



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 089**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
C07C 323/12 (2006.01)
C07D 213/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05855832 .1**
96 Fecha de presentación : **21.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1827501**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Reactivos de tiol polimérico estabilizados.**

30 Prioridad: **21.12.2004 US 639823 P**
04.08.2005 US 705968 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2011

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

72 Inventor/es: **McManus, Samuel y**
Kozlowski, Antoni

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 357 089 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reactivos de tiol polimérico estabilizados.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a reactivos de tiol polimérico estabilizado, derivados de polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol. En particular, la invención se refiere a los reactivos de tiol polimérico, conjugados de los mismos y métodos para utilizar dichos conjugados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Debido a los recientes avances en biotecnología, pueden prepararse ahora a gran escala proteínas terapéuticas y otras biomoléculas, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, haciendo a dichas biomoléculas disponibles más ampliamente. Desafortunadamente, la utilidad clínica de las biomoléculas terapéuticas potenciales en forma no modificada a menudo se ve dificultada por su rápida degradación proteolítica, inestabilidad tras la fabricación, almacenamiento o administración o por su inmunogenicidad.

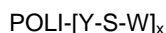
15 Estas deficiencias pueden superarse, a menudo, mediante la unión covalente de un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG). Véase, por ejemplo, Abuchowski, A. et al., J. Biol. Chem. 252(11): 3579 (1977); Davis, S. et al., Clin. Exp Immunol. 46: 649-652 (1981). Las propiedades biológicas de las proteínas modificadas con PEG, denominadas también combinados de PEG o proteínas PEGiladas se ha demostrado, en muchos casos, que mejoran considerablemente respecto a aquellas de sus homólogos no PEGilados (Herman et al., Macromol. Chem. Phys. 195: 203-209 (1994)). Se ha demostrado también que las proteínas modificadas con polietilenglicol poseen mayores tiempos circulatorios en el cuerpo, debido a un aumento de la resistencia a la degradación proteolítica, y también poseen una mayor termoestabilidad (Abuchowski, A. et al., J. Biol. Chem. 252: 3582-3586 (1977)). Se observa un aumento similar en la bioeficacia con otras biomoléculas, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (Chapman, A., Adv. Drug Del. Rev. 54: 531-545 (2002)).

25 El polietilenglicol que tiene grupos terminales activados, adecuados para reaccionar con grupos amino, se usa habitualmente para modificación de proteínas. Dichos PEG activados o "reactivos poliméricos" incluyen PEG-aldehídos (Harris, J. M. y Herati, R. S., Polym Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.) 32(1): 154-155 (1991)), anhídridos mixtos, ésteres de N-hidroxisuccinimida, carbonilimidazolidas y clorocianuratos (Herman, S. et al., Macromol. Chem. Phys. 195: 203-209 (1994)). En algunos casos, sin embargo, la unión del polímero a través de grupos amino proteicos puede ser indeseable, tal como cuando la derivatización de restos lisina específicos inactiva la proteína (Suzuki, T. et al., Biochimica et Biofisica Acta 788: 248-255 (1984)). Por lo tanto, sería ventajoso tener métodos adicionales para la modificación de una proteína mediante PEG usando otro aminoácido diana para la unión, tal como cisteína. La unión a grupos tiol proteicos a cisteína ofrece la ventaja de que las cisteínas son típicamente menos abundantes en las proteínas que las lisinas, reduciendo de esta manera la probabilidad de desactivación de la proteína tras la conjugación a estos aminoácidos que contienen tiol. Los polímeros activados selectivos de tiol se describen, por ejemplo, en la publicación PCT de cesión común N° WO 2004/063250.

35 Los derivados de tiol polimérico y, específicamente, tioles de PEG, son un tipo de polímero activado selectivo para tiol. Sin embargo, muchos tioles poliméricos de la técnica anterior son altamente susceptibles al acoplamiento oxidativo para formar disulfuros, un proceso de degradación que reduce el componente activo y añade dificultad para retirar las impurezas. Esto último puede ser particularmente problemático en la preparación de bioconjugados para estos materiales. Por lo tanto, sería ventajoso proporcionar reactivos de tiol poliméricos que tengan una estabilidad potenciada respecto a los reactivos de la técnica anterior.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención proporciona un polímero activado, soluble en agua, denominado también "reactivo polimérico", que tiene la estructura



45 en la que:

POLI es un polímero soluble en agua, seleccionado entre un poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmetacrilamida), poli(hidroxiálquilmetacrilato), poli(sacárido), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina y poli(N-acriloilmorfolina);

50 Y es un grupo de unión divalente, que contiene al menos cuatro átomos de carbono, y que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a ocho átomos de carbono de longitud, y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno o alcoxi; cicloalquilo C₃-C₆; halo; ciano y fenilo; donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;

S es un átomo de azufre, unido a un átomo hibridado en sp³ de Y;

S-W es un tiol, tiol protegido o derivado de tiol reactivo con tiol;

$x = 1 - 25$; y

POLI tiene un peso molecular de al menos 500 cuando POLI es un polietilenglicol lineal, $x = 1$ e Y es una cadena de alquilo lineal.

5 En una realización, S-W es un derivado reactivo con tiol, tal como disulfuro de orto-piridilo (OPSS).

10 Cuando x es 2, el reactivo es un reactivo polimérico difuncional, tal como se describe opcionalmente más adelante, y puede tener una morfología lineal o "bifurcada", como se describe en este documento. El reactivo polimérico puede tener también una morfología "multibrazo", como se describe en este documento, particularmente cuando x es 3 o mayor. En las realizaciones seleccionadas, x es de 1 a 8, de 1 a 6 o de 1 a 4; en realizaciones adicionales, x es de 1 ó 2 o x es 1. El componente POLI de los reactivos poliméricos descritos puede tener por sí mismo una morfología seleccionada entre el grupo que consiste en lineal, ramificada, multibrazo y combinaciones de las mismas, como se describe adicionalmente en este documento.

En una realización particular, cuando POLI es un polietilenglicol lineal e Y es una cadena de alquilo lineal, POLI tiene un peso molecular de al menos 500.

15 En otras realizaciones, POLI tiene un peso molecular de al menos 1000 o al menos 2000. Como un intervalo superior, POLI tiene un peso molecular no mayor de 300.000 Da.

20 La "estructura básica de hidrocarburo" del grupo de unión Y se define más particularmente como la cadena de carbono contigua más corta que conecta POLI y S. Cuando la estructura básica de Y es insaturada, es preferiblemente monoinsaturada, es decir, tiene un solo doble o triple enlace carbono-carbono. Preferiblemente, el grupo espaciador Y, incluyendo la estructura básica y los sustituyentes es monoinsaturada o, más preferiblemente, totalmente saturada. En otra realización, el grupo espaciador Y, incluyendo la estructura básica y los sustituyentes, consiste en partes saturada y aromáticas.

25 Preferiblemente, la estructura básica es saturada. Por ejemplo, Y puede ser de la forma $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 8, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente, donde dos grupos R^1 y R^2 en átomos de carbono diferentes pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo o arilo. En realizaciones seleccionadas, n es de 3 a 6, n es de 4 a 6 o $n = 4$, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y alquilo inferior, donde alquilo inferior es preferiblemente metilo o etilo.

30 En realizaciones seleccionadas adicionales, Y se selecciona entre el grupo que consiste en alqueno C_4-C_8 , cicloalqueno C_5-C_8 , y combinaciones de los mismos, cualquiera de los cuales puede incluir uno o más sustituyentes no interferentes.

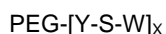
35 Preferiblemente, se incluyen como máximo uno o dos sustituyentes no interferentes, seleccionados entre el grupo que consiste en cicloalquilo C_3-C_6 , halo, ciano, alcoxi inferior y fenilo se seleccionan preferiblemente entre metoxi, etoxi, flúor y cloro. En una realización, no están presentes sustituyentes que contengan heteroátomo; es decir, el Y de unión consiste en carbono e hidrógeno.

En una realización preferida, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno con respecto a las n iteraciones de $-(CR^1R^2)-$; en otra realización preferida, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con la excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R^1 alquilo inferior, preferiblemente metilo o etilo (ramificación α). En una realización, el grupo de ramificación α es metilo.

40 En realizaciones de Y donde Y es $-(CR^1R^2)_n-$ y dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono están unidos para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo, el grupo cicloalquilo es preferiblemente un grupo ciclopentilo o ciclohexilo. Preferiblemente, S está unido a un carbono acíclico hibridado en sp^3 de Y en dichas realizaciones.

45 Como se ha indicado anteriormente, POLI puede ser un polietilenglicol (PEG). Dicho PEG, típicamente, tiene un peso molecular de 148 (por ejemplo, un trímero más un átomo de oxígeno de unión) a aproximadamente 200 a aproximadamente 100.000 Dalton. En realizaciones seleccionadas, el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 40.000 Dalton. Los pesos moleculares representativos incluyen, por ejemplo, 500, 1000, 2000, 2500, 3500, 5000, 7500, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000 y 40000 Dalton. El componente de PEG de los reactivos descritos puede tener por sí mismo una morfología seleccionada entre el grupo que consiste en lineal, ramificada, multibrazo y combinaciones de las mismas, como se describe adicionalmente en este documento.

50 Por consiguiente, la invención proporciona un reactivo polimérico soluble en agua que comprende la estructura:



en la que:

PEG es un polímero de polietilenglicol;

5 Y es un grupo de unión divalente que tiene, al menos, cuatro átomos de carbono; que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a ocho átomos de carbono de longitud y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y sustituyentes no interferentes como se define en este documento, donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno, en diferentes átomos de carbono de la estructura, pueden estar unidos para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;

S es un átomo de azufre unido a un carbono hibridado en sp^3 de Y;

x es de 1 a 25;

10 S-W es un tiol, tiol protegido o un derivado de tiol reactivo con tiol; y

PEG tiene un peso molecular de al menos 500 cuando PEG es lineal, x es 1 e Y es una cadena de alquilo lineal.

15 Como se ha indicado anteriormente, cuando x es 2, el reactivo es un reactivo polimérico difuncional, tal como se describe adicionalmente más adelante, y puede tener una morfología lineal o "bifurcada" como se describe en este documento. El reactivo polimérico puede también tener una morfología "multibrazo", como se describe en este documento, particularmente cuando x es 3 o mayor. En realizaciones seleccionadas, x es de 1 a 8, de 1 a 6 o de 1 a 4; en realizaciones adicionales x es de 1 ó 2 o x es 1. El componente de PEG de los reactivos descritos puede tener por sí mismo una morfología seleccionada entre el grupo que consiste en lineal, ramificada, multibrazo y combinaciones de las mismas, como se describe adicionalmente en este documento.

20 En las realizaciones preferidas, PEG tiene un peso molecular de al menos 148, al menos 200, al menos 500, al menos 1000 o al menos 2000, hasta aproximadamente 100.000 Dalton, incluyendo los diversos intervalos indicados anteriormente, y una morfología seleccionada entre lineal, ramificada, bifurcada y multibrazo. S-W es preferiblemente un derivado de tiol reactivo con tiol y, más preferiblemente, disulfuro de orto-piridilo (OPSS).

25 La "estructura básica de hidrocarburo" del grupo de unión Y se define más particularmente como la cadena de carbono contigua más corta que conecta PEG y S. Preferiblemente, la estructura del grupo de unión Y está saturada de manera que Y tiene la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 8, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente, donde dos grupos R^1 y R^2 en átomos de carbono diferentes pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo o arilo. En realizaciones seleccionadas, n es de 3 a 6, n es de 4 a 6 o $n = 4$, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y metilo.

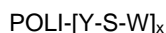
30 En otras realizaciones seleccionadas, Y se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C_3-C_8 , cicloalquilo C_5-C_8 y combinaciones de los mismos, cualquiera de los cuales puede incluir uno o más sustituyentes no interferentes, como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, se incluyen como máximo uno o dos sustituyentes no interferentes, seleccionados entre el grupo que consiste en cicloalquilo C_3-C_6 , halo, ciano, alcoxi inferior y fenilo, y seleccionados preferiblemente entre metoxi, etoxi, flúor y cloro. En una realización, están presentes sustituyentes que no contienen heteroátomo; es decir, el grupo de unión Y consiste en carbono e hidrógeno.

35 Como en el caso anterior, en una realización preferida, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno con respecto a las n iteraciones de $-(CR^1R^2)-$; en otra realización preferida, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno con la excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R^1 alquilo inferior, preferiblemente metilo o etilo (ramificación α). En una realización, el grupo de ramificación α es metilo.

40 En las realizaciones de Y donde Y es $-(CR^1R^2)_n-$ y dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono están unidos para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo, el grupo cicloalquilo es preferiblemente un grupo ciclopentilo o ciclohexilo. Preferiblemente, S está unido a un carbono acíclico hibridado en sp^3 de Y en dichas realizaciones.

45 En un reactivo ejemplar de la forma PEG-Y-S-W, Y es $-(CR^1R^2)_n-$ donde cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno y n es 4, S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS) y PEG es un polietilenglicol terminado en metoxi (mPEG). El mPEG preferiblemente tiene un peso molecular en el intervalo de 5000 a 30000 Da. En reactivos adicionales ejemplares PEG y SW se definen análogamente, n es de 3 ó 4 y cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con la excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R^1 metilo (es decir, Y es $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$).

Los reactivos poliméricos solubles en agua pueden tener una estructura polifuncional, como se muestra:



en la que:

POLI es un polímero soluble en agua;

x es de 2 a 25;

5 cada Y es un grupo de unión divalente, que tiene al menos cuatro átomos de carbono, que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a diez, preferiblemente de tres a ocho átomos de carbono de longitud y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y sustituyentes no interferentes como se define en este documento, donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno inferior en diferentes átomos de carbono de la estructura pueden estar unidos para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno inferior o arilo;

cada S es un átomo de azufre unido a un carbono hibridado en sp^3 de Y adyacente; y

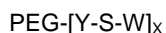
10 cada S-W es independientemente un tiol, tiol protegido o derivado de tiol reactivo con tiol.

Preferiblemente, los dos o más grupos Y son idénticos; los dos o más grupos W son también típicamente idénticos. Como alternativa, particularmente en un reactivo difuncional ($x = 2$), los dos SW pueden ser diferentes, por ejemplo, un SW es un tiol o tiol protegido mientras que el otro es un derivado reactivo con tiol, o un SW es un tiol o derivado reactivo con tiol mientras que el otro es un tiol protegido.

15 Como se ha indicado anteriormente, cuando x es 2, el reactivo polimérico puede tener una morfología lineal o "bifurcada", como se describe en este documento. El reactivo polimérico puede tener también una morfología "multibrazo", como se describe en este documento, particularmente, cuando x es 3 o mayor. En realizaciones seleccionadas x es de 2 a 8, de 2 a 6 o de 2 a 4; en una realización, x es 2. El componente POLI de los reactivos descritos puede tener por sí mismo una morfología seleccionada entre el grupo que consiste en lineal, ramificada, multibrazo y combinaciones de las mismas, como se describe adicionalmente en este documento.

20 Como en el caso anterior, la estructura básica de Y es preferiblemente saturada, de manera que cada Y es un enlazador que tiene al menos cuatro átomos de carbono y que tiene la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10, preferiblemente de 3 a 8, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente, donde dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo o arilo. Las realizaciones preferidas adicionales de Y y de POLI son generalmente como se han definido anteriormente para el reactivo monomérico POLI-Y-S-W.

Los reactivos poliméricos polifuncionales basados en PEG correspondientes tienen la estructura:



en la que:

30 PEG es un polímero de polietilenglicol;

x es de 2 a 25;

35 cada Y es un grupo de unión divalente, que tiene al menos cuatro átomos de carbono, que consiste en una estructura de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a diez, preferiblemente de tres a ocho átomos de carbono de longitud, y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y sustituyentes no interferentes como se define en este documento, donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno inferior en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno inferior o arilo;

cada S es un átomo de azufre unido a un carbono hibridado en sp^3 del Y adyacente; y

cada S-W es, independientemente, un tiol, tiol protegido o derivado de tiol reactivo con tiol.

40 Preferiblemente, los múltiples grupos Y son idénticos; los múltiples grupos W también son típicamente idénticos. La estructura básica de Y es preferiblemente saturada, de manera que cada Y es un enlazador que tiene la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10, preferiblemente de 3 a 8, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente, donde dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo o arilo.

45 Otras realizaciones preferidas de Y, y de PEG, son generalmente como se ha definido anteriormente para PEG-[Y-S-W]_x . En un reactivo difuncional ejemplar de la forma W-S-Y-PEG-Y-S-W, cada Y es $-(CR^1R^2)_n-$ donde cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno y n es 4, S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS), y cada PEG es un polietilenglicol terminado en metoxi (mPEG). El mPEG preferiblemente tiene un peso molecular en el intervalo de 1000 a 5000 Da, por ejemplo, de aproximadamente 2000 a aproximadamente 3400 Da. En un reactivo ejemplar adicional, PEG y SW se definen análogamente, n es 3 ó 4 y cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con la excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R^1 metilo.

50

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



en la que:

POLI es un polímero soluble en agua;

5 x es de 1 a 25;

10 Y es un grupo de unión divalente, que tiene al menos 4 átomos de carbono, que consiste en una estructura de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a diez, preferiblemente de tres a ocho átomos de carbono de longitud y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y sustituyentes no interferentes como se define en este documento, donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;

S-S es un grupo disulfuro, unido a un carbono hibridado en sp^3 de Y; y

A es un resto unido covalentemente (como se define en este documento) de una molécula farmacológicamente activa.

15 En realizaciones seleccionadas, x es de 1 a 8, de 1 a 6 o de 1 a 4; en otras realizaciones, x es 1 ó 2 o x es 1. Cuando x es 2, el conjugado puede tener una morfología lineal o "bifurcada", como se describe en este documento. El conjugado puede tener también una morfología "multibrazo" como se describe en este documento, particularmente cuando x es 3 o mayor. El componente POLI del conjugado puede tener por sí mismo una morfología seleccionada entre el grupo que consiste en lineal, ramificada, multibrazo y combinaciones de las mismas, como se describe adicionalmente en este documento.

25 Preferiblemente, los múltiples grupos Y son idénticos. La estructura básica de hidrocarburo de Y es preferiblemente saturada, teniendo Y la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10, preferiblemente de 3 a 8, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo, alqueno y un sustituyente no interferente y donde dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo o arilo. Más preferiblemente, Y se selecciona entre el grupo que consiste en alqueno C_3-C_8 , cicloalqueno C_5-C_8 , arilo y combinaciones de los mismos, cualquiera de los cuales puede incluir uno o más sustituyentes no interferentes.

30 En realizaciones adicionales, Y es un alqueno lineal o ramificado que tiene la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente. Más preferiblemente, n es de 3 a 8 o de 3 a 6 y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y metilo. En realizaciones seleccionadas, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno. En otra realización preferida, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con excepción de R^1 , en un carbono adyacente a dicha unión disulfuro, siendo dicho R^1 alquilo inferior, por ejemplo, metilo o etilo.

35 Otras realizaciones incluyen aquellas en las que Y es $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10, preferiblemente de 3 a 8, y dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono se unen para formar un grupo cicloalquilo o arilo, preferiblemente un cicloalquilo, tal como un grupo ciclopentilo o ciclohexilo.

40 El polímero soluble en agua POLI preferiblemente tiene un peso molecular de al menos 500 o al menos 1000. El peso molecular de POLI es típicamente mayor de 200 y menor de aproximadamente 300 K Dalton, preferiblemente menor de aproximadamente 200 K Dalton y más preferiblemente menor de aproximadamente 100 K Dalton. En una realización, POLI es un polietilenglicol, que preferiblemente tiene un peso molecular de 148 a aproximadamente 200 a aproximadamente 100.000 Dalton y una morfología seleccionada entre lineal, ramificada, bifurcada y multibrazo. En realizaciones seleccionadas, el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 40.000 Dalton. Los pesos moleculares representativos incluyen por ejemplo, 500, 1000, 2000, 2500, 3500, 5000, 7500, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000 y 40000 Dalton.

