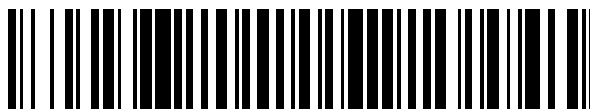


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 258**

51 Int. Cl.:

C08G 65/32 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2006** **E 06789107 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015** **EP 1922350**

54 Título: **Métodos para preparar reactivos poliméricos**

30 Prioridad:

29.07.2005 US 703709 P

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

18.02.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KOZLOWSKI, ANTONI;
MCKANNAN, JON y
MCMANUS, SAMUEL, P.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 529 258 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

Métodos para preparar reactivos poliméricos

5 Campo de la invención

Esta invención se relaciona con métodos para preparar polímeros hidrosolubles y no peptídicos ("reactivos poliméricos"), así como con composiciones de los mismos, conjugados, composiciones farmacéuticas y métodos de administración de composiciones farmacéuticas.

La materia objeto de la presente invención es definida en las reivindicaciones 1-24 adjuntas.

Antecedentes de la invención

Los científicos y los médicos clínicos se enfrentan a una serie de desafíos en sus intentos por desarrollar principios activos en formas adecuadas para administración a un paciente. Los principios activos proteicos, por ejemplo, son frecuentemente administrados por inyección más que por vía oral. De este modo, se introduce la proteína en la circulación sistémica sin exponerla al ambiente proteolítico del estómago.

La inyección de proteínas, sin embargo, presenta varios inconvenientes. Por ejemplo, muchas proteínas tienen una vida media relativamente corta, por lo que necesitan inyecciones repetidas, que con frecuencia resultan inconvenientes y dolorosas. Además, algunas proteínas pueden provocar una o más respuestas inmunes, con la consecuencia de que el sistema inmune del paciente intenta destruir o de algún otro modo neutralizar la proteína inmunogénica. Por supuesto, una vez que la proteína ha sido destruida o de algún otro modo neutralizada, ésta no puede ejercer su actividad farmacodinámica pretendida. Por lo tanto, la administración de principios activos tales como proteínas es con frecuencia problemática, incluso cuando estos agentes son administrados por inyección.

Se ha conseguido algún éxito al abordar los problemas de administración de principios activos mediante inyección. Por ejemplo, la conjugación de un principio activo con un polímero hidrosoluble ha dado como resultado un conjugado de polímero-principio activo que tiene una inmunogenicidad y una antigenicidad reducidas. Además, el conjugado de polímero-principio activo tiene con frecuencia una mayor vida media en comparación con su contrapartida no conjugada como resultado de una menor eliminación a través del riñón y/o de una menor degradación enzimática en la circulación sistémica. Como resultado de tener una mayor vida media, el conjugado de polímero-principio activo requiere una dosificación menos frecuente, lo que a su vez reduce el número global de inyecciones dolorosas y de visitas inconvenientes a un profesional de la salud. Además, principios activos que sólo eran ligeramente solubles demuestran un significativo aumento en la solubilidad en agua cuando se conjugan con un polímero hidrosoluble.

Debido a su documentada seguridad, así como a su aprobación por la FDA para uso tanto tópico como interno, se ha conjugado el polietilenglicol con principios activos. Cuando se conjugan un principio activo con un polímero de polietilenglicol o "PEG", se hace convencionalmente referencia al principio activo conjugado como "PEGilado". El éxito comercial de principios activos PEGilados tales como el interferón alfa-2a PEGilado PEGASYS® (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), el interferón alfa-2b PEGilado PEG-INTRON® (Schering Corp., Kenilworth, NJ) y el PEG-filgrastim NEULASTA™ (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) demuestra que la administración de una forma conjugada de un principio activo puede tener ventajas significativas sobre la contrapartida no conjugada. También se han PEGilado pequeñas moléculas, tales como diestearoilfosfatidiletanolamina (Zalipsky (1993), Bioconjug. Chem. 4(4): 296-299) y fluorouracilo (Ouchi *et al.* (1992), Drug Des. Discov. 9(1): 93-105). Harris *et al.* han proporcionado una revisión de los efectos de la PEGilación sobre los productos farmacéuticos. Harris *et al.* (2003), Nat. Rev. Drug Discov. 2(3): 214-221.

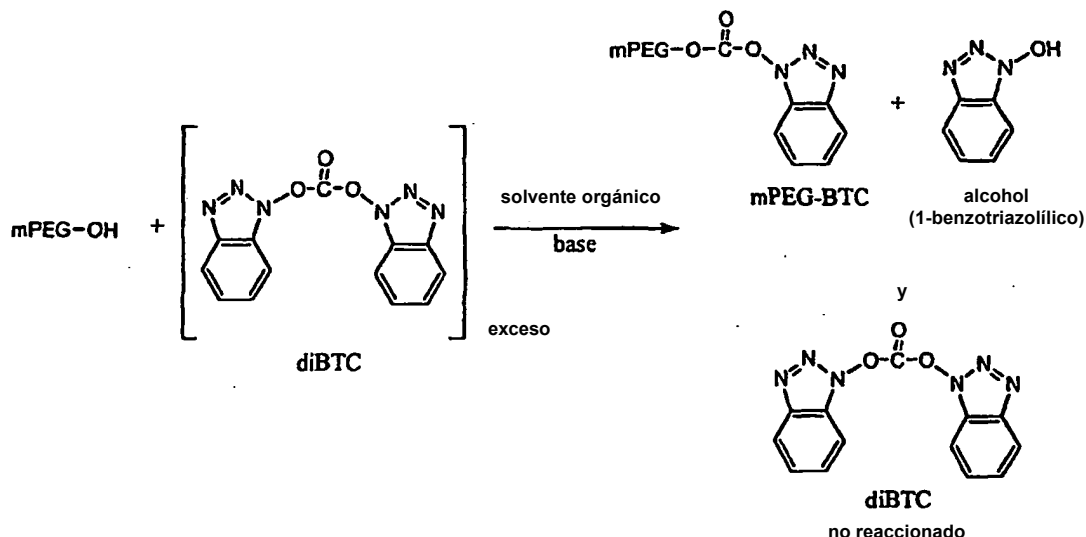
Típicamente, la formación de un conjugado conlleva la reacción entre un principio activo y un reactivo polimérico. Aunque se dispone de cantidades a pequeña escala de reactivos poliméricos de fuentes comerciales tales como Nektar Therapeutics, surge un problema cuando se requiere una escala comercial o de producción del reactivo polimérico. En particular, existe la preocupación de que no se pueda sintetizar el reactivo polimérico particular usado en la preparación del conjugado deseado (o un intermediario útil en la preparación del reactivo polimérico usado en la producción del conjugado deseado), en gran parte libre de impurezas potencialmente nocivas, de un modo puntual, eficaz y económico.

Por ejemplo, la síntesis convencional de polímeros portadores de un éster activo -- que pueden ser usados como reactivo polimérico y como intermediario útil en la preparación de otros reactivos poliméricos -- requiere un exceso de un reactivo de bajo peso molecular [tal como carbonato de di(1-benzotriazolilo)], el cual debe ser eliminado. Aunque complicada, la eliminación del reactivo de bajo peso molecular es necesaria para que el reactivo de bajo peso molecular no reaccione con otras moléculas, introduciendo así reacciones y productos colaterales no deseados que den lugar a un producto relativamente impuro y a un menor rendimiento.

En un enfoque para la preparación de polímeros portadores de un éster activo, la Patente Estadounidense N°

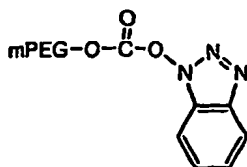
6.624.246 describe la síntesis de metoxipoli(etilenglicol) portador de un grupo carbonato de benzotriazol ("mPEG-BTC"). Tal como se describe en ella, el procedimiento efectivamente conlleva la formación de mPEG-BTC, seguida de purificación del mPEG-BTC para purificar la especie mPEG-BTC y eliminar el carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado y cualquier otro producto de bajo peso molecular (v.g., alcohol 1-benzotriazolílico). Tal como se describe en la Patente Estadounidense N° 6.624.246, la purificación de mPEG-BTC conlleva múltiples etapas de precipitación. A continuación, se proporciona un esquema del procedimiento.

A) Formación de mPEG-BTC



B) Purificación de mPEG-BTC

- destilar el solvente orgánico para formar un residuo de los tres productos
- volver a disolver los tres productos en cloruro de metileno
- añadir éter etílico, enfriar y formar un precipitado de



En la fabricación de mPEG-BTC donde la porción de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 20.000 Daltons, se usó un exceso ocho veces mayor de diBTC para conseguir una conversión del 100% de todo el mPEG-OH en mPEG-BTC. Aunque la gran cantidad de diBTC asegura una óptima conversión del mPEG-OH en mPEG-BTC, una cantidad relativamente grande de diBTC queda sin reaccionar y debe ser eliminada antes de llevar a cabo cualquier otra etapa sintética. De otro modo, el diBTC restante reaccionaría con cualquier grupo reactivo (v.g., grupo alcohol, grupo amina, etc.) encontrado e introduciría impurezas indeseadas y reduciría el rendimiento global.

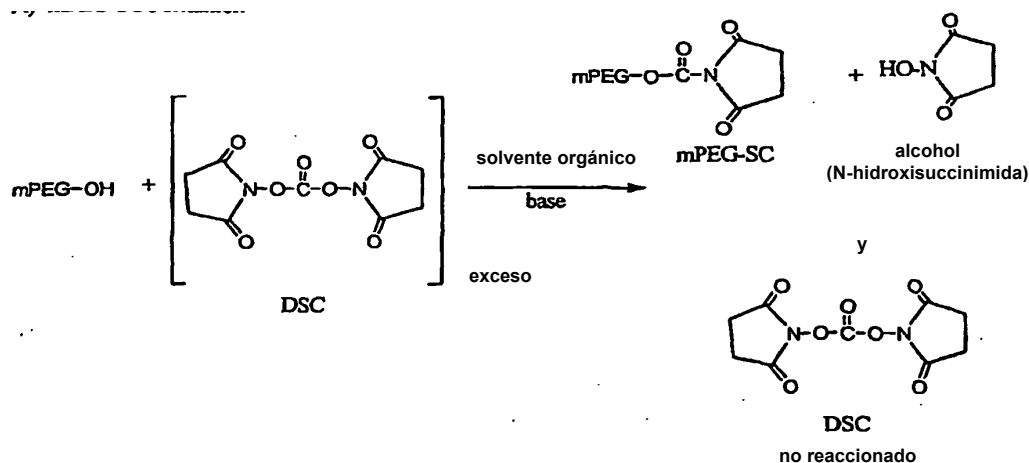
Tal como se describe en la Patente Estadounidense N° 5.932.462, el mPEG-BTC reaccionaba con lisina (portadora de dos grupos amino y un solo grupo ácido carboxílico), proporcionando así una estructura "ramificada con lisina", donde un residuo de mPEG se une a cada uno de los grupos amino y el ácido carboxílico está disponible para posterior funcionalización. Aunque es concebible consumir cualquier exceso de diBTC añadiendo un exceso de lisina, dicho enfoque tiene fallos por al menos dos razones. En primer lugar, tanto el diBTC como el mPEG-BTC "competirán" por los grupos amino disponibles de la lisina, dando así lugar a una mezcla de la estructura ramificada con lisina deseada y otra especie que tiene sólo un único residuo de mPEG, un único grupo BTC y un único ácido carboxílico. En segundo lugar, incluso aunque este enfoque tuviese éxito, no se abordarían situaciones en las que se desea un producto que contenga residuos diferentes de la lisina.

Se puede evitar tener un exceso de diBTC durante la reacción con lisina sólo destruyendo el exceso de diBTC procedente de la formación de mPEG-BTC durante la purificación del mPEG-BTC. Se puede substituir con alcohol isopropílico (IPA, isopropanol) el éter etílico para precipitar el mPEG-BTC de una solución en cloruro de metileno [es

decir, v.g., etapa B(c) en el esquema anterior]. Si se realiza este cambio, el IPA reacciona con el exceso de diBTC para formar isopropil-BTC, que es soluble en la mezcla de cloruro de metileno e IPA. Desafortunadamente, en tal operación a gran escala, algo de isopropil-BTC queda atrapado en el precipitado de mPEG-BTC. Dado que el isopropil-BTC competiría con el mPEG-BTC en cualquier reacción con lisina, el isopropil-BTC debe ser eliminado antes de que la fabricación pueda seguir su curso. Para eliminar el isopropil-BTC atrapado, se deben llevar a cabo una o dos etapas adicionales de "reprecipitación" para liberar al mPEG-BTC del isopropil-BTC. Como cada reprecipitación da alguna pérdida del producto mPEG-BTC ya que sólo se puede recuperar aproximadamente un 85-95% del sólido, este enfoque es costoso y requiere tiempo adicional.

En otro enfoque para la preparación de polímeros portadores de un éster activo, la Patente Estadounidense N° 5.281.698 describe la síntesis de metoxipoli(etilenglicol) portador de un grupo carbonato de succinimida ("mPEG-SC"). Como se describe en ella, el procedimiento efectivamente conlleva la formación de mPEG-SC, seguida de purificación del mPEG-SC para purificar la especie mPEG-SC y eliminar el carbonato de disuccinimidilo no reaccionado y cualquier otro producto de bajo peso molecular (v.g., N-hidroxisuccinimida). Tal como se describe en la Patente Estadounidense N° 5.281.698, la purificación de mPEG-SC conlleva filtración y múltiples etapas de precipitación. A continuación, se proporciona un esquema del procedimiento.

