamente aceptable" hace referencia a un excipiente que puede estar incluido en las composiciones de la invención y que no ocasiona efectos toxicológicamente adversos significativos al paciente.
- "Cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad fisiológicamente eficaz", y "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan indistintamente en la presente memoria para significar la cantidad de producto conjugado de PEG-agente activo presente en una preparación farmacéutica que es necesaria para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o producto conjugado en la corriente sanguínea o en el tejido diana. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, p. ej., el agente activo concreto, los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes a la que está destinada, las consideraciones de los pacientes, y similares, y puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica, basándose en la información proporcionada en la presente memoria y disponible en la literatura relevante.
- "Multifuncional" en el contexto de un polímero de la invención significa una cadena principal polimérica que tiene 3 o más grupos funcionales contenidos allí, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes, y están presentes típicamente en los extremos del polímero. Los polímeros multifuncionales de la invención contendrán típicamente 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 o 10 grupos funcionales en la cadena principal polimérica.
- Un polímero "difuncional" significa un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos allí, típicamente en los extremos del polímero. Cuando los grupos funcionales son iguales, se dice que el polímero es homodifuncional. Cuando los grupos funcionales son diferentes, se dice que el polímero es heterodifuncional.
- El reactante alcalino o ácido descrito en la presente memoria incluye las formas neutras, cargadas, y cualquiera de sus formas salinas correspondientes.
- "Alcohol poliolefínico" hace referencia a un polímero que comprende una cadena principal polimérica olefínica, tal como polietileno, que tiene grupos hidroxilo pendientes múltiples unidos a la cadena principal polimérica. Un alcohol poliolefínico ilustrativo es poli(alcohol vinílico).
- Según se utiliza en la presente memoria, "no-peptídico" hace referencia a una cadena principal polimérica sustancialmente libre de conexiones peptídicas. No obstante, el polímero puede incluir un número mínimo de conexiones peptídicas espaciadas a lo largo de las subunidades monoméricas repetidas, tal como, por ejemplo, no más de aproximadamente 1 conexión peptídica por aproximadamente 50 unidades monoméricas.
- El término "paciente", hace referencia a un organismo viviente que padece o es propenso a una afección que se puede prevenir o tratar mediante la administración de un polímero de la invención, típicamente pero no necesariamente en forma de un producto conjugado de polímero-agente activo, e incluye tanto

seres humanos como animales.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita con posterioridad puede ocurrir o no, de manera que la descripción incluye los casos en los que se produce la circunstancia y los casos donde no.

5 Mediante "resto" se significa la porción de una molécula que queda después de la reacción con una o más moléculas. Por ejemplo, un resto de molécula biológicamente activo en un producto conjugado polimérico de la invención típicamente corresponde a la porción de la molécula biológicamente activa hasta pero excluyendo la conexión covalente resultante de la reacción de un grupo reactivo en la molécula biológicamente activa con un grupo reactivo en un reactivo polimérico.

10 Se pretende que el término "producto conjugado" haga referencia a la entidad formada como resultado de la unión covalente unión de una molécula, p. ej., una molécula biológicamente activa o cualquier superficie reactiva, a una molécula polimérica reactiva, preferiblemente un poli(etilenglicol) reactivo. El término "grupo captador de electrones" hace referencia a un radical químico que conduce la densidad electrónica hacia sí mismo y lejos de otras zonas de una molécula a través de mecanismos mesoméricos (es decir, adición o eliminación de la densidad electrónica local a través de enlaces π) o mecanismos inductivos (es decir, un radical electronegativo radical que retira la densidad electrónica a lo largo de un enlace σ , polarizando de ese modo el enlace).

15 "Químicamente estable" en el contexto de las composiciones, polímeros y productos conjugados descritos en la presente memoria, hace referencia a una muestra que experimenta un cambio de 5% o menos en su composición polimérica (es decir, el polímero sujeto, el producto conjugado o similares no resulta químicamente alterado o degradado en cualquier manera significativa, por ejemplo, donde sea aplicable, mediante despegilación o hidrólisis para dar como resultado especies químicas que son diferentes en las cantidades o en su estructura de las presentes originalmente en la muestra) a lo largo de un período de tiempo de 3 meses cuando se midió a partir del tiempo de preparación de la muestra inicial y se almacenó en forma de una solución tamponada a unos pH sustancialmente neutros (p. ej., de 6,8 a 7,2) en condiciones ambiente.

20 Un polímero o composición que es "resistente a la hidrólisis", en el contexto de la presente invención, es el que experimenta hidrólisis hasta un grado de menos del 5%, cuando se almacena a lo largo de un período de tiempo de 3 meses cuando se midió a partir del tiempo de preparación de la muestra inicial, y se almacenó en forma de una solución a unos pH sustancialmente neutros (p. ej., de 6,8 a 7,2) en condiciones ambiente.

30 Un "ácido succinámico sustituido en la posición 2 o 3" hace referencia a la posición de un sustituyente, p. ej., un nucleófilo que es parte de un agente activo en un ácido succinámico polimérico, donde el grupo ácido carboxílico del ácido succinámico representa el número de carbono 1, y el carbono o la posición adyacente a ese es el número de carbono 2, etcétera.

Visión de conjunto de la invención

Habitualmente, los grupos maleimida situados en un polímero se utilizan para unir covalentemente o conjugar un polímero a un agente activo tal como una biomolécula, especialmente una biomolécula que contiene uno o más grupos tiol reactivos. Tales grupos tiol pueden ser de origen natural, o alternativamente, la biomolécula puede ser modificada o diseñada para contener un tiol adecuado para el acoplamiento a una maleimida. Bajo ciertas condiciones de reacción más rigurosas, p. ej., a niveles de pH más altos, los grupos amino activos de una biomolécula se pueden añadir también a un grupo maleimida de un derivado polimérico para formar el producto conjugado correspondiente. A través de una serie de experimentos, los Solicitantes han reconocido que ciertos derivados poliméricos de maleimida, dependiendo de su estructura, son propensos a la hidrólisis para formar la forma de ácido maleámico de anillo abierto del polímero, antes o después de la conjugación con un agente activo. La reacción de hidrólisis no sólo depende de la estructura global del derivado polimérico, sino que también depende del pH. Generalmente, la velocidad de hidrólisis aumenta al aumentar el pH. Adicionalmente, dependiendo del contenido de humedad y del pH de la composición resultante, la formación de la forma de anillo abierto del producto conjugado polimérico también se puede producir después del almacenamiento de una composición de producto conjugado polimérico seco, p. ej., una en la que el agente activo es un fármaco no proteico. En los casos en los que se produce la apertura del anillo, la composición resultante puede ser realmente una mezcla complicada de productos conjugados de anillo abierto y anillo cerrado. En general, tal hidrólisis puede ser problemática, particularmente para composiciones farmacéuticas comerciales en las que la estabilidad a largo plazo y la consistencia de los lotes de fármacos son características muy deseables.

50 En un esfuerzo para estudiar este problema, la invención proporciona ciertos derivados poliméricos de ácido maleámico, sus productos conjugados, y composiciones que los contiene, junto con métodos para elaborar y utilizar tales derivados poliméricos derivados de ácido maleámico. Los polímeros de la invención son proporcionados para superar los problemas asociados con los polímeros con funcionalidad maleimida forzando o promoviendo la hidrólisis del anillo de maleimida, antes o más preferiblemente después de la conjugación. De este modo, se proporcionan estructuras de ácido maleámico poliméricas de anillo abierto que son mucho más estables que sus contrapartes de maleimida (o succinimida).

65 Preferiblemente, las composiciones poliméricas de ácido maleámico de la invención poseen cantidades bien definidas y sustancialmente inalterables de productos conjugados de ácido maleámico polimérico o ácido succinámico polimérico, de manera que las composiciones de la invención son particularmente muy

adecuadas para su uso como composiciones farmacéuticas para su administración a sujetos mamíferos. Se proporcionan dos esquemas de reacción ilustrativos que demuestran una visión de conjunto de este enfoque en la presente memoria como FIG. 1 y FIG. 2. El Esquema de Reacción I (FIG. 1) ilustra la reacción de una maleimida polimérica (estructura I) y un ácido maleámico polimérico (estructura II) con un grupo tiol de una molécula biológicamente activa, en este caso, una proteína. Se pretende que las condiciones de reacción mostradas en las FIG 1 y 2 sean únicamente ilustrativas y no se pretende que sean limitantes. El Esquema de Reacción II (FIG. 2) ilustra de un modo similar la reacción tanto de una maleimida polimérica como de un ácido maleámico polimérico con un grupo amino de una molécula biológicamente activa, en este caso, una proteína. En cada esquema, se muestran ambas estructuras isoméricas de los productos conjugados de ácido succinámico (estructuras IV y V, donde IV-A y V-A corresponden al ácido succinámico polimérico conjugado con tiol y IV-B y V-B corresponden al ácido succinámico polimérico conjugado con amino. Los dos productos diferentes se originan de la adición del nucleófilo entrante a cualquiera de los dos carbonos, C-2 o C-3, del enlace doble del anillo de maleimida. Al examinar cualquiera de la FIG. 1 o la FIG. 2, se puede observar que si bien se puede llevar a cabo la conjugación de un agente activo con un ácido maleámico polimérico, II, la reacción es particularmente lenta. Por esta razón, una ruta más preferida para el producto conjugado de ácido succinámico deseado es mediante hidrólisis del producto conjugado de la succinimida polimérica, mostrada generalmente como estructura III. Es decir, en comparación con los derivados poliméricos de maleimida correspondientes, los derivados poliméricos de ácido maleámico son menos reactivos con nucleófilos para formar los productos conjugados correspondientes. De este modo, se prefiere generalmente la conjugación con una maleimida polimérica seguido de apertura del anillo sobre la apertura del anillo de una maleimida polimérica seguido de conjugación, si bien ambos enfoques dan como resultado la formación de productos conjugados de ácido succinámico polimérico, mostrados generalmente como estructuras IV y V.

Formación de derivados y productos conjugados poliméricos de ácido maleámico ácido succinámico maleimidias poliméricas.

En general, los métodos proporcionados en la presente memoria comienzan con una maleimida polimérica. Las maleimidias poliméricas se pueden obtener de fuentes comerciales, tales como Nektar, Huntsville, Alabama. Por ejemplo, maleimidias poliméricas tales como mPEG(MAL)₂, mPEG₂(MAL)₂, mPEG₂-MAL, y mPEG-MAL son asequibles comercialmente de Nektar en un amplio intervalo de pesos moleculares. Las estructuras correspondientes a estas maleimidias poliméricas se encuentran en el Catálogo Nektar, 2001, titulado, "Polyethylenglicol and Derivatives for Biomedical Applications", en la página 8, y se incorporan en la presente memoria como referencia.

Alternativamente, las maleimidias poliméricas de la invención se pueden preparar mediante cualquiera de varias de rutas sintéticas incluyendo las siguientes. En un enfoque, se prepara un polímero terminado con maleimida haciendo reaccionar un grupo funcional unido a un segmento polimérico (es decir, un segmento polimérico activado) con un grupo funcional de un reactivo bifuncional que tiene como uno de sus grupos funcionales una maleimida o un grupo funcional que puede ser convertido en maleimida, tal como un grupo amino. Haciendo reaccionar el segmento polimérico con un reactivo bifuncional se produce una unión covalente, típicamente a través de una conexión hidrolíticamente estable, del reactivo con el segmento polimérico para proporcionar una maleimida polimérica o un precursor de maleimida polimérica. Por ejemplo, el reactivo bifuncional puede poseer la estructura A-L-B, donde A es un primer grupo funcional que es reactivo con un segundo grupo funcional del segmento polimérico para formar una conexión, L, para formar POLI-L-B, donde B es una maleimida o un grupo funcional que puede ser convertido fácilmente en una maleimida (p. ej., una amina que se puede convertir en una maleimida mediante reacción con metoxicarbonilmaleimida). En el enfoque anterior, A puede ser cualquiera de varios grupos funcionales tales como halo, hidroxilo, éster activo tal como éster de N-succinimidilo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidrato de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, y epóxido, adecuado para la reacción con el grupo diana en el reactivo polimérico activado.

En los casos en los que se emplea un enfoque que utiliza una amina polimérica, POLI-L_{0,1}-NH₂ como sustancia de partida o intermedio, la amina se puede transformar en una maleimida, por ejemplo, utilizando anhídrido maleico. Preferiblemente, la amina polimérica se purifica antes de la conversión en un grupo maleimida, por ejemplo, mediante cromatografía o cualquier otro método adecuado, para mejorar la pureza del producto final de maleimida. En un enfoque concreto, se hace reaccionar primero una amina polimérica con anhídrido maleico para formar un intermedio de amida-ácido carboxílico de anillo abierto, que después se cierra en una segunda etapa calentando el intermedio en presencia de anhídrido acético y una sal de ácido acético, tal como acetato de sodio o potasio. Preferiblemente, el intermedio se calienta a una temperatura que oscila de aproximadamente 50°C a aproximadamente 140°C durante aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 horas.

Alternativamente, un grupo amino de POLI-L_{0,1}-NH₂ se puede transformar en una maleimida mediante reacción con un reactivo tal como N-metoxicarbonilmaleimida o anhídrido exo-7-oxa[2,2,1]bicycloheptano-2,3-dicarboxílico.

Las estructuras correspondientes a los ácidos maleámicos poliméricos y a los productos conjugados de ácido succinámico polimérico (proporcionados en las secciones que siguen) se pueden prolongar a las sustancias de partida e intermedios correspondientes como se ha descrito antes.

Conjugación a un agente activo

Una maleimida polimérica se acopla a una molécula biológicamente activa o agente activo utilizando condiciones de reacción adecuadas conocidas en la técnica. Las condiciones precisas variarán por supuesto dependiendo del agente activo concreto, el nucleófilo preciso que va a experimentar una adición de tipo Michael al grupo maleimida, el propio polímero reactivo y similares.

Las condiciones de conjugación adecuadas son aquellas condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración de reactivo, disolvente, y similares suficientes para efectuar la conjugación entre una maleimida polimérica y un agente activo. Las condiciones específicas dependen, entre otras cosas, del agente activo, el tipo de conjugación deseada, la presencia de otras sustancias en la mezcla de reacción etcétera. Las condiciones suficientes para efectuar la conjugación en cualquier caso particular pueden ser determinadas por un experto normal en la técnica después de la lectura de la descripción de la presente memoria, la referencia a la literatura relevante, y/o a través de experimentación rutinaria.