45 La molécula conjugada al polímero soluble en agua, representada por A en su forma conjugada, tiene un grupo tiol reactivo en su forma no conjugada, y se selecciona preferiblemente entre el grupo que consiste en proteínas, péptidos y pequeñas moléculas, típicamente pequeñas moléculas orgánicas.

El conjugado es preferiblemente soluble en agua por sí mismo. El conjugado puede proporcionarse en o con un excipiente farmacéutico adecuado, tal como un vehículo acuoso, para uso terapéutico.

50 En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para suministrar una molécula farmacológicamente activa que tiene un grupo tiol reactivo a un sujeto, administrando a un sujeto un conjugado como se ha descrito anteriormente, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El conjugado se prepara típicamente conjugando la molécula con cualquiera de los reactivos poliméricos solubles en agua descritos en este documento.

El segmento o segmentos basados en hidrocarburo, Y, en los reactivos poliméricos activados de la invención,

5 que son de naturaleza hidrófoba, son eficaces para reducir la tendencia hacia la dimerización de estos reactivos, respecto a los reactivos de la técnica anterior, en los que el tiol está unido a un heteroátomo en el segmento de polímero (o en un resto de unión), por ejemplo, mediante una unión de dos carbonos. La ramificación de Y en el carbono adyacente al átomo de azufre (ramificación α) es eficaz adicionalmente para reducir la dimerización. El segmento basado en hidrocarburo Y reduce también la escisión, por ejemplo, la escisión enzimática *in vivo*, del enlace disulfuro adyacente, en conjugados formados usando estos reactivos.

10 Los reactivos descritos en este documento se caracterizan adicionalmente por ser reactivos "sin unión"; es decir, el polímero soluble en agua, preferiblemente un PEG, se une directamente al grupo espaciador basado en hidrocarburo Y. La ausencia de uniones que contienen heteroátomo, tales como amidas, ésteres o carbamatos, entre la funcionalidad de conjugación activa, es decir, el tiol o tiol protegido y el polímero, reduce el potencial para degradación del conjugado resultante. Además, la presencia de estas uniones, tales como amidas, en dichos reactivos, puede desencadenar una respuesta inmune perjudicial. Este potencial se elimina o se reduce en gran medida mediante el uso de los reactivos "sin unión" actuales.

15 Como se muestra en el Ejemplo 2 de este documento, un reactivo de tiol polimérico de la invención era más estable en condiciones sintéticas que un reactivo correspondiente que tiene sólo un enlazador de dos carbonos entre el polímero hidrófilo (PEG) y el grupo tiol. Este aumento de estabilidad se muestra también en el Ejemplo 9 y el Ejemplo Comparativo 10. El comportamiento de conjugación del reactivo de tiol polimérico de la invención era similar al observado para un reactivo polimérico (un polímero terminado en maleimida) que se sabe que no se dimeriza, como también se muestra en el Ejemplo 2.

20 Estos y otros objetos y características de la invención resultarán evidentes más claramente cuando la siguiente descripción detallada de la invención se lea junto con los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 muestra un análisis PAGE de una reacción de conjugación entre un reactivo polimérico de la invención, denominado mPEG₅₀₀₀-4C-OPSS, como se describe en los Ejemplos 1-2, con BSA reducida, y la reacción de conjugación correspondiente del reactivo polimérico mPEG₅₀₀₀-maleimida con BSA reducida: Carril 1, patrones; Carril 2, BSA reducida; Carril 3, conjugación con mPEG-MAL; Carril 4, conjugación con mPEG-4C-OPSS. El gel se tiñe con el tinte SimplyBlue Safe;

Y

La Figura 2 muestra el gel de la Figura 1 teñido adicionalmente con yoduro de bario, para detección de PEG.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Los siguientes términos, como se usan en este documento, tienen los significados indicados. Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el", "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

35 "PEG" o "polietilenglicol", como se usa en este documento, pretende abarcar cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEG para su uso en la presente invención comprenderán una de las dos estructuras siguientes: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ o $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$, donde m es generalmente de 2 a aproximadamente 6000, más típicamente 4 ó 5 a aproximadamente 2500. En un sentido más amplio, "PEG" puede referirse a un polímero que contiene una mayoría, es decir, más del 50%, de subunidades que son $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. Preferiblemente, más del 75%, más del 95% o sustancialmente todas las unidades monoméricas son $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. Los grupos terminales y la arquitectura del PEG global pueden variar. Un extremo del PEG puede contener un grupo de protección terminal, que es generalmente un grupo que contiene carbono, compuesto por 1-20 carbonos y se selecciona preferiblemente entre alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclo y formas sustituidas de cualquiera de los anteriores. El grupo de protección terminal puede ser también un silano. Un grupo de protección terminal es uno que no experimenta fácilmente transformación química en las condiciones de reacción sintética típicas. Los más preferidos son grupos de terminación alquilo (alcoxi) o aralquilo (aralcoxi), tales como metilo, etilo o bencilo.

40 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 propiedades únicas (tales como la capacidad de formar estructuras organizadas con polímeros protegidos terminalmente de forma similar) al polímero. Los fosfolípidos ejemplares incluyen aquellos seleccionados entre la clase de fosfolípidos denominados fosfatidilcolinas. Los fosfolípidos específicos incluyen, sin limitación, aquellos seleccionados entre el grupo que consiste en dilauroil fosfatidilcolina, dioleil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, diestearoil fosfatidilcolina, behenoil fosfatidilcolina, araquidoil fosfatidilcolina y lecitina.

55 El grupo de protección terminal puede comprender también, ventajosamente, una marca detectable. Dichas marcas incluyen restos fluorescentes, quimioluminiscentes, restos usados en marcaje enzimático, colorimétricos (por

ejemplo, tintes), iones metálicos, radiactivos.

El PEG puede terminarse también con un grupo funcional, tal como aquellos descritos más adelante, preferiblemente en forma protegida.

5 Las formas de PEG específicas para su uso en la invención incluyen PEG que tienen una diversidad de pesos moleculares, estructuras o geometrías (por ejemplo, ramificado, lineal, bifurcado, multibrazo).

10 “Ramificado” en referencia a la geometría o estructura global de un polímero, se refiere a un polímero que tiene 2 o más “brazos” del polímero. Un polímero ramificado puede poseer 2 brazos de polímero, 3 brazos de polímero, 4 brazos de polímero, 6 brazos de polímero, 8 brazos de polímero o más. Un tipo particular de polímero altamente ramificado es un polímero dendrítico, o dendrímero, que para los fines de la invención, se considera que posee una estructura distinta de la de un polímero ramificado. Un “punto de ramificación” se refiere a un punto de bifurcación que comprende uno o más átomos en los que un polímero se divide o ramifica desde una estructura lineal en uno o más brazos de polímero adicionales.

15 Un “dendrímero” es un polímero globular, de tamaño monodisperso, en el que todos los enlaces emergen radialmente desde un punto focal central, o núcleo, con un patrón de ramificación regular, y con unidades de repetición cada una de las cuales contribuye a un punto de ramificación. Los dendrímeros presentan ciertas propiedades del estado dendrítico, tales como encapsulación de núcleo, haciéndoles únicos respecto a otros tipos de polímeros.

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

25 “Masa molecular” o “peso molecular” de un polímero, a menos que se especifique otra cosa, se refiere al peso molecular promedio en número. El peso molecular promedio en número (M_n) se define como $\sum N_i M_i / \sum N_i$ en la que N_i es el número de moléculas de polímero (o el número de moles de estas moléculas) que tienen el peso molecular M_i . El peso molecular promedio en número de un polímero puede determinarse por osmometría, valoración del grupo final y propiedades coligativas. El peso molecular promedio en peso se define como en el que N_i es de nuevo el número de moléculas de peso molécula M_i . El peso molecular promedio en peso puede determinarse mediante dispersión de luz., dispersión de neutrones a ángulos bajos (SANS), dispersión de rayos X y velocidad de sedimentación.

30 Los polímeros de la invención, o empleados en la invención, pueden ser polidispersos; es decir, el peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso de los polímeros no son iguales. Sin embargo, los valores de polidispersidad, expresados como una proporción del peso molecular promedio en peso (P_w) a peso molecular promedio número (M_n), (P_w/M_n), son generalmente bajos, es decir, menores de aproximadamente 1,2, preferiblemente menores de aproximadamente 1,15, más preferiblemente menores de aproximadamente 1,10, aún más preferiblemente menores de aproximadamente 1,05, todavía más preferiblemente menores de aproximadamente de 1,03 y, lo más preferiblemente, menores de aproximadamente 1,025.

40 El término “reactivo” o “activado” se refiere 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 ni reaccionan ni requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción poco prácticas para reaccionar (es decir, un grupo “no reactivo” o “inerte”).

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

50 Un “grupo protector” es un resto que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional particular, reactivo químicamente, en una molécula en ciertas condiciones de reacción. El término puede referirse también a la forma protegida de un grupo funcional. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo reactivo químicamente que se está protegiendo, así como de las condiciones de reacción a emplear y la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula. Los grupos funcionales que pueden protegerse incluyen, a modo de ejemplo, grupos ácido carboxílico, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos carbonilo. Las formas protegidas representativas de dichos grupos funcionales incluyen, para ácidos carboxílicos, ésteres (tales como éster p-metoxibencílico), amidas e hidrazidas; para grupos amino, carbamatos (tales como terc-butoxicarbonilo o fluorenilmetoxicarbonilo) y amidas; para grupos hidroxilo, éteres y ésteres, para grupos tiol, tio éteres y tio ésteres, para grupos carbonilo acetales y cetales. Dichos grupos protectores los conocen bien los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en T. W. Greene y G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Tercera Edición, Wiley, Nueva York, 1999, y las referencias citadas en el mismo.

5 Un “derivado reactivo con tiol” de un tiol se refiere a un derivado de tiol que puede reaccionar con otro tiol, preferiblemente en condiciones de temperatura moderada y pH neutro o fisiológico, para formar una unión disulfuro. Preferiblemente, la reacción sólo forma subproductos estables. Los ejemplos típicos de dichos derivados son disulfuros de ortopiridilo y derivados de TNB-tiol (donde TNB es ácido 5-tio-2-nitrobenzoico). Véase, por ejemplo, Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, pág. 150-152.

Como se usa en este documento, el término “grupo funcional” o cualquier sinónimo del mismo pretenden abarcar formas protegidas o derivatizadas del mismo. Análogamente, el término “reactivo de tiol” o “tiol polimérico” abarca reactivos de tiol protegidos o derivatizados o tioles poliméricos protegidos o derivatizados (tales como polímero-OPSS).

10 Un enlace “fisiológicamente escindible” o “hidrolizable” o “degradable” es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo general de unión que conecta dos átomos fundamentales, sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos fundamentales. Las uniones hidrolíticamente inestables o débiles apropiadas incluyen éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, ortoésteres, péptido y oligonucleótido, tioésteres, tiolésteres y carbonatos. Una “unión enzimáticamente degradable”, significa una unión que está sometida a degradación por una o más enzimas.

15 “Sustancialmente” o “básicamente” significa casi totalmente o completamente, el 95%, 99% o mayor de alguna cantidad dada.

20 “Alquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo, que típicamente variará de aproximadamente 1 a 20 átomos de longitud. Dichas cadenas de hidrocarburo son preferiblemente, aunque no necesariamente, saturadas, y pueden ser ramificadas o preferiblemente lineales (no ramificadas). Los grupos alquilo ejemplares incluyen etilo, propilo, butilo, pentilo, 2-metilbutilo, 2-metilpropilo (isobutilo), 3-metilpentilo. Como se usa en este documento, “alquilo” incluye cicloalquilo cuando se mencionan tres o más átomos de carbono. “Alquilenos” se refiere a un grupo alquilo divalente, por ejemplo, $-(CH_2)_x-$.

25 “Alquilo inferior” se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, como se ejemplifica mediante metilo, etilo, n-butilo, isopropilo y t-butilo.

30 “Cicloalquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo cíclico, saturado o insaturado, que incluye compuestos enlazados, condensados o espirocíclicos, preferiblemente formados por de 3 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 hasta aproximadamente 8. “Cicloalquilenos” se refiere a un grupo cicloalquilo divalente.

Como se usa en este documento, “alquilenos” se refiere a un grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado que tiene de 2 a 5 átomos de carbono, y que contiene al menos un doble enlace, tal como etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-butenilo, isobutenilo, octenilo, decenilo, tetradecenilo.

35 El término “alquilenos”, como se usa en este documento, se refiere a un grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado que tiene de 2 a 15 átomos y que contiene al menos un triple enlace, tal como etinilo, n-propinilo, isopentinilo, n-butinilo, octinilo, decinilo.

“Alcoxi” se refiere a un grupo -OR, en el que R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C_1-C_{20} (por ejemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, etc.), más preferiblemente alquilo inferior (es decir, C_1-C_6 o C_1-C_4).

40 “Ariilo” se refiere a un radical aromático monovalente, sustituido o no sustituido, que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o dos anillos condensados o fusionados (por ejemplo, naftilo). Múltiples anillos de ariilo pueden estar también no fusionados (por ejemplo, bifenilo). El término incluye grupos heteroarilo, que son grupos de anillo aromático que tienen uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo, tales como furilo, pirrol, piridilo e indol.

45 “Aralquilo” se refiere a un alquilo, preferiblemente alquilo inferior (C_1-C_4 , más preferiblemente C_1-C_2), sustituyente que está sustituido adicionalmente con un grupo ariilo; los ejemplos son bencilo y fenetilo. “Aralcoxi” se refiere a un grupo de forma -OR, donde R es aralquilo; un ejemplo es benciloxi.

Un “heterociclo” se refiere a un anillo, preferiblemente un anillo de 5 a 7 miembros, cuyos átomos del anillo se seleccionan entre el grupo que consiste en carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Preferiblemente, los átomos del anillo incluyen de 3 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de heterociclos aromáticos (heteroarilo) se han dado anteriormente; los heterociclos no aromáticos incluyen, por ejemplo, pirrolidina, piperidina, piperazina y morfolina.

50 Un grupo o resto “sustituido” es uno en el que un átomo de hidrógeno se ha reemplazado por un átomo o grupo distinto de hidrógeno, que es preferiblemente un sustituyente no interferente.

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

Estos incluyen alquilo inferior, alquilenos o alquilenos; alcoxi inferior, cicloalquilo C_3-C_6 ; halo, por ejemplo, fluoro,

cloro, bromo o yodo; ciano; oxo (ceto); nitro y fenilo.

5 Por “resto” se entiende la parte de una molécula que permanece después de la reacción con una o más moléculas. Por ejemplo, un resto de una molécula biológicamente activa en un conjugado polimérico de la invención típicamente corresponde a la parte de la molécula biológicamente activa hasta, pero sin excluir, el enlace covalente resultante de la reacción de un grupo reactivo en la molécula biológicamente activa con un grupo reactivo en un reactivo polimérico.

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

10 Cada una de las expresiones “fármaco”, “molécula biológicamente activa”, “resto biológicamente activo”, “agente biológicamente activo”, “agente farmacológicamente activo” y “molécula farmacológicamente activa”, cuando se usan en este documento, se refieren a cualquier sustancia que pueda afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un organismo biológico, donde el organismo puede seleccionarse entre virus, bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se usa en este documento, las moléculas biológicamente activas incluyen cualquier sustancia pretendida para diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad en seres humanos u otros animales, o potenciar de otra manera el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequeña, tintes, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para su uso con la invención incluyen, aunque sin limitación, antibióticos, fungicidas, agentes antivíricos, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes anti ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos. Se incluyen también alimentos, complementos alimentarios, nutrientes, nutraceuticos, fármacos, vacunas, anticuerpos, vitaminas y otros agentes beneficiosos.

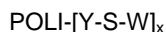
25 “Excipiente farmacéuticamente aceptable” o “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente que puede incluirse en las composiciones de la invención y que no provoca efectos toxicológicos adversos significativos a un paciente.

30 “Cantidad farmacológicamente eficaz”, “cantidad fisiológicamente eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se usan en este documento para hacer referencia a la media de la cantidad de un conjugado polímero-agente activo presente en una preparación farmacéutica, que es necesaria para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o conjugado presente en una preparación farmacéutica que es necesaria para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o conjugado en el torrente circulatorio o en el tejido diana. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el agente activo particular, los componentes y características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes a la que va destinado, las consideraciones del paciente y puede determinarla fácilmente un experto en la materia basándose en la información proporcionada en este documento y disponible en la bibliografía pertinente.

El término “paciente” se refiere a un organismo vivo que padece o es susceptible de padecer una afección que puede evitarse o tratarse mediante la administración de un agente biológicamente activo o conjugado del mismo e incluye tanto seres humanos como animales.

Reactivos de Tiol Polimérico

40 Los reactivos poliméricos, solubles en agua, de la invención comprenden la estructura



en la que:

45 POLI es un polímero soluble en agua, seleccionado entre un poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxi alquilmetacrilamida), poli(hidroxi alquilmetacrilato), poli(sacárido), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina y poli(N-acrilolmorfolina);

50 Y es un grupo de unión divalente, que contiene al menos cuatro átomos de carbono y que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a ocho átomos de carbono de longitud y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno o alcoxi; cicloalquilo C₃-C₆; halo; ciano y fenilo; donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden estar unidos para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;

S es un átomo de azufre unido a un carbono hibridado en sp³ de Y;

S-W es un tiol, tiol protegido o derivado de tiol reactivo con tiol;

x = 1 - 25; y

POLI tiene un peso molecular de al menos 500 cuando POLI es un polietilenglicol lineal, $x = 1$ e Y es una cadena de alquilo lineal.

En una realización, S-W es un derivado reactivo con tiol, tal como disulfuro de orto-piridilo (OPSS). Los tioles protegidos incluyen, por ejemplo, tioéteres, tales como S-bencil o S-tritil éteres y tioésteres.

5 El átomo de azufre S está unido a un átomo de carbono hibridado en sp^3 de Y, como se indica, en lugar de a un anillo de arilo o doble enlace. En una realización, el átomo de carbono al que está unido el átomo de azufre tiene un sustituyente alquilo inferior, tal como metilo o etilo (ramificación α).

10 La "estructura básica" del grupo espaciador Y se define más particularmente como la cadena de carbono contigua más corta que conecta POLI y S. En una realización, la estructura básica de Y está saturada. Por ejemplo, Y puede ser de la forma $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 8, preferiblemente de 3 a 6, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente, y donde dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono de $-(CR^1R^2)_n-$ pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo. Cuando Y contiene un grupo cicloalquilo, es preferiblemente un grupo cicloalquilo de cinco o seis miembros.

15 En las realizaciones seleccionadas adicionales, Y se selecciona entre el grupo que consiste en alqueno C_3-C_8 y combinaciones de alqueno C_3-C_8 con cicloalqueno C_5-C_8 o arilo, cualquiera de los cuales puede incluir uno o más sustituyentes no interferentes. Preferiblemente, se incluyen como máximo uno o dos sustituyentes no interferentes, seleccionados entre el grupo que consiste en cicloalquilo C_3-C_6 , halo, ciano, alcoxi inferior y fenilo se seleccionan preferiblemente entre metoxi, etoxi, flúor y cloro. En una realización, están presentes sustituyentes que no contienen heteroátomo; es decir, Y consiste en carbono e hidrógeno.

20 Cuando la estructura básica de Y es insaturada, preferiblemente es monoinsaturada, es decir, que tiene un solo doble o triple enlace carbono-carbono. Preferiblemente, el grupo espaciador Y, incluyendo la estructura básica y los sustituyentes, es monoinsaturado o más preferiblemente totalmente insaturado. En esta realización, Y puede ser un hidrocarburo totalmente saturado.

25 En otra realización, el grupo espaciador Y, que incluye la estructura básica y los sustituyentes es monoinsaturado o, más preferiblemente totalmente saturado. En esta realización, Y puede ser un hidrocarburo totalmente saturado.

En otra realización, el grupo espaciador Y, incluyendo la estructura básica y los sustituyentes, consiste en partes saturadas y aromáticas, preferiblemente partes de hidrocarburo saturadas y aromáticas.