A) Formación de mPEG-SC



B) Purificación de mPEG-SC

- filtrar la mezcla de reacción
- destilar el solvente orgánico para formar un residuo de los tres productos
- volver a disolver los tres productos en cloruro de metileno
- añadir éter etílico, enfriar y formar un precipitado de mPEG-SC
- repetir la precipitación (etapas c y d) dos veces más

En la fabricación de mPEG-SC donde la porción de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 6.100 Daltons, se usó un exceso veinte veces mayor de DSC para conseguir una conversión del 100% de todo el mPEG-OH en mPEG-SC. Aunque la gran cantidad de DSC asegura una óptima conversión del mPEG-OH en mPEG-SC, una cantidad relativamente grande de DSC permanece sin reaccionar y debe ser eliminada antes de llevar a cabo cualquier otra etapa sintética. De otro modo, el resto de DSC reaccionaría con cualquier grupo reactivo (v.g., grupo alcohol, grupo amina, etc.) encontrado e introduciría impurezas no deseadas y reduciría el rendimiento global.

Por lo tanto, sigue necesitándose un método eficaz para eliminar el exceso de reactivos de bajo peso molecular, tales como diBTC y/o sus productos de degradación reactivos, de la misma mezcla de reacción a la que se añadió el reactivo de bajo peso molecular, dando así lugar a una reacción "en un solo recipiente". La presente invención se dirige a esta y otras necesidades de la técnica.

Resumen de la invención

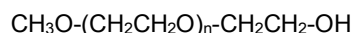
En una o más realizaciones, se proporciona un método sintético, consistiendo el método en:

(a) combinar una composición que contiene un polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo con una composición que contiene un reactivo de carbonato activado, eventualmente en presencia de un catalizador o base neutralizadora de ácidos, donde la composición que contiene el reactivo de carbonato activado es añadida de tal forma que haya un exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado; y

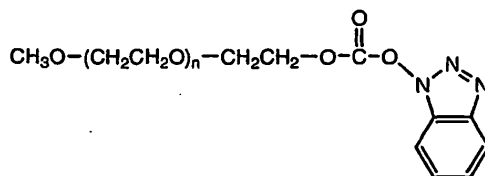
(b) añadir una composición que contiene una molécula reactiva a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado, donde la composición que contiene una molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el reactivo de carbonato activado no reaccionado.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método sintético, donde el método consiste en:

(a) combinar una composición que contiene un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo que tiene la siguiente estructura:



donde (n) es un número entero de 2 a aproximadamente 4.000, con una composición que contiene carbonato de di(1-benzotriazolilo), donde la composición que contiene el carbonato de di(1-benzotriazolilo) es añadida de tal forma que haya un exceso del carbonato de di(1-benzotriazolilo) en relación al polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble que tiene la siguiente estructura:

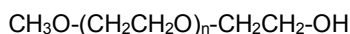


donde (n) es un número entero de 2 a aproximadamente 4.000, y carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado;

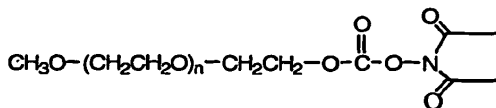
(b) añadir una composición que contiene una molécula reactiva a la composición que contiene el éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble y carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado, donde la composición que contiene el compuesto reactivo es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método sintético, donde el método consiste en:

(a) combinar una composición que contiene un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo que tiene la siguiente estructura:



donde (n) es un número entero de 2 a aproximadamente 4.000, con una composición que contiene carbonato de disuccinimidilo, donde la composición que contiene el carbonato de disuccinimidilo es añadida de tal forma que haya un exceso del carbonato de disuccinimidilo en relación al polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo, para obtener así una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble que tiene la siguiente estructura:

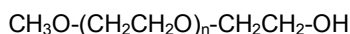


donde (n) es un número entero de 2 a aproximadamente 4.000, y carbonato de disuccinimidilo no reaccionado;

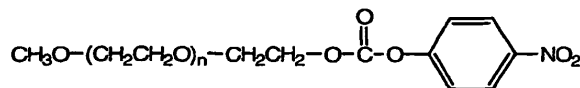
(b) añadir una composición que contiene una molécula reactiva a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y carbonato de disuccinimidilo no reaccionado, donde la composición que contiene la molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el carbonato de disuccinimidilo no reaccionado.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método sintético, donde el método consiste en:

(a) combinar una composición que contiene un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo que tiene la siguiente estructura:



donde (n) es un número entero de 2 a aproximadamente 4.000, con una composición que contiene cloroformiato de p-nitrofenilo, donde la composición que contiene el cloroformiato de p-nitrofenilo es añadida de tal forma que haya un exceso del cloroformiato de p-nitrofenilo en relación al polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo, para así obtener composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble que tiene la siguiente estructura:



donde (n) es un número entero de 2 a aproximadamente 4.000, y cloroformiato de p-nitrofenilo no reaccionado; (b) añadir una composición que contiene una molécula reactiva a la composición que contiene el éster de carbonato activo de polímero hidrosoluble y cloroformiato de p-nitrofenilo no reaccionado, donde la composición que contiene la molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el cloroformiato de p-nitrofenilo no reaccionado.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método sintético, donde el método consiste en:

hacer reaccionar un éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble preparado por

(i) combinación de una composición que contiene un polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo con una composición que contiene un reactivo de carbonato activado, eventualmente en presencia de un catalizador o de una base neutralizadora de ácido, donde la composición que contiene el reactivo de carbonato activado es añadida de tal forma que haya un exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado; y

(ii) añadir una composición que contiene una molécula reactiva a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado, donde la composición que contiene una molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el reactivo de carbonato activado no reaccionado,

con un principio activo en condiciones de conjugación, para así obtener un conjugado de polímero hidrosoluble-principio activo.

En una o más reacciones de un reactivo polimérico preparado por

(a) combinación de una composición que contiene un polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo con una composición que contiene un reactivo de carbonato activado, eventualmente en presencia de un catalizador o de una base neutralizadora de ácido, donde la composición que contiene el reactivo de carbonato activado es añadida de tal forma que haya un exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado;

(b) adición de una composición que contiene una molécula reactiva a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado, donde la composición que contiene una molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el reactivo de carbonato activado no reaccionado; y

(c) reacción del éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble en una o más reacciones para formar un reactivo polimérico con un principio activo en condiciones de conjugación, para así obtener un conjugado de polímero hidrosoluble-principio activo.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método sintético, donde el método consiste en:

hacer reaccionar un reactivo polimérico preparado por

(a) combinación de una composición que contiene un polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo con una composición que contiene un reactivo de carbonato activado, eventualmente en presencia de un catalizador o de una base neutralizadora de ácido, donde la composición que contiene el reactivo de carbonato activado es añadida de tal forma que haya un exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado;

(b) adición de una composición que contiene una molécula reactiva a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado, donde la

composición que contiene una molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el reactivo de carbonato activado no reaccionado; y
 (c) reacción del éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble en una o más reacciones para formar un reactivo polimérico

con un principio activo en condiciones de conjugación, para así obtener un conjugado de polímero hidrosoluble-principio activo.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método para preparar una composición que contiene un conjugado, donde el método consiste en combinar un éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble (o reactivo polimérico preparado a partir del mismo) preparado según un método sintético aquí descrito con un principio activo, para así obtener una composición que contiene un conjugado.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una composición que contiene un conjugado, siendo la composición el resultado del método de preparación de una composición que contiene un conjugado como se presenta aquí.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir una o más realizaciones de la presente invención con detalle, hay que entender que esta invención no se limita a los polímeros, reactivos y similares particulares, ya que éstos pueden variar.

Hay que indicar que, tal como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente algo diferente. Así, por ejemplo, la referencia a "un polímero" incluye un solo polímero, así como dos o más del mismo o de diferentes polímeros; la referencia a "un reactivo de carbonato activado" se refiere a un solo reactivo de carbonato activado, así como a dos o más del mismo o de diferentes agentes reactivos de carbonato activado, y similares.

Al describir y reivindicar la(s) presente(s) invención(es), se usará la siguiente terminología según las definiciones proporcionadas a continuación.

"PEG", "polietilenglicol" y "poli(etilenglicol)", tal como se usan aquí, son intercambiables. Típicamente, los PEG para uso según la invención comprenden la siguiente estructura: $-(OCH_2CH_2)_n-$, donde (n) es de 2 a 4.000. Tal como se usa aquí, PEG también incluye $-CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ y $-(OCH_2CH_2)_nO-$, dependiendo de si se han desplazado o no los oxígenos terminales. En toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, habría que recordar que el término "PEG" incluye estructuras que tienen diversos grupos terminales o "rematadores de extremos". El término "PEG" también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más de un 50%, de subunidades repetitivas $-OCH_2CH_2-$ o $-CH_2CH_2O-$. Con respecto a formas específicas, el PEG puede adoptar cualquier número de una variedad de pesos moleculares, así como estructuras o geometrías, tales como "ramificado", "lineal", "bifurcado", "multifuncional" y similares, que se describirán con mayor detalle más adelante.

Los términos "rematado en extremo" y "terminalmente rematado" son aquí utilizados indistintamente para referirse a un extremo o punto final de un polímero que tiene un resto rematador de extremo. Típicamente, aunque no de manera necesaria, el resto rematador de extremo comprende un grupo hidroxilo o alcoxi C_{1-20} , más preferiblemente un grupo alcoxi C_{1-10} y aún más preferiblemente un grupo alcoxi C_{1-5} . Así, como ejemplos de restos rematadores de extremo, se incluyen alcoxi (v.g., metoxi, etoxi y benciloxi), así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo y similares. Hay que recordar que el resto rematador de extremo puede incluir uno o más átomos del monómero terminal en el polímero [v.g., el resto rematador de extremo "metoxi" en $CH_3(OCH_2CH_2)_n-$]. Además, se contemplan formas saturadas, insaturadas, substituidas y no substituidas de cada uno de los anteriores. Más aún, el grupo rematador de extremo puede ser también un silano. El grupo rematador de extremo puede también incluir ventajosamente un marcaje detectable. Cuando el polímero tiene un grupo rematador de extremo que incluye un marcaje detectable, la cantidad o la localización del polímero y/o del resto (v.g., principio activo) al que se copula el polímero puede ser determinada usando un detector adecuado. Dichos marcajes incluyen, sin limitación, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, restos usados en marcaje enzimático, restos colorimétricos (v.g., colorantes), iones metálicos, restos radiactivos y similares. Como detectores adecuados, se incluyen fotómetros, películas, espectrómetros y similares. El grupo rematador de extremo puede también incluir ventajosamente un fosfolípido. Cuando el polímero tiene un grupo rematador de extremo que incluye un fosfolípido, se imparten propiedades únicas al polímero y al conjugado resultante. Como ejemplos de fosfolípidos, se incluyen, sin limitación, los seleccionados entre la clase de fosfolípidos llamados fosfatidilcolinas. Como fosfolípidos específicos, se incluyen, sin limitación, los seleccionados entre el grupo consistente en dilauroilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diesteroilfosfatidilcolina, behenoilfosfatidilcolina, araquidilfosfatidilcolina y lecitina.

"No natural" con respecto a un polímero como aquí se describe significa un polímero que en su totalidad no se encuentra en la naturaleza. Un polímero no natural puede contener, sin embargo, uno o más monómeros o segmentos de monómeros naturales, siempre que la estructura global del polímero no se encuentre en la naturaleza.

El término "hidrosoluble", como en un "polímero hidrosoluble", se refiere a cualquier polímero que sea soluble en agua a temperatura ambiente. Típicamente, un polímero hidrosoluble transmitirá al menos aproximadamente un 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95%, de la luz transmitida por la misma solución después de filtrar. En base al peso, un polímero hidrosoluble será preferiblemente al menos aproximadamente un 35% (en peso) soluble en agua, más preferiblemente al menos aproximadamente un 50% (en peso) soluble en agua, aún más preferiblemente aproximadamente un 70% (en peso) soluble en agua y aún más preferiblemente aproximadamente un 85% (en peso) soluble en agua. Es más preferido, sin embargo, que el polímero hidrosoluble sea aproximadamente un 95% (en peso) soluble en agua o completamente soluble en agua.

El peso molecular en el contexto de un polímero hidrosoluble, tal como el PEG, puede ser expresado como un peso molecular medio numérico o un peso molecular medio ponderal. A menos que se indique algo diferente, todas las referencias que aquí se dan al peso molecular se refieren al peso molecular medio ponderal. Ambas determinaciones del peso molecular, medio numérico y medio ponderal, pueden ser medidas usando cromatografía de permeación por gel u otras técnicas de cromatografía líquida. También se pueden usar otros métodos para medir los valores del peso molecular, tales como el uso de análisis de grupos finales o la medición de las propiedades coligativas (v.g., depresión del punto de congelación, elevación del punto de ebullición o presión osmótica) para determinar el peso molecular medio numérico, o el uso de técnicas de dispersión de la luz, ultracentrifugación o viscometría para determinar el peso molecular medio ponderal. Los polímeros de la invención son típicamente polidispersos (es decir, que el peso molecular medio numérico y el peso molecular medio ponderal de los polímeros no son iguales), poseyendo bajos valores de polidispersidad, de preferiblemente menos de aproximadamente 1,2, más preferiblemente menos de aproximadamente 1,15, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1,10, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1,05 y más preferiblemente menos de aproximadamente 1,03. Tal como se usan aquí, a veces se harán referencias a un solo polímero hidrosoluble que tiene o bien un peso molecular medio ponderal o bien un peso molecular medio numérico; se entenderá que dichas referencias significan que el único polímero hidrosoluble fue obtenido a partir de una composición de polímeros hidrosolubles que tienen el peso molecular indicado.

Los términos "activo" o "activado", cuando se usan conjuntamente con un grupo funcional particular, se refieren a un grupo funcional reactivo que reacciona fácilmente con un electrófilo o un nucleófilo sobre otra molécula. Esto contrasta con aquellos grupos que requieren potentes catalizadores o condiciones de reacción altamente imprácticas para reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

Tal como se usa aquí, el término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo pretende abarcar sus formas protegidas, así como sus formas no protegidas.

