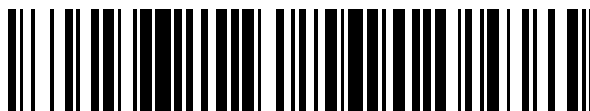


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 201**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04806061 .0**
- 96 Fecha de presentación: **14.12.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1699491**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

54 Título: **POLIETILENGLICOL RAMIFICADO PARA UNIR RESIDUOS POLIMÉRICOS A ANTICUERPOS.**

30 Prioridad:  
**23.12.2003 GB 0329825**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.02.2012**

73 Titular/es:  
**UCB PHARMA, S.A.  
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60  
1070 BRUSSELS, BE**

72 Inventor/es:  
**NORMAN, Timothy John**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 374 201 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

Polietilenglicol ramificado para unir residuos poliméricos a anticuerpos

5 La presente solicitud se refiere a andamios moleculares ramificados que son capaces de unir dos residuos poliméricos (polietilenglicoles) a dos, tres o cuatro residuos derivados de moléculas biológicamente activas. También se proporcionan métodos para la producción de dichas moléculas y composiciones farmacéuticas que las contienen.

10 El polímero hidrófilo polietilenglicol (PEG) ha sido unido covalentemente a moléculas biológicamente activas por diversas razones, por ejemplo, para aumentar la solubilidad en agua (Greenwald *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 331-336), para extender la semivida en la circulación y para reducir la inmunogenicidad (Chapman, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54, 531-545). En general, la unión en un sitio específico de las moléculas de PEG es preferible a la unión al azar, que puede afectar adversamente la actividad biológica de la molécula.

15 Para unir un peso molecular suficientemente alto de PEG a la molécula biológicamente activa, se han utilizado moléculas de PEG ramificadas en lugar de cadenas lineales de polímeros de muy alto peso molecular que pueden ser muy difíciles de preparar, así como costosas.

20 Por diversas razones, se considera ventajoso unir más de una molécula biológicamente activa a un único andamio de PEG ramificado. En esos casos, por ejemplo, se puede observar un importante aumento en la potencia.

Se describen polímeros de PEG ramificados que contienen un único sitio para la unión de una o más moléculas biológicamente activas, por ejemplo, en las patentes US 6,362,254 y 5,932,462.

25 La patente US 6,251,382 proporciona un andamio ramificado que contiene, entre otras cosas, varios sitios diferentes para la unión de al menos dos cadenas poliméricas y al menos dos moléculas biológicamente activas. Las moléculas descritas en ese documento se afirma que son conjugados a base de polímeros, biodegradables, que tienen la fórmula siguiente:

30  $(D)_n\text{-M-(R}_1)_m$

donde

(m) y (n) representan independientemente números enteros positivos, preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 cada uno;

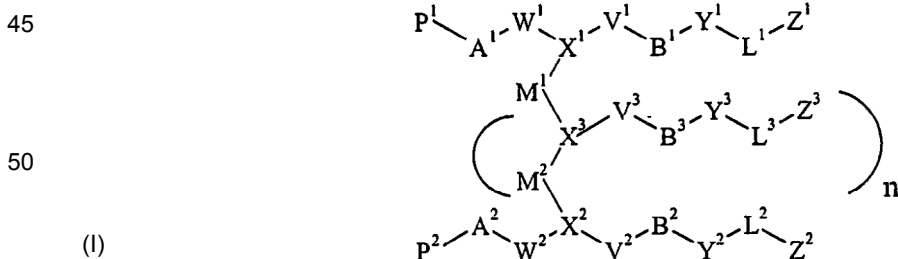
35 D es un residuo de una porción biológicamente activa;

M es una porción de unión o espaciadora multifuncional; y

R<sub>1</sub> es un residuo polimérico.

40 La presente solicitud da a conocer andamios moleculares ramificados que son capaces de unir dos residuos poliméricos (derivados, por ejemplo, de PEG) a dos, tres o cuatro residuos derivados de moléculas biológicamente activas, uniéndose las últimas al andamio mediante uniones hidrolíticamente estables.

Por lo tanto, la presente solicitud da a conocer un compuesto de fórmula (I):



55 (I)

donde

P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup> representan independientemente un residuo de polietilenglicol (PEG);

Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup> y Z<sup>3</sup> representan independientemente el residuo de una porción biológicamente activa;

60 X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan independientemente CR<sup>1</sup> o N;

A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> representan independientemente -CONH-, o -NHCO-,

B<sup>1</sup>, B<sup>2</sup> y B<sup>3</sup> representan independientemente -CONH- o -CO-;

V<sup>1</sup> y V<sup>2</sup> representan independientemente un enlace covalente o -(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>-;

W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> representan independientemente un enlace covalente o -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-;

Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup> e Y<sup>3</sup> representan independientemente -(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-;

$L^1$ ,  $L^2$  y  $L^3$  representan independientemente un grupo espaciador;  
 $M^1$  y  $M^2$  representan independientemente un enlace covalente o  $-(CH_2)_m-$ ;  
 $R^1$  representa hidrógeno o  $C_{1-4}$  alquilo;  
 $R^2$  representa hidrógeno o  $C_{1-4}$  alquilo;  
 n es cero, 1 o 2;  
 v es 1, 2, 3 o 4;  
 w es 1, 2, 3 o 4;  
 y es 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y  
 m es 1, 2 o 3.

Los compuestos de fórmula (I) no forman parte de la presente invención.

La presente solicitud cae dentro del área de competencia genérica más amplia de la patente US 6,251,382. Sin embargo, no hay en ese documento una divulgación específica de un compuesto que caiga dentro del ámbito de cobertura de la fórmula (I) indicada antes.

Según se usa en este documento, el término " $C_{1-4}$  alquilo" se refiere a grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que contienen de 1 a 4 átomos de carbono. Dichos grupos son metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *tert*-butilo.

Según se usa en este documento, se entenderá que el término "residuo" indica la parte de un polímero o de una porción biológicamente activa que permanece después de haber sido sometida a una reacción de sustitución, terminología que es familiar a los expertos.

Los residuos poliméricos  $P^1$  y  $P^2$  en los compuestos de la fórmula (I) anterior son residuos de polietilenglicoles (PEG). Con respecto a las porciones PEG de unión en general, se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington D.C.; y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina de 20 K (comercializada por Nektar, antes Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (comercializada por Nektar, antes Shearwater).

Adecuadamente,  $P^1$  y  $P^2$  son idénticos.

En los compuestos de la fórmula (I) anterior, los residuos  $Z^1$ ,  $Z^2$  y  $Z^3$  serán adecuadamente residuos de las entidades a las que se hace referencia, por ejemplo, en US 6,251,382 B1, con particular referencia al pasaje que va de la columna 18, línea 15 a la columna 22, línea 67, cuyo contenido se incorpora en este documento para referencia. Las porciones biológicamente activas típicas de las cuales  $Z^1$ ,  $Z^2$  y  $Z^3$  son residuos, incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos como a los que se alude en US 6,251,382 B1, columna 22, líneas 14-22.