30 En los reactivos poliméricos, cuando Y es $-(CR^1R^2)_n-$, el segmento de polímero POLI preferiblemente tiene un peso molecular de al menos 500 Da cuando cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno con respecto a las n iteraciones de $-(CR^1R^2)-$, particularmente cuando POLI es un PEG lineal y $x = 1$ en la fórmula anterior. POLI puede tener adicionalmente un peso molecular mayor de 500 Da, mayor de 750 Da o mayor de 1000 Da. Puede usarse una diversidad de intervalos de pesos moleculares mayores, hasta aproximadamente 300.000 Da, más típicamente hasta aproximadamente 100.000 Da, como se ha descrito anteriormente.

35 Cuando x es 2, el reactivo es un reactivo polimérico difuncional, tal como se describe adicionalmente más adelante, y puede tener una morfología lineal o "bifurcada", como se describe en este documento. El reactivo polimérico puede tener también una morfología "multibrazo", como se describe en este documento, particularmente cuando x es 3 o mayor. En las realizaciones seleccionadas, x es de 1 a 8, de 1 a 6 o de 1 a 4; en realizaciones adicionales, x es 1 ó 2 o x es 1. El componente POLI de los reactivos descritos puede tener por sí mismo una morfología seleccionada entre el grupo que consiste en lineal, ramificada, multibrazo y combinaciones de las mismas, como se describe adicionalmente en este documento.

En una realización preferida, el segmento de polímero soluble en agua es un polietilenglicol, de manera que el reactivo tiene la fórmula

45 $PEG-[Y-S-W]_x$

en la que:

PEG es un poli(etilenglicol);

50 Y es un grupo de unión divalente que tiene al menos 4 átomos de carbono; que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a ocho átomos de carbono de longitud y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y sustituyentes no interferentes como se define en este documento, donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;

S es un átomo de azufre unido a un carbono hibridado en sp^3 de Y;

x es de 1 a 25; y

S-W es un tiol (es decir, W es H), tiol protegido o derivado de tiol reactivo con tiol.

5 Los inventores han descubierto que, incluyendo un grupo espaciador hidrófobo entre el segmento de polímero soluble en agua y el grupo tiol en un tiol polimérico soluble en agua, la tendencia de dicha molécula a dimerizar para formar disulfuro se reduce. Los rendimientos, por consiguiente, aumentan en la preparación de dichos reactivos y en su conjugación con otras moléculas, como se demuestra más adelante.

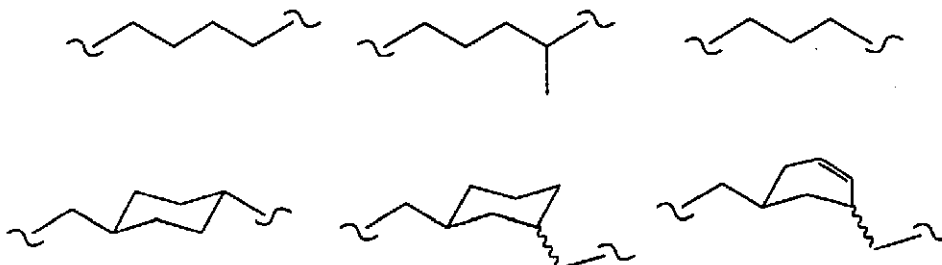
10 Los grupos espaciadores descritos en este documento son grupos basados en hidrocarburo de más de tres carbonos o más de longitud, que contienen al menos cuatro átomos de carbono, que pueden incluir carbonos de ramificación (por ejemplo, un isobutano o 1-metilpropileno, unión). Aunque se describe como "basado en hidrocarburo", el grupo espaciador puede incluir un número limitado de sustituyentes no interferentes como se define en este documento. Preferiblemente, sin embargo el grupo espaciador consiste en carbono e hidrógeno.

15 En las realizaciones preferidas del reactivo polimérico, Y es un alquileo lineal o ramificado que tiene la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 8, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente. Preferiblemente, se incluyen de cero a dos, más preferiblemente de cero a uno de dichos sustituyentes no interferentes.

20 Preferiblemente, n es de 4 a 8, más preferiblemente de 4 a 6. En una realización, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y metilo. En una realización preferida, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno con respecto a las n iteraciones de $-(CR^1R^2)-$; en otra realización preferida, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con la excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre (carbono α), siendo dicho R^1 alquilo inferior, preferiblemente metilo o etilo (ramificación α). En una realización, el grupo de ramificación α es metilo.

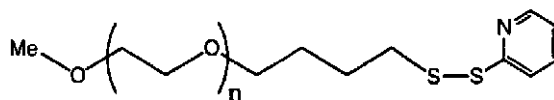
25 En las realizaciones de Y donde Y es $-(CR^1R^2)_n-$, n es de 4 a 8, y dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono se unen para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo, el grupo cicloalquilo es preferiblemente un grupo ciclopentilo o ciclohexilo. En dichas realizaciones, el átomo de azufre está unido preferiblemente a un carbono no cíclico de Y.

Los grupos espaciadores ejemplares Y que tienen una estructura básica saturada incluyen los siguientes (donde las líneas curvas indican enlaces a POLI o S, de manera que la primera estructura, por ejemplo, representa n-butileno):



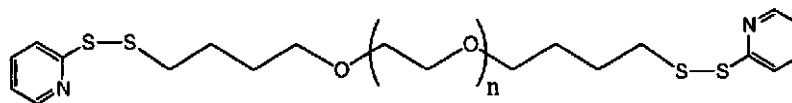
30 Como se ha observado anteriormente, la "estructura básica" del grupo espaciador es la cadena de carbono contigua más corta que une POLI al átomo de azufre. Por consiguiente, cada una de las estructuras en la segunda fila anterior tiene cinco carbonos en la estructura básica. Mediante esta definición, además, la última estructura mostrada tiene una estructura básica saturada, aunque el grupo espaciador en su conjunto es insaturado.

35 En un reactivo polimérico ejemplar, descrito más adelante, POLI es polietilenglicol terminado en metoxi (mPEG), Y es $-(CH_2)_4-$ y -S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS), como se describe más adelante o SH. El mPEG preferiblemente tiene un peso molecular en el intervalo de 5000 a 30000 Da; por ejemplo, aproximadamente 5000, aproximadamente 10000, aproximadamente 20000, o aproximadamente 30000 Da.



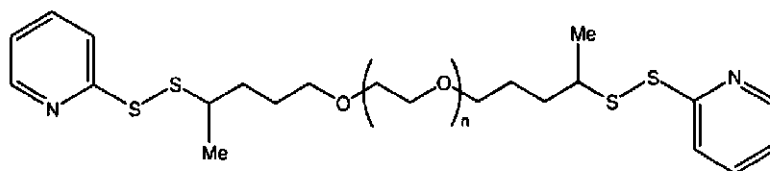
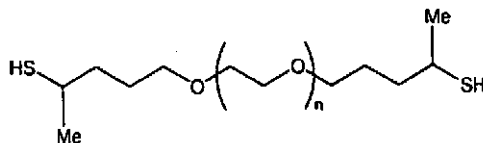
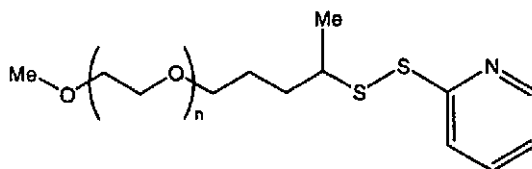
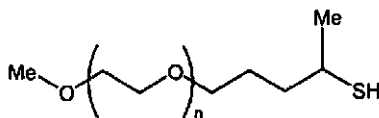
40 En una realización adicional, el reactivo polimérico es una estructura difuncional representada por W-S-Y-POLI-Y-S-W, donde POLI, Y y S-W son como se han definido anteriormente. Típicamente, aunque no necesariamente, el reactivo polimérico es simétrico. Un reactivo polimérico ejemplar de esta estructura, descrito más adelante, es uno en el que POLI es polietilenglicol (PEG), cada Y es $-(CH_2)_4-$ y cada -S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS), como se

describe más adelante, o SH. El PEG preferiblemente tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 1000 a 5000 Da, por ejemplo, de 2000 a 3400 Da.



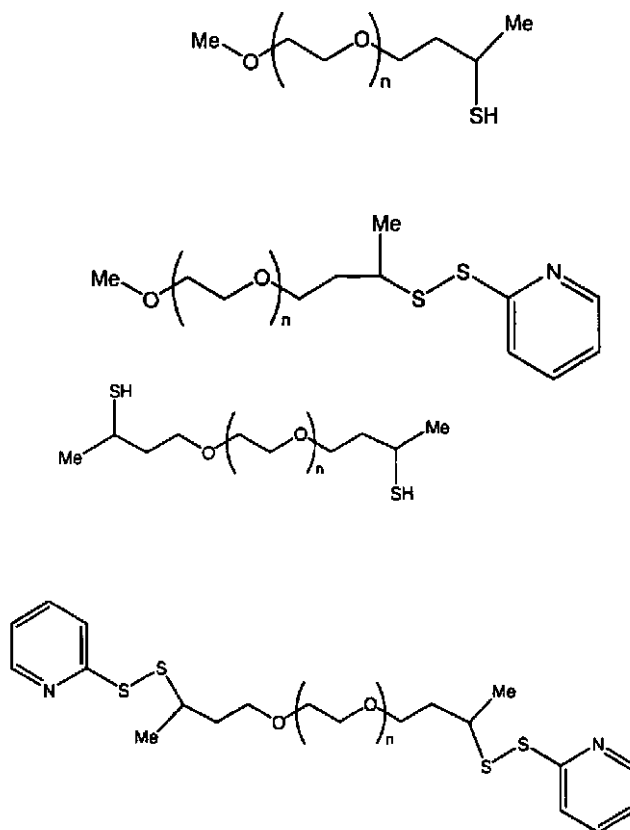
5

Los reactivos poliméricos ejemplares adicionales incluyen reactivos de la fórmula general PEG-[Y-S-W]_x, donde x es 1 ó 2, Y es -(CH₂CH₂CH₂CH(CH₃))- y S-W es SH o disulfuro de orto-piridilo (OPSS). Cuando x es 1, PEG es preferiblemente polietilenglicol terminado en metoxi (mPEG). Dichos reactivos se describen más adelante ("Me" representa metilo aquí y en cualquier otro lugar):

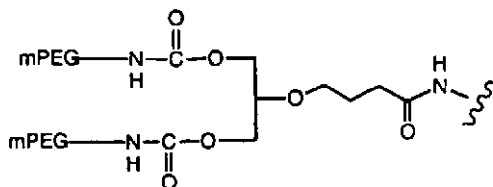


10

Otros reactivos poliméricos ejemplares incluyen aquellos de fórmula general PEG-[Y-S-W]_x donde x es 1 ó 2, Y es -(CH₂CH₂CH(CH₃))- y S-W es SH o disulfuro de orto-piridilo (OPSS). Dichos reactivos se describen a continuación:

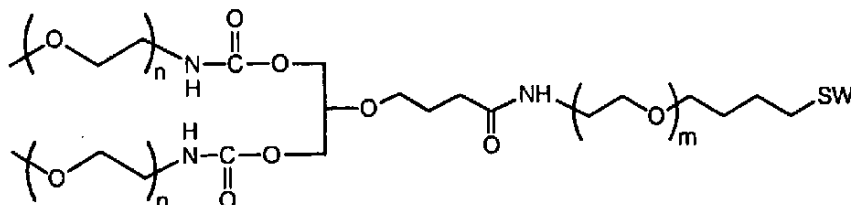


Otra clase ejemplar de reactivos poliméricos es aquella de fórmula general PEG-[Y-S-W]_x donde x es 1, Y es -(CH₂)₄-, -S-W es SH o disulfuro de orto-piridilo (OPSS) y PEG está terminado con la estructura:



5

Dichos reactivos se describen de forma general a continuación:



10

Preferiblemente, el PEG unido a Y-SW tiene un peso molecular de aproximadamente 500 Da o menor, o aproximadamente 200 Da o menor, por ejemplo, donde m = 2 a 10, preferiblemente de 2 a 4. En una realización, m = 4. Cada mPEG en la estructura ramificada terminal mostrada preferiblemente tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa; por ejemplo, n = aproximadamente 110 a aproximadamente 450. Cada mPEG puede ser por ejemplo, de 5, 10, 15 o 20 kDa de peso molecular.

15

Los reactivos descritos en este documento se caracterizan por ser tioles "sin enlace"; es decir, donde el polímero soluble en agua se une directamente al grupo espaciador basado en hidrocarburo Y. Por ejemplo, el átomo de oxígeno de una unidad de repetición de etilenglicol de un poli(alquilen)glicol, tal como -CH₂CH₂O en PEG, se une directamente a Y. La ausencia de heteroátomos adicionales, particularmente en uniones tales como ésteres,

carbamatos o amidas, entre la funcionalidad de conjugación activa, es decir, el diol o tiol protegido y el polímero, reduce el potencial de degradación del polímero conjugado. Además, la presencia de dichas uniones que contienen heteroátomo, tales como amidas, en dichos reactivos, puede desencadenar una respuesta inmune perjudicial. Este potencial se elimina o se reduce en gran medida mediante los reactivos "sin enlace" actuales.

5 En los reactivos poliméricos, el segmento polimérico POLI preferiblemente tiene un peso molecular de al menos 500 Da, particularmente en realizaciones donde POLI es PEG. Diversas realizaciones preferidas del segmento polimérico POLI se describen en detalle más adelante. Preferiblemente, el segmento de polímero "POLI" es un polialquilenglicol, tal como un polietilenglicol (PEG). El polietilenglicol puede tener diversos pesos moleculares, de aproximadamente 88 a aproximadamente 100.000 Dalton, dentro de las estipulaciones anteriores. En las realizaciones
10 seleccionadas, el polietilenglicol tiene una masa molecular promedio en peso de 148 (por ejemplo, un trímero más un átomo de oxígeno de unión) a aproximadamente 200 a aproximadamente 40.000 Dalton. Los pesos moleculares representativos incluyen, por ejemplo, 500, 1000, 2000, 3000, 3500, 5000, 7500, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000 y 40000 Dalton. Generalmente, los reactivos difuncionales o polifuncionales emplearán segmentos POLI o PEG de menor peso molecular que los reactivos monofuncionales.

15 El polímero puede tener una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en lineal, ramificada, bifurcada, multibrazo o combinaciones de las mismas, como se describe adicionalmente en este documento.

El Segmento de Polímero, POLI

20 Los polímeros solubles en agua, representativos para su uso en la preparación de los reactivos poliméricos de la invención, incluyen poli(alquilenglicoles), tales como poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina y poli(N-acrilolmorfolina). POLI puede ser un homopolímero, un copolímero alterno, un copolímero aleatorio, un copolímero de bloque, un tripolímero alterno, un tripolímero aleatorio o un tripolímero de bloque de cualquiera de los anteriores. El segmento de polímero soluble en agua es preferiblemente un polietilenglicol ("PEG") o un derivado del mismo.
25

Preferiblemente, el polímero es un polímero hidrófilo; es decir, un polímero que contiene menos de aproximadamente 25 subunidades de óxido de propileno u otros segmentos de polímero hidrófobos similares. El polímero, en una realización alternativa, puede no tener óxido de propileno o subunidades hidrófobas similares. En un caso, el polímero no es preferiblemente un polímero de tipo pluronic. En otra realización particular más, el polímero no se une preferiblemente a un soporte en fase sólida.
30

El segmento de polímero puede tener cualquier número de geometrías diferentes, por ejemplo, POLI puede ser lineal, ramificado o multibrazo. Más típicamente, POLI es lineal o ramificado, por ejemplo, que tiene dos brazos de polímero. Aunque la mayor parte del análisis en este documento se centra en PEG como un POLI ilustrativo, el análisis y las estructuras presentadas en este documento pueden ampliarse fácilmente para abarcar cualquiera de los segmentos de polímeros solubles en agua descritos anteriormente.
35

Aunque los polímeros solubles en agua que sólo llevan una o dos funcionalidades tiol se usan típicamente y se ilustran en este documento, pueden usarse polímeros que llevan dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más de dichas funcionalidades. Los ejemplos del límite superior del número de restos tiol asociado con el segmento de polímero 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.
40

Un tipo preferido de polímero soluble en agua, PEG, abarca poli(etilenglicol) y cualquiera de sus formas lineales ramificadas o multibrazo, incluyendo PEG con protección terminal, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante y PEG que contiene una o más uniones degradables que separan las unidades monoméricas, que se describirá más completamente más adelante. El número de unidades de repetición de etilenglicol en un segmento de polímero de PEG típicamente variará de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.000, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 3.000 o más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 1.000.
45

Los PEG con protección terminal preferidos son aquellos que tienen como un resto con protección terminal alcoxi, alcoxi sustituido, alquenioloxi, alquenioloxi sustituido, alquinioloxi, alquinioloxi sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido. Los grupos de protección terminal preferidos son alcoxi C₁-C₂₀, tales como metoxi, etoxi y benciloxi. El grupo con protección terminal puede comprender también, ventajosamente, un fosfolípido. Los fosfolípidos ejemplares incluyen fosfatidilcolinas, tales como dilauoilfosfatidilcolina, dioleil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, diestearoil fosfatidilcolina, behenoil fosfatidilcolina, araquidoil fosfatidilcolina y lecitina.
50

Un extremo del polímero que no está tiolado, puede incluir, como alternativa a un grupo terminal, un resto reactivo, que está preferiblemente en forma protegida. Los ejemplos de dichos restos reactivos incluyen hidroxilo, amino, éster, carbonato, aldehído, acetal, aldehído hidrato, cetona, cetal, cetona hidrato, alqueniolo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, hidrazida, urea, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxi, benciloxi, silano, lípido, fosfolípido, biotina y fluoresceína, incluyendo formas
55

activadas y protegidas de los mismos cuando sea aplicable. Se prefieren grupos funcionales tales como N-hidroxisuccinimidil éster, carbonato de 1-hidroxibenzotriazolilo, amina, vinilsulfona, maleimida, carbonato de N-succinimidilo, hidrazida, propionato de succinimidilo, butanoato de succinimidilo, succinato de succinimidilo, succinimidil éster, glicidil éter, oxycarbonilimidazol, carbonato de p-nitrofenilo, aldehído, disulfuro de ortopiridilo y acrilol.

5 Estos y otros grupos funcionales se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: N-succinimidil carbonato (Patentes de Estados Unidos N° 5.281.698 y 5.468.478), amina (Buckmann et al., Makromol. Chem. 182:1379 (1981); Zalipsky et al., Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (Andresz et al., Makromol. Chem. 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (Olson et al., en Poly(ethylene glycol): Chemistry & Biological Applications, pág. 170-181, Harris & Zalipsky, Eds., ACS, Washington, DC (1997); Patente de Estados Unidos N° 5.672.662), succinato de succinimidilo (Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biofis. 7:175 (1984) y Joppich et al., Makromol. Chem. 180:1381 (1979)), succinimidil éster (Patente de Estados Unidos N° 4.670.417), carbonato de benzotriazol (Patente de Estados Unidos N° 5.650.234), glicidil éter (Pitha et al., Eur. J. Biochem. 94:11 (1979); Ellingetal., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991)), oxycarbonilimidazol (Beauchamp et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983); Tondelli et al., J. Controlled Release 1:251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (Veronese et al., Appl. Biochem. Biotech. 11:141 (1985); Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech. 27:45 (1991)), aldehído (Harris et al., J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984); Patente de Estados Unidos N° 5.824.784; Patente de Estados Unidos 5.252.714), maleimida (Goodson et al., Bio/Technology 8:343 (1990); Romani et al., en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984); Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), disulfuro de ortopiridilo (Woghiren et al., Bioconj. Chem. 4:314 (1993)), acrilol (Sawhney et al., Macromolecules 26:581 (1993)), y vinilsulfona (Patente de Estados Unidos N° 5.900.461).