Los términos "resto espaciador", "unión" o "conector" son aquí utilizados para referirse a un átomo o una colección de átomos usados para unir restos de interconexión, tales como un extremo de un polímero y un principio activo o un electrófilo o nucleófilo de un principio activo. El resto espaciador puede ser hidrolíticamente estable o puede incluir una unión fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

"Alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada, típicamente de aproximadamente 1 a 15 átomos de longitud. Dichas cadenas hidrocarbonadas son preferiblemente, aunque no necesariamente, saturadas y pueden ser cadenas ramificadas o lineales, aunque típicamente se prefieren las cadenas lineales. Como ejemplos de grupos alquilo, se incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo y similares. Tal como se usa aquí, "alquilo" incluye cicloalquilo, así como alquilo que contiene cicloalquilenos.

"Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y puede ser de cadena lineal o ramificado. Como ejemplos no limitativos de alquilo inferior, se incluyen metilo, etilo, *n*-butilo, *i*-butilo y *t*-butilo.

"Cicloalquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada cíclica saturada o insaturada, incluyendo compuestos cíclicos con puentes, fusionados o espiro, preferiblemente constituidos por de 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8 átomos de carbono. "Cicloalquilenos" se refiere a un grupo cicloalquilo que se inserta en una cadena de alquilo por unión de la cadena en cualesquiera dos carbonos del sistema de anillo cíclico.

"Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R, donde R es alquilo, alquilo sustituido [preferiblemente alquilo C₁₋₆ (v.g., metoxi, etoxi, propiloxi, etc.) o alquilo sustituido C₁₋₆], arilo o arilo sustituido.

El término "sustituido", como en, por ejemplo, "alquilo sustituido", se refiere a un resto (v.g., un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes que no interfieren, tales como, aunque sin limitación: alquilo, cicloalquilo C₃₋₈, v.g., ciclopropilo, ciclobutilo y similares; halo, v.g., fluoro, cloro, bromo y yodo; ciano; alcoxi; fenilo inferior; fenilo sustituido; nitro, y similares. "Arilo sustituido" es arilo que tiene uno o más sustituyentes que no interfieren. Para las sustituciones sobre un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta o para).

"Sustituyentes que no interfieren" son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, son

típicamente no reactivos con otros grupos funcionales contenidos en la molécula.

"Ariolo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 ó 6 átomos de carbono en el núcleo. Ariolo incluye múltiples anillos de ariolo que pueden estar fusionados, como en el naftilo, o sin fusionar, como en el bifenilo. Los anillos de ariolo pueden también estar fusionados o sin fusionar con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, de heteroarilo o heterocíclicos. Tal como se usa aquí, "arilo" incluye heteroarilo.

"Heteroarilo" es un grupo ariolo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, preferiblemente azufre, oxígeno o nitrógeno o una combinación de éstos. Los anillos de heteroarilo pueden también estar fusionados con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, heterocíclicos, de ariolo o de heteroarilo.

"Heterociclo" o "heterocíclico" significa uno o más anillos de 5-12 átomos, preferiblemente de 5-7 átomos, con o sin insaturación o carácter aromático, y que tienen al menos un átomo de anillo que no es un carbono. Como heteroátomos preferidos, se incluyen azufre, oxígeno y nitrógeno.

"Heteroarilo sustituido" es heteroarilo que tiene uno o más grupos que no interfieren como sustituyentes.

"Heterociclo sustituido" es un heterociclo que tiene una o más cadenas laterales formadas a partir de sustituyentes que no interfieren.

Un "radical orgánico", tal como se usa aquí, incluirá alquilo, alquilo sustituido, ariolo y ariolo sustituido.

"Electrófilo" y "grupo electrofílico" se refieren a un ion o un átomo o una colección de átomos que pueden ser iónicos y que tienen un centro electrofílico, es decir, un centro que busca electrones, capaz de reaccionar con un nucleófilo.

"Nucleófilo" y "grupo nucleofílico" se refieren a un ion o un átomo o una colección de átomos que pueden ser iónicos y que tienen un centro nucleofílico, es decir, un centro que busca un centro electrofílico o que es capaz de reaccionar con un electrófilo.

Un enlace "fisiológicamente escindible" o "hidrolizable" es un enlace que reacciona con agua (es decir, que se hidroliza) en condiciones fisiológicas. Se prefieren enlaces que tienen una vida media de hidrólisis a pH 8 y a 25°C de menos de aproximadamente 30 minutos. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo general de unión que conecta dos átomos dados, sino también de los sustituyentes unidos a estos dos átomos dados. Como uniones hidrolíticamente inestables o débiles apropiadas, se incluyen, aunque sin limitación, éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, éter aciloxialquílico, imina, ortoéster, péptido y oligonucleótido.

Una "unión enzimáticamente degradable" significa una unión que está sujeta a degradación por una o más enzimas.

Una unión o enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es substancialmente estable en agua, es decir, que no sufre hidrólisis en condiciones fisiológicas en ningún grado apreciable a lo largo de un prolongado período de tiempo. Como ejemplos de uniones hidrolíticamente estables, se incluyen, aunque sin limitación, las siguientes: enlaces carbono-carbono (v.g., en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretano y similares. En general, una unión hidrolíticamente estable es una que exhibe una velocidad de hidrólisis de menos de aproximadamente un 1-2% al día en condiciones fisiológicas. Se pueden encontrar las velocidades de hidrólisis de enlaces químicos representativos en la mayoría de los libros de texto de química estándar.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que puede ser eventualmente incluido en una composición y que no causa efectos toxicológicos adversos significativos a un paciente tras su administración.

Se usa aquí "cantidad terapéuticamente efectiva" para indicar la cantidad de un conjugado que se necesita para proporcionar un nivel deseado del conjugado (o del principio activo no conjugado correspondiente) al torrente sanguíneo o al tejido diana. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, v.g., el principio activo particular, los componentes y las características físicas de la composición terapéutica, la población de pacientes a la que se destina, el modo de administración, las consideraciones sobre el paciente individual y similares, y puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica.

"Multifuncional" significa un polímero que tiene tres o más grupos funcionales contenidos en el mismo, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes. Los reactivos poliméricos multifuncionales contendrán típicamente aproximadamente 3-100 grupos funcionales, o 3-50 grupos funcionales, o 3-25 grupos funcionales, o 3-15 grupos funcionales, o 3-10 grupos funcionales, o contendrán 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos funcionales en el esqueleto polimérico.

"Eventual" o "eventualmente" significa que la circunstancia a continuación descrita puede producirse o no, de tal forma que la descripción incluye casos en los que se produce la circunstancia y casos en los que no.

"Substancialmente" (a menos que se defina específicamente para un contexto particular en cualquier otro lugar o que el contexto dicte claramente algo diferente) significa casi totalmente o completamente, por ejemplo, que satisface uno o más de los siguientes: más de un 50%, un 51% o superior, un 75% o superior, un 80% o superior, un 90% o superior y un 95% o superior de la condición.

La expresión "substancialmente no acuoso" significa una composición o un medio de reacción: (i) que tiene menos de 10.000 partes por millón de agua (menos de un 1%), más preferiblemente que tiene menos de 1.000 partes por millón de agua (menos de un 0,1%), aún más preferiblemente menos de 100 partes por millón de agua (menos de un 0,01%), aún más preferiblemente menos de 10 partes por millón de agua (menos de un 0,001%). Preferiblemente, aunque no necesariamente, las condiciones substancialmente no acuosas incluyen una atmósfera inerte.

El término "consumido", tal como se usa aquí, se referirá a la neutralización de un reactivo de carbonato activado no reaccionado [tal como carbonato de di(1-benzotriazolilo)] usando una molécula reactiva, que puede ser eventualmente un resto unido sobre una resina o columna, para destruir químicamente todo o la mayor parte del reactivo de carbonato activado no reaccionado en un procedimiento químico.

"Un solo recipiente", como en un método sintético de un solo recipiente, significa que los productos de una reacción anterior no necesitan ser aislados antes de llevar a cabo una reacción posterior.

A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "combinar", como en "combinar" dos o más composiciones entre sí como parte de un método sintético, no está limitado con respecto al orden de adición.

Un "carbonato activado" incluye diBTC, así como carbonato de di(1-benzotriazolilo) (BTC), carbonato de disuccinimidilo ("DSC"), haloformiato de p-nitrofenilo, oxalato de disuccinimidilo y trifosgeno, incluso aunque uno o más de los compuestos puedan no ser "carbonatos" verdaderos (donde halo es seleccionado entre el grupo consistente en fluoro, cloro, bromo y yodo) y sustituciones alcoxi de uno o de los dos restos de benzotriazolilo en el diBTC. Un carbonato activado debe, sin embargo, dar lugar a un polímero hidrosoluble acabado en uretano, carbonato o tiocarbonato activado tras reacción con un polímero hidrosoluble acabado en amina, acabado en hidroxilo o acabado en tiol. Un polímero hidrosoluble acabado en uretano, carbonato o tiocarbonato activado, a su vez, es un polímero hidrosoluble acabado en uretano, carbonato o tiocarbonato que puede reaccionar con una proteína o con un reactivo para dar un polímero hidrosoluble acabado en un grupo reactivo.

A menos que el contexto dicte claramente algo diferente, cuando el término "aproximadamente" precede a un valor numérico, se entiende que el valor numérico significa $\pm 10\%$ del valor numérico indicado.

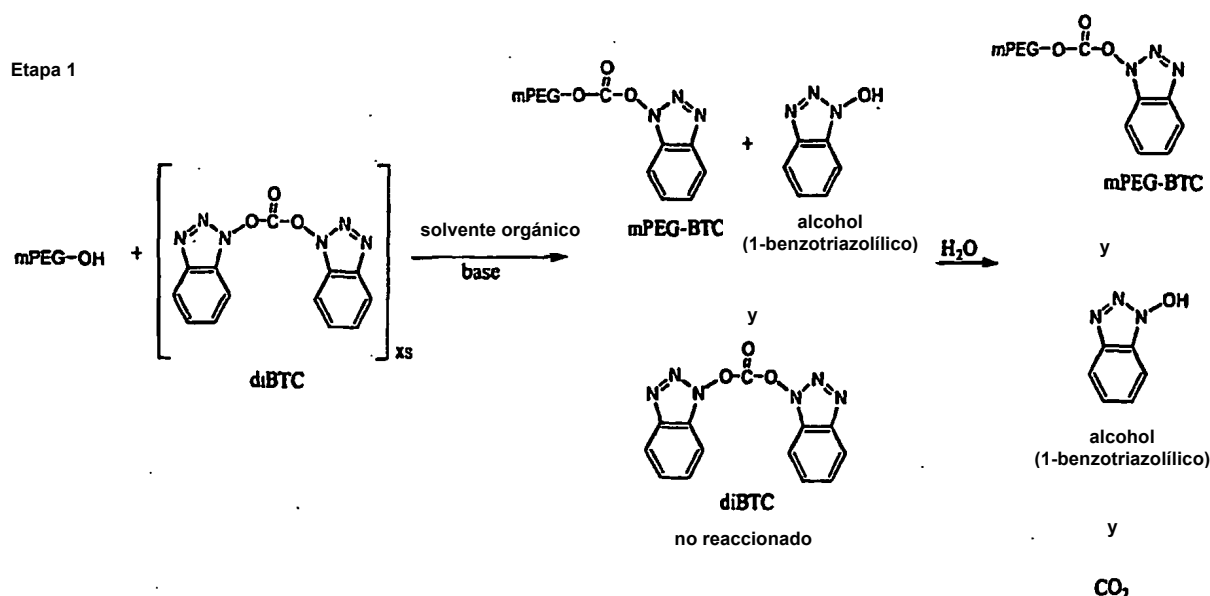
Etapas del método sintético

El método sintético incluye las siguientes etapas:

- (a) combinar una composición que comprende un polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo con una composición que comprende un reactivo de carbonato activado, eventualmente en presencia de un catalizador o de una base neutralizadora de ácido, donde la composición que comprende el reactivo de carbonato activado es añadida de tal forma que haya un exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que comprende un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado; y
- (b) añadir una composición que comprende una molécula reactiva a la composición que comprende el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado, donde la composición que comprende una molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el reactivo de carbonato activado no reaccionado.

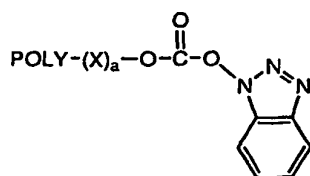
La etapa de combinación da lugar a la formación de, entre otras cosas, una composición que comprende un polímero hidrosoluble acabado en uretano, carbonato o tiol activo. Se forma un polímero hidrosoluble acabado en uretano cuando se usa una composición que comprende un polímero hidrosoluble acabado en amina. Se forma un polímero hidrosoluble acabado en carbonato cuando se usa una composición que comprende un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo. Se forma un polímero hidrosoluble acabado en tiocarbonato cuando se usa un polímero hidrosoluble acabado en tiol. Se hará referencia a cada uno de estos polímeros hidrosolubles así formados (es decir, el polímero hidrosoluble acabado en uretano, el polímero hidrosoluble acabado en carbonato y el polímero hidrosoluble acabado en tiocarbonato) preparados como parte de los métodos aquí facilitados como un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble.

A continuación, se presenta esquemáticamente el método de la invención, donde se usa una composición que comprende el polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo mPEG-OH, el reactivo de carbonato activado es carbonato de di(1-benzotriazolilo), el éster de carbonato activo resultante es mPEG-BTC y la molécula reactiva es agua.