Por lo tanto, los residuos  $Z^1$ ,  $Z^2$  y  $Z^3$  incluyen anticuerpos enteros y fragmentos funcionalmente activos, o sus derivados, y pueden ser, pero no exclusivamente, anticuerpos policlonales, monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y  $F(ab')_2$  y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores.

Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ej., IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de moléculas de inmunoglobulina.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por cualquier método conocido en el área como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp 77-96, Alan R Liss Inc., 1985).

Los anticuerpos para usar en la invención también se pueden generar usando métodos del anticuerpo de linfocito único mediante clonación y expresión de los ADNc de la región variable de la inmunoglobulina, generados a partir de linfocitos únicos seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93(15):7843-7848; y en WO92/02551.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región de armazón de una molécula de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo US 5,585,089).

- Los anticuerpos quiméricos son los anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulinas que fueron diseñados genéticamente para que los genes de las cadenas ligera y pesada estén compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulinas pertenecientes a diferentes especies. Es probable que esos anticuerpos quiméricos sean menos antigénicos. Los anticuerpos bivalentes se pueden preparar por métodos conocidos en el área (Milstein *et al.*, *Nature*, 1983, 305, 537-539; WO 93/08829; Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10, 3655-3659). Los anticuerpos multivalentes pueden ser multiespecíficos o monoespecíficos (véase, por ejemplo, WO 92/22853).
- Los anticuerpos para usar en la presente invención también se pueden generar usando diversos métodos de despliegue en fago conocidos en el área, que incluyen los dados a conocer por Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, 182, 41-50; Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, 184, 177-186; Kettleborough *et al.* *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 952-958; Persic *et al.*, *Gene*, 1997 187, 9-18; y Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 1994, 57, 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y las patentes de los Estados Unidos N° 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; y 5,969,108. Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios, como las descritas en US 4,946,778, también se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios. Asimismo se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos, inclusive otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.
- Los fragmentos de anticuerpos particulares incluyen los descritos en las solicitudes de patente internacional PCT/GB2004/002810, PCT/GB2004/002870 y PCT/GB2004/002871 (todas presentadas el 1 julio de 2004), reivindicando prioridad de diversos modos de las solicitudes de patente del Reino Unido 0315450.7, 0315457.2 (ambas presentadas el 1 julio de 2003) y 0319588.0 (presentada el 20 agosto de 2003).
- Adecuadamente,  $Z^1$  y  $Z^2$  son idénticos.
- En una realización,  $X^1$  representa  $CR^1$ . En otra realización,  $X^1$  representa N.
- En una realización,  $X^2$  representa  $CR^1$ . En otra realización,  $X^2$  representa N.
- En una realización,  $X^3$  representa  $CR^1$ . En otra realización,  $X^3$  representa N.
- Adecuadamente,  $X^1$  y  $X^2$  son idénticos.
- Adecuadamente,  $A^1$  representa -CONH- o -NHCO-. En una realización,  $A^1$  representa -CONH-. En otra realización,  $A^1$  representa -NHCO-.
- Adecuadamente,  $A^2$  representa -CONH- o -NHCO-. En una realización,  $A^2$  representa -CONH-. En otra realización,  $A^2$  representa -NHCO-.
- Adecuadamente,  $A^1$  y  $A^2$  son idénticos.
- En una realización,  $B^1$  representa -CONH-. En otra realización,  $B^1$  representa -CO-. Cuando  $B^1$  representa -CONH-,  $X^1$  representa típicamente CH. Cuando  $B^1$  representa -CO-,  $X^1$  representa típicamente N.
- En una realización,  $B^2$  representa -CONH-. En otra realización,  $B^2$  representa -CO-. Cuando  $B^2$  representa -CONH-,  $X^2$  representa típicamente CH. Cuando  $B^2$  representa -CO-,  $X^2$  representa típicamente N.
- En una realización,  $B^3$  representa -CONH-. En otra realización,  $B^3$  representa -CO-. Cuando  $B^3$  representa -CONH-,  $X^3$  representa típicamente CH. Cuando  $B^3$  representa -CO-,  $X^3$  representa típicamente N.
- Adecuadamente,  $B^1$  y  $B^2$  son idénticos.
- En una realización preferida,  $V^1$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $V^1$  representa  $-(CH_2)_v-$  en la cual v se define como antes.
- En una realización preferida,  $V^2$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $V^2$  representa  $-(CH_2)_v-$  en la cual v se define como antes.
- En una realización preferida,  $V^3$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $V^3$  representa  $-(CH_2)_v-$  en la cual v se define como antes.
- Adecuadamente,  $V^1$  y  $V^2$  son idénticos.

En una realización,  $W^1$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $W^1$  representa  $-(CH_2)_w-$  en la cual  $w$  se define como antes.

5 En una realización,  $W^2$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $W^2$  representa  $-(CH_2)_w-$  en la cual  $w$  se define como antes.

Adecuadamente,  $W^1$  y  $W^2$  son idénticos.

10 Adecuadamente,  $Y^1$  e  $Y^2$  son idénticos.

15 Los grupos espaciadores  $L^1$ ,  $L^2$  y  $L^3$  comprenderán adecuadamente cualquier porción conocida por los expertos capaz de formar un puente entre la cadena de alquileo  $Y^1$ ,  $Y^2$  y (cuando está presente)  $Y^3$  y el residuo  $Z^1$ ,  $Z^2$  y (cuando está presente)  $Z^3$ , respectivamente. Por ejemplo, cuando  $Z^1$  y/o  $Z^2$  y/o  $Z^3$  es el residuo de una molécula de un polipéptido (por ejemplo un anticuerpo o uno de sus fragmentos) que contiene un residuo de cisteína, el grupo espaciador correspondiente  $L^1$  y/o  $L^2$  y/o  $L^3$  será adecuadamente un residuo de maleimida, que puede estar unido covalentemente al residuo de polipéptido que contiene cisteína  $Z^1$  y/o  $Z^2$  y/o  $Z^3$  a través de una unión tiol, y a la cadena de alquileo  $Y^1$  y/o  $Y^2$  y/o  $Y^3$  a través del átomo de nitrógeno de la maleimida.

20 Adecuadamente,  $L^1$  y  $L^2$  son idénticos.

En una realización,  $M^1$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $M^1$  representa  $-(CH_2)_m-$  en la cual  $m$  se define como antes.

25 En una realización,  $M^2$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $M^2$  representa  $-(CH_2)_m-$  en la cual  $m$  se define como antes.

En una realización preferida,  $R^1$  es hidrógeno. En otra realización,  $R^1$  representa  $C_{1-4}$  alquilo, especialmente metilo.

30 En una realización preferida,  $R^2$  es hidrógeno. En otra realización,  $R^2$  representa  $C_{1-4}$  alquilo, especialmente metilo.

Adecuadamente  $n$  es cero o 1.