20 Los tipos de POLI descritos abarcan segmentos de polímero lineal así como segmentos de polímero ramificados o multibrazo. Los ejemplos incluyen moléculas de PEG que tienen 2 brazos, 3 brazos, 4 brazos, 5 brazos, 6 brazos, 7 brazos, 8 brazos o más. Los polímeros ramificados usados para preparar los polímeros de tiol de la invención pueden poseer cualquiera de 2 a 300 o más extremos reactivos. Se prefieren PEG reactivos o multibrazo que tienen 2-8 brazos de polímero. Los polímeros ramificados o multibrazo para su uso en la preparación dentro del polimérico de la invención incluyen aquellos representados más generalmente mediante la fórmula $R(\text{POLI})_n$, en la que R es una molécula fundamental o núcleo a partir de la cual se extienden dos o más brazos de POLI, tales como PEG. La variable n representa el número de brazos de POLI, donde cada uno de los brazos del polímero puede estar independientemente protegido terminalmente o poseer un grupo hidroxilo u otro grupo reactivo en su extremo, donde al menos un brazo de polímero posee dicho grupo reactivo. Los PEG ramificados, tales como aquellos representados generalmente por la fórmula $R(\text{PEG})_n$ anterior, poseen al menos 2 brazos del polímero, hasta aproximadamente 300 brazos del polímero (es decir, n varía de 2 a aproximadamente 300). Preferiblemente, dichos PEG ramificados poseen de 2 a aproximadamente 25 brazos del polímero, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 20 brazos de polímero, e incluso más preferiblemente de 2 a aproximadamente 15 brazos de polímero o menos. Son más preferidos los polímeros multibrazo que tienen 3, 4, 5, 6, 7 u 8 brazos.

35 Las moléculas fundamentales preferidas en los PEG ramificados, como se ha descrito anteriormente, son polioles. Dichos polioles incluyen polioles alifáticos, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono y de 1 a 10 grupos hidroxilo, incluyendo etilenglicol, alcano dioles, alquil glicoles, alquiliden alquil dioles, alquil cicloalcano dioles, 1,5-decalindiol, 4,8-bis(hidroximetil)triclodecano, cicloalquiliden dioles, dihidroxialcanos, trihidroxialcanos, tetrahidroxialcanos. También, los éteres de algunas o todas las clases anteriores pueden servir como moléculas centrales, incluyendo dipentaeritritol, tripentaeritritol, hexaglicerol. Los polioles cicloalifáticos pueden emplearse también, incluyendo azúcares de cadena lineal o de anillo cerrado y alcoholes de azúcar, tales como manitol, sorbitol, inositol, xilitol, quebraquitol, treitol, arabitol, eritritol, adonitol, ducitol, facosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, ramnosa, galactosa, glucosa, fructosa, sorbosa, manosa, piranosa, altrosa, talosa, tagitosa, piranósidos, sacarosa, lactosa, maltosa. Los polioles alifáticos adicionales incluyen derivados de gliceraldehído, glucosa, ribosa, manosa, galactosa, y estereoisómeros relacionados. Otros polímeros fundamentales que pueden usarse incluyen éter corona, ciclodextrinas, dextrinas y otros carbohidratos, tales como almidones y amilosa. Los polioles preferidos incluyen glicerol, pentaeritritol, sorbitol y trimetitolpropano.

50 Una estructura multibrazo correspondiente a un triol polimérico de la invención puede representarse mediante $R-(\text{POLI}-Y-S-W)_x$, donde POLI, Y y S-W son como se han definido anteriormente, R representa la molécula fundamental de la estructura multibrazo y x es preferiblemente de 3 a aproximadamente 8. Cada uno de los brazos del polímero puede estar protegido terminalmente independientemente, o poseer un grupo tiol en su extremo, donde al menos un brazo de polímero posee un grupo tiol o tiol protegido). Los PEG multibrazo adecuados para preparar dichas estructuras están disponibles en Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama).

55 Como alternativa, el segmento de polímero puede poseer una estructura bifurcada global, por ejemplo, del tipo $\text{PEG}-(Y-S-W)_2$. Este tipo de segmento de polímero es útil para la reacción con dos agentes activos, donde los dos agentes activos están situados aparte, a una distancia precisa predeterminada, dependiendo de la selección de Y.

60 Los PEG representativos, que tienen estructuras lineales o ramificadas, para su uso en la preparación de los conjugados de la invención, pueden adquirirse en Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama). Las estructuras ilustrativas se describen en el catálogo Nektar 2004 titulado "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", cuyos contenidos se incorporan expresamente en este documento por referencia.

5 En cualquiera de las estructuras representativas proporcionadas en este documento, una o más uniones degradables pueden estar contenidas en el segmento POLI, para permitir la generación *in vivo* de un conjugado que tenga una cadena POLI más pequeña que en el conjugado administrado inicialmente. Las uniones fisiológicamente escindibles apropiadas incluyen éster, carbonato éster, carbamato, sulfato, fosfato, aciloxialquil éter, acetal y cetal. Dichas uniones preferiblemente serán estables tras el almacenamiento y tras la administración inicial.

10 El peso molecular de POLI típicamente está incluido en uno o más de los siguientes intervalos: de 100 a 100.000 Dalton; de aproximadamente 500 a aproximadamente 80.000 Dalton; de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000 Dalton; de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 25.000 Dalton; y de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000 Dalton. Los pesos moleculares ejemplares incluyen aproximadamente 1.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 15.000, aproximadamente 20.000, aproximadamente 25.000, aproximadamente 30.000 y aproximadamente 40.000 Dalton. Los POLI de bajo peso molecular poseen pesos moleculares de aproximadamente 250, 500, 750, 1000, 2000 ó 5000 Dalton. Los polímeros tiolados ejemplares comprenden PEG que tienen un peso molecular seleccionado entre el grupo que consiste en 5.000, 20.000 y 40.000 Dalton.

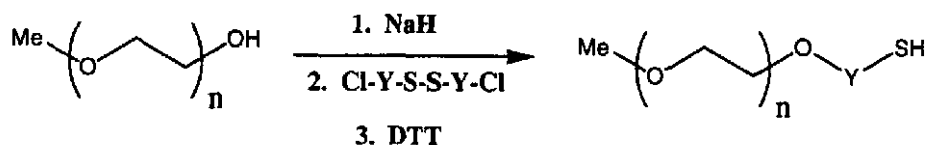
15 En realizaciones particulares de la invención, un reactivo de tiol polimérico, como se proporciona en este documento, posee un segmento de PEG que tiene uno de los siguientes pesos moleculares: 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000 y 40.000 Dalton.

20 En términos del número de subunidades, los PEG para su uso en la invención típicamente comprenderán un número de subunidades (-OCH₂CH₂-) que está incluido dentro de uno o más de los siguientes intervalos: de 12 a 4000 subunidades, de aproximadamente 15 a aproximadamente 2000 subunidades, de aproximadamente 20 a aproximadamente 1000 subunidades, de aproximadamente 25 a aproximadamente 750 subunidades y de aproximadamente 30 a aproximadamente 500 subunidades.

Preparación de Reactivos

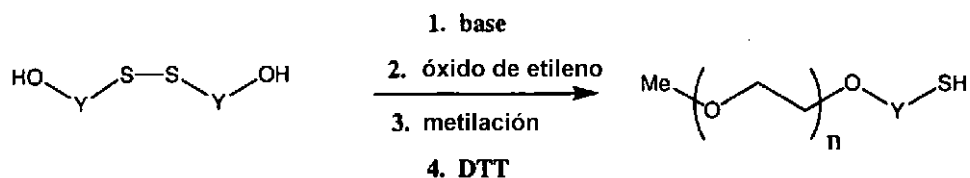
25 En el Esquema 1 se muestra un método de preparación de reactivos de polialquilenoxi-tiol "sin enlace". En la reacción mostrada, un polialquilenglicol que tiene un grupo terminal en un extremo, tal como monometoxi PEG, se alcoxila con una base fuerte, tal como NaH, y este reactivo se combina con un di(haloalquilsulfuro) para formar un disulfuro de diéter polimérico. Este intermedio puede escindirse con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) para dar el reactivo de polialquilenoxi-tiol.

Esquema 1



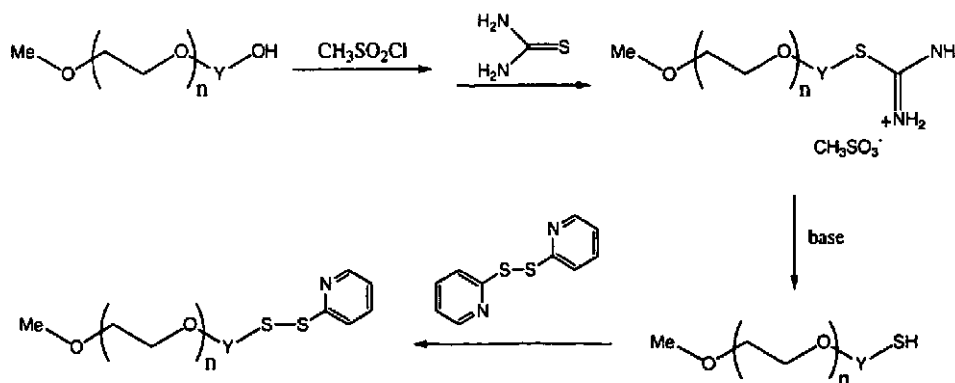
En otra ruta sintética, mostrada en el Esquema 2, se usa un di(hidroalquilsulfuro) como un material fundamental para la polimerización del óxido de etileno, formando un disulfuro de diéter de PEG. Los extremos se terminan, por ejemplo, con grupos metilo. El disulfuro puede escindirse después con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT), para dar el reactivo de polialquilenoxi-tiol.

35 Esquema 2



En el Esquema 3 se ilustra una estrategia adicional. En esta ruta, se proporciona un reactivo de POLI-Y-OH, donde Y es como se ha definido anteriormente. Dichos reactivos pueden prepararse, por ejemplo, por reacción de un POLI-OH, tal como m-PEG-OH, con una base fuerte, tal como NaH, para formar una sal de alcóxido, seguido de reacción con un haloalcanol, tal como 4-bromo-1-butanol. El grupo hidroxilo terminal se convierte en un grupo saliente, tal como tosilato o mesilato, y este compuesto se hace reaccionar después con tiourea, desplazando el grupo saliente. La sal de tiouronio terminal se escinde después con una base para dar el tiol terminal. Una variación en este esquema, en la que el grupo saliente es un haluro, se emplea en el Ejemplo 1 a continuación.

Esquema 3



En cualquiera de estos reactivos, el tiol puede protegerse usando un resto protector de tiol, tal como tritilo, tioéteres, tales como tioéteres de alquilo y bencilo, incluyendo monotio, ditio y aminotio acetales, tioésteres, tiocarbonatos, tiocarbamatos y derivados de sulfenilo. El uso de un grupo protector durante el almacenamiento reduce opcionalmente la tendencia de los reactivos a dimerizarse. El tiol puede convertirse también en un disulfuro de orto-piridilo (OPSS) como se muestra en el Esquema 3, que es estable en condiciones convencionales de almacenamiento. En las condiciones de reacción apropiadas, el grupo OPSS reacciona suavemente con los grupos tiol en los restos a conjugar del polímero soluble en agua, como se muestra en el Ejemplo 2.

Preferiblemente, los reactivos poliméricos de la invención se almacenan en una atmósfera inerte, tal como argón o nitrógeno. También es preferible minimizar la exposición de los polímeros de la invención a humedad. De esta manera, las condiciones de almacenamiento preferidas son en atmósfera de argón seco u otro gas inerte seco, a temperaturas por debajo de aproximadamente -15°C . El almacenamiento en condiciones de temperatura baja se prefiere, puesto que las velocidades de las reacciones secundarias indeseables se ralentizan a menores temperaturas. Por ejemplo, cuando el segmento de polímero es PEG, el PEG puede reaccionar lentamente con oxígeno para formar peróxidos, conduciendo finalmente a la escisión de la cadena y aumentando la polidispersidad de los reactivos de PEG. En vista de lo anterior, adicionalmente se prefiere almacenar los polímeros de la invención en la oscuridad.

Conjugados de Polímero

La presente invención abarca también conjugados formados haciendo reaccionar cualquiera de los reactivos de tiol poliméricos descritos en este documento. En general, los reactivos poliméricos de la invención son útiles para la conjugación con agentes activos que llevan al menos un grupo tiol disponible para la reacción.

Un conjugado de la invención típicamente tendrá la estructura POLI-[Y-S-S-A]_x, donde POLI es como se ha definido anteriormente, y en las realizaciones preferidas es un polietilenglicol (PEG); x es de 1 a 25 y "A" representa el resto del agente activo después de la conjugación. En las realizaciones seleccionadas, x es de 1 a 8, de 1 a 6 o de 1 a 4; en realizaciones adicionales x es 1 o x es 2. Y es un grupo de unión divalente que tiene al menos cuatro átomos de carbono, y que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado que es de tres a diez, preferiblemente de tres a ocho átomos de carbono de longitud, y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y sustituyentes no interferentes como se ha definido en este documento, donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno inferior en átomos de carbono diferentes de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno inferior o arilo.

En las realizaciones seleccionadas, Y tiene la estructura $-(\text{CR}^1\text{R}^2)_n-$ donde n es de 3 a 10, preferiblemente de 3 a 8, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente. Dos grupos R^1 y R^2 en átomos de carbono diferentes pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno inferior o arilo. El átomo de azufre del tiol (o tiol protegido) se fija a un carbono hibridado en sp^3 de Y, en lugar de a un anillo de arilo o doble enlace.

En las realizaciones seleccionadas de Y, Y es alqueno $\text{C}_3\text{-C}_8$ o una combinación de alqueno $\text{C}_3\text{-C}_8$ con cicloalqueno $\text{C}_5\text{-C}_8$ o arilo, cualquiera de los cuales puede incluir uno o más sustituyentes no interferentes, como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, se incluyen de cero a dos, más preferiblemente de cero a uno, de dichos sustituyentes no interferentes.

En realizaciones adicionales, Y es un alqueno lineal o ramificado que tiene la fórmula $-(\text{CR}^1\text{R}^2)_n-$, donde n es de 4 a 8 y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior y un sustituyente no interferente. Preferiblemente, n es de 4 a 6 y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y metilo. En una realización, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno con respecto a las n iteraciones de $-(\text{CR}^1\text{R}^2)-$. En otra realización, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre (carbono α), siendo dicho R^1 alquilo inferior, preferiblemente metilo o etilo.

En las realización de Y en las que Y es $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 4 a 8, y dos grupos R^1 y R^2 en diferentes átomos de carbono se unen para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo, el grupo cicloalquilo es preferiblemente un grupo ciclopentilo o ciclohexilo.

5 En otro aspecto, un conjugado de la invención puede tener la estructura $POLIA-L-SS-Y-POLIB-Y'-SS-A$. Cada POLI es un segmento de polímero soluble en agua, como se ha definido anteriormente, donde $POLIB$ es de bajo peso molecular, por ejemplo, 10 kDa o menor, preferiblemente 5 kDa o menor, y más preferiblemente 2 kDa o menor, y el peso molecular combinado de $POLIA$ y $POLIB$ es al menos 3 kDa. El peso molecular de $POLIA$ es generalmente, aunque no necesariamente, de peso molecular de medio a alto, por ejemplo, mayor de aproximadamente 2 kDa, preferiblemente de 5 kDa o mayor, y más preferiblemente 10 kDa o mayor.

10 Cada uno de Y e Y' es un grupo espaciador, como se ha definido anteriormente para Y, y pueden ser iguales o diferentes. Generalmente Y e Y' son grupos espaciadores idénticos. L es un enlazador entre $POLIA$ y la unión disulfuro adyacente. Típicamente, dicho enlazador es un enlace directo o una cadena de átomos de hasta aproximadamente diez átomos de longitud, que contiene grupos seleccionados preferiblemente entre uniones alquilo (C-C), alqueno, éster, amida, carbamato y tioéster. L puede ser, aunque no necesariamente, una realización de Y como se ha descrito en este documento.

15 Estos conjugados son generalmente el producto de una secuencia de reacción (ilustrada en los Ejemplos 8-11 a continuación), en la que un reactivo de bajo peso molecular de forma $W-S-S-Y-POLIB-Y'-S-S-W$, donde S-W es un tiol o preferiblemente un derivado reactivo con tiol, tal como OPSS, se hace reaccionar en primer lugar con una molécula biológicamente activa A-SH, por ejemplo, una proteína que tiene (o modificada para tener) un resto cisteína libre, para formar un intermedio $A-S-S-Y-POLIB-Y'-S-S-W$. Este intermedio se hace reaccionar después con (típicamente) un reactivo de mayor peso molecular, de la forma $POLIA-L-S-S-W$ para dar el conjugado final.

20 Una ventaja de dicho esquema, particularmente para moléculas biológicas con grupos tiol con impedimentos estéricos, es que un reactivo de bajo peso molecular es capaz de reaccionar más eficazmente con dicho grupo tiol con impedimentos estéricos de lo que lo haría un reactivo de mayor peso molecular. Un polímero de mayor peso molecular puede fijarse de esta manera a A con un mayor rendimiento a través de este esquema, que si se hiciera reaccionar directamente con el tiol con impedimentos estéricos.

25 Sin embargo, si el reactivo inicial $W-S-S-Y-POLIB-Y'-S-S-W$ carece del grupo o grupos espaciadores hidrófilos Y como se ha descrito en este documento, el esquema puede fallar debido a bajos rendimientos en las etapas de unión. Esta diferencia se ilustra en los Ejemplos comparativos 9 y 10 a continuación.

30 En general, los conjugados proporcionados en este documento son preferiblemente solubles o dispersables en agua, aunque los reactivos de tiol poliméricos pueden estar conjugados también a un soporte o superficie sólida que tenga grupos tiol activos.

35 Un grupo tiol, tal como en un resto cisteína, para acoplamiento a un polímero activado de la invención, puede ser de origen natural (por ejemplo, que aparece en la proteína u otra molécula en su forma nativa) o puede introducirse, por ejemplo, insertándolo en la secuencia nativa de una proteína, en lugar de un aminoácido de origen natural, usando técnicas de ingeniería genética convencionales.

40 Cuando el agente activo contiene menos de o sólo un grupo o grupo tiol reactivos, la composición resultante puede contener ventajosamente sólo una especie conjugada polimérica. Esto es útil en la conjugación a proteínas, que típicamente tienen un número relativamente bajo de grupos sulfhidrilo (en comparación con otros grupos activos, tales como amina) accesibles para la conjugación. La unión covalente a través de grupos tiol puede dar como resultado, por tanto, una modificación más selectiva de la proteína diana. Por consiguiente, el uso de tioles poliméricos puede permitir un mayor control sobre el conjugado polimérico resultante, tanto en el número de derivados de polímero unidos a la proteína precursora como en la posición de la unión del polímero.

Moléculas Candidatas para la Conjugación

45 Un agente biológicamente activo para su uso en la preparación de un conjugado de la invención puede estar dentro de una de un número de clases estructurales, incluyendo péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, polisacáridos, esteroides, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, grasas, electrolitos, moléculas pequeñas (preferiblemente, moléculas pequeñas insolubles). Preferiblemente, un agente activo para acoplamiento de un polímero de la invención posee un grupo sulfhidrilo nativo, o está modificado para contener al menos un grupo sulfhidrilo reactivo adecuado para el acoplamiento.

50 Los péptidos o proteínas preferidos para el acoplamiento a un tiol polimérico de la invención incluyen EPO, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN consenso, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, IL-2, Remicade™ (infiximab), Rituxan™ (rituximab), Enbrel™ (etanercept), Synagis™ (palivizumab), Reopro™ (abciximab), Herceptin™ (trastuzimab), tPA, Cerizyme™ (imiglucerasa), vacuna para la hepatitis-B, ADNr-asa, inhibidor de proteinasa alfa-1, G-CSF, GM-CSF, hGH, insulina, FSH, y PTH. En las realizaciones seleccionadas, la proteína es G-CSF o GM-CSF.

Los agentes biológicamente activos ejemplares anteriores pretenden abarcar, cuando sea aplicable, análogos,

agonistas, antagonistas, inhibidores, isómeros y formas de sal farmacéuticamente aceptables de los mismos. En referencia a los péptidos y proteínas, la invención pretende abarcar formas sintéticas, recombinantes, nativas, glucosiladas y no glucosiladas, así como fragmentos biológicamente activos de las mismas. Las proteínas biológicamente activas anteriores pretenden abarcar, adicionalmente, variantes que tienen uno o más aminoácidos sustituidos (por ejemplo, cisteína) delecionados o similares, siempre y cuando la proteína variante resultante posea al menos un cierto grado de actividad de la proteína precursora (nativa).