Las condiciones de conjugación ilustrativas incluyen llevar a cabo la reacción de conjugación a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, y, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10. Más preferiblemente, una maleimida polimérica se conjuga típicamente a un agente activo que contiene sulfhidrilo a pH que oscilan de aproximadamente 6-9,5, más preferiblemente a pH de aproximadamente 7-9, e incluso más preferiblemente a pH de aproximadamente 7 a 8. Muy preferiblemente, la conjugación selectiva para tiol se realiza a pH en torno a 7.

Las temperaturas de reacción son altamente dependientes de la reactividad de la biomolécula y pueden oscilar típicamente de 0°C a 75 °C, preferiblemente de 10°C a 45°C, y más preferiblemente de 18°C a 28°C. Temperaturas superiores pueden desactivar las biomoléculas más sensibles pero puede ser necesario convertir las más resistentes.

Las reacciones de conjugación se pueden llevar a cabo en un tampón tal como un tampón fosfato o acetato o sistema similar.

Generalmente, se emplea un ligero exceso molar de maleimida polimérica, por ejemplo, un exceso molar de 1,5 a 15 veces, preferiblemente un exceso molar de 2 veces a 10 veces. La razón molar de polímero precursor a molécula biológicamente activa puede oscilar de 1,0 a 50, preferiblemente de 1,0 a 8,0, y más preferiblemente de 1,04 a 1,5. Las razones ilustrativas de polímero reactivo a agente activo incluyen razones molares de aproximadamente 1:1 (reactivo polimérico:agente activo), 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1, o 10:1. Se deja que la reacción de conjugación prosiga hasta que sustancialmente no se produzca más conjugación, lo que se puede determinar generalmente verificando el progreso de la reacción a lo largo del tiempo. El progreso de reacción se puede verificar retirando alícuotas de la mezcla de reacción en diferentes momentos puntuales y analizando la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF o cualquier otro método analítico adecuado. Una vez que se alcanza una meseta con respecto a la cantidad de producto conjugado formado o la cantidad de polímero no conjugado restante, se supone que se ha completado la reacción.

De nuevo, el tiempo de reacción es una función de la reactividad del agente activo concreto y se hace más largo cuando el agente activo es lento en reaccionar y sensible a la temperatura. En tales casos, se pueden requerir tiempos de reacción más largos acompañados de temperaturas de reacción moderadas. Los tiempos de reacción típicos pueden oscilar de cinco minutos a 10 días, preferiblemente de 30 minutos a 48 horas, y más preferiblemente de 2 a 17 horas, dependiendo de nuevo de la reactividad de los componentes, según se determina típicamente mediante reacciones de prueba a pequeña escala. La agitación (p. ej., agitación, sacudimiento, etc.) se puede utilizar opcionalmente para facilitar la reacción de acoplamiento. Para los grupos sulfhidrilo con impedimento estérico, los tiempos de reacción requeridos pueden ser significativamente más largos.

Las reacciones con grupos amino prosiguen a pH más altos, pero son relativamente lentas en comparación con la reacción con grupos tiol.

Las condiciones de reacción particulares y la metodología deben ser tales que la molécula activa conserva al menos actividad parcial.

Los productos conjugados preparados de este modo pueden ser caracterizados después adicionalmente utilizando métodos analíticos tales como MALDI, capilaridad, electroforesis, electroforesis en gel, y/o cromatografía. Los productos conjugados poliméricos resultantes de una adición de tipo Michael de un agente activo a una maleimida polimérica son referidos en la presente memoria como productos conjugados de succinimidias poliméricas o succinimidias poliméricas conjugadas (p. ej., véase la estructura III).

Hidrólisis del anillo de maleimida.

Teniendo en mente una maleimida polimérica o una succinimida polimérica conjugada (correspondientes a las estructuras I y III, respectivamente), la especie polimérica se hidroliza después a su forma de anillo abierto. Cuando se parte de una maleimida polimérica, la forma de anillo abierto correspondiente es referida en la presente memoria como un ácido maleámico polimérico, correspondiente a la estructura II. Cuando procede de una succinimida polimérica conjugada (III), la forma de anillo abierto correspondiente es referida en la presente memoria como un ácido succinámico polimérico conjugado, correspondiente a la estructura IV o la estructura V. Las estructuras IV y V son isómeros estructurales, que difieren sólo en el punto de unión del grupo nucleofílico del agente activo. Un nucleófilo entrante que experimenta una reacción de adición de tipo Michael a la maleimida puede añadir a la posición C2, con respecto al carbono

carboxílico final de la forma de anillo abierto denominada C1, o a la posición C3.

Generalmente, un ácido succinámico conjugado se prepara exponiendo una maleimida polimérica, preferiblemente conjugada con un agente activo, a una base acuosa en condiciones eficaces para hidrolizar el grupo maleimida del polímero a un grado medible. Preferiblemente, la reacción de hidrólisis se lleva a cabo ajustando las condiciones de reacción (cantidad de agua, temperatura, razones molares relativas de reaccionantes, etc.) para lograr un grado deseable de hidrólisis o apertura del anillo.

La reacción de hidrólisis se lleva a cabo para formar al menos aproximadamente 95% o más de la forma de anillo abierto polimérica, ya sea conjugada o no-conjugada, con respecto a su contraparte polimérica de anillo cerrado. Centrándose ahora en los productos conjugados de ácido succinámico polimérico, las composiciones particularmente preferidas de la invención contienen al menos 99%, o esencialmente 100% de ácido succinámico polimérico conjugado con respecto a su contraparte polimérica no hidrolizada. Muy preferiblemente, la hidrólisis se lleva a cabo hasta que se completa, es decir, hasta que esencialmente toda la maleimida polimérica o los grupos succinimida en el producto conjugado se convierten en su forma de anillo abierto y en la composición resultante están ausentes esencialmente cantidades cualesquiera detectables de la forma de anillo abierto. Los productos conjugados poliméricos que son de anillo abierto completamente son los más preferidos, puesto que su tendencia a experimentar la reacción inversa, es decir, una reacción de deshidrólisis, es mínima en las condiciones de hidrólisis empleadas para la reacción de apertura del anillo anterior. Con respecto a las composiciones de anillo abierto parcialmente descritas antes, las composiciones que son de anillo abierto completamente son las más estables a transformaciones químicas adicionales tales como despegilación o hidrólisis.

Las composiciones preferidas contienen menos de 2% o menos de la forma de anillo cerrado.

Volviendo ahora a las condiciones empleadas para efectuar la hidrólisis, la hidrólisis se realiza generalmente en condiciones alcalinas. Subiendo el pH de la mezcla de reacción o solución por encima de pH neutros, se puede forzar que se complete la reacción de apertura del anillo can esencialmente. Para lograr los tiempos de reacción más eficaces (es decir, los más cortos), es deseable llevar a cabo la hidrólisis al pH más alto posible, p. ej., hasta aproximadamente 11, para lograr la apertura del anillo sin afectar adversamente a la actividad o la integridad del agente activo.

La apertura del anillo promovida con álcalis se puede llevar a cabo utilizando una solución alcalina o una base unida a un material de soporte sólido, es decir, un intercambiador iónico. Las bases preferidas son aquellas que proporcionan el pH adecuado para una apertura de anillo razonablemente rápida sin incurrir en reacciones secundarias no deseables. Las bases ilustrativas incluyen metales alcalinos tales como metal de sodio o potasio; hidróxidos de metales alcalinos tales como hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, y similares, e hidróxidos de amonio cuaternario tales como hidróxido de tetraamonio, hidróxido de tetrabutilamonio, e hidróxido de benciltrimetilamonio.

La hidrólisis se lleva a cabo a pH que oscilan de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 11. Es decir, la hidrólisis se realiza a un pH seleccionado entre aproximadamente: 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0.

La reacción de hidrólisis puede incluir opcionalmente un tampón. Los tampones ejemplares incluyen tampones orgánicos tales como HEPES, es decir ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperzinoetanosulfónico; así como tampones tales como sales de sodio, potasio, o amonio de aniones tales como citrato, alquilsulfonatos, hidróxido, acetato, carbonato, tetraborato, bicarbonato, fosfato, e hidrogenofosfato. Idealmente, se deberá evaluar, a pequeña escala, la base concreta y el sistema tampón opcional con la maleimida o producto conjugado de maleimida concretos antes de llevar a cabo un gran procedimiento para asegurar que la velocidad de conversión es aceptable y que no hay reacciones secundarias no deseables.

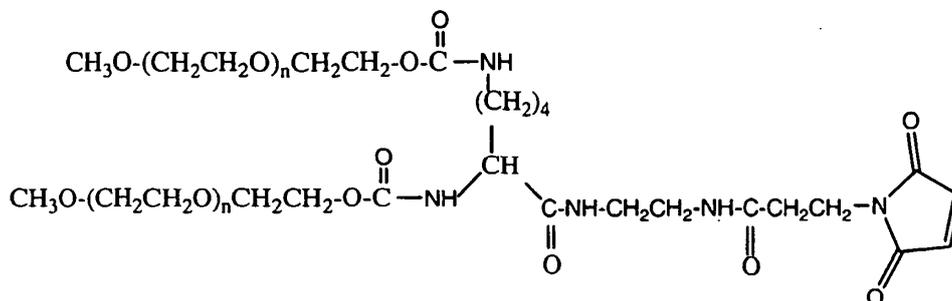
Las temperaturas adecuadas para efectuar la hidrólisis oscila de aproximadamente 4°C a aproximadamente 75°C, preferiblemente de aproximadamente 0°C a aproximadamente 60°C, más preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 45°C, y más preferiblemente de aproximadamente 18°C a aproximadamente 30°C. Como se ha mencionado previamente, los tiempos de reacción dependen del pH. Los tiempos de reacción oscilan típicamente de aproximadamente 5 min a varios días, p. ej., 96 horas o más, si no son evidentes reacciones secundarias. No obstante, los tiempos preferidos son de aproximadamente 30 min a aproximadamente 24 hrs, y más preferiblemente de aproximadamente 2 hr a aproximadamente 17 hr. Se puede utilizar opcionalmente agitación para facilitar la reacción.

En algunos casos, p. ej., en presencia de algunos tampones a ciertas concentraciones de tampón y maleimida polimérica, las reacciones de apertura del anillo se pueden ralentizar con el tiempo. Para lograr una velocidad de reacción estable, pueden ser deseable utilizar un sistema tampón que proporcione un pH estable a lo largo del tiempo en las condiciones de hidrólisis empleadas, o alternativamente, se puede vigilar el pH y añadir base periódicamente, si fuera necesario, para mantener un intervalo de pH constante. Se debe hacer énfasis, no obstante, en que no se requiere un pH constante para obtener una apertura del anillo completa.

Idealmente, el producto conjugado de succinimida polimérica se expone a una base a una temperatura suficiente y durante un período de tiempo suficiente de manera que se logre el grado de apertura del anillo deseado. Puesto que la reacción de apertura del anillo puede producirse a lo largo de un intervalo de valores de pH, es preferible tratar de equilibrar logrando tiempos de reacción cortos, p. ej., a los pH más altos, y favorecer un mayor grado de hidrólisis, p. ej., para formar una composición completamente hidrolizada donde esencialmente todos los anillos de succinimida están hidrolizados, frente a la posibilidad

de aparición de reacciones secundarias competitivas que podrían conducir a mezclas no deseables de productos o agentes activos desactivados. Por consiguiente, a través de reacciones de prueba a pequeña escala, se podría elegir idealmente los valores de pH que minimicen tales reacciones secundarias no deseadas.

5 Por ejemplo, mPEG2-MAL-40K, Estructura VII,



VII

obtenible de Nektar (Huntsville, AL), experimenta un grado de hidrólisis muy limitado del anillo de maleimida bajo ciertas condiciones para formar el ácido maleámico correspondiente. Los datos correspondientes a las cinéticas de la reacción de apertura del anillo se proporcionan en el Ejemplo 2.

10 De nuevo, se debe entender que si el derivado polimérico está destinado a la conjugación con una molécula biológicamente activa, las condiciones de la reacción de hidrólisis y la metodología deben ser tales que la molécula biológicamente activa conserve al menos una actividad parcial.

Después de la hidrólisis, el pH de la mezcla de reacción que contiene el producto conjugado de ácido succinámico polimérico se ajusta típicamente a pH de aproximadamente 5,5 a 8. La composición se desala y se seca después opcionalmente, por ejemplo, mediante liofilización. La composición resultante se puede purificar después adicionalmente, si se desea, por ejemplo mediante precipitación o cromatografía. Los diferentes enfoques de separación cromatográfica que se pueden utilizar incluyen SDS PAGE, cromatografía de penetración en gel, y cromatografía de intercambio iónico. Un enfoque particularmente preferido es la cromatografía de intercambio iónico, que es ventajosa en la separación del producto conjugado de ácido succinámico polimérico, que tiene una funcionalidad ácido carboxílico, de la succinimida polimérica conjugada de anillo cerrado correspondiente. La disminución del pH y el secado de las composición, p. ej., mediante liofilización, es particularmente ventajoso para las composiciones en las que el grado de apertura del anillo no es completo, es decir, en las que todavía no se ha llegado a completar la hidrólisis, puesto que pH inferiores y la ausencia de agua desfavorecen adicionalmente la hidrólisis. De este modo, la composición de la mezcla de reacción está esencialmente "congelada", es decir, es químicamente estable, a una cierta cantidad no en equilibrio de la forma de anillo abierto.

Por otra parte, las composiciones que contienen los productos conjugados de ácido succinámico polimérico descritos en la presente memoria también se pueden purificar adicionalmente para obtener/aislar diferentes especies de ácido succinámico PEGiladas. Alternativamente, y más preferiblemente para los PEG de pesos moleculares inferiores, p. ej., que tiene pesos moleculares de menos de aproximadamente 20 kilodaltons, preferiblemente menos de o igual a aproximadamente 10 kilodaltons, se puede purificar una mezcla producto para obtener una distribución en torno a cierto número de PEG por molécula de proteína, donde sea aplicable. Por ejemplo, se puede purificar una mezcla producto para obtener un promedio de cualquiera de uno a cinco PEG por proteína, típicamente un promedio de aproximadamente 3 PEG por proteína. La estrategia para la purificación de la mezcla de reacción de producto conjugado final depende de varios factores - el peso molecular del polímero empleado, la proteína concreta, el régimen de dosificación deseado, y la actividad residual y las propiedades in vivo de la especie del producto o los productos conjugados individuales. Este enfoque es aplicable más generalmente a los productos conjugados preparados mediante reacción de una PEG-maleimida con los grupos amino de la proteína que típicamente están presentes en mayor abundancia en una proteína dada que lo que lo están los grupos sulfhidrilo.