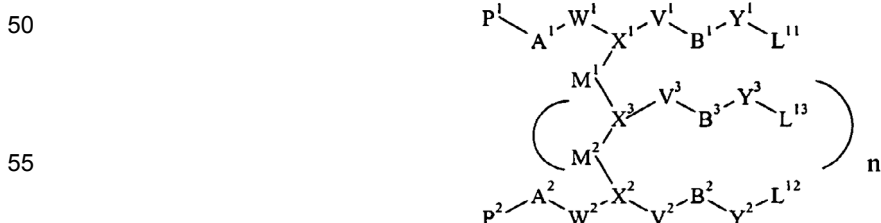
35 En una realización preferida,  $n$  es cero, en cuyo caso  $M^1$  está unido directamente a  $X^2$ . En otra realización,  $n$  es 1. En otra realización más,  $n$  es 2.

En una realización,  $w$  es 1. En otra realización,  $w$  es 2. En una realización adicional,  $w$  es 3. En otra realización más,  $w$  es 4. Favorablemente,  $w$  es 1 o 2.

40 En una realización,  $y$  es 1. En otra realización,  $y$  es 2. En una realización adicional,  $y$  es 3. En otra realización más,  $y$  es 4. Aún en otra realización,  $y$  es 5. Todavía en otra realización,  $y$  es 6. Favorablemente,  $y$  es 2, 3 o 4, típicamente 2 o 4.

45 En una realización,  $m$  es 1. En otra realización,  $m$  es 2. En una realización adicional,  $m$  es 3. Favorablemente,  $m$  es 2.

En otro aspecto, la solicitud da a conocer moléculas andamio que son productos intermedios valiosos para la unión de porciones biológicamente activas de las cuales  $Z^1$ ,  $Z^2$  y  $Z^3$  son residuos. Por lo tanto, la solicitud también da a conocer un compuesto de fórmula (II):



60 donde (II)

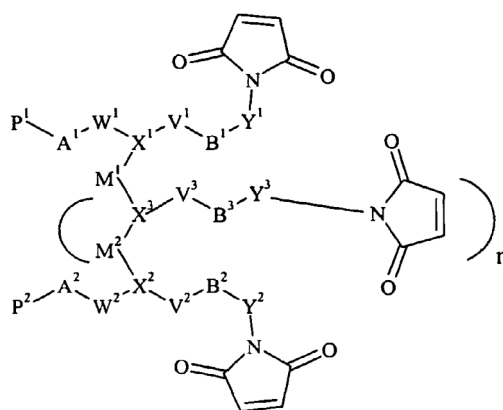
$L^{11}$ ,  $L^{12}$  y  $L^{13}$  representan grupos capaces de unirse a los residuos  $Z^1$ ,  $Z^2$  y  $Z^3$  respectivamente, o capaces de ser convertidos en dichos grupos; y

cada una de las otras variables es la definida antes en relación con la fórmula (I).

Cuando  $Z^1$  y/o  $Z^2$  y/o  $Z^3$  es el residuo de una molécula de polipéptido (por ejemplo un anticuerpo o uno de sus fragmentos), el grupo  $L^1$  y/o  $L^2$  y/o  $L^3$  correspondiente puede estar unido al polipéptido a través de cualquier cadena lateral de un aminoácido o grupo funcional aminoácido terminal ubicado en el fragmento del anticuerpo, disponible, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden encontrarse naturalmente, por ejemplo, en el fragmento del anticuerpo o ser insertados en el fragmento usando métodos de ingeniería genética (véase por ejemplo US 5,219,996). En un aspecto preferido de la invención los dos grupos están unidos covalentemente a través de un grupo tiol de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. La unión covalente será en general un enlace disulfuro o un enlace azufre-carbono, preferentemente el último. En un ejemplo cuando un grupo tiol se usa como el punto de unión de grupos adecuadamente activados, se pueden usar, por ejemplo, derivados selectivos de tiol como derivados de maleimida y cisteína.

Los compuestos de fórmula (II) no forman parte de la presente invención.

En una característica preferida, los grupos  $L^{11}$ ,  $L^{12}$  y (cuando está presente)  $L^{13}$  son idénticos y representan derivados de maleimida unidos al resto de la molécula a través del átomo de nitrógeno de la maleimida. Concordantemente, un subconjunto ilustrativo de los compuestos de la fórmula (II) anterior es representado por los compuestos de fórmula (III):



(III)

cada una de las variables es la definida antes en relación con la fórmula (I).

De acuerdo con otro aspecto de la solicitud, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) como el definido antes, en asociación con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de fórmula (I) no forman parte de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden adoptar una forma adecuada para administración oral, bucal, parenteral, nasal, tópica, oftálmica o rectal, o una forma adecuada para la administración mediante inhalación o insuflación.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar, por ejemplo, la forma de comprimidos, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables como aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (p. ej., almidón de papa o glicolato de sodio); o humectantes (p. ej., lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en el área. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar, por ejemplo, la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden elaborar por los medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables como agentes de suspensión, emulsionantes, vehículos no acuosos o conservantes. Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, saborizantes, colorantes o edulcorantes, según sea adecuado.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para producir una liberación controlada del principio activo.

Las composiciones para administración bucal pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de la manera convencional.

5 Los compuestos de fórmula (I) se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas farmacéuticas, por ejemplo, en ampollas de vidrio o envases multidosis, p. ej. viales de vidrio. Las preparaciones para inyección pueden adoptar dichas formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilizantes, conservantes y/o dispersantes.

10 Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, p. ej. agua estéril apirógena, antes de su uso.

Además de las formulaciones descritas antes, los compuestos de fórmula (I) también se pueden formular como una preparación en depot. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación o por inyección intramuscular.

15

Para la administración nasal o administración por inhalación, los compuestos de acuerdo con la presente solicitud se pueden suministrar convenientemente en forma de un atomizador de aerosol para envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, p. ej. diclorodifluorometano, fluorotriclorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado o mezcla de gases.

20

Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas que contengan el principio activo. El envase o el dispositivo dispensador pueden ir acompañados de las instrucciones para la administración.

25

Para la administración tópica, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular convenientemente en forma de una pomada adecuada que contenga el principio activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Entre los vehículos particulares se encuentran, por ejemplo, aceite mineral, petróleo líquido, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, los compuestos de acuerdo con la presente solicitud se pueden formular como una loción adecuada que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Entre los vehículos particulares se encuentran, por ejemplo, aceite mineral, monoestearato de sorbitan, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, alcohol bencílico, 2-octildodecanol y agua.

30

Para la administración oftálmica los compuestos de acuerdo con la presente solicitud se pueden formular convenientemente como suspensiones microionizadas en solución salina estéril isotónica, con el pH ajustado, con o sin un conservante como un bactericida o fungicida, por ejemplo nitrato fenilmercurio, cloruro de benzalconio o acetato de clorhexidina. Alternativamente, para la administración oftálmica los compuestos se pueden formular como una pomada, por ejemplo vaselina.