Los agentes adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, entre hipnóticos y sedantes, activadores psíquicos, tranquilizantes, fármacos respiratorios, anticonvulsivos, relajantes musculares, agentes antiparkinson (agonistas de dopamina), analgésicos, antiinflamatorios, fármacos anti ansiedad (ansiolíticos), supresores del apetito, agentes antimigraña, contractores musculares, antiinfecciosos (antibióticos, antivíricos, antifúngicos, vacunas), antiartríticos, antimalaria, antieméticos, antiepilépticos, broncodilatadores, citoquinas, factores de crecimiento, agentes anticáncer, agentes antitrombóticos, antihipertensores, fármacos cardiovasculares, antiarrítmicos, antioxidantes, agentes anti asma, agentes hormonales, incluyendo anticonceptivos, simpaticomiméticos, diuréticos, agentes reguladores de lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasíticos, anticoagulantes, neoplásicos, antineoplásicos hipoglucémicos, agentes nutricionales y complementos de crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico y agentes de contraste.

Otros ejemplos específicos de agentes activos incluyen asparaginasa, amdoxovir (DAPD), antide, becaplermin, calcitoninas, cianovirina, denileuquinadiftitox, eritropoyetina (EPO), agonistas de EPO (por ejemplo, péptidos de aproximadamente 10-40 aminoácidos de longitud y que comprende, una secuencia fundamental particular, como se describe en el documento WO 96/40749), dornasa alfa, proteína estimulante de eritropoyesis (NESP), factores de coagulación, tales como Factor V, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XII, Factor XIII, factor de von Willebrand; ceredasa, cerezima, alfa-glucosidasa, colágeno, ciclosporina, alfa defensinas, beta defensina, exendina-4, factor estimulante de la colonia de granulocitos (GCSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de proteinasa alfa-1, elcatonina, factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), fibrinógeno, filgrastim, hormonas del crecimiento humana de hormonas del crecimiento (hGH), hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), GRO-beta, anticuerpo GRO-beta, proteínas morfogénicas del hueso, tales como proteína-2 morfogénica del hueso, proteína-6 morfogénica del hueso, OP-1; factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, ligando CD-40, heparina, albúmina de suero humana, heparina de bajo peso molecular (HBPM), interferones, tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, interferón consenso; interleuquinas y receptores de interleuquinas tales como receptor de interleuquina-1, interleuquina-2, proteínas de fusión de interleuquina-2, antagonista del receptor de interleuquina-1, interleuquina-3, interleuquina-4, receptor de interleuquina-4, interleuquina-6, interleuquina-8, interleuquina-12, receptor de interleuquina-13, receptor de interleuquina-17; fragmentos de lactoferrina y lactoferrina, hormona liberadora de la hormona luteinizante (HLHL), insulina, pro-insulina, análogos de insulina (por ejemplo, insulina mono-acilada como se describe en la Patente de Estados Nº 5.922.675), amilina, péptido-C, somatostatina, análogos de somatostatina incluyendo octreotide, vasopresina, hormona estimulante del folículo (FSH), vacuna de la gripe, factor de crecimiento similar a insulina (IGF), insulintropina, factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF), activadores de plasminógeno tales como alteplasa, uroquinasa, reteplasa, estreptoquinasa, pamiteplasa, lanoteplasa, y tenecteplasa; factor de crecimiento nervioso (NGF), osteoprotegerina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento tisular, factor de crecimiento transformante-1, factor de crecimiento endotelial vascular, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento glial (GGF), receptores de células T, moléculas/antígenos CD, factor de necrosis tumoral (TNF), proteína quimioattractora de monocitos-1, factores de crecimiento endoteliales, hormona paratifoidea (PTH), péptido similar a glucagón, somatotropina, timosina alfa 1, inhibidor de timosina alfa 1 IIb/IIIa, timosina beta 10, timosina beta 9, timosina beta 4, antitripsina alfa-1, compuestos de fosfodiesterasa (PDE), VLA-4 (antígeno-4 muy tardío), inhibidores de VLA-4, bisfosfonatos, anticuerpo del virus sincitial respiratorio, gen del regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (Adnasa), proteína bactericida/de aumento de la permeabilidad (BPI), y anticuerpo anti-CMV. Los anticuerpos monoclonales ejemplares incluyen etanercept (una proteína de fusión dimérica que consiste en la parte extracelular de unión a ligando del receptor de TNF humano de 75 kD, unido a la parte Fc de IgG1), abciximab, afeliomomab, basiliximab, daclizumab, infliximab, ibritumomab tiuexetan, mitumomab, muromonab-CD3, conjugado yodo 131-tositumomab, olizumab, rituximab, y trastuzumab (herceptina).

Los agentes adicionales adecuados para la unión covalente a un polímero incluyen amifostina, amiodarona, ácido aminocaproico, aminohipurato sódico, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, amsacrina, anagrelida, anastrozol, asparaginasa, antraciclinas, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfán, cabergolina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucina, cilastatina sódica, cisplatino, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, camptotecinas, ácido 13-cis retinoico, ácido todo trans retinoico; dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, deferroxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estramustina, etopósido, exemestano, fexofenadina, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, flouximesterona, flutamida, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidroxiaurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecan, itraconazol, goserelina, letrozol, leucovorina, levamisol, lisinopril, lovotiroxina sódica, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalan, mercaptopurina, bitartrato de metaraminol, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, naloxona, nicotina, nilutamida, octreotida, oxaliplatino, pamidronato, pentostatina, pilcamicina, porfímero, prednisona, procarbazona, proclorperazina, ondansetrón, raltitrexed, sirolimus,

estreptozocina, tacrolimus, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tetrahidrocannabinol, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecan, tretinoína, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, dolasetrón, granisetrón; formoterol, fluticasona, leuprolida, midazolam, alprazolam, anfotericina B, podofilotoxinas, antivirales de nucleósido, aroil hidrazonas, sumatriptano; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davercina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, leucomicina, miocamicina, roquitamicina, andazitromicina, y swinolida A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trovafloxacina, alatrofloxacina, moxifloxicin, norfloxacina, enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, lomefloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, pefloxacina, amifloxacina, feroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina, y sitafloxacina; aminoglucósidos, tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amicacina, canamicina, neomicina, y estreptomycin, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato; polimixinas, tales como polimixina B, capreomicina, bacitracina, penems; penicilinas incluyendo agentes sensibles a penicilinas tales como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a penicilinas tales como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos frente a microorganismos gram negativos, tales como ampicilina, amoxicilina, y hetacilina, cilina, y galampicilina; penicilinas antipseudomonas, tales como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, y piperacilina; cefalosporinas, tales como cefpodoxima, cefprozil, ceftbuten, ceftizoxime, 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, monobactamas como aztreonam; y carbapenems tales como imipenem, meropenem, isetiuato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaína, sulfato de metaproterenol, dipropionato de beclometasona, triamcinolona acetamida, acetónido de budesonida, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolin sódico, y tartrato de ergotamina; taxanos tales como paclitaxel; SN-38, y tirfostinas.

Métodos de Conjugación

Las condiciones de conjugación adecuadas son aquellas condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración de reactivo y disolvente suficientes para efectuar la conjugación entre un reactivo de tiol polimérico y un agente activo. Como se sabe en la técnica, las condiciones específicas dependen, entre otras cosas, del agente activo, del tipo de conjugación deseada, de la presencia de otros materiales en la mezcla de reacción. Las condiciones suficientes para efectuar la conjugación en cualquier caso particular las puede determinar un experto en la materia, tras una lectura de la descripción de este documento, por referencia a la bibliografía pertinente y/o por experimentación rutinaria.

Las condiciones de conjugación ejemplares incluyen realizar 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 ó 10. Se permite que la reacción transcurra de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 72 horas, preferiblemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas y, más preferiblemente, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas o menos. Las temperaturas para las reacciones de conjugación están típicamente, aunque no necesariamente, en el intervalo de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C; la conjugación se realiza a menudo a temperatura ambiente o menor. Las reacciones de conjugación a menudo se realizan en un tampón, tal como tampón fosfato o acetato o un sistema similar.

Con respecto a la concentración de reactivo, un exceso del reactivo polimérico, típicamente, se combina con el agente activo. En algunos casos, sin embargo, se prefiere tener cantidades estequiométricas del número de grupos reactivos en el reactivo polimérico a la cantidad de agente activo. Las proporciones ejemplares de péptido polimérico a agente activo incluyen proporciones molares de aproximadamente 1:1 (reactivo polimérico:agente activo) 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1 ó 10:1. Se permite que la reacción de conjugación transcurra hasta que sustancialmente no ocurre más conjugación, lo que generalmente puede determinarse controlando el progreso de la reacción con el tiempo.

El progreso de la reacción puede controlarse extrayendo alícuotas de la mezcla de reacción en diversos puntos temporales, y analizando la mezcla de reacción por 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 conjugado formado o la cantidad de polímero no conjugado restante, la reacción se supone completa. Típicamente, la reacción de conjugación tarda desde minutos a varias horas (por ejemplo, de 5 minutos a 24 horas o más). La mezcla de producto resultante preferiblemente, aunque no necesariamente, se purifica para separar el exceso de reactivos, reactivos no conjugados (por ejemplo, agente activo) especies multi-conjugadas no deseadas, y polímero libre o no reaccionado. Los conjugados resultantes pueden caracterizarse adicionalmente por usar métodos analíticos tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel y/o cromatografía.

Más preferiblemente, un tiol polimérico de la invención típicamente está conjugado a un agente activo que contiene sulfhidrilo, a un pH de aproximadamente 6-9 (por ejemplo, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5 ó 9), más preferiblemente a un pH de aproximadamente 7-9 y aún más preferiblemente a un pH de aproximadamente 7 a 8. Generalmente, se emplea un ligero exceso molar de reactivo polimérico, por ejemplo, un exceso molar de 1,5 a 15 veces, preferiblemente de 2 veces a 10 veces de exceso molar. Los tiempos de reacción generalmente varían de aproximadamente 15 minutos a varias horas, por ejemplo, de 8 a más horas a temperatura ambiente. Para grupos sulfhidrilo con impedimentos estéricos, los tiempos de reacción requeridos pueden ser significativamente mayores.

Purificación de Conjugados

Opcionalmente, los conjugados producidos haciendo reaccionar un tiol polimérico de la invención con un agente biológicamente activo se purifican para obtener/aislar especies diferentes, por ejemplo, especies de PEG, o para retirar productos secundarios de reacción no deseados.

5 Si se desea, los conjugados de PEG que tienen diferentes pesos moleculares pueden aislarse usando cromatografía de filtración en gel. Aunque este enfoque puede usarse para separar conjugados de PEG que tienen diferentes pesos moleculares, este enfoque generalmente es ineficaz para separar isómeros posicionales, que tienen diferentes sitios de PEGilación dentro de una proteína. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel puede usarse para separar entre sí otras mezclas de 1-meros, 2-meros, 3-meros, etc. de PEG, aunque cada una de las composiciones de PEG-meros recuperadas puede contener PEG unidos a diferentes grupos reactivos dentro de la proteína.

10 Las columnas de filtración en gel adecuadas para realizar este tipo de separación incluyen columnas Superdex™ y Sefadex™, disponibles en Amersham Biosciences. La selección de una columna particular dependerá del intervalo de fraccionamiento deseado. La elución generalmente se realiza usando un tampón no basado en amina, tal como fosfato, acetato o similares. Las fracciones recogidas pueden analizarse por numerosos métodos diferentes, por ejemplo, (i) DO a 280 nm para contenido de proteína; (ii) análisis de proteína BSA; (iii) ensayo de yodo para contenido de PEG (Sims, G. E. C. et al., Anal. Biochem, 107, 60-63, 1980), o como alternativa, (iv) ejecutando un gel SDS PAGE, seguido de tinción con yoduro de bario.

15 La separación de los isómeros posicionales puede realizarse por cromatografía en fase inversa usando, por ejemplo, una columna RP-HPLC C18 (Amersham Biosciences o Vydac) o mediante cromatografía de intercambio de iones, usando una columna de intercambio de iones, por ejemplo, una columna de intercambio de iones Sefarose™, disponible en Amersham Biosciences. Puede usarse cualquier enfoque para separar los isómeros de PEG-biomolécula que tengan el mismo peso molecular (isómeros posicionales).

20 Dependiendo del uso pretendido para los conjugados de PEG resultantes, después de la conjugación y, opcionalmente, de las etapas de separación adicionales, la mezcla de conjugado puede concentrarse, filtrarse en condiciones estériles y almacenarse a bajas temperaturas de aproximadamente -20°C a aproximadamente -80°C. Como alternativa, el conjugado puede liofilizarse con o sin tampón residual, y almacenarse como un polvo liofilizado. En algunos casos, es preferible cambiar un tampón usado para conjugación, tal como acetato sódico, por un tampón volátil, tal como carbonato amónico o acetato amónico, que puede retirarse fácilmente durante la liofilización, de manera que el conjugado proteico liofilizado en polvo de la formulación no contenga tampón residual. Como alternativa, puede usarse una etapa de intercambio de tampón usando un tampón de formulación, de manera que el conjugado liofilizado esté en una forma adecuada para reconstitución en un tampón de formulación y, finalmente, para administración a un mamífero.

Composiciones Farmacéuticas

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

30 Los excipientes ejemplares incluyen aquellos seleccionados entre el grupo que consiste en carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos.

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

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

45 La preparación puede incluir también un agente antimicrobiano para prevenir o detener el crecimiento microbiano. Los ejemplos de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol fenil etílico, nitrato fenilmercúrico, timersol y combinaciones de los mismos.

50 Un antioxidante también puede estar presente en la preparación. Los antioxidantes se usan para evitar la oxidación, evitando de esta manera el deterioro del 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, montioglicerol, galato de propilo, bisulfito sódico, formaldehído sulfoxilato sódico, metabisulfito sódico y combinaciones de los mismos.

Un tensioactivo puede estar presente como un excipiente. Los tensioactivos ejemplares incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80" y pluronics, tales como F68 y F88 (ambos de los cuales están disponibles en BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitano; lípidos, tales como fosfolípidos, tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposómica), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides tales como colesterol y agentes quelantes, tales como EDTA, cinc y otros cationes adecuados.

Los ácidos o bases pueden estar presentes como un excipiente en la preparación. Los ejemplos de ácidos que pueden usarse incluyen aquellos ácidos seleccionados entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido trifluoroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen bases seleccionadas entre el grupo que consiste en hidróxido sódico, acetato sódico, hidróxido de amonio, hidróxido potásico, acetato de amonio, acetato potásico, fosfato sódico, fosfato potásico, citrato sódico, formiato sódico, sulfato sódico, sulfato potásico, fumarato potásico y combinaciones de los mismos.

Las preparaciones farmacéuticas abarcan todo tipo de formulaciones y, en particular, aquellas que son adecuadas para inyección, por ejemplo, polvos que pueden reconstituirse, así como suspensiones y soluciones. La cantidad del conjugado (es decir, el conjugado formado entre el agente activo y el polímero descrito en este documento) en la composición, variará dependiendo de numerosos factores, aunque óptimamente será una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacena en un recipiente de dosis unitaria (por ejemplo, un vial). Además, la preparación farmacéutica puede alojarse en una jeringa. Una dosis terapéuticamente eficaz puede determinarse experimentalmente por administración repetida, aumentando las cantidades del conjugado para determinar qué cantidad produce un punto final clínicamente deseado.

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

Generalmente, sin embargo, el excipiente estará presente en la composición en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 5% al 98% en peso, más preferiblemente de aproximadamente el 15-95% en peso del excipiente, siendo las concentraciones menores del 30% en peso las más preferidas.

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

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se administran típicamente, aunque no necesariamente, por inyección y, por lo tanto, son soluciones o suspensiones generalmente líquidas inmediatamente antes de la administración. La preparación farmacéutica puede tomar también otras formas, tales como jarabes, cremas, pomadas, comprimidos, polvos. Se incluyen también otros modos de administración, tales como pulmonar, rectal, transdérmico, transmucosa, oral, intratecal, subcutáneo, intra-arterial.

Como se ha descrito anteriormente, los conjugados pueden administrarse por inyección parenteral, por inyección intravenosa o, menos preferiblemente, por inyección intramuscular o subcutánea. Los tipos de formulación adecuados para administración parenteral incluyen soluciones listas para inyección, polvos secos para combinación con un disolvente antes de su uso, suspensiones listas para inyección, composiciones insolubles secas para combinación con un vehículo antes de su uso y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de la administración, entre otras.

Métodos de Administración

Se describen también métodos para administrar un conjugado, como se proporciona en este documento, a un paciente que sufre una afección que es sensible al tratamiento con el conjugado. El método comprende administrar, generalmente por inyección, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado (preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica). El método de administración puede usarse para tratar cualquier afección que pueda remediarse o evitarse por administración del conjugado particular. Los expertos en la materia apreciarán qué afecciones puede tratar eficazmente un conjugado específico. La dosis real a administrar variará dependiendo de la edad, peso y estado general del sujeto, así como de la gravedad de la afección a tratar, el juicio de profesional sanitario y el conjugado a administrar. Las cantidades terapéuticamente eficaces las conocen los expertos en la materia y/o se describen en los textos de referencia y bibliografía pertinentes. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz variará 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.

5 La dosificación unitaria de cualquier conjugado dado (de nuevo, proporcionado preferiblemente como parte de una preparación farmacéutica) puede administrarse en una diversidad de esquemas de dosificación, dependiendo del juicio del médico, las necesidades del paciente y similares. El esquema de dosificación específico lo conocerá el experto en la materia o puede determinarse experimentalmente usando métodos rutinarios. Los esquemas de dosificación ejemplares incluyen la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se ha alcanzado el punto final clínico, la dosificación de la composición se detiene.

10 La escisión de la parte del polímero soluble en agua del conjugado *in vivo*, cuando se desee, puede efectuarse mediante el uso de uniones físicamente escindibles y/o enzimáticamente degradables, tales como uretano, amida, carbonato o uniones que contienen éster, en la estructura del polímero. De esta manera, el aclaramiento del conjugado (por escisión de las partes del polímero solubles en agua) puede modularse seleccionando el tamaño molecular del polímero y el tipo de grupo funcional que proporcionarían las propiedades de aclaramiento deseadas. Un experto en la materia puede determinar el tamaño molecular apropiado del polímero, así como las uniones escindibles. Por ejemplo, un experto en la materia, usando experimentación rutinaria, puede determinar un tamaño de molécula apropiado y un grupo funcional escindible, preparando en primer lugar una diversidad de derivados del polímero con diferentes pesos del polímero y uniones escindibles, y después obteniendo un perfil de aclaramiento (por ejemplo, mediante sangrado periódico o muestreo de orina), administrando el derivado de polímero a un paciente y tomando muestras periódicas de sangre y/u orina. Se ha obtenido una serie de perfiles de aclaramiento para cada conjugado ensayado, pudiendo identificarse un conjugado adecuado.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. En un aspecto, los ejemplos ilustran la estabilidad aumentada durante la síntesis y conjugación de los reactivos de tiol polimérico de la invención.

Los datos de ^1H RMN se obtuvieron usando un espectrómetro de 400 MHz fabricado por Bruker.

25 Los reactivos de PEG mencionados están disponibles en Nektar Therapeutics, Huntsville, AL.

Ejemplo 1

Preparación de mPEG-(CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo (mPEG-4C-OPSS)

I. Bromuro de mPEG₅₀₀₀-butilo

30 Una solución de mPEG₅₀₀₀ (20,0 g, 0,004 mol) (NOF Corporation) en tolueno (200 ml) se secó azeotrópicamente, retirando por destilación 50 ml de tolueno. Se añadió hidruro sódico (0,8 g, dispersión al 60% en aceite mineral, 0,020 mol) y la mezcla se agitó durante 1 hora a 60°C en atmósfera de argón. Se añadió 1,4-dibromobutano (9,0 g, 0,0417 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 75°C en atmósfera de argón. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida y el residuo se combinó con 850 ml de éter etílico frío. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 17,4 g. RMN (d₆-DMSO): 1,60 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 1,84 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 3,24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,51 ppm (s, estructura básica del PEG).