Si se desea, los productos conjugados de PEG que tienen pesos moleculares diferentes se pueden aislar utilizando cromatografía de filtración en gel. Si bien se puede utilizar este enfoque para separar los productos conjugados de PEG que tienen diferentes pesos moleculares, este enfoque es generalmente ineficaz para separar isómeros posicionales que tienen diferentes sitios de pegilación en una proteína. Por ejemplo, se puede utilizar cromatografía de filtración en gel para separar entre sí mezclas de 1-meros, 2-meros, 3-meros de PEG, etc., si bien cada una de las composiciones PEG-méricas recuperadas puede contener PEG anclados a diferentes grupos amino reactivos (p. ej., restos lisina) dentro de la proteína.

Las columnas de filtración en gel adecuadas para llevar a cabo este tipo de separación incluyen columnas Superdex™ y Sephadex™ asequibles de Amersham Biosciences. La selección de una columna concreta dependerá del intervalo de fraccionamiento deseado. La elución se lleva a cabo generalmente utilizando un tampón no basado en aminas, tal como fosfato, acetato, o similares. Las fracciones recogidas se pueden analizar mediante varios métodos diferentes, por ejemplo, (i) DO a 280 nm para el contenido de proteína, (ii) análisis de proteína BSA, (iii) ensayo con yodo para el contenido de PEG (Sims G. E. C., et

al., Anal. Biochem, 107, 60-63, 1980), o alternativamente, (iv) haciendo correr un gel de SDS PAGE, seguido de tinción con yoduro de bario.

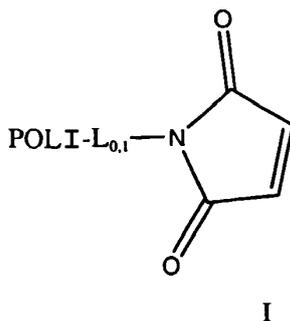
La separación de isómeros posicionales se puede llevar a cabo mediante cromatografía en fase reversa utilizando, por ejemplo, una columna RP-HPLC C18 (Amersham Biosciences o Vydac) o utilizando una columna de cromatografía de intercambio iónico, p. ej., una columna de intercambio iónico Sepharose™ asequible de Amersham Biosciences. Se puede utilizar cualquier enfoque para separar los isómeros de PEG-biomolécula que tienen el mismo peso molecular (isómeros posicionales).

Dependiendo del uso pretendido para los productos conjugados de PEG resultantes, después de la conjugación, y opcionalmente de las etapas de separación adicionales, la mezcla de producto conjugado se puede concentrar, filtrar en condiciones estériles, y almacenar a bajas temperaturas de aproximadamente -20°C a aproximadamente

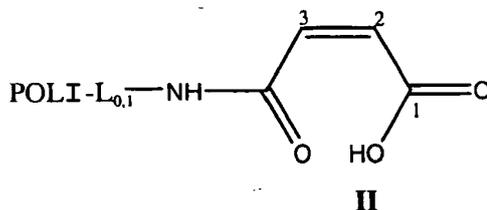
-80°C. Alternativamente, el producto conjugado se puede liofilizar, con o sin tampón residual y almacenar en forma de polvo liofilizado. En algunos casos, es preferible cambiar el tampón utilizado para la conjugación, tal como acetato de sodio, por un tampón volátil tal como carbonato de amonio o acetato de amonio, que se puede eliminar fácilmente durante la liofilización, de manera que la formulación en polvo de producto conjugado de proteína liofilizada esté ausente del tampón residual. Alternativamente, se puede utilizar una etapa de cambio de tampón utilizando un tampón de formulación, de manera que el producto conjugado liofilizado esté en una forma adecuada para la reconstitución en un tampón de formulación y por último para la administración a un mamífero.

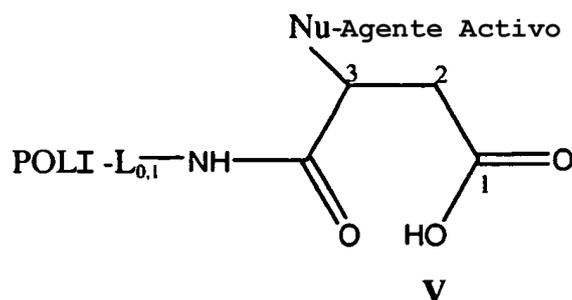
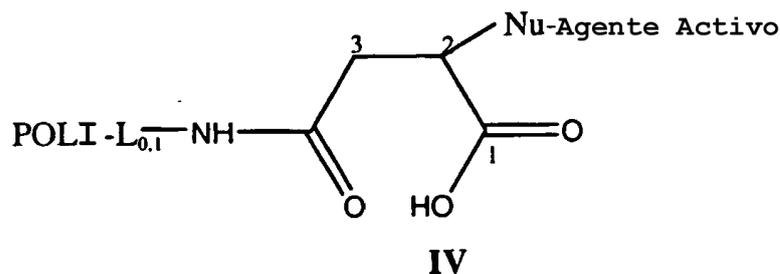
Derivados poliméricos de maleimida precursores y productos conjugados de ácido succinámico

Los derivados poliméricos de maleimida precursores útiles en la presente invención comprenden generalmente al menos un sustituyente maleimida acoplado a un segmento polimérico soluble en agua. La maleimida o las maleimidias sustituyentes se pueden unir directamente de manera covalente a un segmento polimérico soluble en agua, o alternativamente se pueden conectar al segmento polimérico vía grupo conector, L. Se proporciona una estructura generalizada como I más abajo, donde el conector opcional se denomina L, donde L₀ indica la ausencia de un conector, y L₁ indica presencia de un conector.



El ácido maleámico polimérico correspondiente, II, y los productos conjugados de ácido succinámico polimérico, IV y V, tienen las estructuras proporcionadas más abajo. Puesto que las estructuras están todas inter-relacionadas, las descripciones y realizaciones proporcionadas en la presente memoria para POLI y L se aplican igualmente a todas estas estructuras.





El segmento polimérico

5 Como se muestra en las estructuras ilustrativas anteriores, los reactivos poliméricos y los productos conjugados de la invención contienen un segmento polimérico soluble en agua. Los POLI representativos incluyen poli(alquilenglicoles) tales como poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(metacrilato de hidroxialquilo), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolona, y poli(N-acriloilmorfolina). POLI puede ser un homopolímero, un copolímero alternante, un copolímero al azar, un copolímero de bloques, un tripolímero alternante, un tripolímero al azar, o un tripolímero de bloques de cualquiera de los anteriores. El segmento polimérico soluble en agua es preferiblemente, aunque no necesariamente, un polietilenglicol, "PEG", o un derivado del mismo.

10 El segmento polimérico puede tener cualquiera de diversas geometrías diferentes, por ejemplo, POLI puede ser lineal, ramificado, o ahorquillado. Muy típicamente, POLI es lineal o es ramificado, por ejemplo, que tiene 2 brazos poliméricos. Si bien mucha de la discusión de la presente memoria está centrada en PEG como un POLI ilustrativo, la discusión y las estructuras presentadas en la presente memoria se pueden ampliar fácilmente para que abarquen cualquier segmento polimérico soluble en agua descrito antes.

15 Se puede utilizar cualquier polímero soluble en agua que tenga al menos un extremo maleimida reactivo para preparar un producto conjugado de ácido succinámico polimérico de acuerdo con la invención y la invención no está limitada a este respecto. Si bien se pueden utilizar los polímeros solubles en agua que portan sólo un único reactivo maleimida, se pueden utilizar los polímeros que portan dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más maleimidias reactivas adecuadas para la conversión en sus formas de anillo abierto como se muestra en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes del límite superior del número de radicales precursores de maleimida o amino asociados con el segmento polimérico soluble en agua incluyen de aproximadamente 1 a aproximadamente 500, de 1 a aproximadamente 100, de aproximadamente 1 a aproximadamente 80, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, y de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.

20 Volviendo ahora al POLI preferido, PEG abarca poli(etilenglicol) en cualquier de sus formas lineal, ramificada o multi-brazo, incluyendo PEG protegido terminalmente, PEG ahorquillado, PEG ramificado, PEG pendiente, y menos preferiblemente, PEG que contiene una o más conexiones degradables que separan las subunidades monoméricas, para describirlo más abajo más completamente.

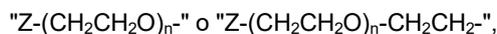
25 Un segmento polimérico PEG comprende lo siguiente:

$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, donde (n) típicamente oscila de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.000, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 3.000, o más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 1.000.

30 POLI puede estar protegido terminalmente, por ejemplo un PEG protegido terminalmente donde PEG está protegido terminalmente con un grupo de protección terminal inerte. Los PEG protegidos terminalmente preferidos son aquellos que tienen un radical de protección terminal tal como alcoxi, alcoxi sustituido, alqueniloxi, alqueniloxi sustituido, alquililoxi, alquililoxi sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido. Los grupos de

protección terminal preferidos son metoxi, etoxi, y benciloxi. El grupo de protección terminal puede comprender también ventajosamente un fosfolípido. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolinas, tales como dilauroilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diesteroilfosfatidilcolina, behenoilfosfatidilcolina, araquidoilfosfatidilcolina, y lecitina. En una realización, no obstante, un polímero de la invención carece sustancialmente de grupos ácido graso u otros radicales lipofílicos.

Remitiéndose ahora a cualquiera de las estructuras que contienen un segmento polimérico, POLI, POLI puede corresponder o comprender lo siguiente:

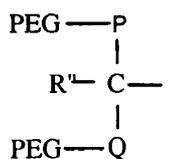


donde n oscila de aproximadamente 3 a aproximadamente 4000, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 4000, y Z es o incluye un grupo funcional, que puede ser un grupo reactivo o un grupo de protección terminal. Los ejemplos de Z incluyen hidroxilo, amino, éster, carbonato, aldehído, acetal, hidrato de aldehído, cetona, cetil, hidrato de cetona, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, hidrazida, urea, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxi, benciloxi, silano, lípido, fosfolípido, biotina, y fluoresceína, incluyendo sus formas activadas y protegidas donde sea aplicable. Son preferidos grupos funcionales tales como éster de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de benzotriazolilo, amina, vinilsulfona, maleimida, carbonato de N-succinimidilo, hidrazida, propionato de succinimidilo, butanoato de succinimidilo, succinato de succinimidilo, éster de succinimidilo, éter de glicidilo, oxycarbonilimidazol, carbonato de p-nitrofenilo, aldehído, ortopiridil-disulfuro, y acrilol.

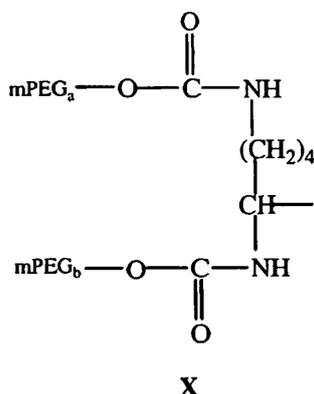
Estos y otros grupos funcionales, Z, son descritos en las siguientes referencias, todas las cuales son incorporadas en la presente memoria como referencia: carbonato de N-succinimidilo (véase p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.281.698, 5.468.478), amina (véase, p. ej., Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (véase, p. ej., Andrez et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, p. ej., Olson et al. en Poly(etilenglicol) Chemistry & Biological Applications, págs. 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, DC, 1997; véase también la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.672.662), succinato de succinimidilo (véase, p. ej., Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biofis. 7:175 (1984) y Joppich et al., Makromol. Chem. 180:1381 (1979), éster de succinimidilo (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.650.234), éter de glicidilo (véase, p. ej., Pitha et al. Eur. J. Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), oxycarbonilimidazol (véase, p. ej., Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véase, p. ej., Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11:141 (1985); y Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehído (véase, p. ej., Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.824.784, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.252.714), maleimida (véase, p. ej., Goodson et al. Bio/Technology 8:343 (1990), Romani et al. en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ortopiridil-disulfuro (véase, p. ej., Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314 (1993)), acrilol (véase, p. ej., Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.900.461).

De nuevo, las estructuras POLI mostradas inmediatamente antes pueden representar segmentos poliméricos lineales, o pueden formar parte de un segmento polimérico ramificado o ahorquillado. En un caso en el que el segmento polimérico es ramificado, las estructuras POLI inmediatamente anteriores pueden corresponder, por ejemplo, a los brazos poliméricos que forman parte de la estructura POLI global. Alternativamente, en un caso en el que POLI posee una estructura ahorquillada, la estructura POLI anterior puede corresponder, por ejemplo, a la porción lineal del segmento polimérico antes del punto de ramificación.

POLI puede corresponder también a una molécula de PEG ramificada que tiene 2 brazos, 3 brazos, 4 brazos, 5 brazos, 6 brazos, 7 brazos, 8 brazos o más. Los polímeros ramificados utilizados para preparar las maleimidias poliméricas de la invención pueden poseer en otra parte de 2 a 300 extremos reactivos más o menos. Los preferidos son los segmentos poliméricos ramificados que tienen 2 o 3 brazos poliméricos. Un POLI ramificado ilustrativo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.932.462, corresponde a la estructura:



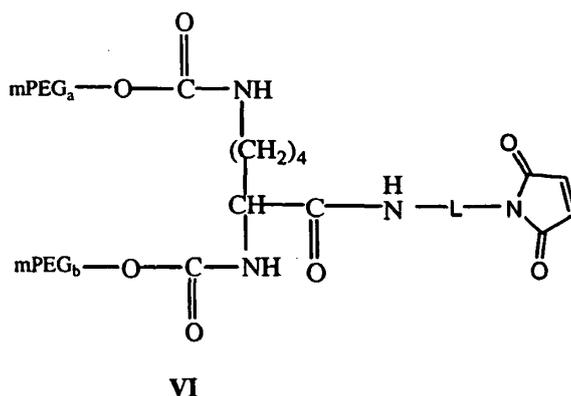
En esta representación, R'' es un radical no reactivo, tal como H, metilo o un PEG, y P y Q son conexiones no reactivas. En una realización preferida, el segmento polimérico PEG ramificado es lisina disustituida con metoxi poli(etilenglicol), y corresponde a:



En la configuración ramificada concreta, el segmento polimérico ramificado posee un solo sitio reactivo que se extiende desde el punto de ramificación "C" para situar el grupo maleimida reactivo a través de un conector como se describe en la presente memoria. Los PEG ramificados tales como los que se utilizan en la presente invención tendrán típicamente menos de 4 brazos PEG, y más preferiblemente, tendrán 2 o 3 brazos PEG. Tales PEG ramificados ofrecen la ventaja de que tienen un solo sitio reactivo, acoplado a una nube polimérica más densa, más grande que sus contrapartes de PEG lineales.