35

Para la administración rectal los compuestos de acuerdo con la presente solicitud se pueden formular convenientemente como supositorios. Estos se pueden preparar mezclando el principio activo con un excipiente no irritante adecuado, que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal de modo que se funda en el recto para liberar el principio activo. Dichos materiales incluyen, por ejemplo, manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

40

45

La cantidad de un compuesto de la solicitud necesaria para la profilaxis o el tratamiento de una afección particular variará dependiendo del compuesto elegido y de la afección del paciente que se va a tratar. En general, sin embargo, las dosis diarias pueden variar de aproximadamente a 10 ng/kg a 1000 mg/kg, típicamente de 100 ng/kg a 100 mg/kg, p. ej. de aproximadamente 0.01 mg/kg a 40 mg/kg de peso corporal para la administración oral o bucal, de aproximadamente 10 ng/kg a 50 mg/kg de peso corporal para la administración parenteral, y de aproximadamente 0.05 mg a aproximadamente 1000 mg, p. ej. de aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 1000 mg, para la administración nasal o la administración por inhalación o insuflación.

50

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar mediante un proceso que comprende la unión de los residuos Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup> y (cuando está presente) Z<sup>3</sup> al compuesto de fórmula (II) adecuado. Este proceso se puede llevar a cabo usando procedimientos bien conocidos por los expertos como, por ejemplo, los métodos descritos en US 6,251,382 B1, con particular referencia a la columna 23, líneas 1 a 50.

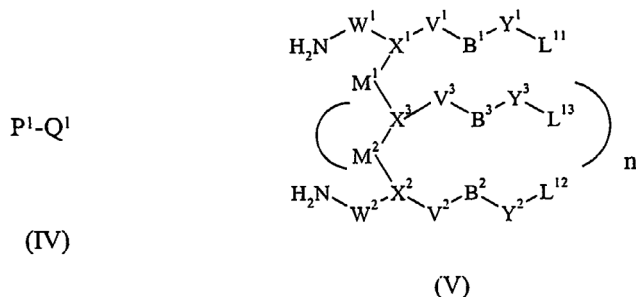
55

Los procesos para la preparación de los compuestos de las fórmulas (I) y (II) no forman parte de la presente invención.

60

Los compuestos de fórmula (II) en los que P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup> son idénticos y A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> son ambos -CONH- se pueden preparar mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula

(V):



donde Q<sup>1</sup> representa una porción carboxilato activada; y las variables restantes son las definidas antes.

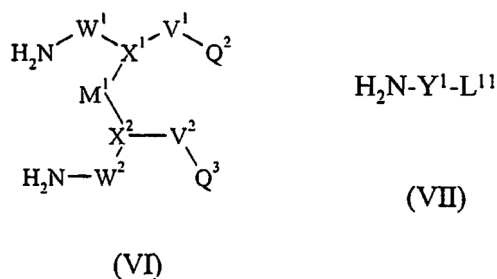
Los ejemplos de porciones carboxilato activadas para el sustituyente Q<sup>1</sup> incluyen cloruros de ácido; anhídridos de ácido; y el éster formado cuando un ácido carboxílico (Q<sup>1</sup> = -CO<sub>2</sub>H) se hace reaccionar con *N*-hidroxisuccinimida.

La reacción entre los compuestos (IV) y (V) se efectúa convenientemente en un solvente adecuado, por ejemplo, diclorometano, típicamente en presencia de una base orgánica, p. ej. trietilamina.

Los compuestos de fórmula (II) en los que P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup> son idénticos y A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> son ambos -OC(O)N(H)- se pueden preparar mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula P<sup>1</sup>-OC(O)R<sup>x</sup>, en el que R<sup>x</sup> representa un grupo fácilmente desplazable como un átomo de halógeno (p. ej. cloro), 4-nitrofenoxi o 1-succinimidiloxi; con un compuesto de fórmula (V) como el definido antes.

El producto intermedio necesario de fórmula P<sup>1</sup>-OC(O)R<sup>x</sup> se puede preparar tratando un compuesto de fórmula P<sup>1</sup>-OH con, por ejemplo, fosgeno, cloroformiato de 4-nitrofenilo o carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo.

A título ilustrativo, los compuestos de fórmula (V) en los que n es cero, B<sup>1</sup> y B<sup>2</sup> son ambos -CONH-, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> son idénticos y L<sup>11</sup> y L<sup>12</sup> son idénticos, se pueden preparar mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (VI) con un compuesto de fórmula (VII):



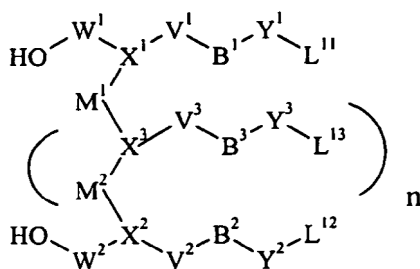
donde Q<sup>2</sup> y Q<sup>3</sup> representan independientemente una porción carboxilato activada como la definida antes para Q<sup>1</sup>; y las variables restantes son las definidas antes.

La reacción entre los compuestos (VI) y (VII) se efectúa convenientemente en un solvente adecuado, por ejemplo, diclorometano, típicamente en presencia de una base orgánica, p. ej. trietilamina.

En un procedimiento alternativo, y a título ilustrativo, los compuestos de fórmula (II) en los que n es cero, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son ambos N, B<sup>1</sup> y B<sup>2</sup> son ambos -CO-, V<sup>1</sup> y V<sup>2</sup> son ambos enlaces covalentes, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> son idénticos y L<sup>11</sup> y L<sup>12</sup> son idénticos, se pueden preparar mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (VIII) con un compuesto de fórmula (IX):







(XIII)

donde las variables son todas según se definieron antes; con, por ejemplo, fósgeno, cloroformiato de 4-nitrofenilo o carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo.

Cuando  $R^2$  es  $C_{1-4}$  alquilo, la unión de la porción  $R^2$  se puede efectuar mediante procedimientos de *N*-alquilación convencionales.

Los compuestos de fórmula (II) en los que  $P^1$  y  $P^2$  son idénticos y  $A^1$  y  $A^2$  son ambos -NHCONH- se pueden preparar mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula  $P^1-N=C=O$  con un compuesto de fórmula (V) como el definido antes.

El producto intermedio necesario de fórmula  $P^1-N=C=O$  se puede preparar, por ejemplo, tratando un compuesto de fórmula (X) como el definido antes con fósgeno.

Cuando no están disponibles en el comercio, los compuestos de fórmulas (IV), (VI), (VII), (IX), (X), (XI) y (XIII) se pueden preparar por métodos análogos a los descritos en los ejemplos acompañantes, o por métodos corrientes bien conocidos en el área.

Cuando se obtiene una mezcla de productos a partir de cualquiera de los procesos descritos antes para la preparación de compuestos de acuerdo con la invención, el producto deseado se puede separar de ella en una etapa adecuada mediante métodos convencionales como cromatografía de difusión en gel; intercambio catiónico o aniónico; HPLC preparativa o cromatografía en columna utilizando, por ejemplo, sílice y/o alúmina junto con un sistema solvente adecuado.

