

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 450**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07C 323/12 (2006.01)

C07D 213/70 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2006 E 10184832 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2279758**

54 Título: **Conjugados que tienen una unión degradable y reactivos poliméricos útiles en la preparación de tales conjugados**

30 Prioridad:

16.06.2005 US 691516 P

04.08.2005 US 705968 P

16.12.2005 US 751082 P

16.12.2005 US 751121 P

21.12.2005 US 752825 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BENTLEY, MICHAEL;
CULBERTSON, SEAN y
MCMANUS, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 536 450 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

Conjugados que tienen una unión degradable y reactivos poliméricos útiles en la preparación de tales conjugados

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere en general a reactivos poliméricos útiles en proporcionar un conjugado que tiene una unión degradable entre un polímero y otro resto. Además, la invención se refiere, entre otras cosas, a conjugados de los reactivos poliméricos, a métodos para sintetizar los reactivos poliméricos y a métodos para
10 conjuguar los reactivos poliméricos con principios activos y otros restos.

Antecedentes de la invención

Los científicos y médicos se enfrentan a varios retos en sus intentos por desarrollar principios activos en formas adecuadas para su administración a un paciente. Los principios activos que son polipéptidos, por ejemplo, a menudo se administran por medio de inyección en lugar de por vía oral. De esta forma, el polipéptido se introduce en la circulación sistémica sin exponerse al entorno proteolítico del estómago. Sin embargo, la inyección de polipéptidos tiene varios inconvenientes.
15

Por ejemplo, muchos polipéptidos tienen una semivida relativamente corta, necesitando de ese modo inyecciones repetidas, que a menudo resultan incómodas y dolorosas. Además, algunos polipéptidos pueden provocar una o más respuestas inmunitarias con la consecuencia de que el sistema inmunitario del paciente intenta destruir o neutralizar de otro modo el polipéptido inmunogénico. Naturalmente, una vez que el polipéptido se ha destruido o neutralizado de otro modo, el polipéptido no puede ejercer su actividad farmacodinámica pretendida. Por tanto, la
20 administración de principios activos tales como polipéptidos a menudo resulta problemática incluso cuando estos agentes se administran mediante inyección.

Se han logrado algunos éxitos al abordar los problemas de administración de principios activos por medio de inyección. Por ejemplo, conjuguar el principio activo con un polímero soluble en agua ha dado como resultado conjugados de polímero-principio activo que tienen inmunogenicidad y antigenicidad reducidas. Además, estos conjugados de polímero-principio activo a menudo tienen semividas enormemente aumentadas en comparación con sus homólogos no conjugados como resultado del aclaramiento disminuido a través del riñón y/o la degradación enzimática disminuida en la circulación sistémica. Como resultado de tener una semivida mayor, el conjugado de polímero-principio activo requiere una dosificación menos frecuente, lo que a su vez reduce el número global de inyecciones dolorosas e incómodas visitas a un profesional sanitario. Además, los principios activos que eran sólo ligeramente solubles demuestran un aumento significativo en la solubilidad en agua cuando se conjugan con un polímero soluble en agua.
30

Debido a su seguridad documentada, así como a su aprobación por la FDA tanto para uso tópico como interno, se ha conjugado polietilenglicol con principios activos. Cuando se conjuga un principio activo con un polímero de polietilenglicol o "PEG", el principio activo conjugado se denomina de manera convencional "pegilado." El éxito comercial de principios activos pegilados tales como interferón alfa-2a pegilado PEGASYS[®] (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), interferón alfa-2b pegilado PEG-INTRON[®] (Schering Corp., Kenilworth, NJ) y PEG-filgrastim NEULASTA[™] (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) demuestra que la administración de una forma conjugada de un principio activo puede tener ventajas significativas con respecto al homólogo no conjugado. También se han pegilado moléculas pequeñas 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 productos farmacéuticos. Harris *et al.* (2003) Nat. Rev. Drug Discov. 2(3):214-221.
40