Un tipo concreto de PEG-maleimida ramificada corresponde a la estructura: (MeO-PEG-)_iG-L_{0.1}-MAL, donde MAL representa maleimida, i es igual a 2 o 3, y G es un resto lisina u otro resto aminoácido adecuado.

Una maleimida polimérica ramificada ilustrativa de la invención tiene la estructura mostrada más abajo, donde L es cualquier de los conectores descritos en la presente memoria.



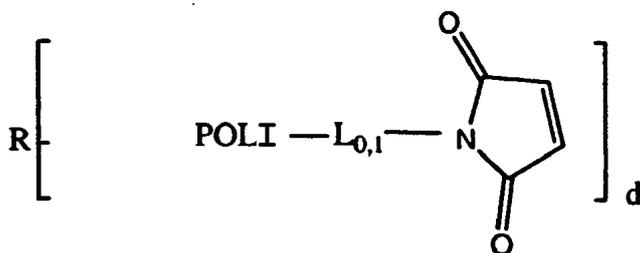
Una PEG-maleimida que tiene una estructura ramificada como la mostrada antes generalmente corresponde a la estructura VII.

Los PEG ramificados para su uso en la preparación de una maleimida polimérica de la invención incluye adicionalmente aquellos representados más generalmente por la fórmula R(PEG)_n, donde R es una molécula central o núcleo de la que se extienden 2 o más brazos PEG. La variable n representa el número de brazos PEG, donde cada uno de los brazos poliméricos independientemente puede estar protegido terminalmente o alternativamente, poseer un grupo funcional reactivo en sus extremos, tal como una maleimida u otro grupo funcional reactivo. En tales realizaciones multibrazo de la invención, cada brazo PEG posee típicamente un grupo maleimida en su extremo. Los PEG poliméricos tales como los representados generalmente por la fórmula, R(PEG)_a, anterior poseen de 2 brazos poliméricos a aproximadamente 300 brazos poliméricos (es decir, n oscila de 2 a aproximadamente 300). Los PEG ramificados tales como estos poseen preferiblemente de 2 a aproximadamente 25 brazos poliméricos, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 20 brazos poliméricos, e incluso más preferiblemente de 2 a aproximadamente 15 brazos poliméricos o menos. Son muy preferidos los polímeros multibrazo que tienen 3, 4, 5, 6, 7 o 8 brazos.

Las moléculas núcleo preferidas en los PEG ramificados descritos antes son los polioles. Tales polioles incluyen polioles alifáticos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono y de 1 a 10 grupos hidroxilo, incluyendo etilenglicol, alcanodiolos, alquilglicoles, alquilidenaalquilodiolos, alquilocicloalcanodiolos, 1,5-decalindiol, 4,8-bis(hidroximetil)triciclodecano, ciclo-alquilidendiols, dihidroxialcanos, trihidroxialcanos, y similares. También se pueden emplear polioles cicloalifáticos, incluyendo azúcares de cadena lineal o anillo cerrado y alcoholes de azúcares, tales como manitol, sorbitol, inositol, xilitol, quebraquitol, treitol, arabitol, eritritol, adonitol, dulcitol, facosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, ramnosa, galactosa, glucosa, fructosa, sorbosa, manosa, piranosa, altrosa, talosa, tagitosa, piranosidos, sacarosa, lactosa, maltosa, y

similares. Los polioles alifáticos adicionales incluyen derivados de gliceraldehído, glucosa, ribosa, manosa, galactosa, y estereoisómeros relacionados. Otros polioles núcleo que se pueden utilizar incluyen éteres corona, ciclodextrinas, dextrinas y otros carbohidratos tales como almidones y amilosa. Los polioles preferidos incluyen glicerol, pentaeritritol, sorbitol, y trimetilolpropano.

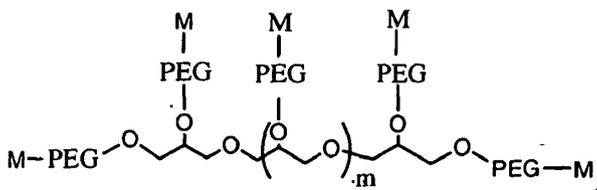
5 Una estructura polimérica multibrazo representativa del tipo descrito antes es:



VII

donde d es un entero de 3 a aproximadamente 100, y R es un resto de una molécula núcleo central que tiene 3 o más grupos hidroxilo, grupos amino, o combinaciones de los mismos.

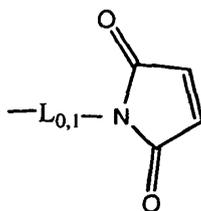
10 Los PEG multibrazo para su uso en la preparación de una maleimida polimérica de la invención incluyen PEG multibrazo asequibles de Nektar, Huntsville, Alabama. En una realización preferida, una maleimida polimérica multibrazo de la invención corresponde a la siguiente, donde los aspectos concretos de la porción maleimida conectada se proporcionan en otra parte de la presente memoria.



VII

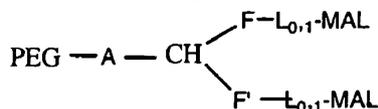
donde

15 PEG es $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$,
M es:



y m se selecciona del grupo que consiste en 3, 4, 5, 6, 7, y 8.

20 Alternativamente, la maleimida polimérica puede poseer una estructura ahorquillada global. Un ejemplo de una horquilla PEG corresponde a la estructura:



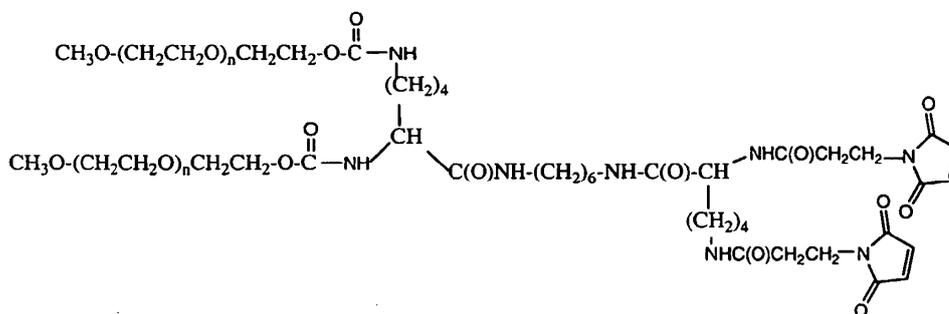
IX

25 donde PEG es cualquiera de las formas de PEG descritas en la presente memoria, A es un grupo conector, preferiblemente una conexión hidrolíticamente estable tal como oxígeno, azufre, o $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, F y F' son grupos espaciadores hidrolíticamente estables que están presentes opcionalmente, y las otras variables, L y maleimida (MAL) se definen como antes. Los conectores y grupos espaciadores ilustrativos correspondientes a A, F y F' se describen en la Solicitud Internacional Núm. PCT/US99/05333, y son útiles para formar segmentos poliméricos de este tipo para su uso en la presente invención. F y F' son grupos
30 espaciadores que pueden ser iguales o diferentes. En una realización concreta de lo anterior, PEG es mPEG, A corresponde a $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, y F y F' son ambos metileno o $-\text{CH}_2-$. Este tipo de segmento

polimérico es útil para la reacción con dos agentes activos, donde los dos agentes activos están situados separadamente a una distancia precisa o predeterminada, dependiendo de la selección de F y F'.

Un PEG ramificado, ahorquillado ilustrativo tiene la estructura mostrada más abajo, donde la porción ramificada está a la izquierda, y la porción ahorquillada que tiene dos grupos maleimida que se extienden desde allí a la derecha.

5



XI

Alternativamente, el segmento polimérico PEG para su uso en la preparación de una maleimida polimérica de la invención puede ser una molécula PEG que tiene grupos reactivos pendientes a lo largo de la longitud de la cadena de PEG en lugar de en el extremo o los extremos, para producir una maleimida polimérica estabilizada que tiene uno o más grupos maleimida pendientes anclados a la cadena de PEG mediante un conector, L.

10

Adicionalmente, en una realización menos preferida, el propio segmento polimérico puede poseer una o más conexiones débiles o degradables que son sujeto de hidrólisis. Las conexiones degradables ilustrativas que pueden estar presentes en el segmento polimérico incluyen pero no están limitadas a carbonato, imina, fosfato éster, e hidrazona.

15

Generalmente, la masa molecular media nominal del segmento polimérico soluble en agua, POLI variará. La masa molecular media nominal de POLI cae típicamente en uno o más de los siguientes intervalos: de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 80.000 daltons; de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 50.000 daltons; de aproximadamente 2.000 daltons a aproximadamente 25.000 daltons; de aproximadamente 5.000 daltons a aproximadamente 20.000 daltons. Las masas moleculares medias nominales ilustrativas para el segmento polimérico soluble en agua POLI incluyen aproximadamente 1.000 daltons, aproximadamente 5.000 daltons, aproximadamente 10.000 daltons, aproximadamente 15.000 daltons, aproximadamente 20.000 daltons, aproximadamente 25.000 daltons, aproximadamente 30.000 daltons, y aproximadamente 40.000 daltons. Los POLI de bajo peso molecular poseen masas moleculares de aproximadamente 250, 500, 750, 1000, 2000, o 5000 daltons.

20

25

Se entiende que cualquiera de las estructuras anteriores correspondientes a una maleimida polimérica también abarca su contraparte de ácido succinámico polimérico correspondiente, incluso si no se muestra explícitamente. De este modo, se entiende todas las estructuras de maleimida poliméricas de la presente memoria se extienden a la misma estructura con la excepción de que el anillo de maleimida está en su forma de anillo abierto, y puede estar no conjugada (ácido maleámico) o conjugada (producto conjugado de ácido succinámico).

30

El conector

Volviendo ahora al radical conector, un radical conector o simplemente "conector" de la invención está representado generalmente por la variable, L. Un conector de la invención, L, si se encuentra, típicamente contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 átomos. El conector es la porción del polímero global que conecta la porción maleimida o ácido maleámico o ácido succinámico del polímero con el segmento polimérico. Un conector de la invención puede ser un solo átomo, tal como un oxígeno o un azufre, dos átomos, o varios átomos. Un conector tiene típicamente pero no necesariamente naturaleza lineal. La longitud global del conector oscilará típicamente entre 1 y aproximadamente 40 átomos, donde por longitud se entiende el número de átomos de una sola cadena, sin contar los sustituyentes. Por ejemplo, -CH₂- cuenta como un átomo con respecto a la longitud global del conector, -CH₂CH₂O- cuenta como 3 átomos de longitud. Preferiblemente, un conector tendrá una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 átomos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos, y es hidrolíticamente estable.

35

40

45

Un conector de la invención puede ser un grupo funcional sencillo tal como una amida, un éster, un uretano, o una urea, o puede contener metileno u otros grupos alquilenos flanqueando cualquier lado del grupo funcional sencillo. Alternativamente, un conector puede contener una combinación de grupos funcionales que pueden ser iguales o diferentes. Adicionalmente, un conector de la invención puede ser una cadena alquilénica, que contiene opcionalmente uno o más átomos de oxígeno o azufre (es decir, un éter o tioéter). Los conectores preferidos son aquellos que son hidrolíticamente estables. Cuando se observa en el contexto de las estructuras de la presente memoria, un conector es el que cuando se

50

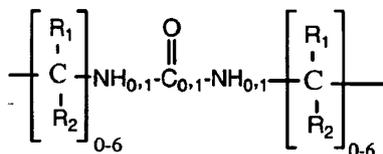
considera como parte del polímero global, no produce una estructura global que contiene un enlace peróxido (-O-O-) o un enlace -N-O- o -O-N-.

En el contexto de las estructuras I, II, un conector de la invención puede ser cualquiera de los siguientes:

- 5 -O-, -NH-, -S-, -C(O)-, C(O)-NH, NH-C(O)-NH, O-C(O)-NH,
 -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-, -CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-
 CH₂-, -CH₂-CH₂-O-,
 -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-
 O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-,
 -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-
 10 CH₂-CH₂-,
 -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-
 CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-
 CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH₂-, -CH₂-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-O-CH₂-, -C(O)-O-
 CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-
 15 C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-,
 -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -NH-CH₂-, -NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-, -C(O)-CH₂-, -C(O)-
 CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-, -CH₂-CH₂-
 CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-
 CH₂-NH-C(O)-CH₂-, grupo cicloalquileo bivalente, -N(R⁶)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-
 20 CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-[CH₂]_h-(OCH₂CH₂)_j-, y combinaciones de dos o más de cualquiera de los
 anteriores, donde (h) es de 0 a 6, (j) es de 0 a 20, R⁶ 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.

Para los fines de la presente descripción, no obstante, una serie de átomos no es considerada radical
 25 conector cuando la serie de átomos es inmediatamente adyacente a un segmento polimérico, POLI, y la
 serie de átomos no es más que otro monómero tal que el radical conector podría representar una mera
 extensión de la cadena polimérica. Por ejemplo, dada la estructura parcial "POLI-L-", donde POLI en este
 caso está definido como "CH₃O(CH₂CH₂O)_n-", el radical conector no sería "-CH₂CH₂O-" puesto que tal
 definición representaría meramente una extensión del polímero. Esto no quiere decir, no obstante, que un
 30 conector de la invención no posea una o más porciones -CH₂CH₂O- contiguas. Por ejemplo, un conector
 puede contener una o más subunidades (-CH₂CH₂O-) flanqueadas en uno o ambos lados por uno o una
 combinación de conectores ilustrativos como los proporcionados antes.