II. mPEG₅₀₀₀-butanotiol

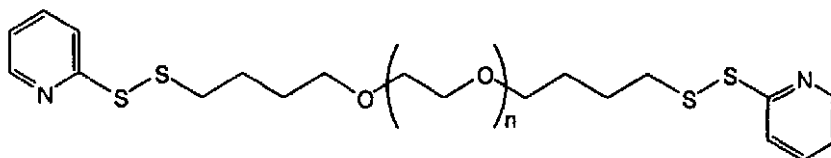
40 A una solución de mPEG₅₀₀₀-bromuro de butilo (2,0 g, 0,0004 mol) en éter etílico anhidro (20 ml), se le añadió tiourea (0,31 g, 0,0041 mol) y la mezcla se agitó durante una noche a 78°C en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en NaOH acuoso al 1% (21 ml). Esta solución se calentó durante 2,5 horas a 85°C en atmósfera de argón. Después de enfriar la solución a 35°C, el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. Se añadió NaCl (6 g), y el producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato sódico anhidro y el producto se precipitó con éter etílico frío. Rendimiento 1,8 g. RMN (CDCl₃): 1,35 ppm (t, -CH₂-SH, 1H), 1,69 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SH, 4H), 2,55 ppm (m, -CH₂-SH, 2H), 2,69 ppm (t, -CH₂-S-S-CH₂-, 4H, 1,2% en moles) 3,24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,51 ppm (s, estructura básica del PEG). El análisis yodométrico mostró que el producto contenía un 94% de grupos tiol. Los datos de RMN, anteriores, indicaban que el producto contenía una cantidad muy pequeña (1,2% en moles por RMN) de dímero unido a disulfuro, formado por oxidación de grupo tiol. No se requirió la purificación adicional del tiol.

50 En contraste, la preparación análoga de mPEG₅₀₀₀-etanotiol (es decir, el reactivo correspondiente que sólo contenía un espaciador de dos carbonos entre el PEG y el grupo tiol) a partir de mPEG₅₀₀₀-mesilato y tiourea, realizada de una manera similar, produjo un producto que contenía aproximadamente un 15% en moles del dímero unido a disulfuro, que contenía el grupo ditiol (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/063250). Este nivel de dímero necesita purificación adicional o tratamiento químico adicional para convertir el dímero en el PEG-tiol deseado).

III. mPEG₅₀₀₀-4C-OPSS

5 A una solución de mPEG₅₀₀₀-butanotiol (2,0 g, 0,0004 mol) en alcohol metílico anhidro (40 ml), se le añadió disulfuro de 2,2'-dipiridilo (0,18 g, 0,00082 mol), y la mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, el residuo se disolvió en diclorometano (5 ml) y el producto se precipitó con 50 ml de éter etílico frío. Rendimiento 1,7 g. RMN (CDCl₃): 1,68 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 1,76 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 2,82 ppm (t, -CH₂-S-, 2H), 3,38 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,52 ppm (s, estructura básica del PEG), 7,12, 7,68, 7,75 y 8,47 ppm (4 m, protones de piridilo, 4H).

Ejemplo 2

Preparación de PEG₂₀₀₀-di-(CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo (PEG-di-(4C-OPSS), 2 kDa)10 PEG₂₀₀₀-bromuro de di-butilo

15 Una solución de PEG₂₀₀₀ (20,0 g, 0,020 equiv.) (NOF Corporation) en tolueno (150 ml) se secó azeotrópicamente, retirando por destilación 50 ml de tolueno. Se añadió hidruro sódico (6,0 g, dispersión al 60% en aceite mineral, 0,150 mol) y la mezcla se agitó durante 1 hora a 60°C en atmósfera de argón. Se añadió 1,4-dibromobutano (34,55 g, 1,600 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 75°C en atmósfera de argón. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida, y el residuo se combinó con 850 ml de éter etílico frío. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 17,0 g. RMN (d₆-DMSO): 1,60 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 1,84 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 3,51 ppm (s, estructura básica del PEG); sustitución 96,3%.

mPEG₂₀₀₀-di(butanodiol)

20 A una solución de PEG₂₀₀₀-di(bromuro de butilo) (10,0 g, 0,0100 equiv.) en alcohol etílico anhidro (100 ml), se le añadió tiourea (7,68 g, 99%, 0,100 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 78°C en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en NaOH acuoso al 3,3% (180 ml). Esta solución se calentó durante 2,5 horas a 85°C en atmósfera de argón. Después de enfriar la solución a 35°C, se añadieron 60 ml de agua desionizada y el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. La solución se lavó con 50 ml de acetato de etilo y el producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El producto bruto se recrystalizó en alcohol isopropílico y se secó al vacío. Rendimiento 7,8 g. RMN (CDCl₃): 1,35 ppm (t, -CH₂-SH, 1H), 1,69 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SH, 4H), 2,55 ppm (m, -CH₂-SH, 2H), 2,69 ppm (t, -CH₂-S-S-CH₂-, 4H, 1,9% en moles), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG).

25 Los datos de RMN, anteriores, indicaban que el producto contenía una cantidad relativamente pequeña (1,9% en moles por RMN) del dímero unido a disulfuro, formado por oxidación de grupo tiol. No se requirió purificación adicional del tiol.

30 En contraste, la preparación análoga del PEG₂₀₀₀-di-etanotiol (es decir, el reactivo correspondiente que contenía sólo un espaciador de dos carbonos entre el PEG y el grupo tiol) del PEG₂₀₀₀-di-mesilato y tiourea, realizada de una manera similar, produjo un producto que contenía aproximadamente un 41% en moles de dímero unido a disulfuro que contenía grupos ditiol.

PEG₂₀₀₀-di-(4C-OPSS)

35 A una solución de disulfuro de 2,2'-dipiridilo (0,89 g, 0,0040 mol) en alcohol metílico anhidro (40 ml), se le añadió PEG₂₀₀₀-dibutanodiol (2,0 g, 0,0020 equiv.), y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, el residuo se disolvió en diclorometano (5 ml) y el producto se precipitó con 50 ml de éter etílico frío. La precipitación se repitió dando 1,0 g del producto sólido blanco. RMN (CDCl₃): 1,68 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 1,76 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 2,82 ppm (t, -CH₂-S-, 2H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG), 7,12, 7,68, 7,75 y 8,47 ppm (4 m, piridilo Hs, 4H).

Ejemplo 3

Preparación de mPEG_{10.000}-(CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo (mPEG-4C-OPSS, 10 kDa)45 mPEG_{10.000}-bromuro de butilo

Una solución de mPEG_{10.000} (20,0 g, 0,020 mol) (NOF Corporation) en tolueno (200 ml) se secó azeotrópicamente, retirando por destilación 50 ml de tolueno. Se añadió hidruro sódico (0,8 g, dispersión al 60% en aceite mineral, 0,0200 mol), y la mezcla se agitó durante 1 h a 60°C en atmósfera de argón. Se añadió 1,4-

dibromobutano (4,8 g, 0,0222 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 75°C en atmósfera de argón. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida, y el residuo se combinó con 850 ml de éter etílico frío. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 18,5 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,60 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 1,84 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 3,24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,51 ppm (s, estructura básica del PEG); sustitución 97,5%.

mPEG_{10.000}-butanotiol

A una solución de mPEG_{10.000}-bromuro de butilo (10,0 g, 0,0010 mol) en alcohol etílico anhidro (100 ml), se le añadió tiourea (0,77 g, 99%, 0,0100 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 78°C en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, y el residuo se disolvió en NaOH acuoso al 1,0% (90 ml). Esta solución se calentó durante 3 h a 85°C, en atmósfera de argón. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente se añadió NaCl (10 g), y el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. El producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en una pequeña cantidad de diclorometano, se precipitó con éter etílico y se secó al vacío. Rendimiento 9,0 g. RMN (CDCl₃): 1,35 ppm (t, -CH₂-SH, 1H), 1,69 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SH, 4H), 2,55 ppm (m, -CH₂-SH, 2H), 2,69 ppm (t, -CH₂-S-S-CH₂-, 4H, 4,8% en moles), 3,38 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG). Los datos de RMN, anteriores, indicaban que el producto contenía una cantidad relativamente pequeña (4,8% en moles por RMN) de dímero unido a disulfuro, formado por oxidación de grupos tiol. No se requirió la purificación adicional del tiol.

mPEG_{10.000}-4C-OPSS

A una solución de disulfuro de 2,2'-dipiridilo (0,10 g, 0,00045 mol) en alcohol metílico anhidro (40 ml), se le añadió mPEG_{10.000}-butanotiol (2,0 g, 0,00020 equiv.), y la mezcla se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en diclorometano (5 ml) y se precipitó con 50 ml de éter etílico frío, dando después del secado 1,8 g de polvo sólido blanco. RMN (CDCl₃): 1,68 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 1,76 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 2,82 ppm (t, -CH₂-S-, 2H), 3,38 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG), 7,12, 7,68, 7,75 y 8,47 ppm (4 m, protones de piridilo, 4H).

Los Ejemplos 4 y 5 ilustran la preparación de los reactivos correspondientes de mayor peso molecular.

Ejemplo 4

Preparación de mPEG_{20.000}-(CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo (mPEG-4C-OPSS, 20 kDa)

mPEG_{20.000}-bromuro de butilo

Una solución de mPEG_{20.000} (20,0 g, 0,010 mol) (NOF Corporation) en tolueno (200 ml) se secó azeotrópicamente, retirando por destilación 50 ml de tolueno. Se añadió hidruro sódico (0,4 g, dispersión al 60% en aceite mineral, 0,0100 mol), y la mezcla se agitó durante 1 h a 60°C en atmósfera de argón. Se añadió 1,4-dibromobutano (2,4 g, 0,0111 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 75°C en atmósfera de argón. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida, y el residuo se combinó con 850 ml de éter etílico frío. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 18,2 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,60 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 1,84 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 3,24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,51 ppm (s, estructura básica del PEG); sustitución 98,0%.

mPEG_{20.000}-butanotiol

A una solución de mPEG_{20.000}-bromuro de butilo (10,0 g, 0,5 mmol) en alcohol etílico anhidro (100 ml), se le añadió tiourea (0,30 g, 99%, 0,0051 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 78°C en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, y el residuo se disolvió en NaOH acuoso al 1,0% (90 ml). Esta solución se calentó durante 3 h a 85°C, en atmósfera de argón. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente se añadió NaCl (10 g), y el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. El producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en una pequeña cantidad de diclorometano, se precipitó con éter etílico y se secó al vacío. Rendimiento 8,2 g. RMN (CDCl₃): 1,35 ppm (t, -CH₂-SH, 1H), 1,69 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SH, 4H), 2,55 ppm (m, -CH₂-SH, 2H), 2,69 ppm (t, -CH₂-S-S-CH₂-, 4H, 3,4% en moles), 3,38 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG). Los datos de RMN, anteriores, indicaban que el producto contenía una cantidad relativamente pequeña (3,4% en moles por RMN) de dímero unido a disulfuro, formado por oxidación de grupos tiol. No se requirió la purificación adicional del tiol.

mPEG_{20.000}-4C-OPSS

A una solución de disulfuro de 2,2'-dipiridilo (0,05 g, 0,00023 mol) en alcohol metílico anhidro (40 ml), se le añadió mPEG_{20.000}-butanotiol (2,0 g, 0,00010 equiv.), y la mezcla se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, el residuo se disolvió en diclorometano (5 ml) y el producto se precipitó con 50 ml de éter etílico, dando 1,9 g de polvo sólido blanco. RMN (CDCl₃): 1,68 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 1,76 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 2,82 ppm (t, -CH₂-S-, 2H), 3,38 ppm (s, -

OCH₃, 3H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG), 7,12, 7,68, 7,75 y 8,47 ppm (4 m, protones de piridilo, 4H).

Ejemplo 5

Preparación de mPEG_{30.000}-(CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo (mPEG-4C-OPSS, 30 kDa)

mPEG_{30.000}-bromuro de butilo

5 Una solución de mPEG_{30.000} (20,0 g, 0,00067 mol) (NOF Corporation) en tolueno (150 ml) se secó azeotrópicamente, retirando por destilación 50 ml de tolueno. Se añadió hidruro sódico (0,3 g, dispersión al 60% en aceite mineral, 0,00750 mol), y la mezcla se agitó durante 1 h a 60°C en atmósfera de argón. Se añadió 1,4-dibromobutano (2,17 g, 0,0100 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 75°C en atmósfera de argón. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida, y el residuo se combinó con 850 ml de éter etílico frío. El producto precipitado se retiró por filtración y se secó a presión reducida. Rendimiento 15,3 g. RMN (d₆-DMSO): 1,60 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 1,84 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br, 2H), 3,24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,51 ppm (s, estructura básica del PEG); sustitución 96,0%.

mPEG_{30.000}-butanotiol

15 A una solución de mPEG_{30.000}-bromuro de butilo (10,0 g, 0,00033 mol) en alcohol etílico anhidro (100 ml), se le añadió tiourea (0,26 g, 99%, 0,0038 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 78°C en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, y el residuo se disolvió en NaOH acuoso al 1,0% (90 ml). Esta solución se calentó durante 3 h a 85°C, en atmósfera de argón. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente se añadió NaCl (10 g), y el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. El producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en una pequeña cantidad de diclorometano, se precipitó con éter etílico y se secó al vacío. Rendimiento 9,4 g. RMN (CDCl₃): 1,35 ppm (t, -CH₂-SH, 1H), 1,69 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SH, 4H), 2,55 ppm (m, -CH₂-SH, 2H), 2,69 ppm (t, -CH₂-S-S-CH₂-, 4H, 3,8% en moles, 3,38 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG). Los datos de RMN, anteriores, indicaban que el producto contenía una cantidad relativamente pequeña (3,8% en moles por RMN) de dímero unido a disulfuro, formado por oxidación de grupos tiol. No se requirió la purificación adicional del tiol.

25 mPEG_{30.000}-4C-OPSS

30 A una solución de disulfuro de 2,2'-dipiridilo (0,05 g, 0,00023 mol) en alcohol metílico anhidro (40 ml), se le añadió mPEG_{30.000}-butanotiol (3,0 g, 0,00010 equiv.), y la mezcla se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, el residuo se disolvió en diclorometano (8 ml) y el producto se precipitó con 60 ml de éter etílico, dando 2,9 g de polvo sólido blanco. RMN (CDCl₃): 1,68 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 1,76 ppm (m, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-, 2H), 2,82 ppm (t, -CH₂-S-, 2H), 3,38 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG), 7,12, 7,68, 7,75 y 8,47 ppm (4 m, protones de piridilo, 4H).

Ejemplo 6

Conjugación de BSA con mPEG₅₀₀₀-4C-OPSS y con mPEG₅₀₀₀-MAL (MAL = maleimida) (Comparativo)

Reducción de BSA (Escisión de las uniones disulfuro)

35 A 3,1 mg de muestra de BSA se le añadieron 5 ml de ReactiVial™, que contenía 3,1 ml de 1 x PBS, pH 7,5. La solución se puso en una placa de agitación a velocidad media. Se añadió una muestra de 4,62 mg de tiotreitil (DTT) a la solución con agitación, y se permitió que reaccionara durante 2 horas a temperatura ambiente reduciendo la muestra completamente.

40 La mezcla de reacción se puso en un Amicon StirCell de 350 ml con una membrana de PES de PM 10.000, para la retirada del DTT. Se añadió tampón (1 x PBS pH 7,5) a un volumen de 350 ml, con agitación para evitar la sedimentación. Se aplicó presión al aparato (0,41 MPa (60 psi)) hasta que el volumen se redujo a < 10 ml. Se añadió PBS de nuevo a un volumen de 350 ml y el proceso se repitió dos veces. Se congeló una alícuota de 1 ml para los patrones (geles, HPLC, etc.) y el volumen restante se usó en la etapa de conjugación.

Conjugación

45 El BSA reducida de la etapa A (4 ml) se combinó con 2,35 mg (exceso 10 x) de mPEG_{5K}-4C-OPSS, descrito en el Ejemplo 1, y en un ReactiVial de 5 ml, sobre una placa de agitación, ajustada en el ajuste medio. Se preparó una mezcla de reacción similar usando BSA reducida de la etapa A (4 ml) y 2,35 mg (exceso 10x) de mPEG_{5K}-MAL. (En mPEG-MAL, disponible en Nektar Therapeutics, Huntsville, AL, la maleimida se une a través del nitrógeno del anillo al -OCH₂CH₂- terminal de mPEG.). Los viales se dejaron a temperatura ambiente durante 60 horas.

50 Análisis

Las mezclas de reacción se ensayaron con geles Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen) usando las siguientes condiciones.

Tampón de Muestra 4x LDS (Invitrogen) 10 µl / muestra

Muestra de Reacción 30 µl / muestra

Tampón de Ensayo 1x MES (Invitrogen) 600 ml

Patrones de Proteína MultiMarca (Invitrogen) 7 µl

5

Tinte SimplyBlue Safe (Invitrogen) 50 µl

Muestra de Carga (a + b) 30 µl

Tensión 200 V

Amperios 400 mA

Tiempo 36 minutos.

10

La Figura 1 muestra el gel acabado, teñido con el Tinte SimplyBlue Safe. La Figura 2 muestra el mismo gel teñido adicionalmente con yoduro de bario para detectar PEG.

El peso molecular y la intensidad relativa de las especies mostradas en el gel de la Figura 2 se exponen también en la tabla a continuación:

Carril 2: BSA reducida		Carril 3: Reacción de conjugación PEG _{5K} -MAL		Carril 4: Reacción de conjugación PEG _{5K} -OPSS	
PM	Int. Rel.	PM	Int. Rel.	PM	Int. Rel.
100718,7	0,0727	126456,9	0,0591	134703,1	0,0433
50521,2	0,9273	85120	0,0852	85120	0,0664
		75000	0,1449	75460	0,0826
		58440	0,3984	58440	0,4224
		50077,5	0,1822	50077,5	0,2032
		7883,1 ^a	0,1301	22090,9 ^a	0,0806
				6454,5 ^a	0,1015

^a visualizado por Bal (para detección de PEG)

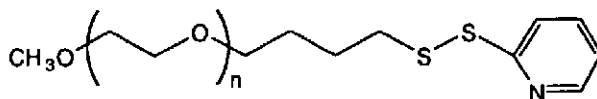
15

La reacción de conjugación de PEG_{5K}-MAL-BSA produjo mono PEGmeros al 39,8% (bandas de 58440 PM) y la reacción de conjugación mPEG_{5K}-4C-OPSS-BSA produjo mono PEGmeros al 42,2%. Por consiguiente, el comportamiento de conjugación del reactivo de tiol polimérico de la invención era mejor que el observado para un reactivo polimérico de referencia (polímero terminado en maleimida), indicando que no ocurría una dimerización significativa de PEG-OPSS, que es típica para el reactivo correspondiente basado en mPEG-etanotiol.

Ejemplo 7

20

PEGilación del factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) con mPEG_{10.000}-(CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo (mPEG₁₀₀₀₀-4C-OPSS)



mPEG_{10.000}-(CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo (mPEG_{10.000}-4C-OPSS)

25

Un exceso de cincuenta veces (relativo a la cantidad de G-CSF en una alícuota medida de solución madre de G-CSF) de mPEG_{10.000}-(CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo (mPEG_{10.000}-4C-OPSS), como se preparó en el Ejemplo 3, se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para formar una reacción de reactivo al 10%. La solución de reactivo al 10% se añadió rápidamente a la alícuota de solución madre de G-CSF (0,4 mg/ml de tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcló bien. Para permitir el acoplamiento del reactivo mPEG-OPSS al resto cisteína libre (es decir, participación en el

5

enlace no intraproteína-disulfuro) en la posición 17 de G-CSF, la solución de reacción se puso en un RotoMix (Tipo 48200, Thermolyne, Dubuque IA) para facilitar la conjugación a 37°C. Después de treinta minutos, se añadió otro exceso de cincuenta veces de mPEG_{10.000}-4C-OPSS a la solución de reacción, seguido de mezcla en primer lugar durante treinta minutos a 37°C y después durante dos horas a temperatura ambiente, para formar de esta manera una solución de conjugado de mPEG_{10.000}-G-CSF.