Pese a estos éxitos, la conjugación de un polímero con un principio activo para dar como resultado un fármaco relevante comercialmente es a menudo complicada. Por ejemplo, la conjugación puede dar como resultado que el polímero se una en o cerca de un sitio en el principio activo que es necesario para la actividad farmacológica (por ejemplo, en o cerca de un sitio de unión). Tales conjugados pueden tener por tanto una actividad inaceptablemente baja debido a, por ejemplo, los efectos estéricos introducidos por el polímero. Los intentos por reparar conjugados que tienen una actividad inaceptablemente baja pueden frustrarse cuando el principio activo tiene pocos o ningún otro sitio adecuado para la unión a un polímero. Por tanto, se han deseado alternativas de pegilación adicionales.
45

Un enfoque sugerido para solucionar éste y otros problemas es la "pegilación reversible" en la que se libera el principio activo nativo (o un resto que tiene actividad aumentada en comparación con el principio activo pegilado). Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0079155 describe conjugados que usan uniones reversibles. Tal como se describe en esta publicación, pueden efectuarse uniones reversibles a través del uso de un resto de sustrato enzimático. Sin embargo, se ha señalado que los enfoques basados en la actividad enzimática dependen de la disponibilidad de enzimas. Véase Peleg-Schulman (2004) J. Med. Chem. 47:4897-4904.
50

Por tanto, se han descrito como deseables enfoques adicionales que no se basan en procesos enzimáticos para la degradación.
55

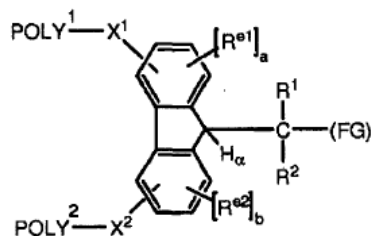
Uno de tales enfoques para la pegilación reversible describe un reactivo polimérico que comprende un resto de fluoreno al que se une un polímero ramificado usando química de maleimida. Véase id. Peleg-Schulman (2004) J. Med. Chem. 47:4897-4904 y el documento WO 2004/089280. El enfoque de síntesis usado para formar el reactivo polimérico descrito es complejo, requiriendo muchas etapas. Por consiguiente, son necesarios reactivos poliméricos alternativos que no requieran tales esquemas de síntesis complejos.

Otro enfoque de conjugación reversible se describe en la patente estadounidense n.º 6.514.491. Las estructuras descritas en esta patente incluyen aquellas en las que un polímero no peptídico, soluble en agua, se une a un grupo aromático a través de un único punto de unión. Aunque se proporcionan uniones degradables dentro del conjugado, existe la necesidad de proporcionar reactivos poliméricos todavía adicionales que puedan formar uniones degradables con un conjugado.

Por tanto, siguen siendo necesarios reactivos poliméricos adicionales útiles en proporcionar conjugados que tienen una unión degradable entre un polímero y otro resto. Además, sigue siendo necesario proporcionar una variedad de reactivos poliméricos útiles en proporcionar conjugados que tienen una variedad de tasas de liberación. Por tanto, la presente invención busca solucionar éstas y otras necesidades en la técnica.

Sumario de la invención

En una o más realizaciones de la presente invención, se proporciona un reactivo polimérico de la siguiente fórmula:



(Fórmula V)

en la que:

POLY¹ es un primer poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 1000.000 Daltons;

POLY² es un segundo poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 1000.000 Daltons;

X¹ es un primer resto espaciador;

X² es un segundo resto espaciador;

H_α es un átomo de hidrógeno ionizable;

R¹ es H o un radical orgánico;

R² es H o un radical orgánico;

(a) es o bien cero o bien uno;

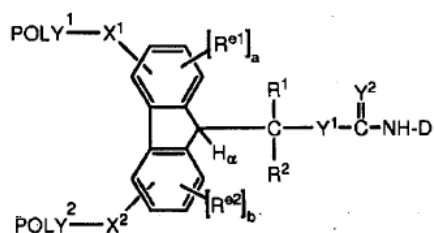
(b) es o bien cero o bien uno;

R^{e1}, cuando está presente, es un primer grupo de alteración de electrones;

R^{e2}, cuando está presente, es un segundo grupo de alteración de electrones; y

(FG) es un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable, tal como una unión de carbamato.