En una realización de la invención, un conector posee la estructura:



35 En el conector anterior, R¹ y R² en cada aparición son cada uno independientemente H o un radical
 orgánico que se selecciona del grupo que consisten en alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo
 sustituido, alquilencicloalquilo, y alquilencicloalquilo sustituido. En la estructura anterior, un subíndice de
 cero indica la ausencia de este átomo o grupo funcional concreto.

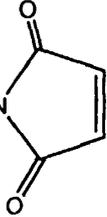
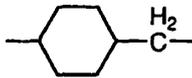
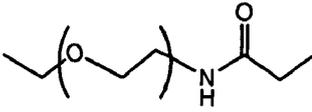
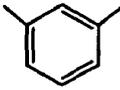
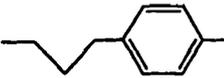
Utilizando un solo grupo terminal maleimida y una protección terminal metoxi como representación, se
 40 ejemplifican algunas estructuras de PEG-maleimida ilustrativas en las Estructuras 1-4 de más abajo. Los
 conectores, L, mostrados en la Tabla 1, se pueden utilizar para formar los polímeros de ácido maleámico y
 productos conjugados de la invención. La PEG-maleimida representada por la Estructura 3-ET es
 denominada "sin conector" puesto que el anillo de maleimida simplemente reemplaza el grupo hidroxilo
 45 terminal en el PEG. Los conectores ilustrativos mostrados más abajo se pueden utilizar combinados con
 cualquiera de los segmentos poliméricos descritos antes; se entiende que las realizaciones de más abajo
 con mPEG son sólo ilustrativas.

50

55

60

Tabla 1.

$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{L}-\text{HN}$ 	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> $\text{L}_1 = -\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{X}-$ </div>	
Abrev. Conector	X
AMET	-(CH ₂) ₂ -
AMTR	-(CH ₂) ₃ -
AMPE	-(CH ₂) ₅ -
MCH	
TEO	
mPH	
pPHAL	

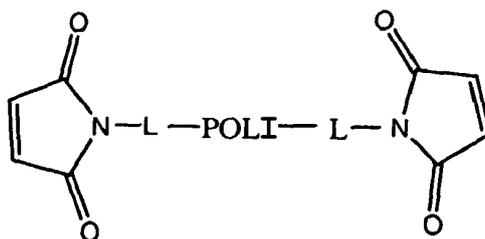
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> $\text{L}_2 = -\text{NH}-\text{Y}-$ </div>	
Abrev. Conector	Y
BU	-(CH ₂) ₄ -
HE	-(CH ₂) ₆ -
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> $\text{L}_3 = -\text{O}-\text{Z}-$ </div>	
Abrev. Conector	Z
ET	-(CH ₂) ₂ -
PR	-(CH ₂) ₃ -

PRAC	-C(O)-CH ₂ -CH ₂ -
L₄ = -CH₂-Q	
Abrev. Conector	Q
PACA	-C(O)-
PAME	-C(O)-NH-CH ₂ -
PAET	-C(O)-NH-CH ₂ CH ₂ -
BAET	-(CH ₂)-C(O)NH-CH ₂ -CH ₂ -
PAHE	-C(O)-NH-(CH ₂) ₆ -
BAET	-CH ₂ -C(O)NH-(CH ₂) ₆ -
PAOX	-C(O)-NH-CH ₂ CH ₂ O-

5 Generalmente, son preferidos los conectores que son eficaces para proporcionar una velocidad de hidrólisis de apertura del anillo de la maleimida polimérica no acoplada que resulta aumentada (es decir, más rápida) que la de la misma maleimida polimérica soluble en agua que carece de un conector. En una realización preferida, el grupo conector facilita la apertura del anillo de manera que la velocidad de hidrólisis de apertura del anillo de la maleimida tiene una vida media igual o menor de aproximadamente 12 horas a pH 7,5 cuando se mide a temperatura ambiente. En una realización más preferida, el grupo conector facilita la apertura del anillo de manera que la hidrólisis de apertura del anillo de la maleimida tiene una vida media igual o menor de aproximadamente 12 horas a pH 9 cuando se mide a temperatura ambiente. Los grupos conectores preferidos que facilitan apertura del anillo incluyen las maleimidas sin conector, es decir L₃-ET, aquellos con conectores alquílicos cortos, p. ej. L₃-PR, aquellos con un grupo etileno o anillo anclado al nitrógeno del anillo de maleimida, p. ej. L₁-MCH y L₁-pPHAL, aquellos con conectores alquílicos cortos entre el átomo de nitrógeno de la maleimida y un grupo carbonilo, p. ej. L₁-AMET y diferentes modificaciones de los grupos enumerados que contienen sustituyentes que potencian la retirada de electrones del nitrógeno anular de la maleimida sin proporcionar un impedimento estérico significativo a la hidrólisis, es decir sin sustitución ramificada hacia el átomo conector unido al nitrógeno anular. Los conectores preferidos poseen un grupo captador de electrones a aproximadamente 6 átomos de la maleimida o del nitrógeno derivado de maleimida, es decir, a 1, 2, 3, 4, 5, o 6 átomos de la maleimida o del nitrógeno derivado de maleimida, o incluso más preferiblemente, a aproximadamente 3 átomos.

Los polímeros y productos conjugados de la invención incluyen las estructuras monofuncionales, bifuncionales, y multifuncionales descritas previamente.

25 Por ejemplo, un precursor de maleimida polimérica de un polímero o producto conjugado de la invención se puede describir generalmente mediante la siguiente estructura donde las variables se definen en otra parte de la presente memoria:



XII

30 En la realización anterior, las L pueden ser iguales o diferentes. En una realización concreta el polímero reactivo es homo-bifuncional, es decir, ambas L son iguales.

Productos conjugados de ácido succinámico

35 Las características generalizadas de los productos conjugados de la invención se han descrito antes de manera detallada. Los agentes activos que se unen covalentemente a un ácido succinámico polimérico abarcan cualquiera de varios tipos de moléculas, entidades, superficies, y similares, como resultará evidente de lo siguiente.

Moléculas diana y superficies

Las maleimidias poliméricas (tanto de anillo abierto como cerrado) de la invención se pueden unir, covalentemente o no covalentemente, a varias entidades incluyendo películas, superficies de separación química y purificación, soportes sólidos, superficies de metal/óxido metálico tales como oro, titanio, tántalo, niobio, aluminio, acero, y sus óxidos, óxido de silicio, macromoléculas, y moléculas pequeñas.

Adicionalmente, los polímeros y métodos de la invención también se pueden utilizar en sensores bioquímicos, conmutadores bioelectrónicos, y reguladores. Los polímeros y métodos de la invención también se pueden emplear para preparar portadores para la síntesis peptídica, para la preparación de superficies recubiertas de polímero e injertos poliméricos, para preparar productos conjugados de polímero-ligando para el reparto por afinidad, para preparar hidrogeles entrecruzados o no entrecruzados, y para preparar aductos de polímero-cofactor para biorreactores.

Un agente biológicamente activo para uso en el suministro de un producto conjugado de la invención puede ser uno cualquiera más de los siguientes. Los agentes adecuados se pueden seleccionar, por ejemplo, entre hipnóticos y sedantes, excitadores psíquicos, tranquilizantes, fármacos respiratorios, anticonvulsivos, relajantes musculares, agentes antiparkinson (antagonistas de dopamina), analgésicos, anti-inflamatorios, fármacos anti-ansiedad (ansiolíticos), supresores del apetito, agentes antimigraña, agente para la contracción muscular, agentes anti-infecciosos (antibióticos, antivirales, antifúngicos, vacunas), agentes antiartríticos, agentes antimaláricos, antieméticos, anepilépticos, broncodilatadores, citoquinas, factores de crecimiento, agentes anti-cancerosos, agentes antitrombóticos, antihipertensores, fármacos cardiovasculares, antiarrítmicos, antioxidantes, agentes anti-asmáticos, agentes hormonales incluyendo contraceptivos, simpatomiméticos, diuréticos, agentes reguladores de lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasíticos, anticoagulantes, neoplásticos, antineoplásticos, hipoglucémicos, agentes y suplementos nutricionales, suplementos para el crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico, y agentes de contraste.

Más concretamente, el agente activo puede encontrarse en una de varias clases estructurales, incluyendo pero no limitadas a moléculas pequeñas (preferiblemente moléculas pequeñas insolubles), péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, polisacáridos, esteroides, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, grasas, electrolitos, y similares. Preferiblemente, un agente activo para el acoplamiento a una maleimida polimérica posee un grupo amino o sulfhidrilo nativo, o alternativamente, es modificado para que contenga al menos un grupo amino o sulfhidrilo reactivo adecuado para el acoplamiento a una maleimida polimérica.

Los ejemplos específicos de los agentes activos adecuados para la unión covalente a un polímero de la invención incluyen pero no están limitados a asparraginasas, amdoxovir (DAPD), antide, becaplermina, calcitoninas, cianovirina, diftixina dinileuquina, eritropoyetina (EPO), agonistas de EPO (p. ej., péptidos de aproximadamente 10-40 aminoácidos de longitud y que comprenden una secuencia núcleo concreta como se describe en la Publicación WO 96/40749), dornasa alfa, proteína estimuladora de la eritropoyesis (NESP), factores de coagulación tales como Factor V, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XII, Factor XIII, factor de von Willebrand; ceredasa, cerezyme, alfa-glucosidasa, colágeno, ciclosporina, alfa-defensinas, beta-defensinas, exedina-4, factor estimulado de colonias de granulocitos (GCSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de proteinasa alfa-1, elcatonina, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), fibrinógeno, filgrastim, hormonas del crecimiento como la hormona del crecimiento humana (hGH), hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), GRO-beta, anticuerpo GRO-beta, proteínas morfogénicas óseas tales como la proteína morfogénica ósea 2, la proteína morfogénica ósea 6, OP-1; factor de crecimiento para fibroblastos ácido, factor de crecimiento para fibroblastos alcalino, ligando CD-40, heparina, seralbumina humana, heparina de bajo peso molecular (LMWH), interferones tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, interferón consenso; interleuquinas y receptores de interleuquinas tales como el receptor de interleuquina-1, interleuquina-2, proteínas de fusión de interleuquina-2, antagonistas del receptor de interleuquina-1, interleuquina-3, interleuquina-4, receptor de interleuquina-4, interleuquina-6, interleuquina-8, interleuquina-12, receptor de interleuquina-13, receptor de interleuquina-17; lactoferrina y fragmentos de lactoferrina, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), insulina, pro-insulina, análogos de insulina (p. ej., insulina monoacilada como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.922.675), amilina, péptido C, somatostatina, análogos de somatostatina incluyendo octreotida, vasopresina, hormona estimuladora del folículo (FSH), vacuna de la influenza, factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), insulintropina, factor estimulado de colonias de macrófagos (M-CSF), activadores de plasminógeno tales como alteplasa, uroquinasa, reteplasa, estreptoquinasa, pamiteplasa, lanoteplasa, y tenetepplasa; factor de crecimiento nervioso (NGF), osteoprotegerina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento tisulares, factor de crecimiento transformante 1, factor de crecimiento endotelial vascular, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento glial (GGF), receptores de Células T, moléculas/antígenos CD, factor de necrosis tumoral (TNF), proteína quimioatrayente de monocitos 1, factores de crecimiento endoteliales, hormona paratiroidea (PTH), péptido de tipo glucagón, somatotropina, timosina alfa 1, inhibidor de timosina alfa 2 IIb/IIIa, timosina beta 9, timosina beta 4, antitripsina alfa 1, compuestos fosfodiesterasa (PDE), VLA-4 (antígeno 4 muy tardío), inhibidores de VLA-4, bisfosfonatos, anticuerpo del virus respiratorio sincitial, gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (ADNasa), proteína bactericida/aumentadora de la permeabilidad (BPI), y anticuerpo anti-CMV. Los anticuerpos monoclonales ilustrativos incluyen etanercept (una proteína de fusión dimérica que consiste en la porción de unión al ligando extracelular del receptor de TNF de 75 kD humano conectada a la

porción Fc de IgG1), abciximab, afeliomomab, basiliximab, daclizumab, infliximab, ibritumomab tiuexetan, mitumomab, muromonab-CD3, producto conjugado de yodo 131-tositumomab, olizumab, rituximab, y trastuzumab (herceptina).

Los agentes adicionales adecuados para la unión covalente a un polímero incluyen pero no están limitados a amifostina, amiodarona, ácido aminocaproico, aminohipurato sódico, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, amsacrina, anagrelida, anastrozol, asparraginasa, antraciclinas, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfan, cabergolina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucin, cilastatina sodio, cisplatino, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, campotecinas, ácido 13-cis-retinoico, ácido retinóico todo trans; dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, deferoxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilostilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estramustina, etoposido, exemestano, fexofenadina, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecan, itraconazol, goserelina, letrozol, leucovorina, levamisol, lisinopril, lovotiroxina sodio, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalan, mercaptopurina, bitartrato de metaraminol, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, naloxona, nicotina, nilutamida, octreotida, oxaliplatino, pamidronato, pentostatina, pilcamicina, porfimer, prednisona, procarbazona, proclorperazina, ondansetron, raltitrexed, sirolimus, estreptozocina, tacrolimus, tamoxifeno, temozolomida, teniposido, testosterona, tetrahidrocannabinol, ftalidomida, tioguanina, tiotepa, topotecan, tretinoína, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, dolasetron, granisetron; formoterol, fluticasona, leuprolida, midazolam, alprazolam, amfotericina B, podofilotoxinas, antivirales nucleósidos, aroil hidrazonas, sumatriptan; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davercina, azitromicina, fluritiromicina, diritiromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, leucomicina, miocamicina, roquitamicina, andazitromicina, y swinolide A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trovafloxacina, alatrofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, lomefloxacina, sparfloxacina, temafloxacina, pefloxacina, amifloxacina, feroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina, y sitafloxacina; aminoglicósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amicacina, kanamicina, neomicina, y estreptomina, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato; polimixinas tales como polimixina B, capreomicina, bacitracina, penemos; penicilinas incluyendo agentes sensibles a la penicilinasasa como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a la penicilinasasa como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos contra microorganismos gram negativos como ampicilina, amoxicilina, y hetacilina, cilina, y galampicilin; penicilinas antipseudomonas como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, y piperacilina; cefalosporinas como cefpodoxime, cefprozil, ceftbuten, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradrina, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxil, cefaloglicina, cefuroxima, ceforanida, cefotaxima, cefatrizina, cefacetilo, cefepima, cefixima, cefonicid, cefoperazona, cefotetan, cefmetazol, ceftazidima, loracarbef, y moxalactam, monobactamos como aztreonam; y carbapenemos tales como imipenemo, meropenemo, isetionato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaina, sulfato de metaproteronol, dipropionate de beclometasona, acetamida de triamcinolona, acetónido de budesonida, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolin sodio, y tartrato de ergotamina; taxanos tales como paclitaxel; SN-38, y tirfostinas.