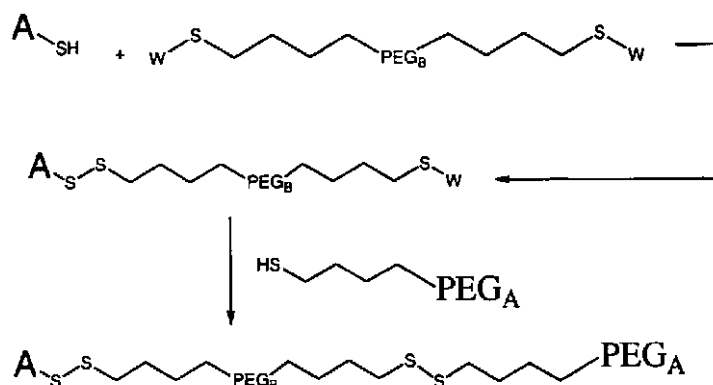
10

La solución de conjugado de mPEG_{10.000}-G-CSF se caracterizó por SDS-PAGE y RP-HPLC. Se determinó que la reacción de PEGilación tenía un rendimiento del 36% de conjugado mPEG_{10.000}-G-CSF (un conjugado monoPEGilado en un resto cisteína de G-CSF). La cromatografía de intercambio de cationes se usó para purificar el conjugado.

Puede usarse el mismo enfoque para preparar otros conjugados, usando reactivos de mPEG-4C-OPSS que tienen otros pesos moleculares.

15

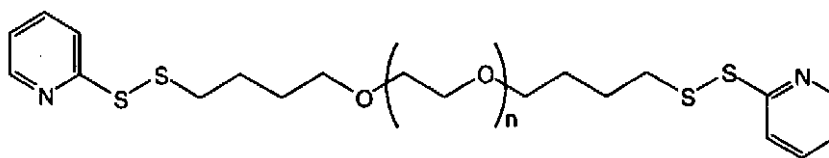
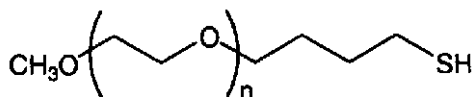
Los ejemplos 8-10, siguientes, emplean un enfoque (ilustrado esquemáticamente a continuación) en el que un reactivo polimérico que tiene un peso molecular relativamente bajo (PEG_B en el esquema) se une inicialmente a un resto a conjugar (A), seguido de la unión de un reactivo polimérico de mayor peso molecular (PEG_A en el esquema) a la parte polimérica del conjugado formado de la unión del reactivo de bajo peso molecular y el resto conjugado. Usando este enfoque, es posible modificar eficazmente un sitio con impedimentos estéricos. En los siguientes ejemplos, el sitio con impedimentos estéricos está enterrado, parcialmente libre de un resto cisteína que contiene tiol de G-CSF.



Ejemplo 8a

PEGilación de G-CSF con PEG₂₀₀₀-di-((CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo y mPEG_{20.000}-butanotiol

20

PEG₂₀₀₀-di-((CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo) (PEG_{2.000}-di-(4C-OPSS))mPEG_{20.000}-butanol (mPEG_{20K}-4C-SH)

25

En este Ejemplo el reactivo bifuncional PEG-di-(4C-OPSS) se inserta en el tiol libre de impedimentos estéricos por unión disulfuro, seguido de acoplamiento de mPEG_{20K}-butanol al resto libre del reactivo PEG₂₀₀₀-di-(4C-OPSS), a través de una unión disulfuro adicional.

30

El PEG₂₀₀₀-di-(4C-OPSS), como se prepara en el Ejemplo 2, almacenado a -20°C en atmósfera de argón, se calentó a temperatura ambiente. Un exceso de cincuenta veces (relativo a la cantidad de G-CSF en una alícuota medida de solución madre de G-CSF) del reactivo se disolvió en DMSO para formar una solución al 10%. La solución de reactivo al 10% se añadió rápidamente a la alícuota de solución madre de G-CSF (0,4 mg/ml en tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcló bien. La solución de reacción se puso en un RotoMix (Tipo 48200, Thermolyne, Dubuque IA), y se

permitió que se mezclara durante una hora a 37°C, y después durante dos horas a temperatura ambiente. Después de que la reacción se completara, la solución de reacción se dializó frente a tampón fosfato sódico, pH 7,0, para retirar el exceso de PEG₂₀₀₀-di-(4C-OPSS libre).

5 Un exceso de cincuenta veces (relativo a G-CSF) de mPEG_{20,000}-butanodiol como se preparó en el Ejemplo 4B, se añadió después a la solución dializada del conjugado intermedio, seguido de mezcla durante una hora a temperatura ambiente y después durante una noche a 4°C para formar de esta manera el conjugado mPEG_{20,000}-PEG_{2,000}-GCSF. El producto se caracterizó por SDS-PAGE y RP-HPLC.

10 Este enfoque puede usarse para preparar otros conjugados, usando PEG-di-(4C-OPSS) y mPEG-4C-SH que tengan otros pesos moleculares, de nuevo donde el reactivo PEG-di-(4C-OPSS) es preferiblemente de peso molecular relativamente bajo.

Ejemplo 8b

PEGilación de G-CSF con PEG₂₀₀₀-di-((CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo y mPEG_{30,000}-butanotiol

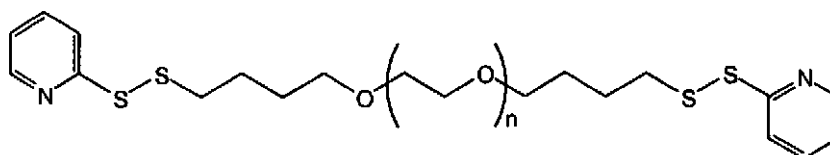
Se repitió el procedimiento del Ejemplo 8a usando cantidades correspondientes de PEG₂₀₀₀-di-((CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo y mPEG_{30,000}-butanotiol para obtener el conjugado mPEG_{30,000}-PEG₂₀₀₀-GCSF correspondiente.

15 Otros conjugados pueden prepararse análogamente usando PEG-di-(4C-OPSS) y mPEG-4C-SH que tengan otros pesos moleculares.

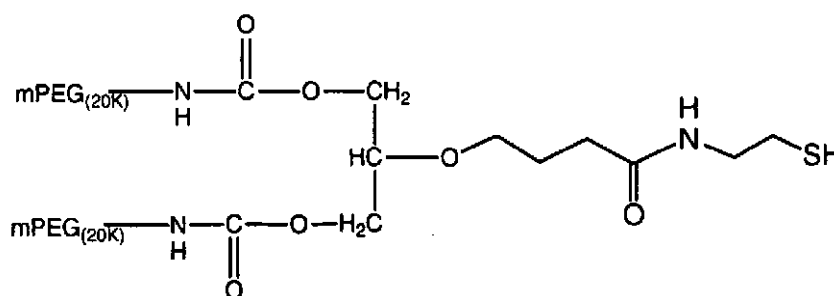
20 Los Ejemplos 9-10, a continuación, difieren entre sí en que las especies de PEG de bajo peso molecular del Ejemplo 9 contienen un enlazador hidrófilo de cuatro carbonos de la invención, mientras que el Ejemplo 10 contiene únicamente un enlazador de dos carbonos. Puede verse que el enlazador de la invención proporciona rendimientos significativamente mayores de conjugado.

Ejemplo 9

PEGilación de G-CSF con PEG₂₀₀₀-di-((CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo) y PEG_{240,000}-tiol ramificado



PEG₂₀₀₀-di-((CH₂)₄-disulfuro de ortopiridilo)



PEG_{240,000}-tiol

25

30

De nuevo, estos ejemplos emplean un enfoque que implica la unión inicial de un reactivo polimérico que tiene un peso molecular relativamente pequeño (en este Ejemplo, PEG_{2,000}-di-(4C-OPSS)) a un resto G-CSF, seguido de unión de un reactivo polimérico de peso molecular relativamente grande (en este Ejemplo, PEG_{240,000}-tiol ramificado) al resto del reactivo PEG_{2,000}-di-(4C-OPSS) a través de otra unión disulfuro.

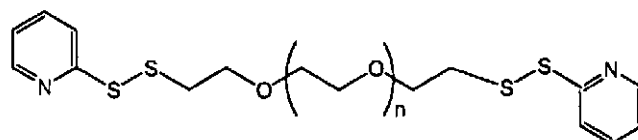
35

El PEG_{2,000}-di-(4C-OPSS) como se preparó en el Ejemplo 2, almacenado a -20°C en atmósfera de argón, se calentó a temperatura ambiente. Un exceso de cincuenta veces (relativo a la cantidad de G-CSF en una alícuota medida de solución madre de G-CSF) del PEG_{2,000}-di-4C-OPSS calentado se disolvió en DMSO para formar una solución de reactivo al 10%. La solución de reactivo al 10% se añadió rápidamente a la alícuota de solución madre de G-CSF (0,4 mg/ml en tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcló bien. La solución se puso en un RotoMix (Tipo 48200, Thermolyne, Dubuque IA) y se permitió que se mezclara durante una hora a 37°C, después durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se dializó frente a tampón fosfato sódico, pH 7,0, para retirar el exceso de PEG_{2,000}-di-(4C-OPSS).

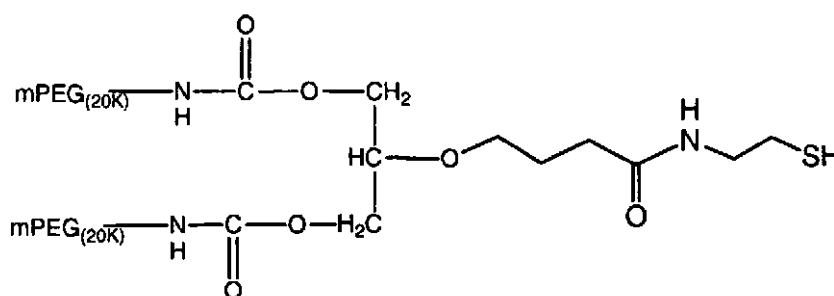
Después se añadió un exceso de setenta y cinco veces (relativo a G-CSF) de PEG_{240.000}-tiol (Nektar Therapeutics) a la solución de conjugado dializada, seguido de mezcla durante tres horas a temperatura ambiente y después durante una noche a 4°C para formar un conjugado de PEG_{240.000}-PEG_{2.000}-G-CSF. El conjugado se caracterizó por SDS-PAGE y RP-HPLC. El rendimiento final del conjugado obtenido fue del 35%.

5 Ejemplo 10 (comparativo)

Reacción de PEGilación de G-CSF con PEG₂₀₀₀-di-((CH₂)₂-disulfuro de ortopiridilo) y PEG_{240.000}-tiol



PEG₂₀₀₀-di-((CH₂)₂-disulfuro de ortopiridilo)



PEG_{240.000}-tiol

10

El procedimiento de reacción del Ejemplo 10 se duplicó básicamente, usando un reactivo de PEG tiol de bajo peso molecular que tenía un enlazador de dos carbonos en lugar de uno de cuatro carbonos.

15

Por consiguiente, el PEG_{2.000}-di-(2C-OPSS) de Nektar Therapeutics, almacenado a -20°C en atmósfera de argón, se calentó a temperatura ambiente. Un exceso de cincuenta veces (relativo a la cantidad de G-CSF en un alícuota medida de solución madre de G-CSF) del reactivo se disolvió en DMSO para formar una solución al 10%. Esta solución se añadió rápidamente a la alícuota de solución madre de G-CSF (0,4 mg/ml en tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcló bien. La solución de reacción se puso en un RotoMix (Tipo 48200, Thermolyne, Dubuque IA) y se permitió que se mezclara durante una hora a 37°C, después durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se dializó frente a tampón fosfato sódico, pH 7,0, para retirar el exceso de PEG_{2.000}-di-(2C-OPSS).

20

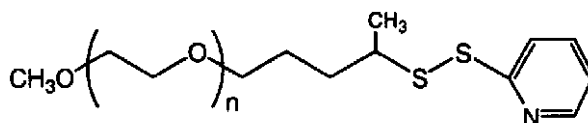
Un exceso de setenta veces (relativo a G-CSF) de PEG_{240.000}-tiol ramificado (Nektar Therapeutics) se añadió a la solución de conjugado dializado, seguido de mezcla durante tres horas a temperatura ambiente y durante una noche a 4°C. Sin embargo, los análisis por SDS-PAGE y RP-HPLC mostraron que no había cantidad detectable del conjugado PEG_{240.000}-PEG_{2.000}-G-CSF deseado.

25

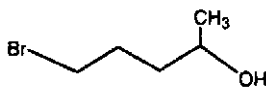
La evidencia sugiere que el reactivo de PEG-OPSS unido a etileno (C2) experimenta una escisión reductora para destruir eficazmente el reactivo antes de que reaccione con la proteína diana. El reactivo unido a butileno (C4) es más estable a dicha escisión y, de esta manera, sobrevive para dar un rendimiento mucho mayor del conjugado.

Ejemplo 11

Preparación de mPEG_{5.000}-CH₂-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-disulfuro de ortopiridilo (mPEG-(α -metil)4C-OPSS, 5 kDa)



1-Metil-4-bromo-1-butanol



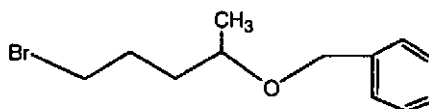
5

Se disolvió 2-metiltetrahidrofurano (10,14 g, 0,0834 mol) en cloroformo (72 ml) y se añadió bromuro de tetraetilamonio (18,4 g, 0,0876 mol). Después se añadió trifluoruro de boro-eterato de dietilo (11,12 ml, 0,0876 mol), gota a gota, durante 15 minutos y la solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La solución se enfrió a 0-5°C y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (80 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con agua (80 ml) y NaCl acuoso saturado (80 ml), y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se retiró por destilación, dando 9,5 g de un líquido viscoso de color amarillo pálido.

10

RMN (d₆-DMSO): 1,04 ppm (d, -CH₃-, 3H), 1,43 ppm (a, -CH₂-CH(CH₃)-OH, 2H), 1,84 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-OH, 2H), 3,53 ppm (t, -CH₂Br, 2H), 3,60 ppm (m, -CH₂-CH(CH₃)-OH, 1H), 4,41 ppm (sa, -OH, 1H).

1-Bromo-4-metil-4-benciloxibutano

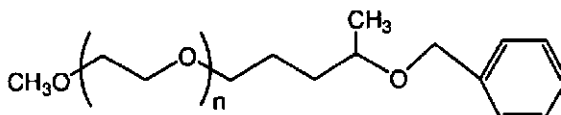


15

A una solución de 1-metil-4-bromo-1-butanol (9,0 g, 0,05384 mol) y 2,2,2-tricloroacetimidato de bencilo (16,3 g), en una mezcla de ciclohexano anhidro (100 ml) y diclorometano anhidro (50 ml), enfriada a 0°C, se le añadió ácido trifluorometanosulfónico (1,0 ml) y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente en atmósfera de argón. La mezcla se filtró, se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (250 ml) y agua desionizada (250 ml) y se secó con Na₂SO₄. Los disolventes se retiraron por destilación a presión reducida. El producto bruto (9,2 g) se sometió a destilación al vacío, dando 7,2 g de un líquido viscoso incoloro.

20

RMN (d₆-DMSO): 1,14 ppm (d, -CH₃-, 3H), 1,57 ppm (m, -CH₂-CH(CH₃)-OH, 2H), 1,88 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-OH, 2H), 3,53 ppm (ma, -CH₂Br, 2H y -CH₂-CH(CH₃)-OH, 1H), 4,46 ppm (m, -CH₂-bencilo, 2H), 7,32 ppm (m, C₆H₅-, bencilo, 5H).

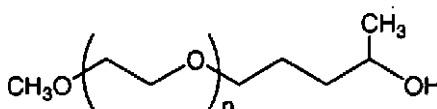
mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-benciloxibutano

25

A una solución secada azeotrópicamente de mPEG₅₀₀₀ (20,0 g, 0,004 mol) (NOF Corporation) en tolueno anhidro (200 ml), se le añadieron una solución 1,0 M de terc-butóxido potásico en terc-butanol (16,0 ml, 0,0160 mol) y 1-bromo-4-metil-4-benciloxibutano (3,10 g, 0,012 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 20 horas a 70°C en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se filtró y se concentró al vacío hasta sequedad. El producto bruto se disolvió en 30 ml de diclorometano y se precipitó con 500 ml de isopropanol a 0-5°C. El producto final se recogió por filtración al vacío y se secó al vacío durante una noche. Rendimiento: 17,4 g.

30

RMN (d₆-DMSO): 1,14 ppm (d, -CH₃-, 3H), 1,57 ppm (m, -CH₂-CH(CH₃)-OH, 2H), 1,88 ppm (m, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-OH, 2H), 3,24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3,51 ppm (s, estructura básica del polímero), 4,46 ppm (m, -CH₂-bencilo, 2H), 7,32 ppm (m, C₆H₅-, bencilo, 5H).

mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-butanol

35

Una mezcla de mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-benciloxibutano (15,0 g, 0,00300 mol), alcohol etílico (150 ml) y paladio (al 10% sobre carbono activo, 1,5 g) se hidrogenó durante una noche a 0,31 MPa (45 psi) de hidrógeno. La mezcla se filtró y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en diclorometano (25 ml) y se precipitó con 400 ml de alcohol isopropílico a 0-5°C. El producto se retiró por filtración y se secó a presión reducida.

Rendimiento: 13,1 g.

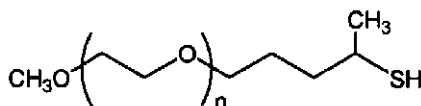
RMN (d_6 -DMSO): 1,14 ppm (d, $-CH_3$, 3H), 1,57 ppm (m, $-CH_2-CH(CH_3)-OH$, 2H), 1,88 ppm (m, $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-OH$, 2H), 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,51 ppm (s, estructura básica del polímero), 4,45 ppm (sa, $-OH$, 1H).

mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-metanosulfonilbutano

- 5 Una solución de mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-butanol (10,0 g, 0,0020 mol) en tolueno (100 ml) se secó azeotrópicamente, retirando por destilación el tolueno a presión reducida. El mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-butanol secado se disolvió en una mezcla de tolueno anhidro (100 ml) y diclorometano anhidro (20 ml). Se añadieron trietilamina (0,9 ml, 0,0030 mol) y cloruro de metanosulfonilo (0,45 ml, 0,0026 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Los disolventes se retiraron por destilación a presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (15 ml) y se añadieron 250 ml de alcohol isopropílico. El producto precipitado se filtró y se secó al vacío, produciendo 8,9 g de polvo sólido blanco.

RMN (d_6 -DMSO): 1,40 ppm (d, $-CH_3$, 3H), 1,57 ppm (m, $-CH_2-CH(CH_3)$ -mesilato, 2H), 1,88 ppm (m, $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)$ -mesilato, 2H), 3,17 ppm (s, $-CH_3$, mesilato, 3H), 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,51 ppm (s, estructura básica del polímero), 4,00 ppm (m, $-CH$ -mesilato, 1H).

- 15 mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-butanotiol

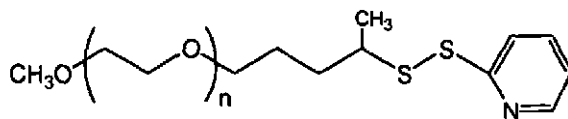


- 20 A una solución de mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-metanosulfonilbutano (8,0 g, 0,0016 mol) en alcohol etílico anhidro (80 ml), se le añadió tiourea (1,24 g, 0,0163 mol), y la mezcla se agitó durante una noche a 78°C en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, y el residuo se disolvió en NaOH acuoso al 1% (84 ml). Esta solución se calentó durante 2,5 horas a 85°C en atmósfera de argón. Después de enfriar la solución a 35°C, el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. Se añadió NaCl (24 g) y el producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato sódico anhidro, y el producto se precipitó con éter etílico frío. Rendimiento 7,3 g.