Durante cualquiera de las secuencias de síntesis anteriores puede ser necesario y/o deseable proteger los grupos sensibles o reactivos de cualquiera de las moléculas de interés. Esto se puede lograr por medio de grupos protectores convencionales, como los descritos en *Protective Groups in Organic Chemistry* ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; y T. W. Greene & P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 3ª edición, 1999. Los grupos protectores se pueden eliminar en cualquier etapa posterior conveniente, usando métodos conocidos en el área.

Los ejemplos siguientes ilustran la divulgación.

Producto intermedio 1

Éster *tert*-butílico del ácido (4-maleimidil-butil)-carbámico

A una solución de *N*-BOC-1,4-diaminobutano (8.324 g, 0.044 mol) en tolueno seco (50 ml) se le agregó anhídrido maleico (4.336 g, 0.044 mol) y la solución se calentó a reflujo en las condiciones de Dean-Stark durante dos días. El solvente se eliminó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílice eluyendo con 25-40% de acetato de etilo en hexano para dar el compuesto del título, 1.461 g, 12%, como un sólido blanco.

$m/z$  (LCMS ES+, 70V) 291 ( $MH^+$ ).

$\delta H$  ( $CDCl_3$ ) 6.63 (2H, s), 4.46 (1H, br), 3.48 (2H, t, J7.1 Hz), 3.08 (2H, m), 1.56 (2H, p, J7.4 Hz), 1.41 (2H, m), 1.38 (9H, s).

Producto intermedio 2

Ácido *meso*-2,3-bis-*tert*-butoxicarbonilamino-succínico

A una solución de ácido *meso*-2,3-diaminosuccínico (1.96 g, 0.013 mol) y trietilamina (5.36 g, 0.053 mol) en agua (50 ml) se le agregó una solución de dicarbonato de di-*tert*-butilo (6.35 g, 0.029 mol) en dioxano (30 ml) durante un período de 20 min. Después de 2 horas el solvente se redujo a 10 ml, se diluyó con agua hasta 50 ml y se lavó con

diclorometano (4 × 30 ml). La solución se acidificó después hasta pH 1-2 con HCl 2 M y se extrajo con acetato de etilo (5 × 50 ml). La solución de acetato de etilo se secó en sulfato de magnesio y el solvente se eliminó para obtener el compuesto del título, 4.345 g, 94%, como un cristal incoloro.

m/z (LCMS ES+, 70V) 371 (MNa<sup>+</sup>).

5 δH (d<sub>6</sub>-DMSO, 370 K) 6.03 (2H, br), 4.49 (2H, s), 1.42 (18H, s).

Producto intermedio 3

Ácido {*tert*-butoxicarbonil-[2-(*tert*-butoxicarbonil-carboximetil-amino)-etil]-amino}-acético

10 A una suspensión en agitación de ácido etilenodiamina-N,N'-diacético (1.00 g, 5.68 mmol) en metanol (150 ml) se le agregó trietilamina (2.30 g, 22.7 mmol) seguida de dicarbonato de di-*tert*-butilo (2.48 g, 11.4 mmol). La suspensión se calentó a reflujo durante 10 minutos hasta que la mayoría de los sólidos se disolvió, después se permitió que se enfriara hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La suspensión se filtró, se eliminó el solvente, el residuo se disolvió en agua (40 ml) y el pH se elevó hasta aproximadamente 8-9 con trietilamina. La solución se lavó con diclorometano (5 × 40 ml), se acidificó con HCl 1 M hasta un pH de aproximadamente 1 y se extrajo con DCM (10 × 40 ml) seguido de acetato de etilo (10 × 40 ml). Las fracciones de acetato de etilo y diclorometano se secaron en sulfato de magnesio, se combinaron y el solvente se eliminó hasta obtener el material deseado, 1.558 g, 74%, como un sólido blanco

15 m/z (LCMS ES+, 70V) 399 (MNa<sup>+</sup>).

20 δH (d<sub>6</sub>-DMSO, 380 K) 3.86 (4H, s), 3.37 (4H, s), 1.42 (18H, s).

Producto intermedio 4

Ácido 3-(*tert*-butoxicarbonil-[2-[*tert*-butoxicarbonil-(2-carboxi-etil)-amino]-etil]-amino)-propiónico

25 A la sal de diclorhidrato del ácido etilenodiamina-N,N'-dipropiónico (2.00 g, 7.2 mmol) en agua (50 ml) y trietilamina (4.38 g, 43 mmol) se le agregó dicarbonato de di-*tert*-butilo (3.307 g, 15 mmol) en dioxano (30 ml) durante un período de 10 minutos. Se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente, el dioxano se eliminó a presión reducida y la solución acuosa remanente se lavó con diclorometano (4 × 50 ml). La capa acuosa se acidificó con HCl concentrado hasta un pH de aproximadamente 1 y el precipitado blanco resultante se extrajo con acetato de etilo (5 × 60 ml). La solución de acetato de etilo se secó en sulfato de magnesio y el solvente se eliminó para obtener el producto, 2.68 g, 92%, como un sólido blanco.

30 m/z (LCMS ES+, 70V) 472 (MNa<sup>+</sup>).

δH (d<sub>6</sub>-DMSO, 380 K) 3.41 (4H, t, J7.2 Hz), 3.31 (4H, s), 2.46 (4H, t, J7.2 Hz) 1.44 (18H, s).

35 Producto intermedio 5

Éster bis-succinimidílico del ácido 2,3-bis-*tert*-butoxicarbonilamino-succínico

40 Al producto intermedio 2 (1.500 g, 4.31 mmol) en diclorometano (20 ml) se le agregaron N-hidroxisuccinimida (1.240 g, 10.78 mmol) y EDC (2.066 g, 10.78 mmol). Después de reaccionar durante toda la noche la solución se diluyó hasta 50 ml con diclorometano, se lavó con agua (3 × 30 ml), se secó en sulfato de magnesio y el solvente se eliminó para dar un residuo sólido blanco. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con 50-65% de acetato de etilo en hexano para obtener el éster di-NSH deseado, 277 mg, 12%, como un sólido blanco.

45 m/z (LCMS ES+, 70V) 565 (MNa<sup>+</sup>).

δH (CDCl<sub>3</sub>-rotámeros) 6.47, 6.17, 6.10 (2H, 3xbr), 5.35, 5.25, 5.10 (2H, 3xbr), 2.82 (8H, s), 1.44, 1.42 (18H, 2xs).