Los péptidos o proteínas preferidos para el acoplamiento a una maleimida polimérica de la invención incluyen EPO, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN consenso, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, IL-2, remicade (infliximab), Rituxan (rituximab), Enbrel (etanercept), Sinagis (palivizumab), Reopro (abciximab), Herceptin (trastuzimab), tPA, Cerizyme (imiglucerasa), vacuna de la Hepatitis-B, rDNAsa, inhibidor de proteinasa alfa-1, GCSF, GMCSF, hGH, insulina, FSH, y PTH.

Se entiende que los agentes biológicamente activos ilustrativos anteriores abarcan, cuando sea aplicable, análogos, agonistas, antagonistas, inhibidores, isómeros, y sus formas salinas farmacéuticamente aceptables. En referencia a los péptidos y las proteínas, se pretende que la invención abarque las formas sintéticas, recombinantes, nativas, glicosiladas, y no glicosiladas, así como sus fragmentos biológicamente activos. Se entiende adicionalmente que las proteínas biológicamente activas anteriores abarcan las variantes que tienen uno o más aminoácidos sustituidos (p. ej., cisteína), suprimidos, o similares, con tal que la proteína variante resultante posea al menos un cierto grado de actividad de la proteína de origen (nativa).

Los productos conjugados o métodos descritos en la presente memoria también se pueden ampliar a formulaciones de hidrogeles.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención también incluye las preparaciones farmacéuticas que comprenden un producto conjugado como se proporciona en la presente memoria combinado con un excipiente farmacéutica. Generalmente, el propio producto conjugado estará en forma sólida (p. ej., precipitado) o en solución, que se puede combinar con un excipiente farmacéutico adecuado que puede estar en forma sólida o líquida.

Los excipientes ilustrativos incluyen, sin limitación, aquellos seleccionados del grupo que consiste en carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases, y sus combinaciones.

Pueden estar presentes un carbohidrato tal como un azúcar, un azúcar transformado tal como alditol,

ácido aldónico, un azúcar esterificado, y/o un polímero azucarado como excipiente. Los excipientes carbohidratados 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.

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

La preparación puede incluir también un agente antimicrobiano para prevenir o impedir el crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitantes de los agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timerosal, y sus combinaciones.

En la preparación puede estar presente también un antioxidante. Los antioxidantes se utilizan para prevenir la oxidación, previniendo de este modo el deterioro del producto conjugado u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, sodio formaldehído sulfoxilato, metabisulfito de sodio, y sus combinaciones.

Un tensioactivo puede estar presente como excipiente. Los tensioactivos ilustrativos incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80," y plurónicos tales como F68 y F88 (ambos los cuales son asequibles de BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidil-etanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposómica), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, cinc y otros cationes adecuados.

Los ácidos o las bases pueden estar presentes en forma de un excipiente en la preparación. Los ejemplos de los ácidos que se pueden utilizar incluyen aquellos 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 sus combinaciones. Los ejemplos de las bases adecuadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio, y sus combinaciones.

Las preparaciones farmacéuticas abarcan todos los tipos de formulaciones y en particular aquellas que son adecuadas para su inyección, p. ej., polvos que pueden ser reconstituídos en forma de suspensiones y soluciones. La cantidad del producto conjugado (es decir, el producto conjugado formado entre el agente activo y el polímero descrito en la presente memoria) en la composición variará dependiendo de varios factores, pero óptimamente será una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacene en un recipiente de dosificación unitaria (p. ej., un vial). Por añadidura, la preparación farmacéutica se puede alojar en una jeringa. Una dosis terapéuticamente eficaz se puede determinar experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades crecientes del producto conjugado con el fin de determinar qué cantidad produce el criterio de valoración clínicamente deseado.

La cantidad de cualquier excipiente individual en las composición variará dependiendo de la actividad del excipiente y de las necesidades concretas de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de experimentación rutinaria, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan de pequeñas a grandes), examinando la estabilidad y otros parámetros, y determinando después el intervalo al que se logra en funcionamiento óptimo sin efectos adversos significativos.

Generalmente, no obstante, el excipiente estará presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso, preferiblemente de aproximadamente 5%-98% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 15-95% en peso de excipiente, siendo muy preferidas concentraciones menores de 30% en peso.

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

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se administran típicamente, aunque no necesariamente, vía 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. También están incluidos otros modos de administración, tales como pulmonar, rectal, transdérmico, transmucosal, oral, intratecal, subcutáneo, intra-arterial, etcétera.

Como se ha descrito previamente, los productos conjugados se pueden administrar inyectados parenteralmente mediante inyección intravenosa, o menos preferiblemente mediante inyección intramuscular o mediante inyección subcutánea. Los tipos de formulación adecuados para la administración parenteral incluyen soluciones listas para su inyección, polvos secos para la combinación con un disolvente antes de su uso, suspensiones listas para su inyección, composiciones insolubles secas

para su combinación con un vehículo antes de su uso, y emulsiones y productos concentrados líquidos para diluirlos antes de su administración, entre otros.

Métodos de administración

- 5 La invención también proporciona un método para administrar un producto conjugado como el proporcionado en la presente memoria a un paciente que padece una afección que es sensible al tratamiento con el producto conjugado. El método comprende administrar, generalmente vía inyección, una cantidad terapéuticamente eficaz del producto conjugado (proporcionado preferiblemente como parte de una preparación farmacéutica). El método de administración se puede utilizar para tratar cualquier
- 10 afección que pueda ser remediada o evitada mediante la administración del producto conjugado concreto. Los expertos normales en la técnica apreciarán qué afecciones se pueden tratar eficazmente con un producto conjugado específico. La dosis real que se va a administrar variará dependiendo de la edad, el peso, y las condiciones generales del sujeto así como de la gravedad de la afección que vaya a ser tratada, el criterio del profesional sanitario, y del producto conjugado que esté siendo administrado. Las
- 15 cantidades terapéuticamente eficaces son conocidas por los expertos en la técnica y/o se describen en los textos y la literatura de referencia pertinentes. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará de aproximadamente 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 50 mg/día.
- 20 La dosificación unitaria de cualquier producto conjugado producido (de nuevo, proporcionado preferiblemente como parte de una preparación farmacéutica) se puede administrar en una variedad de programas de dosificación dependiendo del criterio del médico, las necesidades del paciente, etcétera. El programa de dosificación específico será conocido por los expertos normales en la técnica o se puede determinar experimentalmente utilizando métodos rutinarios. Los programas de dosificación ilustrativos incluyen, sin limitación, administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces
- 25 al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquiera de sus combinaciones. Una vez que se ha logrado el criterio de valoración clínico, se detiene la dosificación de la composición.
- Una ventaja de la administración de los productos conjugados de la presente invención es que las porciones poliméricas solubles en agua se pueden separar mediante escisión. Tal resultado es ventajoso cuando el aclaramiento del organismo es potencialmente un problema debido al tamaño del polímero. Óptimamente, la escisión de la porción polimérica soluble en agua es facilitada a través del uso de conexiones escindibles fisiológicamente y/o degradables enzimáticamente tales como conexiones que contienen uretano, amida, carbonato o éster. De este modo, el aclaramiento del producto conjugado (vía escisión de las porciones poliméricas solubles en agua individuales) se puede modular seleccionando el
- 30 tamaño molecular del polímero y el tipo de grupo funcional proporcionaría las propiedades de aclaramiento deseadas. Un experto normal en la técnica puede determinar el tamaño molecular apropiado del polímero así como el grupo funcional escindible. Por ejemplo, un experto normal en la técnica, utilizando experimentación rutinaria, puede determinar un tamaño molecular apropiado y un grupo funcional escindible preparando primero una variedad de derivados poliméricos con diferentes pesos de
- 35 polímeros y grupos funcionales escindibles, y después obtener el perfil de aclaramiento (p. ej., a través de toma de muestras periódicas de sangre u orina) administrando el derivado polimérico a un paciente y recogiendo muestras periódicas de sangre y/o orina. Una vez que se ha obtenido una serie de perfiles de aclaramiento para cada producto conjugado sometido a ensayo, se puede identificar un producto conjugado adecuado.
- 40 Todos los artículos, libros, publicaciones de patente y otras publicaciones referenciadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

- 50 Se debe entender que mientras la invención ha sido descrita junto con algunas realizaciones específicas preferidas de la misma, se pretende que la descripción precedente así como los ejemplos que siguen ilustren y no limiten el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones en el alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Abreviaturas

- 55 DCM: diclorometano
 RMN: resonancia magnética nuclear
 DI: desionizada
 r.t. temperatura ambiente
 anh. anhidro
- 60 Da Daltons
 GPC Cromatografía de Penetración en Gel

Materiales y métodos

- 65 Todos los reactivos químicos referidos en los ejemplos adjuntos son adquiribles en el mercado a no ser que se indique lo contrario.
 Todos los reactivos PEG referidos en los ejemplos adjuntos son adquiribles de Nektar, Huntsville, AL.
 Todos los datos de RMN ^1H se generaron mediante un espectrómetro de RMN a 300 o 400 MHz fabricado

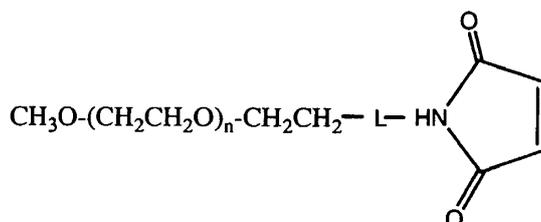
por Bruker.

EJEMPLO 1

5 Tasas de hidrólisis de peg-maleimidados ilustrativos

Se sintetizó y se estudió una serie de metoxi-PEG-maleimidados representativos con un peso molecular medio de 5000 Daltons. Las cinéticas de la reacción de hidrólisis del anillo de maleimida para cada estructura de más abajo se determinó midiendo la absorción UV a 297 nm de soluciones de cada mPEG-maleimida a una concentración de 5 mg/mL en Tampón Fosfato 50 mM a un pH de aproximadamente 7,5.

10 La estructura generalizada para las maleimidados poliméricos se muestra más abajo. Las estructuras exactas correspondiente a cada uno de los conectores (L₁, L₂, y L₃) se proporciona en la Tabla 1 de más abajo.



15 Tabla 2. Tasas de Hidrólisis de mPEG (5 k-Da) Maleimidados (5 mg/mL) en Tampón Fosfato 50 mM (pH~7,5) según se Midió mediante Absorción UV a 297 nm.

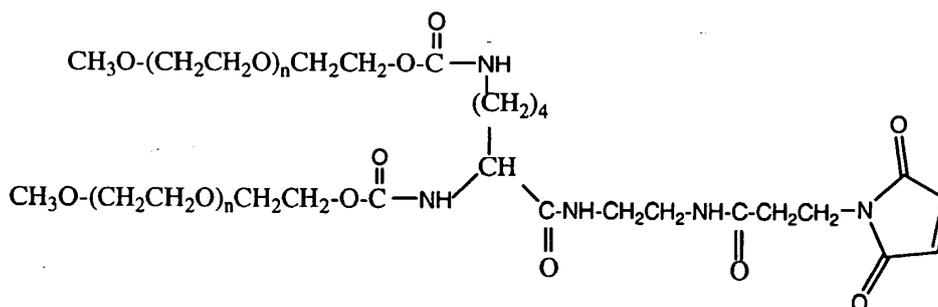
Estructura	vida media (hrs)	Tasa Relativa
L ₁ -AMTR	8,8	3,66
L ₁ -AMPE	19,4	1,66
L ₁ -MCH	16,3	1,98
L ₂ -BU	19,6	1,65
L ₂ -HE	32,3	1,00
L ₃ -ET	8,1	4,01
L ₃ -PR	11,5	2,82

20 Como se muestra mediante los datos de la Tabla 2, las tasas de hidrólisis de las maleimidados poliméricos ilustrativas varían con la estructura. En este grupo, el conector HE es el más resistente a la hidrólisis, mientras que el conector ET muestra la velocidad de hidrólisis más rápida, indicando la tendencia de su anillo de maleimida a la hidrólisis, incluso a pH bastante suave.

25 Los datos anteriores indican que los grupos conectores preferidos para facilitar la apertura del anillo incluyen aquellos que tienen un grupo captador de electrones fuerte, EWG, en íntima proximidad (muy preferiblemente a 3 átomos más o menos) del sustituyente o los sustituyentes maleimida, es decir, el nitrógeno del anillo de maleimida. El conector L₃-ET, -O-etileno-, posee un átomo captador de electrones, oxígeno, a 3 átomos del nitrógeno de la maleimida, que parece contribuir a su tendencia al aumento de la velocidad de hidrólisis. Son preferidos los conectores que tienen un EWG muy preferiblemente a 1, 2, 3 o 4 átomos del nitrógeno de la maleimida.

30 **EJEMPLO 2**

Hidrólisis de una maleimida polimérica ramificada y conectada. mpeg2-mal-40k



35 La maleimida polimérica representada antes, mPEG2-MAL-40K, se obtuvo de Nektar (Huntsville, AL).

Este derivado polimérico experimenta un grado limitado de hidrólisis del anillo de maleimida en ciertas condiciones para formar el derivado de ácido maleámico correspondiente, como se describe más abajo. La reacción de hidrólisis se verificó analíticamente observando el descenso del porcentaje de la maleimida de origen a lo largo del tiempo mediante HPLC. Las cinéticas de la reacción de hidrólisis se determinó a un pH de aproximadamente 5,5, utilizando una solución tamponada con HEPES a aproximadamente 25°C.

Se obtuvo una correlación lineal a partir de los datos de partida trazando el logaritmo de la concentración de ácido maleámico o de maleimida frente al tiempo (lo último se muestra en la FIG. 3).