- 25 RMN ($CDCl_3$): 1,24 ppm (d, $-CH_3$, 3H), 1,38 ppm (m, $-CH_2-CH(CH_3)-SH$, 2H), 1,54 ppm (d, $-CH-SH$, 1H), 1,88 ppm (m, $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-SH$, 2H), 2,83 ppm (m, $-CH_2-CH(CH_3)-SH$, 1H), 2,05 ppm (m, $-CH_2-CH(CH_3)-S-S-CH(CH_3)-CH_2-$, 4H, 0,7% en moles), 3,38 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG).

Los datos de RMN, anteriores, indicaban que el producto contenía una cantidad muy pequeña (0,7% en moles por RMN) de dímero unido a disulfuro, formado por oxidación de grupos tiol. No se requirió una purificación adicional del tiol.

mPEG₅₀₀₀-CH₂-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-OPSS

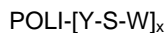


- 30 A una solución de mPEG₅₀₀₀-4-metil-4-butanotiol (2,0 g, 0,0004 mol) en alcohol metílico anhidro (40 ml), se le añadió disulfuro de 2,2'-dipiridilo (0,18 g, 0,00082 mol), y la mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en atmósfera de argón. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, el residuo se disolvió en diclorometano (5 ml) y el producto se precipitó con 50 ml de éter etílico frío. Rendimiento 1,7 g.

- 35 RMN ($CDCl_3$): 1,34 ppm (d, $-CH_3$, 3H), 1,68 ppm (m, $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-SH$, 2H), 1,88 ppm (m, $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-SH$, 2H), 3,38 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,64 ppm (s, estructura básica del PEG), 7,12, 7,68, 7,75 y 8,47 ppm (4 m, protones de piridilo, 4H).

REIVINDICACIONES

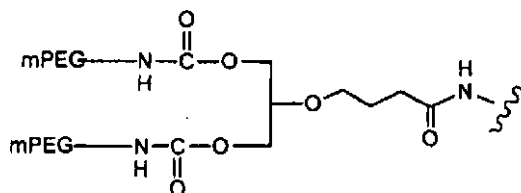
1. Un reactivo polimérico, soluble en agua, que comprende la estructura:



en la que:

- 5 POLI es un polímero soluble en agua, seleccionado entre un poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmacrilamida), poli(hidroxiálquilmacrilato), poli(sacárido), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina y poli(N-acriloilmorfolina);
- 10 Y es un grupo de unión divalente, que contiene al menos cuatro átomos de carbono, y que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a ocho átomos de carbono de longitud, y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno o alcoxi; cicloalquilo C₃-C₆; halo; ciano y fenilo; donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;
- S es un átomo de azufre, unido a un átomo hibridado en sp³ de Y;
- S-W es un tiol, tiol protegido o derivado de tiol reactivo con tiol;
- 15 $x = 1 - 25$; y
- POLI tiene un peso molecular de al menos 500 cuando POLI es un polietilenglicol lineal, $x = 1$ e Y es una cadena de alquilo lineal.
- 20 2. El reactivo de la reivindicación 1, en el que Y tiene la fórmula $-(\text{CR}^1\text{R}^2)_n-$, donde n es de 3 a 8, y cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno o alcoxi; cicloalquilo C₃-C₆; halo; ciano y fenilo; donde dos grupos R¹ y R² en átomos de carbono diferentes pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo o arilo.
3. El reactivo de la reivindicación 1, en el que x es 1 ó 2.
4. El reactivo de la reivindicación 1, en el que POLI es un polietilenglicol.
5. El reactivo de la reivindicación 1, en el que S-W es un derivado de tiol reactivo con tiol.
- 25 6. El reactivo de la reivindicación 5, en el que S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
7. El reactivo de la reivindicación 4, en el que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular de 148 a aproximadamente 100.000 Dalton, y una morfología seleccionada entre lineal, ramificada, bifurcada y multibrazo.
8. El reactivo de la reivindicación 1, en el que Y se selecciona entre el grupo que consiste en alqueno C₄-C₈, cicloalqueno C₅-C₈ y combinaciones de los mismos.
- 30 9. El reactivo de la reivindicación 2, en el que n es de 3 a 6, y cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente entre hidrógeno y metilo.
10. El reactivo de la reivindicación 2, en el que cada uno de R¹ y R² es hidrógeno, con la excepción de R¹ en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R¹ alquilo C₁-C₆.
11. El reactivo de la reivindicación 10, en el que dicho alquilo C₁-C₆ es metilo o etilo.
- 35 12. El reactivo de la reivindicación 11, en el que dicho alquilo C₁-C₆ es metilo.
13. El reactivo de la reivindicación 2, en el que dos grupos R¹ y R² en átomos de carbono diferentes están unidos para formar un grupo cicloalquilo o arilo.
14. El reactivo de la reivindicación 13, en el que Y comprende un grupo ciclopentilo o ciclohexilo.
- 40 15. El reactivo de la reivindicación 1, en el que POLI es un poli(etilenglicol) (PEG) que tiene un morfología seleccionada entre lineal, ramificada, bifurcada, multibrazo; y dicho PEG tiene un peso molecular de al menos 500 cuando PEG es lineal, $x = 1$ e Y es una cadena de alquilo lineal.
- 45 16. El reactivo de la reivindicación 15, en el que Y tiene la fórmula $-(\text{CR}^1\text{R}^2)_n-$, donde n es de 3 a 8, y cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno o alcoxi; cicloalquilo C₃-C₆; halo; ciano y fenilo; donde dos grupos R¹ y R² en átomos de carbono diferentes pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo o arilo.

17. El reactivo de la reivindicación 15, en el que x es 1 ó 2.
18. El reactivo de la reivindicación 15, en el que S-W es un derivado de tiol reactivo con tiol.
19. El reactivo de la reivindicación 18, en el que S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
- 5 20. El reactivo de la reivindicación 15, en el que Y se selecciona entre el grupo que consiste en alquileo C₄-C₈, cicloalquileo C₅-C₈, y combinaciones de los mismos.
21. El reactivo de la reivindicación 16, en el que n es de 3 a 6, y cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente entre hidrógeno y metilo.
22. El reactivo de la reivindicación 16, en el que cada uno de R¹ y R² es hidrógeno, con la excepción de R¹ en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R¹ alquilo C₁-C₆.
- 10 23. El reactivo de la reivindicación 22, en el que dicho alquilo C₁-C₆ es metilo o etilo.
24. El reactivo de la reivindicación 23, en el que dicho alquilo C₁-C₆ es metilo.
25. El reactivo de la reivindicación 24, en el que x es 1 ó 2, n es 4 y S-W es SH o disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
26. El reactivo de la reivindicación 25, en el que x es 1, y PEG es polietilenglicol terminado en metoxi (mPEG).
27. El reactivo de la reivindicación 25, en el que x es 2.
- 15 28. El reactivo de la reivindicación 26, en el que S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
29. El reactivo de la reivindicación 27, en el que S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
30. El reactivo de la reivindicación 21, en el que n es de 4 a 6, y cada uno de R¹ y R² es hidrógeno.
31. El reactivo de la reivindicación 30, en el que x es 1 ó 2, n es 4 y S-W es SH o disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
32. El reactivo de la reivindicación 31, en el que x es 1, y PEG es polietilenglicol terminado en metoxi (mPEG).
- 20 33. El reactivo de la reivindicación 31, en el que x es 2.
34. El reactivo de la reivindicación 32, en el que S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
35. El reactivo de la reivindicación 33, en el que -S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
36. El reactivo de la reivindicación 15, en el que x es 1 ó 2, Y es -(CH₂CH₂CH(CH₃))- , y S-W es SH o disulfuro de ortopiridilo (OPSS).
- 25 37. El reactivo de la reivindicación 36, en el que x es 1, y PEG es polietilenglicol terminado en metoxi (mPEG).
38. El reactivo de la reivindicación 36, en el que x es 2.
39. El reactivo de la reivindicación 37, en el que -S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
40. El reactivo de la reivindicación 38, en el que -S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
- 30 41. El reactivo de la reivindicación 15, en el que x es 1, Y es -(CH₂)₄-, -S-W es SH o disulfuro de orto-piridilo (OPSS) y PEG está terminado con la estructura:



42. El reactivo de la reivindicación 41, en el que -S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
43. El reactivo de la reivindicación 41, en el que PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 500 Dalton o menor.
- 35 44. El reactivo de la reivindicación 43, en el que PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 200 Da o menor.

45. El reactivo de la reivindicación 41, en el que cada mPEG en la estructura terminal mostrada tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa.
46. El reactivo de la reivindicación 1, en el que x es 2-25.
- 5 47. El reactivo de la reivindicación 46, en el que cada Y es un alquileo lineal o ramificado que tiene la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 .
48. El reactivo de la reivindicación 47, en el que n es de 3 a 8.
49. El reactivo de la reivindicación 47, en el que cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno.
- 10 50. El reactivo de la reivindicación 47, en el que para al menos un Y, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con la excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R^1 alquilo C_1-C_6 .
51. El reactivo de la reivindicación 50, en el que x es 2.
52. El reactivo de la reivindicación 46, en el que POLI es un polietilenglicol (PEG).
53. El reactivo de la reivindicación 52, en el que x es 2.
- 15 54. El reactivo de la reivindicación 52 en el que cada Y es $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10 y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_6 y alqueno C_1-C_6 .
55. El reactivo de la reivindicación 54, en el que n es de 3 a 8.
56. El reactivo de la reivindicación 55, en el que cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y metilo.
57. El reactivo de la reivindicación 56, en el que cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno.
- 20 58. El reactivo de la reivindicación 54, en el que para al menos un Y, cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con la excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R^1 alquilo C_1-C_6 .
59. El reactivo de la reivindicación 58, en el que dicho alquilo C_1-C_6 es metilo o etilo.
60. El reactivo de la reivindicación 57, en el que n es 4 para cada Y.
61. El reactivo de la reivindicación 57, en el que cada -S-W es disulfuro de orto-piridilo (OPSS).
- 25 62. El reactivo de la reivindicación 61, en el que PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 1000 a 5000 Da.
63. Un polímero conjugado que comprende la estructura:
- $$\text{POLI-[Y-S-S-A]}_x$$
- en la que:
- 30 POLI es un polímero soluble en agua; seleccionado entre un poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacárido), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina y poli(N-acriloilmorfolina);
- 35 Y es un grupo de unión, que contiene al menos cuatro átomos de carbono, y que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a diez átomos de carbono de longitud, y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueno o alcoxi; cicloalquilo C_3-C_6 ; halo; ciano y fenilo; donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;
- S-S es un grupo disulfuro, unido a un carbono hibridado en sp^3 de Y; y
- A es un resto unido covalentemente de una molécula farmacológicamente activa; y
- x es 1 - 25.
- 40 64. El conjugado de la reivindicación 63, en el que dicho conjugado es soluble en agua.
65. El conjugado de la reivindicación 63, en el que Y es $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueno o alcoxi; cicloalquilo C_3-C_6 ; halo; ciano y fenilo.
66. El conjugado de la reivindicación 65, en el que n es de 3 a 8.

67. El conjugado de la reivindicación 64, en el que x es 1 ó 2.
68. El conjugado de la reivindicación 63, en el que POLI es un polietilenglicol.
69. El conjugado de la reivindicación 68, en el que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular de 148 a aproximadamente 100.000 Dalton, y una morfología seleccionada entre lineal, ramificada, bifurcada y multibrazo.
- 5 70. El conjugado de la reivindicación 64, en el que Y es un alquileo lineal o ramificado, que tiene la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 .
71. El conjugado de la reivindicación 70, en el que cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y metilo.
72. El conjugado de la reivindicación 71, en el que cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno.
- 10 73. El conjugado de la reivindicación 70, en el que cada uno de R^1 y R^2 es hidrógeno, con la excepción de R^1 en un carbono adyacente a dicho átomo de azufre, siendo dicho R^1 alquilo C_1-C_6 .
74. El conjugado de la reivindicación 64, en el que Y es $-(CR^1R^2)_n-$ y dos grupos R^1 y R^2 en átomos de carbono diferentes están unidos para formar un grupo cicloalquilo o arilo.
- 15 75. El conjugado de la reivindicación 63, en el que dicha molécula tiene un grupo tiol reactivo en su forma no conjugada y se selecciona entre el grupo que consiste en proteínas, péptidos y moléculas pequeñas.
76. El conjugado de la reivindicación 63, que comprende la estructura: A-S-S-Y-POLI-Y-S-S-A.
77. El conjugado de la reivindicación 76, en el que los grupos Y son idénticos.
78. El conjugado de la reivindicación 63, en combinación con un excipiente farmacéutico.
79. El conjugado de la reivindicación 78, en el que dicho excipiente es un vehículo acuoso.
- 20 80. Un conjugado polimérico, como se cita en la reivindicación 63, donde x es 1, comprendiendo dicho conjugado la estructura:
- POLI_A-L-S-S-Y-POLI_B-Y-S-S-A
- en la que:
- 25 cada POLI_A y POLI_B es un segmento de polímero soluble en agua, donde POLI_B tiene un peso molecular de 10 kDa o menos, y la suma de los pesos moleculares de POLI_A y POLI_B es al menos 3 kDa;
- 30 cada Y es, independientemente, un grupo de unión divalente, que contiene al menos cuatro átomos de carbono, y que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a diez átomos de carbono de longitud, y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueno o alcoxi; cicloalquilo C_3-C_6 ; halo; ciano y fenilo; donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alqueno en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;
- L es un grupo enlazador;
- cada S-S es un grupo disulfuro unido a un carbono hibridado en sp^3 del Y adyacente; y
- A es un resto unido covalentemente de una molécula farmacológicamente activa.
- 35 81. El conjugado de la reivindicación 80, en el que cada Y es independientemente $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 10, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueno o alcoxi; cicloalquilo C_3-C_6 ; halo; ciano y fenilo, y donde dos grupos R^1 y R^2 en átomos de carbono diferentes pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo o arilo.
82. El conjugado de la reivindicación 81, donde n es de 3 a 8.
- 40 83. El conjugado de la reivindicación 80, en el que POLI_A tiene un peso molecular de al menos 5 kDa.
84. El conjugado de la reivindicación 81, en el que dos grupos Y son idénticos.
85. El conjugado de la reivindicación 81, en el que cada Y es un alquileo lineal o ramificado, que tiene la fórmula $-(CR^1R^2)_n-$, donde n es de 3 a 8 y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 .
- 45 86. El conjugado de la reivindicación 80, en el que cada uno de POLI_A y POLI_B es polietilenglicol (PEG).

87. Una composición que comprende, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, un conjugado que tiene la estructura:



en la que:

5 POLI es un polímero soluble en agua; seleccionado entre un poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmacetilamida), poli(hidroxialquilmacetilato), poli(sacárido), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina y poli(N-acriloilmorfolina);

10 Y es un grupo de unión divalente, que contiene al menos cuatro átomos de carbono, y que consiste en una estructura básica de hidrocarburo saturado o insaturado, que es de tres a diez átomos de carbono de longitud, y que tiene sustituyentes que se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo o alcoxi; cicloalquilo C₃-C₆; halo; ciano y fenilo; donde dos de dichos sustituyentes alquilo y/o alquenilo en diferentes átomos de carbono de la estructura básica pueden unirse para formar un grupo cicloalquilo, cicloalquenilo o arilo;

S-S es un grupo disulfuro, unido a un carbono hibridado en sp³ de Y;

x es 1 - 25; y

15 A es un resto unido covalentemente de una molécula farmacológicamente activa, en la que dicha molécula tiene un grupo tiol reactivo en forma no conjugada;

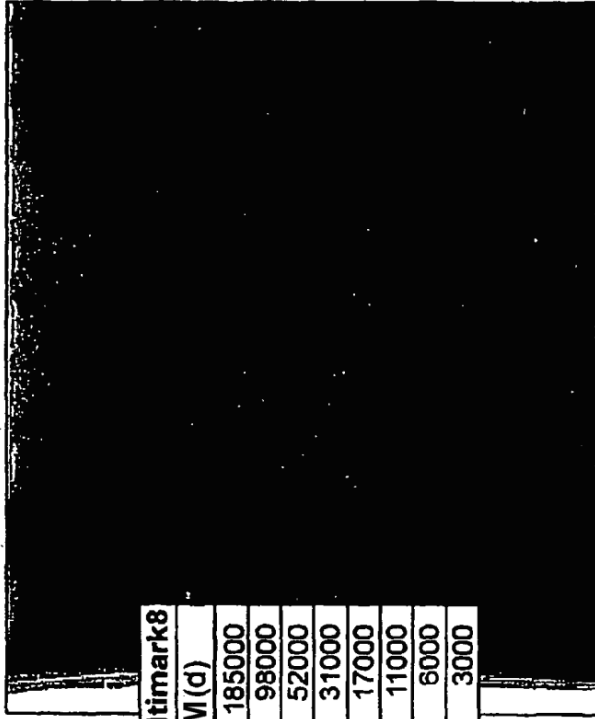
para su uso en la administración de dicha molécula farmacológicamente activa a un sujeto, en la que dicha composición es para administrarla al sujeto.

88. La composición de la reivindicación 87, en la que x es 1 ó 2.

20 89. La composición de la reivindicación 88, en la que POLI es un polietilenglicol (PEG).

90. La composición de la reivindicación 88, en la que dicho vehículo es un vehículo acuoso.

MALemida 5 K frente a OPSS 5 K

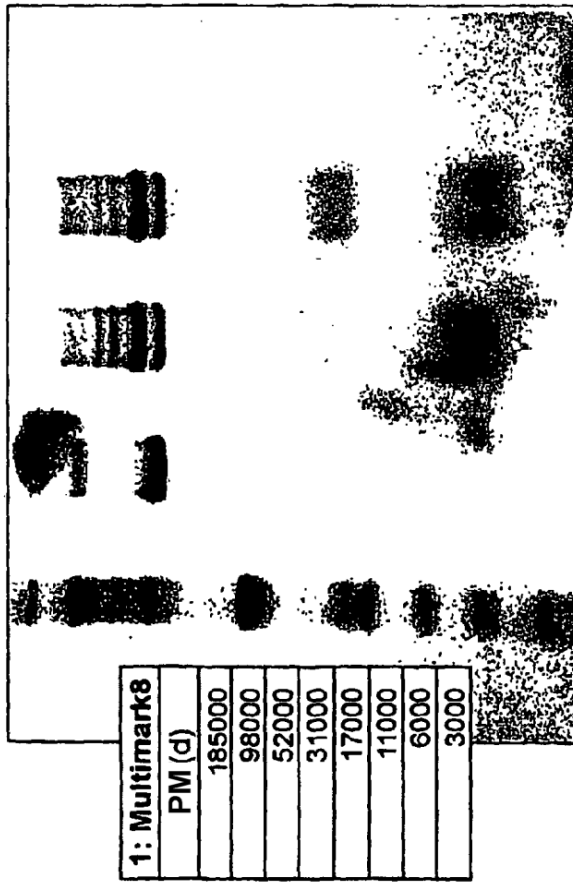


1: Multimarck8	
PM(d)	
185000	
98000	
52000	
31000	
17000	
11000	
6000	
3000	

2: BSA-red		
PM(d)	Int. Rel.	
98000	0,1200	
51125	0,8800	

3: MAL 5 k- BSA		
PM(d)	Int. Rel.	
120095,2	0,0675	
84525,3	0,0711	
74303	0,1135	
57111,1	0,4921	
49666,7	0,2558	

4: OPSS 5 k- BSA		
PM(d)	Int. Rel.	
125619	0,0604	
86383,8	0,0413	
74303	0,0602	
56646,5	0,5611	
49520,8	0,2770	



1: Multimark8	
PM (d)	Int. Rel.
185000	0,0727
98000	0,9273
52000	
31000	
17000	
11000	
6000	
3000	

2: BSA-red	
PM(d)	Int. Rel.
N 100718,7	0,0727
N 50521,1	0,9273

3: MAL 5 k - BSA	
PM(d)	Int. Rel.
PM 126546,9	0,0591
? 85120	0,0852
PM 75000	0,1449
? 58440	0,3984
N 50077,5	0,1822
P 7883,1	0,1301

4: OPSS 5k - BSA	
PM(d)	Int. Rel.
PM 134703,1	0,0433
? 85120	0,0664
PM 75460	0,0826
? 58440	0,4224
N 50077,5	0,2032
P 22090,9	0,0806
P 6454,5	0,1015

FIG. 2