Producto intermedio 6

Éster bis-succinimidílico del ácido {*tert*-butoxicarbonil-[2-(*tert*-butoxicarbonil-carboximetil-amino)-etil]-amino}-acético

50 A una suspensión del producto intermedio 3 (200 mg, 0.53 mmol) en diclorometano (4 ml) se le agregó trietilamina (269 mg, 2.66 mmol) y una vez que se obtuvo una solución transparente, se le agregaron N-hidroxisuccinimida (153 mg, 1.33 mmol) seguida de EDC (255 mg, 1.33 mmol). La LCMS de la reacción a los 45 min y a las 5 h mostró que se había detenido antes de completarse. Se agregaron 1.5 equivalentes extra tanto de N-hidroxisuccinimida como de EDC en DCM (3 ml) y se dejó reaccionar durante toda la noche, tiempo durante el cual se formó un sólido blanco poco soluble. La mezcla de reacción se diluyó hasta 40 ml con diclorometano, la solución/suspensión se lavó con HCl 0.1 M (6 × 50 ml), se secó en sulfato de magnesio y el solvente se evaporó. El residuo sólido blanco resultante se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con acetato de etilo al 70% en hexano para obtener el éster di-NHS deseado, 38 mg, 13%, como un sólido blanco poco soluble.

55 m/z (LCMS ES+, 70V) 593 (MNa<sup>+</sup>).

60 δH (d<sub>6</sub>-DMSO, 380 K) 4.36 (4H, s), 3.46 (4H, s), 2.84 (8H, s), 1.45 (18H, s).

Producto intermedio 7

Éster bis succinimidílico del ácido 3-(*tert*-butoxicarbonil-[2-[*tert*-butoxicarbonil-(2-carboxi-etil)-amino]-etil]-amino)-propiónico

Al producto intermedio 4 (1.00 g, 2.48 mmol) en diclorometano (40 ml) se le agregaron trietilamina (751 mg, 7.43 mmol), N-hidroxisuccinimida (712 mg, 6.19 mmol) y EDC (1.186 g, 6.19 mmol). Después de 2 h 20 min se agregaron otros 474 mg de EDC y se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente. El solvente se eliminó y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 70% en hexano para obtener el producto, 773 mg, 52%, como un sólido blanco  
 5 m/z (LCMS ES+, 70V) 621 (MNa<sup>+</sup>).  
 δH (d<sub>6</sub>-DMSO, 380 K) 3.54 (4H, t, J7.0 Hz), 3.37 (4H, s), 2.91 (4H, t, J7.0 Hz), 2.83 (8H, s), 1.46 (18H, s).

Producto intermedio 8  
 10 2,3-Bis-*tert*-butoxicarbonilamino-N,N'-bis-(4-maleimidil-butyl)-succinamida

Al producto intermedio 1 (300 mg, 1.120 mmol) se le agregó ácido trifluoroacético:diclorometano 1:1 (8 ml). Después de 30 minutos se eliminó el solvente, el residuo se disolvió en diclorometano y se le agregó el producto intermedio 5 (276 mg, 0.509 mmol), seguido inmediatamente de trietilamina (258 mg, 2.546 mmol). Después de 30 minutos se agregó resina scavenger (depuradora) de PS-TsCl (0.5 g, 1.44 mmol/g), se agitó durante 1 hora y se filtró. El solvente se eliminó y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con 75-100% de acetato de etilo en hexano para dar el material deseado, 115 mg, 35%, como un sólido blanco  
 15 m/z (LCMS ES+, 70V) 649 (MH<sup>+</sup>).  
 20 δH (CDCl<sub>3</sub>) 6.64 (2H, br), 6.62 (4H, s), 6.28 (2H, br), 4.30 (2H, br), 3.46 (4H, t, J6.9 Hz), 3.17 (4H, m), 1.57-1.40 (8H, m), 1.39 (18H, s).

Producto intermedio 9  
 25 Éster *tert*-butílico del ácido (2-{*tert*-butoxicarbonil-[(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-metil]-amino}-etil)-[(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-metil]-carbámico

A una solución del producto intermedio 6 (5.7 mg, 0.010 mmol) en diclorometano (5 ml) se le agregaron metoxi-PEG-amina de 20 K (500 mg, 0.025 mmol) (adquirido a Rapp Polymere) y trietilamina (5.1 mg, 0.050 mmol). Se dejó reaccionar durante toda la noche, se diluyó con diclorometano hasta 25 ml y se agitó durante 3 días con resina scavenger de MP-ácido tóxico (3.0 g, 1.43 mmol/g). La resina se separó por filtración, la solución se diluyó hasta 50 ml con diclorometano y se lavó con HCl 0.1 M (4 × 30 ml). La solución se secó en sulfato de magnesio y el solvente se eliminó para dar el producto de 40 K, 370 mg, 92%, como un sólido blanco ceroso.  
 30 δH (CDCl<sub>3</sub>) 4.1-3.3 (~3600H, brm), 3.30 (6H, s), 1.42 (18H, br).

Producto intermedio 10  
 35 Éster *tert*-butílico del ácido (2-{*tert*-butoxicarbonil-[2-(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-etil]-amino}-etil)-[2-(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-etil]-carbámico

A una solución del producto intermedio 7 (11.1 mg, 0.019 mmol) en diclorometano (10 ml) se le agregaron metoxi-PEG-amina de 20 K (1.00 g, 0.05 mmol) (adquirida a Rapp Polymere) y trietilamina (9.4 mg, 0.093 mmol). Se dejó reaccionar durante toda la noche, se diluyó con diclorometano hasta 50 ml y se agitó durante 3 días con resina depuradora de MP-ácido tóxico (6.0 g, 1.43 mmol/g). La resina se separó por filtración, la solución se lavó con HCl 0.1 M (4 × 50 ml), se secó en sulfato de magnesio y el solvente se eliminó para obtener cuantitativamente el producto de 40 K como un sólido blanco ceroso.  
 40 δH (CDCl<sub>3</sub>) 4.5-3.0 (~3600H, brm), 3.30 (6H, s), 2.4 (4H, br), 1.37 (18H, brs).

Producto intermedio 11  
 Sal bis TFA de 2,3-Diamino-N,N'-bis-[4-maleimidil-butyl]-succinamida

Se disolvió el producto intermedio 8 (4.0 mg, 0.0062 mmol) en diclorometano (1 ml) y se le agregó ácido trifluoroacético (1 ml). Después de media hora el solvente se eliminó y el residuo se usó crudo en la síntesis del ejemplo 1.  
 50 m/z (LCMS ES+, 70V) 449 (MH<sup>+</sup>).  
 δH (d<sub>6</sub>-DMSO) 6.93 (4H, s), 4.14 (2H, s), 3.32 (4H, t, J6.8 Hz), 3.06, 2.96 (4H, 2xm), 1.42 (4H, m), 1.29 (4H, m).

Producto intermedio 12  
 55 Diclorhidrato de N-(2-(metoxi-polietoxi)-etil)-2-(2-[(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-metil]-amino)-etilamino)-acetamida.