Los datos se utilizaron después para determinar la vida media de la reacción de hidrólisis, que se calculó oque era de aproximadamente 34 días en las condiciones examinadas. Así, en estas condiciones, esta maleimida concreta es resistente a la apertura del anillo. No obstante, en agua no tamponada, de nuevo a 25°C y a un pH superior, se determinó que la hidrólisis de mPEG2-MAL-40K tenía una vida media de aproximadamente 2,1 días, cuando se midió de la misma manera.

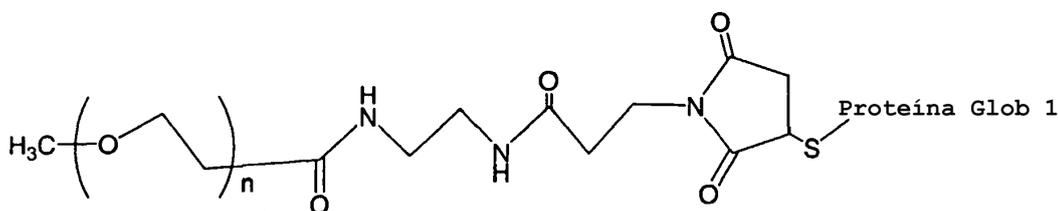
15 EJEMPLO 3

Estudio de la tasa de hidrólisis de los productos conjugados de succinimida poliméricos

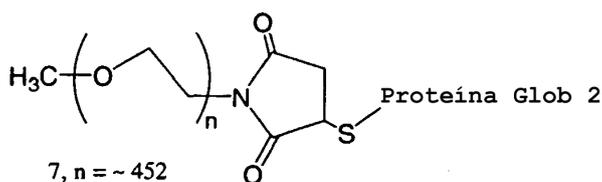
Las tasas de hidrólisis de productos conjugados de proteínas y moléculas pequeñas se investigaron para examinar la correlación entre las tendencias de apertura del anillo de las propias maleimidias terminadas en polímero frente a sus productos conjugados.

Puesto que componentes biomolecular grandes tales como las proteínas tienen un efecto espectacular sobre la retención de moléculas conjugadas en columnas de cromatografía líquida comunes; generalmente es más difícil medir las cinéticas de los productos conjugados de maleimida de lo que lo es para los propios polímeros. En este análisis, la forma de ácido abierto del ácido maleámico no fue claramente separable de la forma anular no abierta o cerrada. No obstante, un análisis combinado basado en cromatografía de exclusión por tamaños (HPLC-SE) y electroforesis analítica de proteínas (SDS-PAGE) se empleó con éxito para estimar las características de apertura del anillo de los productos conjugados proteicos de maleimida polimérica, así como los productos conjugados preparados utilizando compuestos no proteicos modelo.

En este estudio, se estudiaron dos productos conjugados de PEG-proteína globular representados generalmente más abajo para examinar sus características de apertura del anillo.



6, n = ~ 681



7, n = ~ 452

La estructura superior es un producto conjugado PEG-maleimida de Proteína Glob 2, donde la Proteína Glob 2 es una proteína que tiene a peso molecular de aproximadamente 48 kDa. La Proteína Glob 2 era un producto conjugado a una PEG-maleimida derivada de un ácido PEG-propionico, PM 30 kDa, que incluía adicionalmente un conector de longitud media interpuesto entre la porción derivada de ácido propiónico del polímero y el extremo maleimida. El conector en la estructura superior es $-C(O)-NH(CH_2)_2-NH-C(O)-CH_2CH_2-$.

La estructura inferior es un producto conjugado PEG-maleimida de Proteína Glob 1, donde la proteína posee un peso molecular de aproximadamente 11 kDa. El producto conjugado se preparó utilizando una maleimida sin conector (mPEG-MAL) que tenía un peso molecular de aproximadamente 20 kDa. La estructura de PEG-maleimida correspondiente es 3-ET.

La estructura inferior (Proteína Glob 2) tiene el anillo completamente abierto al cabo de 24 horas a pH 8,5 a temperatura ambiente, indicando de este modo la inestabilidad de este polímero terminado en maleimidilo. De este modo, este producto conjugado polimérico es un buen candidato para promover la reacción de apertura del anillo para proporcionar una composición químicamente estable, es decir, una en el equilibrio, que comprende el producto conjugado de ácido succinámico polimérico. Con respecto a la

forma sin conector, no obstante, el conector de la estructura superior (Glob Proteína 1) parece que retarda la apertura del anillo, puesto que la estructura anular en el producto conjugado superior no tiene el anillo completamente abierto hasta las 17 horas, a pH 9, después de calentar a 50°C durante 17 horas.

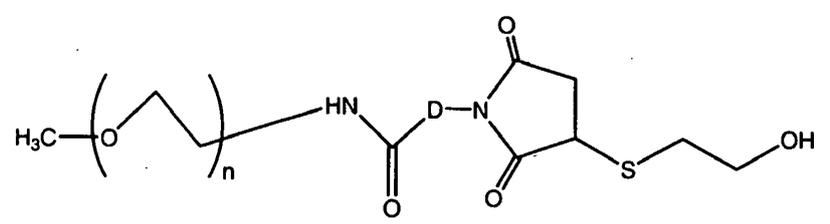
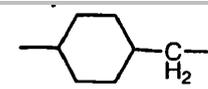
5 **EJEMPLO 4**

Características de apertura del anillo del modelo de los productos conjugados de peg-succinimida

Se determinaron las tasas de hidrólisis de algunos productos conjugados de maleimidias poliméricas ilustrativas con respecto a un compuesto modelo, 2-mercaptoetanol, para evaluar la tendencia de los productos conjugados a la apertura del anillo, y por tanto su idoneidad para el enfoque de apertura del anillo proporcionado en la presente memoria.

Los estudios de la velocidad de hidrólisis de los productos conjugados que tiene las estructuras mostradas más abajo, donde los conectores incluyen las porciones denominadas TRI, PEN, y MCH, se llevaron a cabo como se ha descrito antes para las maleimidias no conjugadas. Las vidas medias mostradas se calcularon a partir de los datos recogidos a dos valores de pH diferentes. De una manera similar a las maleimidias no conjugadas, los datos indican una reducción de la velocidad de hidrólisis a medida que los pH tendieron a bajar con el aumento de apertura del anillo. La conexión con la cadena hidrocarbonada más corta adyacente al anillo de succinimida (es decir, TRI) fue la más rápida para abrirse en comparación con los otros productos conjugados estudiados.

Tabla 3. Vidas medias de Hidrólisis de Productos Conjugados de mPEG (5 k-Da) Maleimida

		
Conector, D	Vidas Medias Determinadas Experimentalmente	
	pH 9,06	pH 8,11
TRI; trimetileno	31,4 horas	17,6 días
PEN; pentametileno	--	28,5 días
MCH; 	43,3 horas	--

EJEMPLO 5

25 Hidrólisis a diferentes valores de ph para una mpeg-maleimida sin conector

Se llevaron a cabo estudios de hidrólisis de productos conjugados formados mediante reacción del compuesto modelo, 2-mercaptoetanol, con mPEG-5K-Maleimida como se ha descrito previamente. Se proporciona un resumen de las cinéticas de la reacción de hidrólisis de los productos conjugados a diferentes pH en la Tabla 4 de más abajo.

30

TABLA 4. ESTUDIO DE HIDRÓLISIS DE UN ADUCTO DE M-PEG(5K)-MAL con 2-MERCAPTOETANOL

pH	Vida Media, min
12	<5
11	<15
10	30
9	600

A. Síntesis de un aducto de mpeg-sk-maleimida con 2-mercaptoetanol (mpeg-mal-me).

35 A una solución de mPEG(5000 Da)-maleimida (3,0 g, 0,0006 moles, Nektar, Huntsville, Alabama) en acetonitrilo (60 ml), se le añadió 2-mercaptoetanol (0,15 g, 0,0190 moles) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Los disolventes se destilaron después a presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (7,5 ml) y después se añadió alcohol isopropílico. El producto precipitado se separó mediante filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento: 2,80 g. RMN (d6-DMSO): 2,78 ppm (m ancho, -S-CH₂CH₂OH, 2H), 3,24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,51 ppm (s, segmento PEG), 4,03 ppm (m, -CH-S-, 1H), 4,85 ppm (7, -OH, 1H).

40

B. Hidrólisis a pH 9

La mPEG-MAL-ME (0,2 g) se disolvió en 4 ml de agua destilada y la solución resultante se añadió a 4 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH = 9,3). El pH se ajustó inmediatamente a 9,0 mediante la adición de NaOH 0,01 M. Se retiraron muestras de 0,25 ml de la solución a intervalos de 1 h y se analizaron mediante HPLC. Durante la medición el pH de la solución se mantuvo en un intervalo de 8,95-9,05 mediante la adición periódica de NaOH 0,01 M.

C. Aislamiento de productos conjugados de ácido succinámico

Llevando a cabo la reacción de hidrólisis como se ha descrito antes, los productos se aislaron a partir de reacciones conducidas a pH 9 y pH 12. En cada caso los productos fueron los mismos. Se formaron dos productos de hidrólisis, el aducto de la posición 2 y el aducto de la posición 3. Las asignaciones de los productos se realizaron sobre la base de las simulaciones espectrales. El análisis de RMN reveló que la razón molar del aducto de la posición 2 con respecto al aducto de la posición 3 fue de 71 a 29.

Muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención se le ocurrirán a un experto en la técnica a la que pertenece esta invención que tiene el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones precedentes y los dibujos asociados. Por lo tanto, se debe entender que la invención no está limitada a las realizaciones específicas descritas y que se pretende que las modificaciones y otras realizaciones estén incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Si bien se emplean términos específicos en la presente memoria, estos se utilizan únicamente en sentido genérico y descriptivo y no con fines limitantes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un producto conjugado polimérico, comprendiendo dicho método:
- 5 (a) proporcionar un polímero soluble en agua que comprende un grupo maleimida,
(b) hacer reaccionar dicho polímero con un agente activo que comprende un nucleófilo en condiciones
eficaces para acoplar dicho agente a dicho polímero soluble en agua vía reacción de adición de tipo
Michael para formar un producto conjugado de agente activo conectado a una succinimida polimérica, y
10 (c) tratar el producto conjugado de (b) en condiciones eficaces para abrir dicho anillo de succinimida a la
fuerza donde dicha etapa de tratamiento se lleva a cabo a pH que oscilan de aproximadamente 7,5 a
aproximadamente 11 para formar de este modo una composición de polímero-producto conjugado que
comprende un producto conjugado de ácido succinámico polimérico además comprende adicionalmente
la etapa de determinar el grado de apertura de dicho anillo de succinimida en dicha composición, donde
15 dicho tratamiento se lleva a cabo hasta que se forma al menos aproximadamente 95% de dicho producto
conjugado de ácido succinámico polimérico y donde dicho agente separado sea uno que proporcione un
efecto farmacológico.
2. El método de la reivindicación 1, donde dicha etapa de tratamiento comprende hidrólisis.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, donde dicho tratamiento se lleva a cabo en un disolvente acuoso u
orgánico.
4. El método de la reivindicación 1, donde dicha etapa de tratamiento se lleva a cabo en presencia de una
base.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, donde dicha base se selecciona del grupo que consiste hidróxidos
metálicos o no metálicos, hidróxidos de amonio cuaternario, sodio (Na^o), y potasio (K^o).
6. El método de la reivindicación 4, donde dicha base está sobre un soporte sólido o en solución.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, donde dicha etapa de tratamiento se lleva a cabo en un tampón.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, donde dicho tratamiento se lleva a cabo hasta que se forma al menos
aproximadamente 98% de dicho producto conjugado de ácido succinámico polimérico.
9. El método de la reivindicación 1, donde dicho nucleófilo es un grupo sulfhidrilo (tiol) o un grupo amino.
- 40 10. El método de la reivindicación 1, donde dicho agente activo es una proteína o un péptido.
11. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente recuperar dicho producto conjugado
de ácido succinámico polimérico de la composición.
- 45 12. El método de la reivindicación 11, donde dicha etapa de recuperación comprende precipitar dicho
producto conjugado de ácido succinámico polimérico.
13. El método de la reivindicación 11, donde dicha etapa de recuperación comprende adicionalmente
purificar dicho producto conjugado de ácido succinámico polimérico.
- 50 14. El método de la reivindicación 13, donde dicha etapa de purificación comprende purificar dicho
producto conjugado de ácido succinámico polimérico mediante cromatografía.
15. El método de la reivindicación 14, donde dicha cromatografía se selecciona del grupo que consiste en
55 SDS-PAGE, cromatografía de penetración en gel, y cromatografía de intercambio iónico.
16. El método de la reivindicación 1, donde dicho polímero soluble en agua se selecciona del grupo que
consiste en un poli(óxido de alquileo), polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), polioxazolona,
poliacrililormorfina, y poli(poliol oxietilado).
- 60 17. El método de la reivindicación 16, donde dicho polímero soluble en agua es un poli(óxido de
alquileo).
18. El método de la reivindicación 17, donde dicho polímero soluble en agua es un poli(etilenglicol).
- 65 19. El método de la reivindicación 18, donde el poli(etilenglicol) comprende un radical de protección
terminal.

20. El método de la reivindicación 19, donde el radical de protección terminal se selecciona del grupo que consiste en alcoxi, alcoxi sustituido, alqueniloxi, alqueniloxi sustituido, alquiniloxi, alquiniloxi sustituido, ariloxi, y ariloxi sustituido.

5

21. El método de la reivindicación 20, donde el radical de protección terminal se selecciona del grupo que consiste en metoxi, etoxi, y benciloxi.

22. El método de la reivindicación 18, donde el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular media nominal de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 80.000 daltons.

10

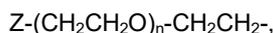
23. El método de la reivindicación 22, donde el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular media nominal de aproximadamente 2.000 daltons a aproximadamente 50.000 daltons.

24. El método de la reivindicación 18, donde dicho poli(etilenglicol) tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lineal, ramificada, ahorquillada, y multibrazo.