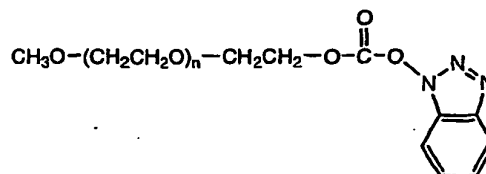


Así, en un enfoque ejemplar, el método consiste en

- 5 a) combinar una composición que comprende un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo de la siguiente estructura: POLI-(X)_a-OH, donde POLI es un polímero hidrosoluble, X (cuando está presente) es un resto espaciador eventual y (a) es cero o uno [preferiblemente, POLI-(X)_a-OH es CH₃O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH], con una composición que comprende carbonato de di(1-benzotriazolilo), donde la composición que comprende el carbonato de di(1-benzotriazolilo) es añadida de tal forma que haya un exceso del di(1-benzotriazolilo) en relación al polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que comprende un éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble que tiene la siguiente estructura:



donde POLI, X y (a) son como se ha definido previamente, preferiblemente



- 15 donde (n) es un número entero de 2 a aproximadamente 4.000, y carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado (e hidroxibenzotriazol liberado);
- b) añadir agua a la composición que comprende el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado, donde el agua es añadida de tal forma que se consuma substancialmente todo el reactivo de carbonato activado no reaccionado.

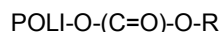
El método puede ser ventajosamente llevado a cabo como una síntesis en "un solo recipiente". Además, el método no requiere una etapa de precipitación para eliminar el reactivo de carbonato activado, como se requiere en el método desvelado en la Patente Estadounidense N° 6.624.246. Sin embargo, si este reactivo de carbonato activado es el reactivo deseado, éste puede ser aislado por precipitación.

Eventualmente, el método incluye además la reacción del éster de carbonato activado de un polímero hidrosoluble (tal como mPEG-BTC) en una o más reacciones para formar un reactivo polimérico diferente. Habiendo formado un reactivo polimérico, es posible hacer reaccionar al reactivo polimérico con un principio activo en condiciones de conjugación, para así obtener un conjugado de polímero hidrosoluble-principio activo. Aunque se puede usar el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble (tal como mPEG-BTC) como intermediario en la formación de un reactivo polimérico, es también posible usar el propio éster de carbonato activo (tal como mPEG-BTC) como reactivo polimérico en una reacción de conjugación.

Con objeto de recuperar ésteres de carbonato activos de polímeros hidrosolubles, es típico añadir un exceso de un

no solvente. Como ejemplos de no solventes, se incluyen alcohol isopropílico, éter dietílico, MTBE, heptano, THF, hexano y sus combinaciones.

En una o más realizaciones de la invención, el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble tendrá una estructura de la fórmula siguiente:



donde:

POLI es un polímero hidrosoluble y

R es un radical orgánico, con la condición de que, cuando POLI es un poli(etilenglicol) rematado con metilo lineal, el polietilenglicol rematado con metilo lineal tenga un peso molecular de al menos 103.

Como ejemplos de moléculas reactivas para uso en el método, se incluyen moléculas nucleofílicas, tales como agua, alcoholes monohídricos de alquilo inferior (tales como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, etc.), aminas monobásicas de alquilo inferior y resinas portadoras de grupos carboxilato, hidroxilo, tiol o amina reactivos unidos (mediante, por ejemplo, un gel de amina, tal como un gel de amina Duolite A-7). Ventajosamente, dicha resina puede formar parte de una columna a través de la cual se puede pasar una composición portadora de reactivo de carbonato activado no reaccionado para efectuar la etapa de "adición de una composición que comprende una molécula reactiva a la composición que comprende un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado". Se prefiere, sin embargo, que la molécula reactiva sea agua. El agua puede ser añadida directamente. Además, el agua puede ser añadida mediante un resto que libere agua, tal como una sal hidratada.

En una o más realizaciones del método, se produce la formación de dióxido de carbono al consumirse substancialmente el reactivo de carbonato activado no reaccionado.

La etapa de combinación requiere una composición que comprende un polímero hidrosoluble acabado en amina, acabado en hidroxilo o acabado en tiol. Tal como se usa aquí, un "polímero hidrosoluble acabado en amina, acabado en hidroxilo o acabado en tiol" es cualquier polímero hidrosoluble que lleve al menos un grupo amina ("NH₂") o grupo hidroxilo ("OH") o grupo tiol ("SH"), independientemente de si el grupo amina, el grupo hidroxilo o el grupo tiol se localiza realmente en un extremo del polímero hidrosoluble. De hecho, el grupo amina ("NH₂") o el grupo hidroxilo ("OH") o el grupo tiol ("SH") pueden unirse a un grupo aromático.

La etapa de combinación también requiere una composición que comprende un reactivo de carbonato activado. El reactivo de carbonato activado usado en el método es típicamente, aunque no necesariamente, seleccionado entre el grupo consistente en carbonato de di(1-benzotriazolilo) (BTC), carbonato de disuccinimidilo ("DSC"), cloroformiato de p-nitrofenilo, cloroformiato de triclorofenilo, carbonato de p-nitrofenilsuccinimidilo, carbonato de p-nitrofenil-1-benzotriazolilo, cloroformiato de pentafluorofenilo, 1,1'-carbonildiimidazol, oxalato de disuccinimidilo y trifosgeno. En ciertos casos, el reactivo de carbonato activado tiene una estructura de una de las siguientes fórmulas: R-O(C=O)-OR, R-O(C=O)-OR' y R-O(C=O)X, donde R es un radical orgánico, R' es un radical orgánico diferente de R y X es Cl, Br o I.

El exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo representa uno o más de los siguientes: un exceso al menos aproximadamente 5% mol, un exceso al menos aproximadamente 50% mol, un exceso al menos aproximadamente dos molar, un exceso al menos aproximadamente cuatro molar y un exceso al menos aproximadamente ocho molar.

El método para preparar ésteres de carbonato activo de polímeros hidrosolubles tiene utilidad para, entre otras cosas, proporcionar un intermediario que es útil en la formación de reactivos poliméricos, como se discute en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses N° 6.624.246 y N° 5.932.462.

La etapa de combinación es típicamente llevada a cabo en condiciones substancialmente no acuosas. Además, se usan composiciones basadas en solventes apróticos en los métodos sintéticos. Además, el enfoque sintético es frecuentemente realizado en su totalidad bajo una atmósfera inerte, tal como argón.

Una o más de las etapas del método son llevadas a cabo en un solvente orgánico. Aunque se puede usar cualquier solvente orgánico y la invención no está limitada en este sentido, como ejemplos de solventes orgánicos se incluyen aquellos solventes seleccionados entre el grupo consistente en hidrocarburos alifáticos halogenados, alcoholes, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos aromáticos halogenados, éteres, éteres cíclicos y sus combinaciones. Como ejemplos de solventes orgánicos preferidos, se incluyen los seleccionados entre el grupo consistente en cloruro de metileno (diclorometano), cloroformo, octanol, tolueno, metil t-butil éter, tetrahidrofurano, acetato de etilo, carbonato de dietilo, acetona, acetonitrilo, DMF, DMSO, dimetilacetamida, N-ciclohexilpirrolidinona, ciclohexano y sus combinaciones.

Método para preparar una composición que contiene un conjugado

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método para preparar una composición que contiene un conjugado, consistiendo el método en combinar un principio activo con un éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble (o un reactivo polimérico que fue preparado usando dicho éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble), para así obtener una composición que contiene un conjugado. Así, se incluyen en la invención métodos para preparar composiciones que contienen conjugados.

Composiciones que contienen conjugados

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una composición que contiene un conjugado, siendo la composición el resultado del método consistente en combinar un principio activo con un éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble (o un reactivo polimérico que fue preparado usando dicho éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble) como aquí se indica.

Así, se incluyen en la invención composiciones que contienen conjugados. Se piensa que las composiciones (tanto composiciones de conjugados como composiciones de reactivos) tienen una mayor pureza que la obtenida con los métodos previamente conocidos, y también que se preparan más eficazmente.

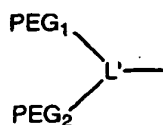
Polímero hidrosoluble ("POLI")

Tal como se usa aquí, el término "polímero hidrosoluble" incluye aquellos polímeros hidrosolubles que son biocompatibles y no inmunogénicos y excluye específicamente cualquier segmento de polímero hidrosoluble que no sea biocompatible y no inmunogénico. Con respecto a la biocompatibilidad, se considera que una sustancia es biocompatible si los efectos beneficiosos asociados al uso de la sustancia sola o con otra sustancia (v.g., principio activo) en relación a los tejidos vivos (v.g., administración a un paciente) superan a cualquier efecto nocivo, según la evaluación de un clínico, v.g., un médico. Con respecto a la no inmunogenicidad, se considera que una sustancia no es inmunogénica si el uso pretendido de la sustancia *in vivo* no produce una respuesta inmunológica indeseada (v.g., la formación de anticuerpos), o, si se produce una respuesta inmunológica, no se considera que dicha respuesta sea clínicamente significativa o importante, según la evaluación de un clínico. Se prefiere particularmente que los segmentos de polímeros hidrosolubles aquí descritos, así como los conjugados, sean biocompatibles y no inmunogénicos.

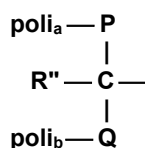
Al hacer referencia al polímero, hay que entender que el polímero puede ser cualquiera de una serie de polímeros hidrosolubles y no peptídicos, tales como los aquí descritos como adecuados para uso en la presente invención. Preferiblemente, el polímero es poli(etilenglicol) (es decir, PEG). El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de una serie de geometrías o formas, incluyendo formas lineales, formas ramificadas o de múltiples brazos (v.g., PEG bifurcado o PEG unido a un núcleo de poliol), PEG pendiente o PEG con uniones degradables en el mismo, que serán más ampliamente descritas a continuación.

El número de grupos funcionales llevados por el polímero y la posición de los grupos funcionales pueden variar. Típicamente, el polímero tendrá de 1 a aproximadamente 25 grupos funcionales, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos funcionales. Los polímeros lineales, tales como polímeros de PEG, tendrán típicamente uno o dos grupos funcionales situados en el extremo de la cadena polimérica. Si el polímero de PEG es monofuncional (es decir, mPEG), el polímero incluirá un solo grupo funcional. Si el polímero de PEG es difuncional, el polímero puede contener dos grupos funcionales independientemente seleccionados, uno en cada extremo de la cadena polimérica. Como se entenderá, los polímeros de múltiples brazos o ramificados pueden tener un número mayor de grupos funcionales.

También se pueden usar moléculas de PEG de múltiples brazos o ramificadas, tales como las descritas en la Patente Estadounidense N° 5.932.462, aquí incorporada como referencia en su totalidad, como polímero de PEG. Hablando en general, un polímero de múltiples brazos o ramificado posee dos o más "brazos" poliméricos que se extienden desde un punto de ramificación central. Por ejemplo, un polímero de PEG ramificado ejemplar tiene la estructura:

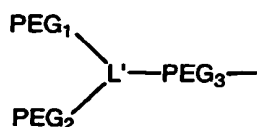


donde PEG₁ y PEG₂ son polímeros de PEG en cualquiera de las formas o geometrías aquí descritas, y pueden ser iguales o diferentes, y L' es una unión hidrolíticamente estable. Un PEG ramificado ejemplar tiene la estructura:



donde poli_a y poli_b son esqueletos de PEG, tales como metoxipoli(etilenglicol); R'' es un resto no reactivo, tal como H, metilo o un esqueleto de PEG; y P y Q son uniones no reactivas. En una realización preferida, el polímero de PEG ramificado es lisina disustituida con metoxipoli(etilenglicol). Para los presentes fines, una estructura de múltiples brazos incluirá tres o más ramas, mientras que una estructura ramificada incluirá sólo dos ramas.

La estructura de PEG ramificada puede estar unida a una tercera cadena de oligómero o polímero como se muestra a continuación:

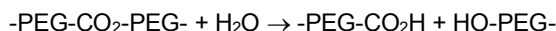


donde PEG_3 es una tercera cadena de oligómero o polímero de PEG, que puede ser igual o diferente de PEG_1 y PEG_2 .

El polímero de PEG puede incluir de manera alternativa un PEG bifurcado. Hablando en general, un polímero que tiene una estructura bifurcada se caracteriza por tener una cadena polimérica unida a dos o más grupos funcionales mediante uniones covalentes que se extiende desde un punto de ramificación hidrolíticamente estable en el polímero. Un ejemplo de PEG bifurcado está representado por PEG-YCHZ_2 , donde Y es un grupo de unión y Z es un grupo terminal activado para unión covalente a un principio biológicamente activo. El grupo Z se une a CH por una cadena de átomos de longitud definida. La Patente Estadounidense N° 6.362.254 desvela diversas estructuras de PEG bifurcadas capaces de ser utilizadas en la presente invención. La cadena de átomos que une los grupos funcionales Z (v.g., grupos hidroxilo) al átomo de carbono de la ramificación sirve como grupo de unión y puede comprender, por ejemplo, una cadena de alquilo, una unión éter, una unión éster, una unión amida o sus combinaciones.

El polímero de PEG puede comprender una molécula de PEG pendiente con grupos reactivos (v.g., grupos hidroxilo) covalentemente unidos a lo largo del esqueleto de PEG más que en el extremo de la cadena de PEG. Los grupos reactivos pendientes pueden unirse al esqueleto de PEG directamente o a través de un resto de unión, tal como un grupo alquileo.

Además de las formas antes descritas de PEG, el polímero puede ser también preparado con una o más uniones hidrolíticamente estables o degradables en el esqueleto polimérico, incluyendo cualquiera de los polímeros antes descritos. Por ejemplo, el PEG puede ser preparado con uniones éster en el esqueleto polimérico que están sujetas a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis da lugar a escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular:



Otras uniones hidrolíticamente degradables, útiles como unión degradable en un esqueleto polimérico, incluyen uniones carbonato; uniones imina resultantes, por ejemplo, de la reacción de una amina y un aldehído (véase, v.g., Ouchi *et al.*, Polymer Preprints, 38(1): 582-3 (1997)); uniones éster fosfato formadas, por ejemplo, por reacción de un alcohol con un grupo fosfato; uniones hidrazona, que se forman típicamente por reacción de una hidrazida y un aldehído; uniones acetal, que se forman típicamente por reacción entre un aldehído y un alcohol; uniones orto-éster, que se forman, por ejemplo, por reacción entre derivados ácidos y un alcohol; y uniones oligonucleotídicas formadas, por ejemplo, por un grupo fosforamídita, v.g., en el extremo de un polímero, y un grupo 5' hidroxilo de un oligonucleótido. El uso de muchas de las uniones degradables antes descritas es menos preferido debido a la reactividad nucleofílica de muchas de las uniones inestables con grupos amina.