Se disolvió el producto intermedio 9 (aproximadamente 400 mg) en diclorometano (4 ml) y se le agregó ácido trifluoroacético (4 ml). Después de media hora se eliminó el solvente, el residuo se disolvió en diclorometano (100 ml), se lavó con HCl 0.1 M (3 × 100 ml), se secó en sulfato de magnesio y el solvente se eliminó para obtener la sal (386 mg) como un sólido blancuzco.  
 60 δH (CDCl<sub>3</sub>) 4.2-3.0 (~3600H, brm), 3.31 (6H, s).

## Producto intermedio 13

Sal de diclorhidrato de N-(2-(metoxi-polietoxi)-etil)-3-{2-[2-(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-etilamino]-etilamino}-propionamida

5 Se disolvió el producto intermedio 10 (460 mg) en diclorometano (5 ml) y se le agregó ácido trifluoroacético (5 ml). Después de media hora se eliminó el solvente, el residuo se disolvió en diclorometano (60 ml), se lavó con HCl 0.1 M (4 × 60 ml), se secó en sulfato de magnesio y el solvente se eliminó para obtener la sal (460 mg) como un sólido blanco.

10  $\delta$ H (CDCl<sub>3</sub>) 7.20 (2H, br), 4.0-3.0 (~3600H, brm), 3.31 (6H, s), (señales remanentes oscurecidas por la señal ancha del H<sub>2</sub>O).

**Ejemplos**

## Ejemplo 1

15 N,N'-Bis-[4-maleimidilbutil]-2,3-bis-(3-(metoxi-polietoxi)-propionilamino)-succinamida

Al producto intermedio 11 (4.0 mg, 6.2 micromol) en diclorometano (8 ml) se le agregó M-PEG-SPA de Nektar (antes Shearwater) (393 mg, PM 22 K) seguido de trietilamina (13 mg, 123  $\mu$ mol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, seguido de 2 días a reflujo suave. A la reacción se le agregó resina de MP-TsCl (0.25 g, 1.44 mmol/g), la reacción se agitó suavemente durante 2 horas y la resina se separó por filtración. La reacción se diluyó hasta 50 ml con diclorometano, se lavó con HCl 0.1 M (3 × 30 ml), se secó en sulfato de magnesio y se eliminó el solvente. El análisis por <sup>1</sup>H NMR mostró la presencia de M-PEG-SPA sin reaccionar, por lo tanto el residuo se disolvió en agua destilada (10 ml) y se dejó toda la noche para hidrolizar el éster. La solución acuosa se lavó con éter dietílico (2 × 50 ml), se extrajo en diclorometano (5 × 50 ml), se secó en sulfato de magnesio y el solvente se eliminó para obtener un sólido blanco que contenía una mezcla de mPEG-ácido propiónico, las especies mono-PEGiladas y las especies di-PEGiladas deseadas.

20  $\delta$ H (CDCl<sub>3</sub>) 7.95 (2H, br), 7.55 (2H, br), 6.63 (4H, s), 4.89 (2H, br), 4.1-3.0 (~4000H, brm), 2.52 (4H, t), 1.58 (4H, m), 1.38 (4H, m).

## Ejemplo 2

30 3-Maleimidil-N-(2-{[3-maleimidil-propionil]-[2-(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-metil]-amino}-etil)-N-[(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-metil]-propionamida

El producto intermedio 12 (386 mg, 0.0097 mmol) se disolvió en diclorometano (7 ml) se le agregó éster N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido-propiónico (6.4 mg, 0.024 mmol) seguido de trietilamina (39 mg, 0.386 mmol). Después de reaccionar durante toda la noche se eliminó el solvente, el residuo se disolvió en diclorometano (6 ml) y se vertió en éter dietílico agitado rápidamente (80 ml) para dar un precipitado blanco. Esto se filtró en atmósfera de nitrógeno, se disolvió en diclorometano y el solvente se eliminó para dar un material con adición sólo parcial de maleimida. Un lote de 80 mg de este material se volvió a tratar con 10 equivalentes de éster N-hidroxisuccinimida del ácido maleimido-propiónico y 40 equivalentes de trietilamina en diclorometano (2 ml) durante 3 días, para dar, después de la precipitación en éter dietílico, 80 mg de un producto sustancialmente inalterado. Este material se trató después con 10 equivalentes de cloruro de maleimido-propionilo (del ácido maleimido-propiónico tratado con cloruro de oxalilo:diclorometano 1:1 (4 ml) durante 3 horas a temperatura ambiente) y 40 equivalentes de trietilamina, para dar, después de la precipitación en éter dietílico, el material que determinado por <sup>1</sup>H NMR consistía en una mezcla aproximadamente 1:1 de las especies di-maleimida y mono-maleimida deseadas.

45  $\delta$ H (CDCl<sub>3</sub>) 6.65 (4H, m), 4.2-3.2 (~3600H, brm), 3.31 (6H, s), 2.57 (4H, m).

## Ejemplo 3

50 3-Maleimidil-N-(2-{[3-(maleimidil)-propionil]-[2-(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-etil]-amino}-etil)-N-[2-(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-etil]-propionamida

Al ácido maleimido-propiónico en diclorometano (2 ml) se le agregó cloruro de oxalilo (2 ml) y después de 4.5 horas el solvente se eliminó completamente a presión reducida. A este cloruro de ácido crudo se le agregó producto intermedio 13 (116 mg, 2.9  $\mu$ mol) en diclorometano (2 ml) seguido de trietilamina (12 mg, 116  $\mu$ mol). Después de tres días se eliminó el solvente, el residuo se volvió a disolver en diclorometano (3 ml) y se agregó lentamente a éter dietílico (100 ml) agitado rápidamente. El precipitado blanco resultante se filtró, se lavó con éter dietílico, se volvió a disolver en diclorometano y se filtró. El solvente se eliminó después para obtener el producto en rendimiento cuantitativo como un sólido blanco ceroso.

60  $\delta$ H (CDCl<sub>3</sub>) 6.81 (1H, t), 6.78 (1H, t), 6.69,6.68 (4H, 2xs), 4.0-3.2 (~3600H, brm), 3.35 (6H, s), 2.72 (4H, m), (señales remanentes oscurecidas por la señal ancha del H<sub>2</sub>O).