En una o más realizaciones de la presente invención, se proporciona un conjugado que comprende la estructura:



(Fórmula V-C)

POLY¹ es un primer poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 1000.000 Daltons;

POLY² es un segundo poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 1000.000 Daltons;

X¹ es un primer resto espaciador;

X² es un segundo resto espaciador;

H_α es un átomo de hidrógeno ionizable;

R¹ es H o un radical orgánico

R² es H o un radical orgánico;

(a) es o bien cero o bien uno;

(b) es o bien cero o bien uno;

R^{e1}, cuando está presente, es un primer grupo de alteración de electrones;

R^{e2}, cuando está presente, es un segundo grupo de alteración de electrones; e

Y¹ es O o S;

Y² es O o S; y

D es un residuo de un principio biológicamente activo.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un reactivo polimérico preparado según los métodos descritos para preparar reactivos poliméricos.

En una o más realizaciones de la invención, se proporcionan métodos para preparar conjugados.

En una o más realizaciones de la invención, se proporcionan conjugados preparados usando los reactivos poliméricos novedosos descritos en el presente documento.

En una o más realizaciones de la invención, se proporcionan preparaciones farmacéuticas que comprenden los conjugados.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción de insulina y el reactivo polimérico preparado tal como se describe en el ejemplo 2.

La figura 2 es un cromatograma de HPLC del conjugado de 1 mero pegilado preparado tal como se describe en el ejemplo 2.

La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de un estudio de degradación de un conjugado degradable de 1 mero de PEG-insulina (realizado a pH 7,35 y 37°C) tal como se describe en el ejemplo 2.

La figura 4 corresponde a un análisis de SDS-PAGE de una mezcla de reacción de G2PEG2Fmoc_{20K}-GLP-1 tal como se describe en el ejemplo 6. Carril 1: Patrón no teñido Mark 12 de Invitrogen. Carril 2: mezcla de reacción de G2PEG2Fmoc_{20K}-N^{ter}-GLP-1.

La figura 5 demuestra los resultados de purificación de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 monopegilado mediante cromatografía de intercambio catiónico tal como se describe en el ejemplo 6.

5 La figura 6 corresponde a un análisis de SDS-PAGE de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 monopegilado antes y después de la liberación de GLP-1 (ejemplo 6). Carril 1: Patrón no teñido Mark 12 de Invitrogen. Carril 2: Conjugado de G2PEG2-Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 monopegilado tras la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico. Carril 3: Tras la liberación completa de GLP-1 del conjugado de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1.

10 Las figuras 7A, 7B demuestran un análisis de HPLC de fase inversa del conjugado de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 monopegilado tras la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (figura 7A) y tras la liberación de GLP-1 del conjugado de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 (figura 7B), tal como se describe en el ejemplo 6.

15 La figura 8 ilustra los resultados de purificación de G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1 monopegilado mediante cromatografía de intercambio catiónico tal como se describe en el ejemplo 7.

20 La figura 9 muestra los resultados de un análisis de SDS-PAGE de G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1 monopegilado antes y después de la liberación de GLP-1 (ejemplo 7). Carril 1: Patrón no teñido Mark 12 de Invitrogen. Carril 2: Conjugado de G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1 monopegilado tras la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico. Carril 3: Tras la liberación de GLP-1 del conjugado de G2PEG2-Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1.

La figura 10 demuestra la purificación de G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP monopegilado mediante cromatografía de intercambio catiónico (ejemplo 8).

25 La figura 11 corresponde a un análisis de SDS-PAGE de G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1 monopegilado purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico (ejemplo 8). Carril 1: Patrón no teñido Mark 12 de Invitrogen. Carriles 2 a 6: Fracciones que contienen conjugado de G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1 monopegilado tras cinco purificaciones individuales mediante cromatografía de intercambio iónico.

30 La figura 12 ilustra los resultados de purificación de G2PEG2Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1 monopegilado mediante cromatografía de intercambio catiónico (ejemplo 9).

35 La figura 13 representa un análisis de SDS-PAGE de la mezcla de reacción y fracciones de G2PEG2Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1 a partir de una purificación cromatográfica de intercambio catiónico tal como se describe en el ejemplo 9. Carril 1: Patrón no teñido Mark 12 de Invitrogen. Carril 2: Mezcla de reacción de G2PEG2Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1. Carriles 3-5: Fracciones a partir del pico en el volumen de retención de 9,37 ml. Carriles 6-10: Fracciones de G2PEG2Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1 monopegilado recogidas a partir del pico en el volumen de retención de 158,3 ml.