Los expertos en la técnica entienden que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las formas anteriores de PEG.

También se puede usar cualquiera de una variedad de otros polímeros que comprenden otras cadenas poliméricas no peptídicas e hidrosolubles en la presente invención. El polímero puede ser lineal o puede estar en cualquiera de las formas antes descritas (v.g., ramificada, bifurcada y similares). Como ejemplos de polímeros adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, otros poli(alquilenglicoles), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(ácido α -hidroxiacético), poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolin, poli(N-

acrilolmorfina), tal como se describe en la Patente Estadounidense N° 5.629.384, y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos.

Aunque el peso molecular del polímero hidrosoluble puede variar dependiendo de la aplicación deseada, de la configuración de la estructura del polímero, del grado de ramificación y similares, el peso molecular satisfará uno o más de los siguientes valores: mayor de 100 Daltons, mayor de 200 Daltons, mayor de 400 Daltons, mayor de 500 Daltons, mayor de 750 Daltons, mayor de 900 Daltons, mayor de 1.000 Daltons, mayor de 1.400 Daltons, mayor de 1.500 Daltons, mayor de 1.900 Daltons, mayor de 2.000 Daltons, mayor de 2.200 Daltons, mayor de 2.500 Daltons, mayor de 3.000 Daltons, mayor de 4.000 Daltons, mayor de 4.900 Daltons, mayor de 5.000 Daltons, mayor de 6.000 Daltons, mayor de 7.000 Daltons, mayor de 7.500 Daltons, mayor de 9.000 Daltons, mayor de 10.000 Daltons, mayor de 11.000 Daltons, mayor de 14.000 Daltons, mayor de 15.000 Daltons, mayor de 16.000 Daltons, mayor de 19.000 Daltons, mayor de 20.000 Daltons, mayor de 21.000 Daltons, mayor de 22.000 Daltons, mayor de 25.000 Daltons y mayor de 30.000 Daltons. Se entiende que el límite máximo de peso molecular para cualquier segmento polimérico hidrosoluble dado aquí útil es menor de aproximadamente 300.000 Daltons.

El peso molecular del polímero estará típicamente dentro de al menos uno de los siguientes rangos: de aproximadamente 100 Daltons a aproximadamente 100.000 Daltons, de aproximadamente 200 Daltons a aproximadamente 60.000 Daltons y de aproximadamente 300 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

Como ejemplos de pesos moleculares para el segmento polimérico hidrosoluble, se incluyen aproximadamente 100 Daltons, aproximadamente 200 Daltons, aproximadamente 300 Daltons, aproximadamente 350 Daltons, aproximadamente 400 Daltons, aproximadamente 500 Daltons, aproximadamente 550 Daltons, aproximadamente 600 Daltons, aproximadamente 700 Daltons, aproximadamente 750 Daltons, aproximadamente 800 Daltons, aproximadamente 900 Daltons, aproximadamente 1.000 Daltons, aproximadamente 2.000 Daltons, aproximadamente 2.200 Daltons, aproximadamente 2.500 Daltons, aproximadamente 3.000 Daltons, aproximadamente 4.000 Daltons, aproximadamente 4.400 Daltons, aproximadamente 5.000 Daltons, aproximadamente 6.000 Daltons, aproximadamente 7.000 Daltons, aproximadamente 7.500 Daltons, aproximadamente 8.000 Daltons, aproximadamente 9.000 Daltons, aproximadamente 10.000 Daltons, aproximadamente 11.000 Daltons, aproximadamente 12.000 Daltons, aproximadamente 13.000 Daltons, aproximadamente 14.000 Daltons, aproximadamente 15.000 Daltons, aproximadamente 20.000 Daltons, aproximadamente 22.500 Daltons, aproximadamente 25.000 Daltons, aproximadamente 30.000 Daltons, aproximadamente 35.000 Daltons, aproximadamente 40.000 Daltons, aproximadamente 50.000 Daltons, aproximadamente 60.000 Daltons y aproximadamente 75.000 Daltons.

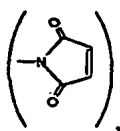
Con respecto a las versiones ramificadas del polímero, como ejemplos de rangos de tamaños adecuados para el peso molecular total del polímero (basado esencialmente en los pesos combinados de las dos porciones poliméricas hidrosolubles), se incluyen los siguientes: de aproximadamente 200 Daltons a aproximadamente 100.000 Daltons, de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 80.000 Daltons, de aproximadamente 2.000 Daltons a aproximadamente 50.000 Daltons, de aproximadamente 4.000 Daltons a aproximadamente 25.000 Daltons y de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons. Más en particular, el peso molecular medio ponderal total de una versión ramificada del polímero de la invención corresponde a uno de los siguientes: 400, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000 ó 80.000.

Con respecto al PEG, donde se puede tener una estructura consistente en un monómero repetitivo de óxido de etileno, tal como $-(CH_2CH_2O)_n-$ o $-(OCH_2CH_2)_n$, como valores preferidos para (n) se incluyen: de aproximadamente 3 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 10 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 15 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 20 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 25 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 30 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 40 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 50 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 55 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 75 a aproximadamente 3.000, de aproximadamente 100 a aproximadamente 3.000 y de aproximadamente 225 a aproximadamente 3.000.

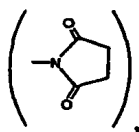
Resto espaciador ("X")

Eventualmente, se encuentra un resto espaciador en los polímeros hidrosolubles y otras estructuras aquí presentadas. Como ejemplos de restos espaciadores, se incluyen los siguientes: -O-, -S-, -C(O)-, -O-C(O)-, -C(O)-O-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-, -CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -CH₂-OCH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -OCH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH₂-, -CH₂-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-O-CH₂-, -C(O)-O-CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NHC(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -OC(O)-NH-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -NH-CH₂-, -NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-, -C(O)-CH₂-, -

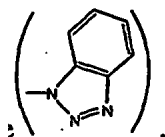
- 5 C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -OC(O)-NH-[CH₂]₀₋₆-(OCH₂CH₂)₀₋₂-, -C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, -O-C(O)-CH₂-, -OC(O)-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NHCH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, un grupo cicloalquilo bivalente, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, O-C(O)-NH-[CH₂]_f-(OCH₂CH₂)_n- y combinaciones de dos o más de cualquiera de los anteriores, donde (f) es de 0 a 6, (n) es de 0 a 20 (preferiblemente de 0 a 10, v.g., 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, y más preferiblemente 4). Además, cada uno de los restos espaciadores que contienen carbono anteriores puede tener un grupo alquilo ramificado unido al mismo. Como ejemplos no limitativos de grupos cicloalquilo bivalentes (v.g., cicloalquilenos), se incluyen cicloalquilo C₃₋₈, tal como diversos isómeros de ciclopropadiilo (v.g., 1,1-, cis-1,2- o trans-1,2-ciclopropileno), ciclobutadiilo, ciclopentadiilo, ciclohexadiilo y cicloheptadiilo. El grupo cicloalquilenos puede estar sustituido con uno o más grupos alquilo, preferiblemente grupos alquilo C₁-C₆.
- 10
- 15 Habiendo formado el éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble, se puede usar el éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble "tal cual" como reactivo polimérico útil para una reacción de conjugación con un principio activo, o eventualmente se puede derivatizar además para formar un reactivo polimérico diferente portador de un grupo reactivo diferente. Los grupos reactivos preferidos son seleccionados entre el grupo de los electrófilos y nucleófilos. Como grupos reactivos ejemplares, se incluyen hidroxilo (-OH), éster, ortoéster, carbonato, acetal, aldehído, hidrato de aldehído, cetona, vinilcetona, hidrato de cetona, tiona, hidrato de tiona, hemicetal, hemicetal sustituido con azufre, cetil, alquienilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, amina, hidrazida, tiol, disulfuro, hidrato de tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida
- 20



- 25 succinimida

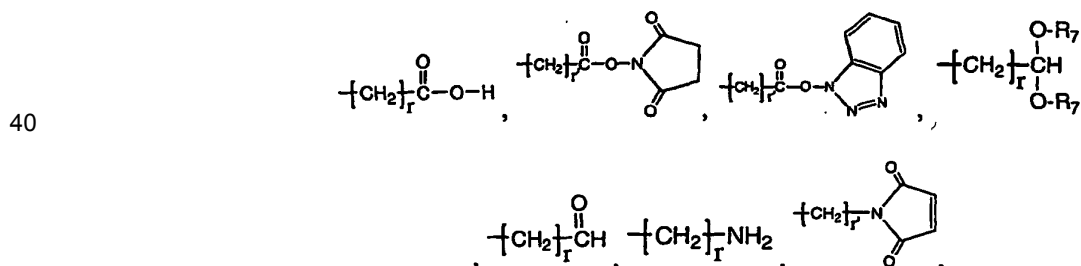


- 30 benzotriazol

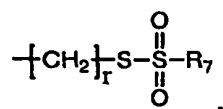


- 35 vinilsulfona, cloroetilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tiosulfonato, tresilato y silano. Como ejemplos específicos de grupos reactivos preferidos, se incluyen amina, ácido carboxílico, éster, aldehído, acetal, succinimida y maleimida.

Como ejemplos ilustrativos de restos espaciadores y combinaciones de grupos reactivos, se incluyen



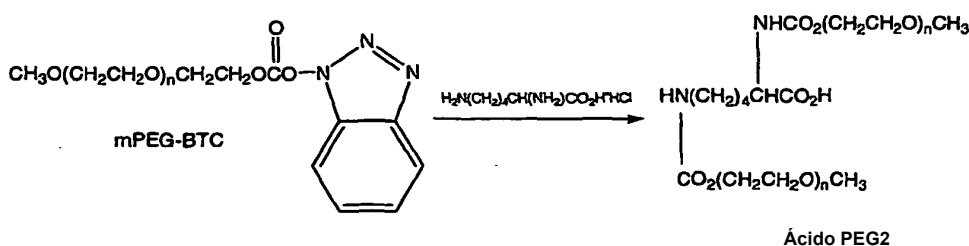
- 45 y



donde r es 1-5, r' es 0-5 y R₇ es arilo o alquilo.

- 5 Por ejemplo, el éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble puede reaccionar con aminoácidos para formar derivados de aminoácido. Así, por ejemplo, los ésteres de mPEG-BTC pueden reaccionar con lisina para formar un derivado de lisina polimérico. Por ejemplo, uno de tales derivados de lisina [es decir, H₂N(CH₂)₄CH(NH₂)CO₂H·HCl] es una lisina doblemente PEGilada, donde los dos PEG se unen a las aminas de la lisina por enlaces carbamato, como se muestra a continuación (donde n es de 2 a aproximadamente 4.000).

10



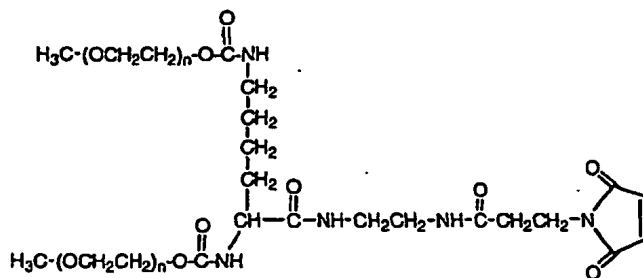
15

Dichos derivados PEG de lisina son útiles como reactivos para la preparación de derivados PEG de proteínas. Estos derivados PEG ofrecen con frecuencia ventajas sobre las proteínas no PEGiladas, tales como mayores tiempos de vida circulante *in vivo*, reducidas velocidades de proteólisis y menor inmunogenicidad. En otro aspecto, los derivados PEG BTC son usados directamente en la unión de PEG a proteínas a través de uniones carbamato y pueden ofrecer ventajas similares a las descritas para los derivados PEG de lisina.

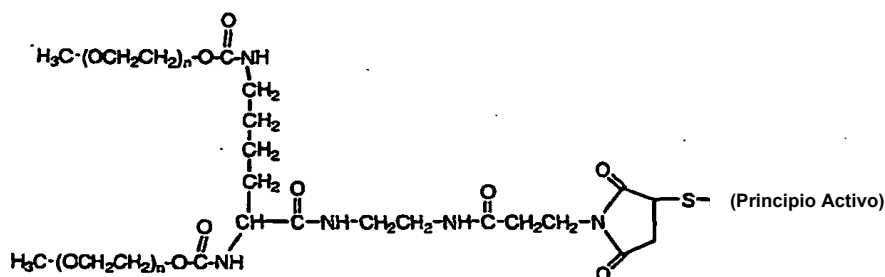
20

Así, por ejemplo, al anterior "Ácido PEG2" puede reaccionar con dicitlohexilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida para formar un éster activo de PEG2 (N-hidroxisuccinimida) del ácido PEG2. Después, en una reacción posterior, el éster activo de PEG2 puede reaccionar, en presencia de una base de amina terciaria, con una sal del ácido trifluoroacético de la etilendiaminomonoamida del ácido 3-N-maleimidopropanoico, para formar un reactivo polimérico portador de un grupo maleimida capaz de reaccionar con grupos tiol sobre proteínas, biomoléculas de bioingeniería y otras moléculas terapéuticas de interés.