## Ejemplo de referencia 4

Conjugado DiFab' del producto del ejemplo 1

5 ml de un Fab' obtenido por ingeniería genética que contenía un único tiol de la bisagra (véase por ejemplo US 5,677,425; WO 98/25971), a una concentración de 20 mg/ml en fosfato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 6, se redujo con un exceso molar de 20 veces de 2-mercaptoetilamina durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se eliminó al reductor por filtración en gel en cinco columnas PD10 en paralelo equilibradas en fosfato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 6. La concentración del Fab' reducido combinado se determinó por A280 (11.8 mg/ml) y después 40 mg del Fab' reducido se conjugaron con 20 mg del producto del ejemplo 1 (solución madre a una concentración de 50 mg/ml en fosfato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 6) durante 16 horas a temperatura ambiente. El grado de conjugación se evaluó por SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño. A 3.33 ml de la reacción de conjugación Fab':PEG se le agregaron 6.67 ml de agua destilada y 100 µl de ácido acético 1 M, y 10 ml de esto se cargaron en una columna HP C10 SP-sefarosa de 4 ml (GE Healthcare) equilibrada en acetato 50 mM, pH 4.5, a 2 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 16 ml de NaCl 0-250 mM en acetato 50 mM, pH 4.5. Se recogieron fracciones de 2 ml y las que contenían PEG-DiFab', según se evaluó por SDS-PAGE, se combinaron. Las fracciones combinadas se concentraron con cartuchos spin 10000 MWCO a 310 µl. Se cargaron 300 µl de esto en una columna de filtración en gel Superose 6 HR10/30 (GE Healthcare) equilibrada en acetato 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5.5, a 0.5 ml/min. La columna Superose 6 se eluyó con un gradiente isocrático de acetato 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5.5, a 0.5 ml/min. Se recogieron fracciones de 0.5 ml y las que contenían sólo PEG-DiFab' (Nº B7-B5), según se evaluó por SDS-PAGE, se combinaron. Las fracciones combinadas se concentraron con cartuchos spin 10000 MWCO a 100 µl. La concentración del PEG-DiFab' se determinó por A280 y la pureza se evaluó por SDS-PAGE reductora y no reductora.

Ejemplo de referencia 5  
Conjugado DiFab' del producto del ejemplo 2

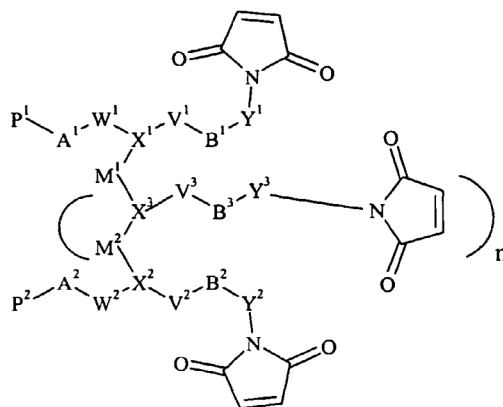
4 ml de un Fab' obtenido por ingeniería genética que contenía un único tiol de la bisagra (véase por ejemplo US 5,677,425; WO 98/25971), a una concentración de 20 mg/ml en fosfato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 6, se redujo con un exceso molar de 20 veces de 2-mercaptoetilamina durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se eliminó el reductor por filtración en gel en cuatro columnas PD10 en paralelo equilibradas en fosfato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 6. La concentración del Fab' reducido combinado se determinó por A280 (12.0 mg/ml) y después 22.77 mg del Fab' reducido se conjugaron con 4.8 mg del producto del ejemplo 2 durante 16 horas a temperatura ambiente. El grado de conjugación se evaluó por SDS-PAGE reductora y no reductora, y HPLC de exclusión por tamaño. La purificación del conjugado y el análisis igual que para el ejemplo 4

Ejemplo de referencia 6  
Conjugado DiFab' del producto del ejemplo 3

4 ml de un Fab' obtenido por ingeniería genética que contenía un único tiol de la bisagra (véase por ejemplo US 5,677,425; WO 98/25971), a una concentración de 20 mg/ml en fosfato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 6, se redujo con un exceso molar de 20 veces de 2-mercaptoetilamina durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se eliminó el reductor por filtración en gel en cuatro columnas PD10 en paralelo equilibradas en fosfato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 6. La concentración del Fab' reducido combinado se determinó por A280 (14.6 mg/ml) y después 14.2 mg por duplicado del Fab' reducido se conjugaron con 4 mg del producto del ejemplo 3 (solución madre a una concentración de 20 mg/ml en agua destilada) durante 16 horas a temperatura ambiente. El grado de conjugación se evaluó por SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño. Se combinaron las reacciones de conjugación Fab':PEG por duplicado y se les agregaron 7.56 ml de agua destilada y 100 µl de ácido acético 1 M. Se cargaron 9.7 ml de esto en una columna HP C10 SP-Sepharose de 4 ml (GE Healthcare) equilibrada en acetato 50 mM, pH 4.5, a 2 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 16 ml de NaCl 0-250 mM en acetato 50 mM, pH 4.5. Se recogieron fracciones de 2 ml y las que contenían PEG-DiFab', según se evaluó por SDS-PAGE, se combinaron. Las fracciones combinadas se concentraron con cartuchos spin 10000 MWCO a 260 µl. Se cargaron 200 µl de esto en una columna de filtración en gel Superose 6 HR10/30 (GE Healthcare) equilibrada en acetato 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5.5, a 0.5 ml/min. La columna Superose 6 se eluyó con un gradiente isocrático de acetato 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5.5, a 0.5 ml/min. Se recogieron fracciones de 0.5 ml, las que contenían sólo PEG-DiFab' según se evaluó por SDS-PAGE se combinaron. Las fracciones combinadas se concentraron con cartuchos spin 10000 MWCO a 570 µl. La concentración del PEG-DiFab' se determinó por A280 (3.5 mg/ml) y la pureza se evaluó por SDS-PAGE reductora y no reductora, ensayo de endotoxina y HPLC de exclusión por tamaño.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (III):



(III)

P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup> representan independientemente un residuo de polietilenglicol (PEG);  
 X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan independientemente CR<sup>1</sup> o N;  
 A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> representan independientemente -CONH-, o -NHCO-,  
 B<sup>1</sup>, B<sup>2</sup> y B<sup>3</sup> representan independientemente -CONH- o -CO-;  
 V<sup>1</sup>, V<sup>2</sup> y V<sup>3</sup> representan independientemente un enlace covalente o -(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>-;  
 W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> representan independientemente un enlace covalente o -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-;  
 Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup> e Y<sup>3</sup> representan independientemente -(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-;  
 M<sup>1</sup> y M<sup>2</sup> representan independientemente un enlace covalente o -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-;  
 R<sup>1</sup> representa hidrógeno o C<sub>1-4</sub> alquilo;  
 n es cero, 1 o 2;  
 v es 1, 2, 3 o 4;  
 w es 1, 2, 3 o 4;  
 y es 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y  
 m es 1, 2 o 3.

2. Un compuesto como el reivindicado en la reivindicación 1 donde R<sup>1</sup> es hidrógeno.

3. Un compuesto como el reivindicado en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde n es cero.

4. Un compuesto de fórmula (III) como el reivindicado en la reivindicación 1 seleccionado entre los siguientes:

N,N'-bis-[4-maleimidilbutil]-2,3-bis-(3-(metoxi-polietoxi)-propionilamino)-succinamida;  
 3-maleimidil-N-(2-[[3-maleimidil-propionil]-[2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil]-metil]-amino)-etil)-N-[(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-metil]-propionamida; y  
 3-maleimidil-N-(2-[[3-(maleimidil)-propionil]-[2-(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-etil]-amino)-etil)-N-[(2-(2-(metoxi-polietoxi)-etilcarbamoil)-etil)-propionamida.