40 La figura 14 es un gráfico que demuestra los efectos hipoglucemiantes comparativos a lo largo del tiempo del conjugado de GLP-1, G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1 y el conjugado de G2PEG2Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1 cuando se administran por vía subcutánea a ratones db/db tal como se describe en el ejemplo 10.

45 La figura 15 es un gráfico que demuestra los efectos hipoglucemiantes comparativos a lo largo del tiempo del conjugado de GLP-1, G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 y el conjugado de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 cuando se administran por vía subcutánea a ratones db/db tal como se describe en el ejemplo 10.

La figura 16 es un gráfico de los resultados obtenidos a partir del experimento realizado en el ejemplo 11.

Descripción detallada de la invención

50 Debe observarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a un “polímero” incluye un único polímero así como dos o más polímeros iguales o diferentes, la referencia a un “conjugado” se refiere a un único conjugado así como a dos o más conjugados iguales o diferentes, la referencia a un “excipiente” incluye un único excipiente así como dos o más excipientes iguales o diferentes, y similares.

Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología según las definiciones descritas a continuación.

60 “PEG”, “polietilenglicol” y “poli(etilenglicol)” tal como se usan en el presente documento pretenden abarcar cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Normalmente, los PEG para su uso según la invención comprenden la siguiente estructura “-O(CH₂CH₂O)_m-” en la que (m) es de 2 a 4000. Tal como se usa en el presente documento, PEG también incluye “-CH₂CH₂-O(CH₂CH₂O)_m-CH₂CH₂-” y “-(CH₂CH₂O)_m-”, dependiendo de si los oxígenos terminales se han desplazado o no. Cuando el PEG comprende adicionalmente un resto espaciador (que va a describirse en mayor detalle a continuación), los átomos que comprende el resto espaciador, cuando se unen covalentemente a un segmento de polímero soluble en agua, no dan como resultado la formación de un enlace

oxígeno-oxígeno (es decir, una unión “-O-O-” o de peróxido). A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, debe recordarse que el término “PEG” incluye estructuras que tienen diversos grupos terminales o “de ocupación de extremos”, etc. El término “PEG” también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más del 50%, de subunidades monoméricas de -CH₂CH₂O-. Con respecto a las formas específicas, el PEG puede adoptar cualquier número de una variedad de pesos moleculares, así como estructuras o geometrías tales como “ramificadas”, “lineales”, “bifurcadas”, “multifuncionales” y similares, que van a describirse en mayor detalle a continuación.

Los términos “con extremos ocupados” o “con ocupación terminal” se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un extremo terminal o terminación de un polímero que tiene un resto de ocupación de extremos. Normalmente, aunque no es necesario, el resto de ocupación de extremos comprende un grupo hidroxilo o alcoxilo C₁₋₂₀. Por tanto, los ejemplos de restos de ocupación de extremos incluyen alcoxilo (por ejemplo, metoxilo, etoxilo y benciloxilo), así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo, y similares. Además, se prevén formas saturadas, insaturadas, sustituidas y no sustituidas de cada uno de los anteriores. Además, el grupo de ocupación de extremos también puede ser un silano. El grupo de ocupación de extremos también puede comprender ventajosamente un marcador detectable. Cuando el polímero tiene un grupo de ocupación de extremos que comprende un marcador detectable, puede determinarse la cantidad o ubicación del polímero y/o el resto (por ejemplo, principio activo) de interés al que se acopla el polímero mediante el uso de un detector adecuado. Tales marcadores incluyen, sin limitación, agentes que fluorescen, agentes quimioluminiscentes, restos usados en marcaje enzimático, agentes colorimétricos (por ejemplo, colorantes), iones metálicos, restos radiactivos, y similares. Los detectores adecuados incluyen fotómetros, películas, espectrómetros, y similares.

“Que no se produce de manera natural” con respecto a un polímero o polímero soluble en agua significa un polímero que en su conjunto no se encuentra en la naturaleza. Sin embargo, un polímero que no se produce de manera natural o polímero soluble en agua puede contener una o más subunidades o partes de una subunidad que se producen de manera natural, siempre que la estructura del polímero global no se encuentre en la naturaleza.