25



- 30 Reactivo polimérico portador de un grupo maleimida (donde n es un número entero de 2 a 4.000)
 Por reacción del anterior reactivo polimérico portador de un grupo maleimida con un principio activo que contiene tiol ["(Principio Activo)-HS", tal como un polipéptido o proteína que contiene cisteína u otra biomolécula que contiene tiol] bajo condiciones de reacción de conjugación, se forma un conjugado que tiene la siguiente estructura



- 35 conjugado [donde n es un número entero de 2 a 4.000 y S-(Principio Activo) es un residuo del principio activo que contiene tiol]

Conjugados biológicamente activos

Para cualquier polímero dado, los métodos antes descritos ventajosamente proporcionan la capacidad de transformar aún más el polímero (antes o después de cualquier etapa de desprotección) de tal manera que éste lleve un grupo reactivo específico. Así, usando técnicas bien conocidas en este campo, el polímero puede ser funcionalizado para que incluya un grupo reactivo (v.g., éster activo, tiol, maleimida, aldehído, cetona, etc.).

Por ejemplo, cuando el polímero lleva un ácido carboxílico como grupo reactivo, se puede formar el correspondiente éster usando técnicas convencionales. Por ejemplo, el ácido carboxílico puede sufrir una condensación catalizada por ácido con un alcohol, para dar así el correspondiente éster. Un enfoque para conseguirlo es usar el método al que comúnmente se hace referencia como reacción de esterificación de Fischer. Otras técnicas para formar un éster deseado son conocidas por quienes tienen conocimientos ordinarios en este campo.

Por ejemplo, cuando el polímero lleva un ácido carboxílico como grupo reactivo, se puede formar el correspondiente éster usando técnicas convencionales. Por ejemplo, el ácido carboxílico puede sufrir una condensación catalizada por ácido con un alcohol, para dar así el correspondiente éster. Un enfoque para conseguirlo es usar el método al que comúnmente se hace referencia como reacción de esterificación de Fischer. Otras técnicas para formar un éster deseado son conocidas por quienes tienen conocimientos ordinarios en este campo.

Además, los polímeros portadores de un ácido carboxílico pueden ser modificados para formar grupos reactivos útiles distintos de ésteres. Por ejemplo, el ácido carboxílico puede ser derivatizado para formar haluros de acilo, pseudohaluros de acilo, tales como cianuro de acilo, isocianato de acilo y azida de acilo, sales neutras, tales como sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos (v.g. sales de calcio, sodio y bario), ésteres, anhídridos, amidas, imidas, hidrazidas y similares. En una realización preferida, se esterifica el ácido carboxílico para formar un éster de N-succinimido, un éster de *o*-, *m*- o *p*-nitrofenilo, un éster de 1-benzotriazolilo, un éster de imidazolilo o un éster de N-sulfosuccinimido. Por ejemplo, el ácido carboxílico puede convertirse en el correspondiente éster de N-succinimido por reacción del ácido carboxílico con dicitohexilcarbodiimida (DCC) o diisopropilcarbodiimida (DIC) en presencia de una N-hidroxisuccinimida.

Las etapas de los métodos sintéticos antes descritos tienen lugar en un solvente apropiado. Alguien con conocimientos ordinarios en la técnica puede determinar si un solvente específico es apropiado para una reacción dada. Típicamente, sin embargo, el solvente es un solvente no polar o un solvente aprótico polar. Como ejemplos no limitativos de solventes no polares, se incluyen benceno, xileno, dioxano, tetrahidrofurano (THF) y tolueno. Como ejemplos de solventes apróticos polares, se incluyen, aunque sin limitación, acetonitrilo, DMSO (sulfóxido de dimetilo), HMPA (hexametilfosforamida), DMF (dimetilformamida), DMA (dimetilacetamida) y NMP (N-metilpirrolidinona).

El método de preparación de los polímeros eventualmente incluye una etapa adicional de aislamiento y recuperación del polímero una vez formado. Se pueden usar métodos conocidos para aislar el polímero, pero se prefiere en particular usar cromatografía, v.g., cromatografía de exclusión por tamaños. De manera alternativa o adicional, el método incluye la etapa de purificación del polímero una vez formado. Una vez más, se pueden usar métodos de purificación estándar conocidos en la técnica para purificar el polímero. También se puede conseguir el aislamiento del éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble destilando el solvente mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

Los polímeros de la invención pueden ser almacenados en una atmósfera inerte, tal como bajo argón o bajo nitrógeno. De este modo, se reducen o evitan por completo procesos potencialmente degradativos asociados a, por ejemplo, el oxígeno atmosférico. En algunos casos, para evitar la degradación oxidativa, se pueden añadir antioxidantes, tales como hidroxitolueno butilado (BHT), al producto final antes del almacenamiento. Además, se prefiere minimizar la cantidad de humedad asociada a las condiciones de almacenamiento para reducir reacciones potencialmente perjudiciales asociadas al agua. Más aún, se prefiere mantener las condiciones de almacenamiento en la oscuridad para evitar ciertos procesos degradativos en los que está implicada la luz. Así, como condiciones de almacenamiento preferidas, se incluyen una o más de las siguientes: almacenamiento bajo argón seco u otro gas inerte seco, almacenamiento a temperaturas por debajo de aproximadamente -15°C, almacenamiento en ausencia de luz y almacenamiento con una cantidad adecuada (v.g., de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 partes por millón) de un antioxidante, tal como BHT.

Los polímeros antes descritos son útiles para conjugación con principios biológicamente activos o superficies que tienen al menos un grupo adecuado para reacción con el grupo reactivo sobre el polímero. Por ejemplo, los grupos amino (v.g., aminas primarias), las hidrazinas, las hidrazidas y los alcoholes sobre un principio activo o una superficie reaccionarán con un grupo ácido carboxílico sobre el polímero. Además, se puede preparar una versión más "activada" del ácido carboxílico del polímero para aumentar la reactividad con el principio biológicamente activo o la superficie. Los métodos de activación de ácidos carboxílicos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el método de formación de un éster activo antes descrito. Quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica conocen otros enfoques para activar un ácido carboxílico.

Típicamente, el polímero es añadido al principio activo o a la superficie en una cantidad equimolar (con respecto al número deseado de grupos adecuados para reacción con el grupo reactivo) o en un exceso molar. Por ejemplo, el polímero puede ser añadido al principio activo diana en una proporción molar de aproximadamente 1:1 (polímero:principio activo), 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1 ó 10:1. Se deja que la reacción de conjugación proceda hasta que no se produce substancialmente más conjugación, lo cual puede ser generalmente determinado monitorizando el progreso de la reacción en el tiempo. Se puede monitorizar el progreso de la reacción retirando alícuotas de la mezcla de reacción en diversos tiempos y analizando la mezcla de reacción por SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF o cualquier otro método analítico adecuado. Una vez alcanzada una meseta con respecto a la cantidad de conjugado formado o a la cantidad de polímero no conjugado que queda, se supone que la reacción se ha completado. Típicamente, la reacción de conjugación tarda de minutos a varias horas (v.g., de 5 minutos a 24 horas o más). La mezcla producto resultante es preferiblemente, aunque no necesariamente, purificada para separar el exceso de reactivos, los reactivos no conjugados (v.g., principio activo), las especies multiconjugadas no deseadas y el polímero libre o no reaccionado. Los conjugados resultantes pueden ser luego caracterizados usando métodos analíticos tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel y/o cromatografía.

Con respecto a los conjugados polímero-principio activo, los conjugados pueden ser purificados para obtener/aislar diferentes especies de conjugados. De manera alternativa, y más preferiblemente para polímeros de menor peso molecular (v.g., menos de aproximadamente 20 kilodaltons, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 kilodaltons), se puede purificar la mezcla producto para obtener la distribución de segmentos de polímero hidrosoluble por principio activo. Por ejemplo, se puede purificar la mezcla producto para obtener una media de uno a cinco PEG por principio activo (v.g., proteína), típicamente una media de aproximadamente 3 PEG por principio activo (v.g., proteína). La estrategia para la purificación de la mezcla de reacción del conjugado final dependerá de una serie de factores, incluyendo, por ejemplo, el peso molecular del polímero empleado, el principio activo particular, el régimen de dosificación deseado y la actividad residual y las propiedades *in vivo* del(de los) conjugado(s) individual(es).

Si se desea, se pueden aislar conjugados que tienen diferentes pesos moleculares usando cromatografía de filtración por gel. Es decir, se usa cromatografía de filtración por gel para fraccionar razones de polímero-a-principio activo de diferente numeración (v.g., 1-mero, 2-mero, 3-mero, etc., donde "1-mero" indica 1 polímero por principio activo, "2-meros" indica dos polímeros por principio activo, etc.) en base a sus diferentes pesos moleculares (donde la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular medio de los segmentos de polímero hidrosoluble). Por ejemplo, en una reacción ejemplar en la que se conjuga aleatoriamente una proteína de 100 kDa con un ácido PEG alcianoico que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, la mezcla de reacción resultante contendrá probablemente proteína sin modificar (PM 100 kDa), proteína monopegilada (PM 120 kDa), proteína dipegilada (PM 140 kDa), etc. Aunque este enfoque puede ser utilizado para separar PEG y otros conjugados poliméricos que tienen diferentes pesos moleculares, este enfoque es generalmente ineficaz para separar isómeros posicionales que tienen diferentes sitios de unión a polímero dentro de la proteína. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de filtración por gel para separar mezclas de PEG 1-meros, 2-meros, 3-meros, etc., aunque cada una de las composiciones PEG-méricas recuperadas puede contener PEG unidos a diferentes grupos amino reactivos (v.g., residuos de lisina) en el principio activo.

Como columnas de filtración por gel adecuadas para llevar a cabo este tipo de separación, se incluyen las columnas Superdex™ y Sephadex™ de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). La selección de una columna particular dependerá del rango de fraccionación deseado. Generalmente se realiza la elución utilizando un tampón adecuado, tal como fosfato, acetato o similar. Las fracciones recogidas pueden ser analizadas mediante una serie de métodos diferentes, por ejemplo, (i) densidad óptica (DO) a 280 nm para el contenido en proteína, (ii) análisis de proteína de seroalbúmina bovina (BSA), (iii) pruebas de yodo para el contenido en PEG [Sims *et al.* (1980), Anal. Biochem, 107: 60-63] y (iv) electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecilsulfato de sodio (SDS PAGE), seguida de tinción con yoduro de bario.

Se realiza la separación de los isómeros posicionales por cromatografía de fase invertida usando una columna C18 de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase invertida (RP-HPLC) (Amersham Biosciences o Vydac) o por cromatografía de intercambio iónico usando una columna de intercambio iónico, v.g., una columna de intercambio iónico Sepharose™ de Amersham Biosciences. Se puede usar cualquiera de los enfoques para separar isómeros de polímero-principio activo que tienen el mismo peso molecular (isómeros posicionales).

Después de la conjugación, y eventualmente de etapas de separación adicionales, la mezcla de conjugado puede ser concentrada, esterilizada por filtración y almacenada a baja temperatura, típicamente de aproximadamente -20°C a aproximadamente -80°C. De manera alternativa, el conjugado puede ser liofilizado, con o sin tampón residual, y almacenado como un polvo liofilizado. En algunos casos, es preferible cambiar con un tampón usado para conjugación, tal como acetato de sodio, un tampón volátil, tal como carbonato de amonio o acetato de amonio, que puede ser fácilmente eliminado durante la liofilización, de tal modo que el polvo liofilizado está libre de tampón residual. De forma alternativa, se puede usar una etapa de intercambio de tampón utilizando un tampón de formulación, de tal modo que el conjugado liofilizado está en una forma adecuada para reconstitución en un tampón de formulación y en último lugar para administración a un mamífero.

Los polímeros de la invención pueden unirse, ya sea covalente o no covalentemente, a una serie de entidades, incluyendo películas, superficies de separación química y purificación, soportes sólidos, superficies metálicas, tales como oro, titanio, tántalo, niobio, aluminio, acero y sus óxidos, óxido de silicio, macromoléculas (v.g., proteínas, polipéptidos, etc.) y pequeñas moléculas. Adicionalmente, los polímeros pueden ser también usados en sensores bioquímicos, conmutadores bioelectrónicos y puertas. Los polímeros pueden ser también empleados como soportes para síntesis peptídica, para la preparación de superficies revestidas de polímero e injertos poliméricos, para preparar conjugados de polímero-ligando para reparto de afinidad, para preparar hidrogeles entrecruzados o no entrecruzados y para preparar aductos de polímero-cofactor para biorreactores.

Un principio biológicamente activo para uso en copulación con un polímero como aquí se presenta puede ser cualesquiera uno o más de los siguientes: hipnóticos y sedantes, energizantes psíquicos, tranquilizantes, fármacos respiratorios, anticonvulsivantes, relajantes musculares, agentes antiparkinson (antagonistas de la dopamina), analgésicos, antiinflamatorios, fármacos contra la ansiedad (ansiolíticos), supresores del apetito, agentes antimigraña, contractores musculares, antiinfecciosos (antibióticos, antivíricos, antifúngicos, vacunas), antiartríticos, antimaláricos, antieméticos, antiepilépticos, broncodilatadores, citoquinas, factores de crecimiento, agentes anticancerosos, agentes antitrombóticos, antihipertensores, fármacos cardiovasculares, antiarítmicos, antioxidantes, agentes contra el asma, agentes hormonales, incluyendo contraceptivos, simpaticomiméticos, diuréticos, agentes reguladores de lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasitarios, anticoagulantes, neoplásicos, antineoplásicos, hipoglucémicos, agentes y suplementos nutricionales, suplementos para el crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico y agentes de contraste.