15

25. El método de la reivindicación 18, donde dicho poli(etilenglicol) comprende la estructura:

20



donde n es de aproximadamente 10 a aproximadamente 4000, y Z comprende un radical seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, amino, éster, carbonato, aldehído, hidrato de aldehído, acetal, cetona, hidrato de cetona, cetal, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, hidrazida, urea, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxi, benciloxi, silano, lípido, fosfolípido, biotina, y fluoresceína.

25

26. El método de la reivindicación 1, donde dicho polímero soluble en agua comprende un conector, L, interpuesto entre dicho polímero soluble en agua y dicho grupo maleimida.

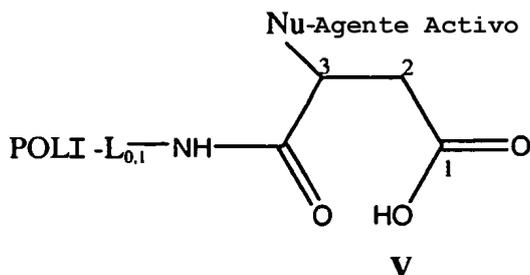
30

27. El método de la reivindicación 26, donde dicho conector es eficaz para dar como resultado una vida media de hidrólisis de apertura del anillo de dicho polímero soluble en agua de aproximadamente 12 horas o menos cuando se mide a temperatura ambiente en tampón fosfato a pH 9,0.

28. El método de la reivindicación 18, donde dicho polímero de polietilenglicol está unido directamente al átomo de nitrógeno de dicho grupo maleimida.

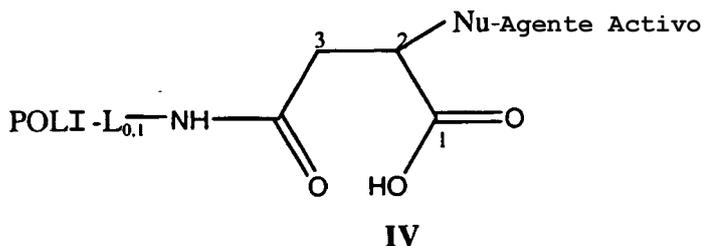
35

29. Una composición químicamente estable que comprende:



40

o



donde la composición experimenta un cambio de 5% o menos en su composición polimérica a lo largo de un período de 3 meses cuando se mide a partir del tiempo de preparación de la muestra inicial y se almacena en forma de una solución tamponada a pH sustancialmente neutros (p. ej., 6,8 a 7,2) en

condiciones ambiente; y

donde: la composición comprende al menos aproximadamente 95% en peso de las estructuras V y IV combinadas, basándose en los componentes que contienen POLI; donde:

POLI es un segmento polimérico soluble en agua,

5 L es un conector opcional, y

"Nu-Agente activo" representa un agente activo que comprende un nucleófilo, "Nu" y donde dicho activo separado sea uno que proporcione un efecto farmacológico..

30. La composición de la reivindicación 29, donde dicho Nu es tiol o tiolato.

10

31. La composición de la reivindicación 30, donde dicho Nu es un tiol o tiolato contenido en una cisteína y dicho agente activo es una proteína o un péptido.

32. La composición de la reivindicación 29, donde Nu es amino.

15

33. La composición de la reivindicación 29 donde Nu es un grupo amino contenido en una lisina o es una amina terminal y dicho agente activo es una proteína o péptido.

34. La composición de la reivindicación 29 en forma de polvo.

20

35. La composición de la reivindicación 29 en forma de solución.

36. La composición de la reivindicación 29 que comprende al menos aproximadamente 98% en peso de las estructuras V y IV combinadas, basándose en los componentes que contienen POLI.

25

37. La composición de la reivindicación 29, donde L es un conector eficaz para proporcionar un aumento de la velocidad de hidrólisis de apertura del anillo del grupo maleimida del precursor de maleimida polimérica soluble en agua no acoplado a V o IV con respecto a la del mismo precursor de maleimida polimérica soluble en agua pero en ausencia de un conector.

30

38. La composición de la reivindicación 29, donde L es un conector eficaz para dar como resultado una vida media de hidrólisis de apertura del anillo del precursor de maleimida polimérica soluble en agua no acoplado a V o IV de aproximadamente 12 horas o menos cuando se mide a temperatura ambiente en tampón fosfato a pH 9.

35

39. La composición de la reivindicación 29, donde POLI comprende un polietilenglicol y las estructuras V y IV carecen de un conector.

40. La composición de la reivindicación 39, donde POLI es un polietilenglicol lineal.

40

41. La composición de la reivindicación 29, donde dicho conector comprende un grupo captador de electrones (EWG) a aproximadamente 6 átomos del átomo de nitrógeno de dicho ácido succinámico.

42. La composición de la reivindicación 41, donde dicho conector comprende un grupo captador de electrones (EWG) a aproximadamente 3 átomos del átomo de nitrógeno de dicho ácido succinámico.

45

43. La composición de la reivindicación 29, donde dicho agente activo es un agente biológicamente activo.

44. Una forma de dosificación unitaria que comprende la composición de la reivindicación 43.

50

45. Una composición que comprende proteínas transformadas con un polímero soluble en agua, donde el polímero está acoplado a la proteína vía grupos succinimida unidos covalentemente a los grupos sulfhidrilo de la cisteína o a los grupos amino de la lisina, y están presentes sustancialmente todos los grupos succinimida en la composición en una forma de anillo abierto.

55

Esquema de Reacción I

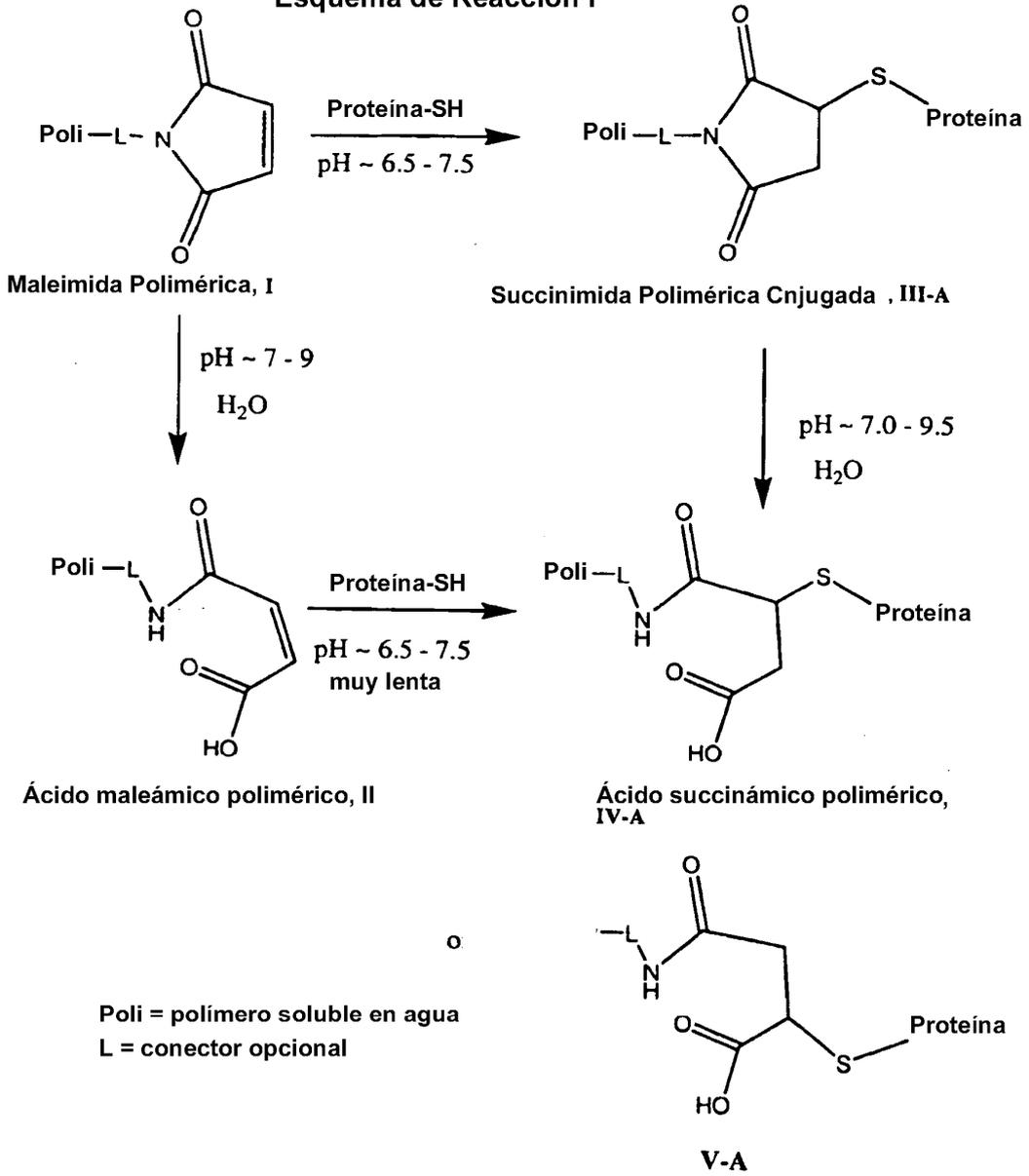
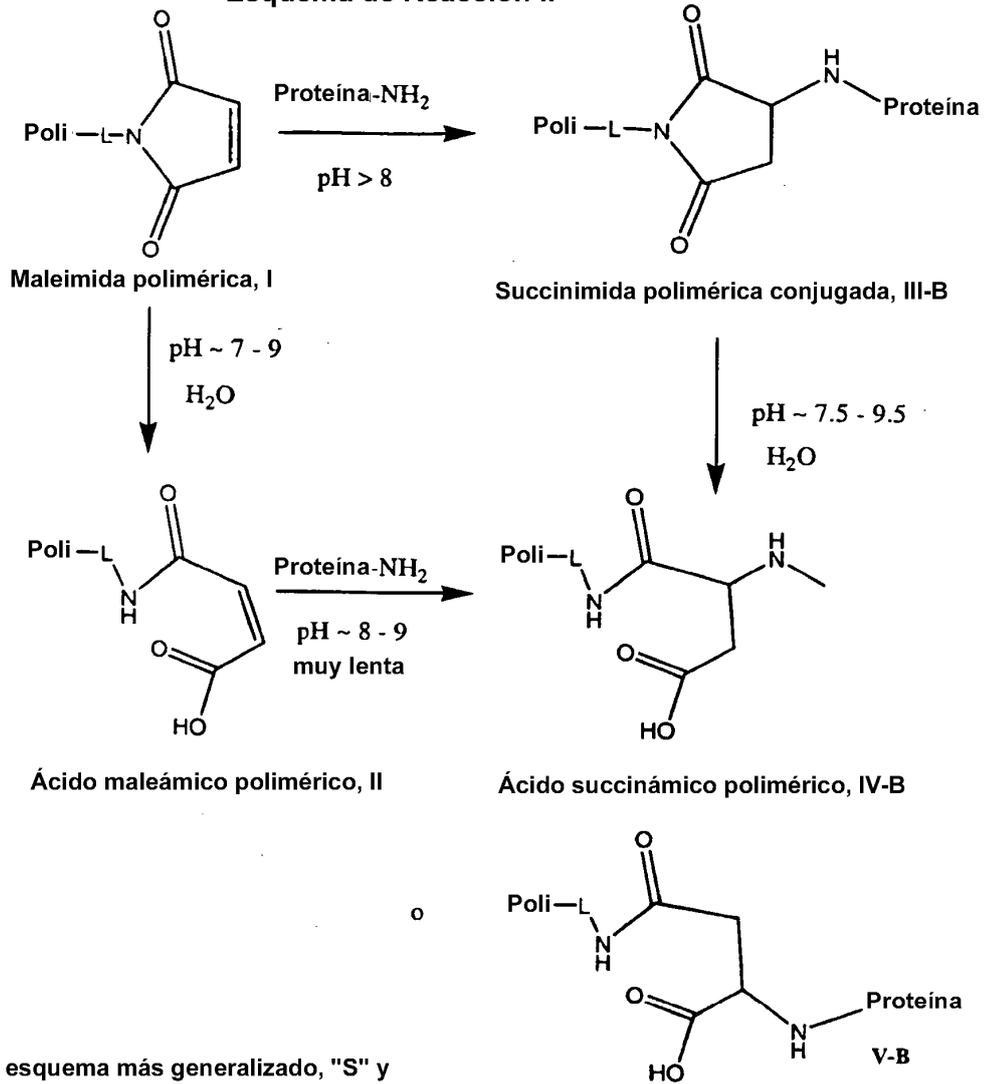


FIG. 1

Esquema de Reacción II



En un esquema más generalizado, "S" y "N" pueden ser reemplazados por "Nu", un nucleófilo susceptible de una adición de Michael

FIG. 2

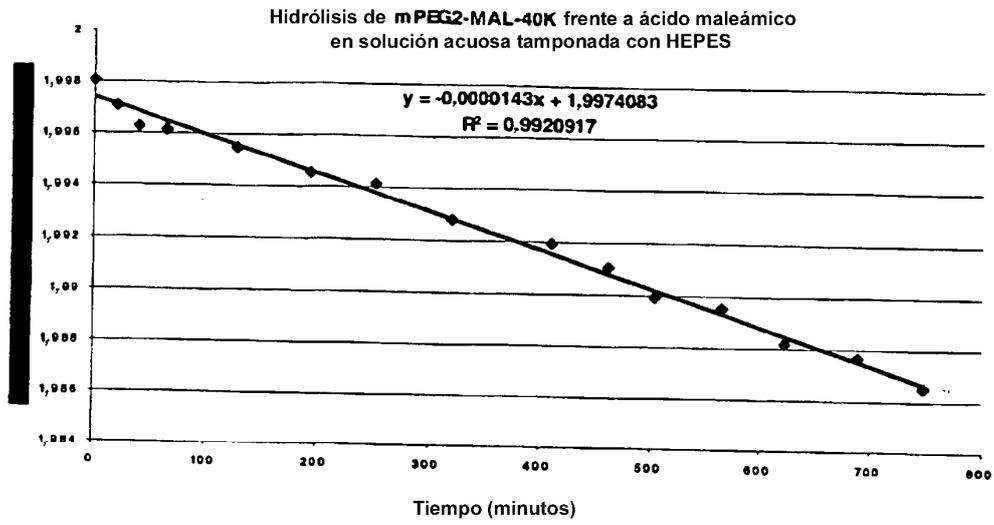


FIG. 3