El término “polímero soluble en agua” es cualquier polímero que es soluble en agua a temperatura ambiente. Normalmente, un polímero soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente 75°C, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de luz, transmitida por la propia disolución tras el filtrado. En una base en peso, un polímero soluble en agua será preferiblemente soluble en agua en al menos aproximadamente el 35% (en peso), más preferiblemente soluble en agua en al menos aproximadamente el 50% (en peso), todavía más preferiblemente soluble en agua en aproximadamente el 70% (en peso) y todavía más preferiblemente soluble en agua en aproximadamente el 85% (en peso). Sin embargo, todavía se prefiere más que el polímero soluble en agua sea soluble en agua en aproximadamente el 95% (en peso) y lo más preferido que el polímero soluble en agua sea completamente soluble en agua.

El peso molecular en el contexto de un polímero soluble en agua de la invención, tal como PEG, puede expresarse como o bien un peso molecular promedio en número o bien un peso molecular promedio en peso. A menos que se indique otra cosa, todas las referencias al peso molecular en el presente documento se refieren al peso molecular promedio en peso. Ambas determinaciones del peso molecular, promedio en número y promedio en peso, pueden medirse usando cromatografía de permeación en gel u otras técnicas de cromatografía de líquidos. Pueden usarse otros métodos para medir los valores de peso molecular, tal como el uso de análisis de grupos de extremo o la medición de propiedades coligativas (por ejemplo, disminución del punto de congelación, elevación del punto de ebullición o presión osmótica) para determinar el peso molecular promedio en número o el uso de técnicas de dispersión de la luz, ultracentrifugación o viscosimetría para determinar el peso molecular promedio en peso. Los polímeros de la invención normalmente son polidispersos (es decir, el peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso de los polímeros no son iguales), presentando valores de polidispersidad bajos de preferiblemente menos de aproximadamente 1,2, más preferiblemente menos de aproximadamente 1,15, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 1,10, aún todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 1,05 y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 1,03.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido carboxílico” es un resto que tiene un grupo funcional



[también representado como “-COOH” o -C(O)OH], así como restos que son derivados de un ácido carboxílico, incluyendo tales derivados, por ejemplo, ácidos carboxílicos protegidos. Por tanto, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, el término ácido carboxílico incluye no sólo la forma de ácido, sino también los ésteres y las formas protegidas correspondientes. Con respecto a los grupos protectores adecuados para un ácido carboxílico y cualquier otro grupo funcional descrito en el presente documento, se hace referencia a Greene *et al.*, “PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS” 3ª edición, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1999.

El término “reactivo” o “activado” cuando se usa conjuntamente con un grupo funcional particular, se refiere a un

grupo funcional reactivo que reacciona fácilmente con un electrófilo o un nucleófilo u otra molécula. Esto es en contraposición con aquellos grupos que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción altamente inviables con el fin de reaccionar (es decir, un grupo “no reactivo” o “inerte”).

- 5 Los términos “protegido” o “grupo protector” o “grupo de protección” se refieren a la presencia de un resto (es decir, el grupo protector) que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo particular en una molécula en determinadas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo funcional químicamente reactivo que esté protegiéndose, así como de las condiciones de reacción que van a emplearse y de la presencia de reactivos o grupos protectores adicionales en la molécula, si los hay. Pueden encontrarse grupos protectores conocidos en la técnica en Greene *et al.*, citado anteriormente.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “grupo funcional” o cualquier sinónimo del mismo pretende abarcar formas protegidas del mismo.

- 15 Los términos “espaciador” o “resto espaciador” se usan en el presente documento para referirse a un átomo o un conjunto de átomos usados opcionalmente para unir un resto a otro, tal como un segmento de polímero soluble en agua a un resto que contiene grupo aromático. Los restos espaciadores de la invención pueden ser hidrolíticamente estables o pueden incluir una o más uniones fisiológicamente hidrolizables o enzimáticamente degradables.