Como ejemplos de principios activos adecuados para uso en la unión covalente al polímero reactivo de la invención, se incluyen, aunque sin limitación, calcitonina, eritropoyetina (EPO), Factor VIII, Factor IX, ceredasa, Cerezyme, ciclosporina, factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de la alfa-1 proteinasa, elcatonina, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), hormona del crecimiento, hormona del crecimiento humana (HGH), hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), heparina, heparina de bajo peso molecular (LMWH), interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, receptor de interleuquina-1, interleuquina-2, antagonista del receptor de interleuquina-1, interleuquina-3, interleuquina-4, interleuquina-6, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), factor IX, insulina, proinsulina, análogos de insulina (v.g., insulina monoacilada, como se describe en la Patente Estadounidense N° 5.922.675), amilina, péptido C, somatostatina, análogos de somatostatina, incluyendo octreotida, vasopresina, hormona estimulante del folículo (FSH), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), insulintropina, factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento de los nervios (NGF), factores de crecimiento tisular, factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de la glía (GGF), factor de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento endotelial, hormona paratiroidea (PTH), péptido de tipo glucagón timosina alfa 1, inhibidor de IIb/IIIa, antitripsina alfa-1, compuestos fosfodiesterasa (PDE), inhibidores de VLA-4, bisfosfonatos, anticuerpo contra el virus sincitial respiratorio, gen regulador de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (ADNasa), proteína bactericida/incrementadora de la permeabilidad (BPI), anticuerpo anti-CMV, ácido 13-cis-retinoico, macrólidos, tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davericina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, leucomicina, miocamicina, rokitamicina, andazitromicina y swinolida A, fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trovafloxacina, alatrofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, lomefloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, pefloxacina, amifloxacina, fleroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina y sitafloxacina, aminoglicósidos, tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amikacina, kanamicina, neomicina y estreptomina, vancomicina, telcoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato, polimixinas, tales como polimixina B, capreomicina, bacitracina, penems, penicilinas, incluyendo agentes sensibles a la penicilinas, como penicilina G y penicilina V, agentes resistentes a la penicilinas, como metilicina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina y nafcilina, principios activos contra microorganismos gram negativos, como ampicilina, amoxicilina y hetacilina, cilina y galampicilina, penicilinas antipseudomonas, como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina, cefalosporinas, como cefpodoxima, cefprozilo, ceftbutil, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradrina, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxilo, cefaloglicina, cefuroxima, ceforanida, cefotaxima, cefatrizina, cefacetrilo, cefepima, cefixima, cefonicid, cefoperazona, cefotetán, cefmetazol, ceftazidima, loracarbef y moxalactama, monobactamas, como aztreonam, y carbapenems, tales como imipenem, meropenem, isetionato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaína, sulfato de metaproterenol, dipropionato de beclometasona, triamcinolona acetamida, budesonida acetónido, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolín sódico, tartrato de ergotamina y, cuando sea aplicable, análogos, agonistas, antagonistas, inhibidores y formas de sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores. En relación a péptidos y proteínas, la invención pretende abarcar las formas sintéticas, nativas, glicosiladas, no glicosiladas y pegiladas, y fragmentos y análogos biológicamente activos de las mismas.

La presente invención también incluye preparaciones farmacéuticas que comprenden un conjugado como aquí se presenta en combinación con un excipiente farmacéutico. En general, el propio conjugado estará en forma sólida (v.g., un precipitado), que puede combinarse con un excipiente farmacéutico adecuado, que puede estar en forma sólida o líquida.

Como ejemplos de excipientes, se incluyen, sin limitación, los seleccionados entre el grupo consistente en carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, surfactantes, tampones, ácidos, bases y sus combinaciones.

Puede estar presente un carbohidrato, tal como un azúcar, un azúcar derivatizado, tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar, como excipiente. Como excipientes carbohidrato específicos, se incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xylitol, sorbitol (glucitol), piranosil-sorbitol, mioinositol y similares.

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

La preparación puede también incluir un agente antimicrobiano para prevenir o impedir el crecimiento microbiano. Como ejemplos no limitativos de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención, se incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencilico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timersol y sus combinaciones.

También puede estar presente un antioxidante en la preparación. Los antioxidantes son utilizados para prevenir la oxidación, evitando así el deterioro del conjugado u otros componentes de la preparación. Como antioxidantes adecuados para uso en la presente invención, se incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosfórico, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, sulfoxilato de sodio y formaldehído, metabisulfito de sodio y sus combinaciones.

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

Pueden estar presentes ácidos o bases como excipiente en la preparación. Como ejemplos no limitativos de ácidos que pueden ser utilizados, se incluyen los ácidos seleccionados entre el grupo consistente en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y sus combinaciones. Como ejemplos de bases adecuadas, se incluyen, sin limitación, bases seleccionadas entre el grupo consistente en hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio y sus combinaciones.

Las preparaciones farmacéuticas abarcan todo tipo de formulaciones, y en particular las que son adecuadas para inyección, v.g., polvos que pueden ser reconstituídos, así como suspensiones y soluciones. La cantidad del conjugado (es decir, el conjugado formado entre el principio activo y el polímero aquí descrito) en la composición variará dependiendo de una serie de factores, pero será de manera óptima una dosis terapéuticamente efectiva cuando se almacena la composición en un recipiente de dosis unitaria (v.g., un vial). Además, la preparación farmacéutica puede ser albergada en una jeringa. Se puede determinar una dosis terapéuticamente efectiva experimentalmente por administración repetida de cantidades crecientes del conjugado para determinar qué cantidad produce un criterio de valoración clínicamente deseado.

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

En general, 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%-98% en peso, más preferiblemente de aproximadamente el 15-95% en peso, del excipiente, siendo más preferidas concentraciones inferiores al 30% en peso.

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

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención son típicamente, aunque no necesariamente, administradas por inyección y son, por lo tanto, generalmente soluciones o suspensiones líquidas inmediatamente antes de su administración. La preparación farmacéutica puede también adoptar otras formas, tales como jarabes, cremas, ungüentos, tabletas, polvos y similares. También se incluyen otros modos de administración, tales como pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosal, oral, intratecal, subcutánea, intraarterial, etc..

Como se ha descrito previamente, los conjugados pueden ser administrados parenteralmente por inyección intravenosa, o menos preferiblemente por inyección intramuscular o subcutánea. Como tipos de formulación adecuados para administración parenteral, se incluyen soluciones listas para inyección, polvos secos para combinación con un solvente 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 su administración, entre otros.

La invención también proporciona un método para administrar un conjugado según se presenta aquí a un paciente que sufre una afección que responde al tratamiento con un conjugado. El método consiste en administrar, generalmente por inyección, una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado (preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica). El método de administración puede ser usado para tratar cualquier afección que pueda ser remediada o prevenida por administración del conjugado particular. Quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica aprecian qué afecciones puede tratar de manera efectiva un conjugado específico. La dosis real que se ha de administrar variará dependiendo de la edad, el peso y el estado general del paciente, así como de la gravedad de la afección que se esté tratando, del juicio del profesional sanitario y del conjugado que se esté administrando. Las cantidades terapéuticamente efectivas son conocidas para los expertos en la técnica y/o se describen en los textos y literatura de referencia pertinentes. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva variará 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.

La dosificación unitaria de cualquier conjugado dado (de nuevo, preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica) puede ser administrada en una variedad de regímenes de dosificación, dependiendo del juicio del clínico, de las necesidades del paciente, etc. El régimen de dosificación específico será conocido por quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica o puede ser determinado experimentalmente usando métodos de rutina. Como ejemplos de regímenes de dosificación, se incluyen sin limitación, la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana, una vez por semana, dos veces al mes, una vez al mes y cualquier combinación de éstas. Una vez alcanzado el criterio de valoración clínico, se detiene la dosificación de la composición.

Hay que entender que, aunque la invención ha sido descrita conjuntamente con las realizaciones específicas preferidas de la misma, la descripción que antecede, así como los ejemplos que se dan a continuación, pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la que la invención pertenece. Aunque se emplean aquí términos específicos, éstos son utilizados en un sentido genérico y descriptivo únicamente y no con fines de limitación.

Experimental

La práctica de la invención empleará, a menos que se indique algo diferente, técnicas convencionales de síntesis orgánica, bioquímica, purificación de proteínas y similares, que se encuentran dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas están totalmente explicadas en la literatura. Véase, por ejemplo, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4ª Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992), *supra*.

En los siguientes ejemplos, se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (v.g., cantidades, temperaturas, etc.), pero habría que tener en cuenta algún error y desviación experimentales. A menos que se indique algo diferente, la temperatura es en grados C y la presión es la presión atmosférica o próxima a ella a nivel del mar. Se considera que cada uno de los siguientes ejemplos es instructivo para alguien con conocimientos ordinarios en la técnica para llevar a cabo una o más de las realizaciones aquí descritas.

Ejemplo 1

Preparación de mPEG(5.000 Da)-BTC

Se agitó una solución de mPEG(5.000 Da)-OH (PM 5.000, 15 g, 0,003 moles), carbonato de di(1-benzotriazolilo) (4,0 g de mezcla al 70%, 0,000945 moles) y piridina (2,2 ml) en acetonitrilo (30 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. El análisis de RMN mostró que el mPEG(5.000 Da)-BTC obtenido estaba 100% sustituido y la mezcla de reacción contenía 0,0012 moles de carbonato de di(1-benzotriazolilo) residual. Se añadió una cantidad calculada de agua destilada (0,025 g, calculada para proporcionar una cantidad en exceso relativa al diBTC) y se agitó la mezcla durante tres horas. El análisis de RMN consecutivo mostró que el mPEG(5.000 Da)-BTC estaba aún 100% sustituido, pero el carbonato de di(1-benzotriazolilo) residual se había hidrolizado por completo.

Se eliminó el solvente por destilación y se secó el residuo a vacío y a temperatura ambiente, para obtener 14,8 g de producto, que se vio por análisis de ^1H RMN que estaba 100% sustituido. ^1H RMN (d_6 -DMSO) esperada: 3,23 ppm (s, $-\text{OCH}_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto polimérico), 4,62 ppm (m, mPEG-O- CH_2 - $-\text{OCO}_2$ -, 2H), 7,41-8,21 ppm (mult complejo, protones de benzotriazol, 4H).

Ejemplo 2

Preparación de mPEG(20.000 Da)-BTC

Se agitó una solución de mPEG(20.000 Da)-OH (PM 20.000, 20 g, 0,001 moles), carbonato de di(1-benzotriazolilo) (3,4 g de mezcla al 70%, 0,00803 moles) y piridina (3,0 ml) en acetonitrilo (40 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. El análisis de RMN mostró que el mPEG(20.000 Da)-BTC obtenido estaba 100% sustituido y la mezcla de reacción contenía 0,0027 moles de carbonato de di(1-benzotriazolilo) residual. Se añadió una cantidad calculada de agua destilada (0,050 g, calculados para proporcionar una cantidad en exceso en relación al diBTC) y se agitó la mezcla durante tres horas. El análisis posterior de RMN mostró que el mPEG(20.000 Da)BTC estaba aún 100% sustituido, pero el carbonato de di(1-benzotriazolilo) residual se había hidrolizado por completo. Se usó directamente la mezcla obtenida para preparar mPEG(20.000 Da)-amina. ^1H RMN (d_6 -DMSO): 3,23 ppm (s, $-\text{OCH}_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto polimérico), 4,62 ppm (m, mPEG-O- CH_2 - $-\text{OCO}_2$ -, 2H), 7,41-8,21 ppm (mult complejo, protones de benzotriazol, 4H).

Ejemplo 3

Preparación de mPEG(20.000 Da)-amina a partir de mPEG(20.000 Da)-BTC

Se añade gota a gota la solución de mPEG(20.000 Da)-carbonato de benzotriazol (20,0 g, 0,001 moles) en acetonitrilo (40 ml) preparada en el Ejemplo 2 a una solución de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (Sigma-Aldrich; FW=148,21, 3 g, 0,020 moles) en acetonitrilo (40 ml) y se agita la mezcla de reacción durante dos horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. A continuación, se evapora el solvente a sequedad. Se disuelve el producto bruto en cloruro de metileno y se precipita con alcohol isopropílico. Se seca el producto húmedo a presión reducida. Rendimiento 18,2 g. ^1H RMN (d_6 -DMSO) esperada: 2,64 ppm (t, $-\text{CH}_2$ -amina-, 2H), 3,11 ppm (c, $-\text{CH}_2$ -NH-,), 3,23 ppm (s, $-\text{OCH}_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2$ -O($\text{C}=\text{O}$)-, 2H), 7,11 ppm (t, $-(\text{C}=\text{O})$ -NH-, 1H). Cromatografía de intercambio catiónico: mPEG(20.000 Da)-Amina 97,7%.

Ejemplo 4

Preparación de mPEG(20.000 Da)-Carbonato de succinimidilo

Se agitó una solución de mPEG(20.000 Da)-OH (PM 20.000, 60 g, 0,003 moles), carbonato de N,N'-disuccinimidilo (2,4 g, 0,00937 moles) y piridina (6,5 ml) en acetonitrilo (300 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. El análisis de RMN mostró que el mPEG(20.000 Da)-carbonato de succinimidilo obtenido estaba 100% sustituido y la mezcla de reacción contenía 0,0034 moles de carbonato de N,N'-disuccinimidilo residual. Se añadió una cantidad calculada de agua destilada (0,097 g, calculados para proporcionar una cantidad en exceso en relación al diBTC) y se agitó la mezcla durante cuatro horas. El posterior análisis de RMN mostró que el mPEG(20.000 Da)-carbonato de succinimidilo aún estaba 100% sustituido, pero el carbonato de N,N'-disuccinimidilo residual se había hidrolizado por completo. Se eliminó el solvente por destilación y se secó el residuo a vacío, para obtener 56,8 g de producto, que se vio por ^1H RMN que estaba 100% sustituido. ^1H RMN (d_6 -DMSO): 2,80 ppm (s, succinimida, 4H), 3,23 ppm (s, $-\text{OCH}_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto polimérico), 4,62 ppm (m, mPEG-O- CH_2 - $-\text{OCO}_2$ -, 2H).

Ejemplo 5

Preparación de mPEG(20.000 Da)-NPC

Se agitó una solución de mPEG(20.000 Da)-OH (PM 20.000 Da, 60 g, 0,003 moles), cloroformiato de p-nitrofenilo (NPC) (1,9 g, 0,00943 moles) y piridina (6,5 ml) en acetonitrilo (300 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. El análisis de RMN mostró que el mPEG(20.000 Da)-NPC obtenido estaba 100% sustituido y la mezcla de reacción contenía 0,0034 moles de cloroformiato de p-nitrofenilo residual. Se pasó la mezcla de reacción a través de una columna de gel (gel de amina Duolite A-7) que permite la circulación de pequeñas moléculas, pero excluye en gran medida las especies poliméricas. El posterior análisis de RMN mostró que el mPEG(20.000 Da)-NPC estaba aún 100% sustituido, pero no había ningún cloroformiato de p-nitrofenilo residual. ^1H RMN (CDCl_3): 3,39 ppm (s, $-\text{OCH}_3$, 3H), 3,58 ppm (s, esqueleto polimérico), 4,37 ppm (m, mPEG-O- CH_2 - $-\text{OCO}_2$ -, 2H), 7,44 ppm (m, protones aromáticos, 2H), 8,27 ppm (m, protones aromáticos, 2H).

Ejemplo 6

Preparación de mPEG(22.000 Da)-Ácido propiónico a partir de mPEG(20.000 Da)-NPC

- 5 A una solución de mPEG(20.000 Da)-NPC (60,0 g, 0,0030 moles del Ejemplo 5) en acetonitrilo, se le añadieron PEG(2.000 Da)-ácido α -amino- ω -propiónico (6,6 g, 0,0033 moles) y trietilamina (1,8 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante seis horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. A continuación, se filtró la mezcla y se evaporó el solvente a sequedad. Se disolvió el producto bruto en cloruro de metileno y se precipitó con alcohol isopropílico. Se secó el producto húmedo bajo presión reducida. Rendimiento 54,3 g. ^1H RMN (d_6 -DMSO): 2,44 ppm (t, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$, 2H), 3,11 ppm (c, $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, 2H), 3,24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,04 ppm (m, $-\text{CH}_2-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$, 2H), 7,11 ppm (t, $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$, 1H). Cromatografía de intercambio aniónico: m-PEG(20.000 Da)-Ácido propiónico 96,5%.

Ejemplo 7

- 15 Preparación de mPEG(20.000 Da)-BTC

Síntesis a gran escala

- 20 Se disolvió mPEG(20.000 Da)-OH (28 kg) en acetonitrilo anhidro (93 kg) bajo una atmósfera de argón. Se secó la mezcla pasándola a través de un cartucho de tamices moleculares y se lavó luego el cartucho con 50 l de acetonitrilo. Se repitió el proceso de secado hasta que el contenido en agua resultó menor de 100 ppm. Se combinó entonces carbonato de di(1-benzotriazolilo) (1.285 g de mezcla al 42%) con aproximadamente 2.000 ml de acetonitrilo en un recipiente aparte para formar una suspensión, que fue añadida bajo argón a la mezcla previamente preparada. Se aclaró el recipiente separado dos veces con acetonitrilo (aproximadamente 200 ml) para aumentar la transferencia cuantitativa. Se añadió luego piridina (200 ml) bajo argón, seguido de mezcla a $31^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ durante 12 horas. Se añadió agua (aproximadamente 20 ml) diluida con acetonitrilo (1 l) y se mezcló la totalidad de la mezcla de reacción a $31^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ durante 60 minutos. A continuación, se destiló la mezcla de reacción a presión reducida y se recogió el producto y se dejó enfriar. Se añadió después isopropanol (551 kg) con un bajo contenido acuoso. Tras completarse la adición del isopropanol, se mezcló el precipitado resultante durante un mínimo de treinta minutos. Se aisló después el precipitado y se lavó con isopropanol (aproximadamente 90 kg) bajo argón. Finalmente, se secó el precipitado a vacío. El porcentaje de rendimiento y la cantidad total de producto fueron de 22 kg (79% de rendimiento). El análisis de RMN mostró que el producto contenía un 98,6% del mPEG(20.000 Da)-BTC deseado y un 1,4% del mPEG(20.000 Da)-OH de partida. No se detectó carbonato de isopropilbenzotriazol.

Ejemplo Comparativo 8

Preparación de mPEG(20.000 Da)-BTC

- 40 Síntesis a gran escala sin tratamiento acuoso

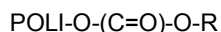
- Se repitió la síntesis a gran escala de mPEG(20.000 Da)-BTC descrita en el Ejemplo 7, pero no se añadió agua a la mezcla de reacción para hidrolizar el carbonato de di(1-benzotriazolilo) residual. El análisis de RMN mostró que el producto final contenía un 44% mol de carbonato de isopropilbenzotriazolilo. Así, este experimento muestra que es posible la producción a gran escala con necesidad de aislar y eliminar los reactivos de carbonato activados. Sin embargo, se predice que la pérdida en la precipitación será del 10-20% en base a experimentos comparativos.

REIVINDICACIONES

1. Un método sintético consistente en:

- (a) combinar una composición que contiene un solvente aprótico y un polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo con una composición que contiene un reactivo de carbonato activado seleccionado entre el grupo consistente en carbonato de di(1-benzotriazolilo), carbonato de disuccinimidilo, cloroformiato de p-nitrofenilo, cloroformiato de tricloro fenilo, carbonato de p-nitrofenilsuccinimidilo, carbonato de p-nitrofenil-1-benzotriazolilo, cloroformiato de pentafluorofenilo y 1,1'-carbonildiimidazol, eventualmente en presencia de un catalizador o de una base neutralizadora de ácido, donde la composición que contiene el reactivo de carbonato activado es añadida de tal forma que haya un exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado, y
- (b) añadir, antes de recuperar el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble, una composición que contiene una molécula reactiva seleccionada entre el grupo consistente en agua, un alcohol monohídrico de alquilo inferior, sulfuro de hidrógeno y una amina monobásica de alquilo inferior a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado, donde la composición que contiene una molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma más de un 50% de reactivo de carbonato activado no reaccionado.

2. El método de la reivindicación 1, donde el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble tiene una estructura de la siguiente fórmula:



donde:

POLI es un polímero hidrosoluble y
R es un radical orgánico,

con la condición de que, cuando POLI es un poli(etilenglicol) rematado con metilo lineal, el polietilenglicol rematado con metilo lineal tenga un peso molecular de al menos 103.

3. El método como en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde el reactivo de carbonato activado tiene una estructura de una de las siguientes fórmulas: R-O(C=O)-OR , R-O(C=O)-OR' y R-O(C=O)X , donde R es un radical orgánico, R' es un radical orgánico diferente de R y X es Cl, Br o I.

4. El método como en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, donde el solvente aprótico es seleccionado entre el grupo consistente en acetonitrilo, sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida, cloroformo, diclorometano y sus combinaciones.

5. El método de la reivindicación 1, que además incluye la reacción del éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble en una o más reacciones para formar un reactivo polimérico.

6. El método de la reivindicación 1, donde el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble es aislado por destilación del solvente.

7. El método de la reivindicación 1, donde el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble es aislado por precipitación tras adición de un no solvente.

8. El método de la reivindicación 7, donde el no solvente es seleccionado entre el grupo consistente en alcohol isopropílico, hexano, éter etílico y sus combinaciones.

9. El método de la reivindicación 1, donde el polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo es un polímero hidrosoluble portador de un grupo amina o grupo hidroxilo terminal, donde el polímero hidrosoluble es seleccionado entre el grupo consistente en poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxi alquilmetacrilamida), poli(hidroxi alquilmetacrilato), poli(sacárido), poli(ácido α -hidroxiaacético), poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acrilolmorfolina) y copolímeros o terpolímeros de los mismos.

10. El método de la reivindicación 6, donde el polímero hidrosoluble es un poli(etilenglicol).

11. El método de la reivindicación 10, donde el poli(etilenglicol) es un poli(etilenglicol) lineal.

12. El método de la reivindicación 10, donde el poli(etilenglicol) es un poli(etilenglicol) ramificado.

13. El método de la reivindicación 10, donde el poli(etilenglicol) es un poli(etilenglicol) de múltiples brazos.

14. El método de la reivindicación 10, donde el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000 Daltons.

15. El método como en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, donde el polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo es un polímero hidrosoluble acabado en amina.

16. El método como en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, donde el polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo es un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo.

17. El método como en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, donde el exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo representa al menos aproximadamente un exceso del 5% mol.

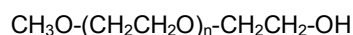
18. El método como en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, donde el exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo representa al menos aproximadamente un exceso del 50% mol.

19. El método como en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, donde el exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo representa al menos aproximadamente un exceso dos veces molar.

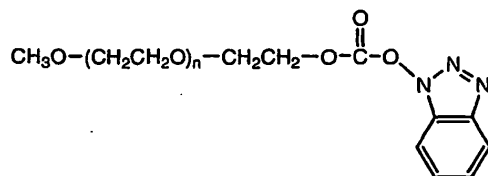
20. El método como en la reivindicación 1, donde la molécula reactiva es agua.

21. Un método sintético según la reivindicación 1, consistente en:

(a) combinar una composición que contiene un solvente aprótico y un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo que tiene la siguiente estructura:



donde (n) es un número entero de 2 a 4.000, con una composición que contiene carbonato de di(1-benzotriazolilo), donde la composición que contiene el carbonato de di(1-benzotriazolilo) es añadida de tal forma que haya un exceso del carbonato de di(1-benzotriazolilo) en relación al polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo, para así obtener una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble que tiene la siguiente estructura:

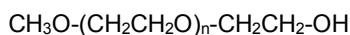


donde (n) es un número entero de 2 a 4.000, y carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado;

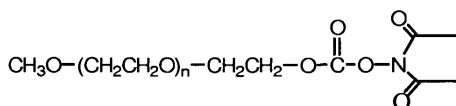
(b) añadir, antes de recuperar el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble, una composición que contiene una molécula reactiva seleccionada entre el grupo consistente en agua, un alcohol monohídrico de alquilo inferior, sulfuro de hidrógeno y una amina monobásica de alquilo inferior a la composición que contiene el éster de carbonato activo de un polímero hidrosoluble y carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado, donde la composición que contiene el compuesto reactivo es añadida de tal forma que se consuma más de un 50% del carbonato de di(1-benzotriazolilo) no reaccionado.

22. Un método sintético según la reivindicación 1, que consiste en:

(a) combinar una composición que contiene un solvente aprótico y un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo que tiene la siguiente estructura:



donde (n) es un número entero de 2 a 4.000, con una composición que contiene carbonato de disuccinimidilo, donde la composición que contiene el carbonato de disuccinimidilo es añadida de tal forma que haya un exceso del carbonato de disuccinimidilo en relación al polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo, para obtener así una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble que tiene la siguiente estructura:

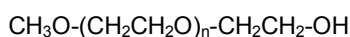


donde (n) es un número entero de 2 a 4.000, y carbonato de disuccinimidilo no reaccionado;

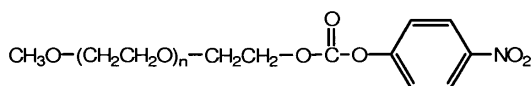
(b) añadir, antes de recuperar el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble, una composición que contiene una molécula reactiva seleccionada entre el grupo consistente en agua, un alcohol monohídrico de alquilo inferior, sulfuro de hidrógeno y una amina monobásica de alquilo inferior a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y carbonato de disuccinimidilo no reaccionado, donde la composición que contiene la molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma más de un 50% del carbonato de disuccinimidilo no reaccionado.

23. Un método sintético según la reivindicación 1, que consiste en:

(a) combinar una composición que contiene un solvente aprótico y un polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo que tiene la siguiente estructura:



donde (n) es un número entero de 2 a 4.000, con una composición que contiene cloroformiato de p-nitrofenilo, donde la composición que contiene el cloroformiato de p-nitrofenilo es añadida de tal forma que haya un exceso del cloroformiato de p-nitrofenilo en relación al polímero hidrosoluble acabado en hidroxilo, para obtener así una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble que tiene la siguiente estructura:



donde (n) es un número entero de 2 a 4.000, y cloroformiato de p-nitrofenilo no reaccionado;

(b) añadir, antes de recuperar el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble, una composición que contiene una molécula reactiva seleccionada entre el grupo consistente en agua, un alcohol monohídrico de alquilo inferior, sulfuro de hidrógeno y una amina monobásica de alquilo inferior a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y cloroformiato de p-nitrofenilo no reaccionado, donde la composición que contiene la molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma más de un 50% del cloroformiato de p-nitrofenilo no reaccionado.

24. Un método sintético según la reivindicación 1, que consiste en:

hacer reaccionar un reactivo polimérico preparado por

(a) combinación de una composición que contiene un solvente aprótico y un polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo con una composición que contiene un reactivo de carbonato activado seleccionado entre el grupo consistente en carbonato de di(1-benzotriazolilo), carbonato de disuccinimidilo, cloroformiato de p-nitrofenilo, tricloroformiato de triclorofenilo, carbonato de p-nitrofenilsuccinimidilo, carbonato de p-nitrofenil-1-benzotriazolilo, cloroformiato de pentafluorofenilo y 1,1'-carbonyldiimidazol, eventualmente en presencia de un catalizador o de una base neutralizadora de ácido, donde la composición que contiene el reactivo de carbonato activado es añadida de tal forma que haya un exceso del reactivo de carbonato activado en relación al polímero hidrosoluble acabado en amina o acabado en hidroxilo, para obtener así una composición que contiene un éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado;

(b) adición, antes de recuperar el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble, de una composición que contiene una molécula reactiva seleccionada entre el grupo consistente en agua, un alcohol monohídrico de alquilo inferior, sulfuro de hidrógeno y una amina monobásica de alquilo inferior a la composición que contiene el éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble y reactivo de carbonato activado no reaccionado, donde la composición que contiene una molécula reactiva es añadida de tal forma que se consuma más de un 50% del reactivo de carbonato activado no reaccionado; y

(c) reacción del éster de carbonato activo del polímero hidrosoluble en una o más reacciones para formar un reactivo polimérico

con un principio activo en condiciones de conjugación, para obtener así un conjugado de polímero hidrosoluble-principio activo.