- 20 Un “radical orgánico” tal como se usa incluye, por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

- 25 “Alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada, que oscila normalmente entre aproximadamente 1 y 20 átomos de longitud. Tales cadenas hidrocarbonadas, preferiblemente aunque no necesariamente, están saturadas y pueden ser una cadena lineal o ramificada, aunque se prefiere normalmente una cadena lineal. Los grupos alquilo a modo de ejemplo incluyen etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares. Tal como se usa en el presente documento, “alquilo” incluye cicloalquilo cuando se hace referencia a tres o más átomos de carbono y alquilo inferior.

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

- 35 “Cicloalquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada cíclica saturada o insaturada, incluyendo compuestos cíclicos en puente, condensados o de espiro, preferiblemente constituidos por de 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8.

“Sustituyentes que no interfieren” son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, normalmente no son reactivos con otros grupos funcionales contenidos dentro de la molécula.

- 40 El término “sustituido” como, por ejemplo, en “alquilo sustituido”, se refiere a un resto (por ejemplo, un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes que no interfieren, tales como, pero sin limitarse a: cicloalquilo C₃-C₈, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, y similares; halo, por ejemplo, flúor, cloro, bromo y yodo; ciano; alcoxilo, fenilo inferior (por ejemplo, fenilo 0-2 sustituido); fenilo sustituido; y similares. “Arilo sustituido” es arilo que tiene uno o más grupos que no interfieren como sustituyente. Para las sustituciones en un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta o para).

“Alcoxilo” se refiere a un grupo -O-R, en el que R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C₁-C₂₀ (por ejemplo, metoxilo, etoxilo, propiloxilo, bencilo, etc.), preferiblemente alquilo C₁-C₇.

- 50 Tal como se usa en el presente documento, “alquenilo” se refiere a un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado de 1 a 15 átomos de longitud, que contiene al menos un doble enlace, tal como etenilo, *n*-propenilo, isopropenilo, *n*-butenilo, isobutenilo, octenilo, decenilo, tetradecenilo, y similares.

- 55 El término “alquinilo”, tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado de 2 a 15 átomos de longitud, que contiene al menos un triple enlace, etinilo, *n*-butinilo, isopentinilo, octinilo, decinilo, etc.

- 60 “Arilo” significa uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 ó 6 átomos de carbono de núcleo. Arilo incluye múltiples anillos de arilo que pueden estar condensados, como en naftilo, o no condensados, como en bifenilo. Los anillos de arilo también pueden estar condensados o no condensados con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, de heteroarilo o heterocíclicos. Tal como se usa en el presente documento, “arilo” incluye heteroarilo. Un resto aromático (por ejemplo, Ar¹, Ar², etc.), significa una estructura que contiene arilo.

- 65 “Heteroarilo” es un grupo arilo que contiene desde uno hasta cuatro heteroátomos, preferiblemente N, O o S, o una combinación de los mismos. Los anillos de heteroarilo también pueden estar condensados con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, heterocíclicos, de arilo 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. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno y nitrógeno.

5

“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 de sustituyentes que no interfieren.

10

“Electrófilo” se refiere a un ion o átomo o conjunto de átomos que pueden ser iónicos que tiene un centro electrófilo, es decir, un centro que está buscando electrones, que puede reaccionar con un nucleófilo.

“Nucleófilo” se refiere a un ion o átomo o conjunto de átomos que pueden ser iónicos que tiene un centro nucleófilo, es decir, un centro que está buscando un centro electrófilo o con un electrófilo.

15

Un enlace “fisiológicamente escindible” o “hidrolizable” es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo general de unión que conecta dos átomos centrales, sino también de los sustituyentes unidos a esos átomos centrales. Las uniones débiles o hidrolíticamente inestables apropiadas incluyen, pero sin limitarse a, éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, orto-ésteres, péptidos y oligonucleótidos.

20

Una “unión degradable” incluye, pero sin limitarse a, un enlace fisiológicamente escindible, un enlace hidrolizable y una unión enzimáticamente degradable. Por tanto, una “unión degradable” es una unión que puede experimentar o bien hidrólisis o bien escisión mediante algún otro mecanismo (por ejemplo, catalizada por enzimas, catalizada por ácidos, catalizada por bases, etc.) en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, una “unión degradable” puede implicar una reacción de eliminación que tiene una abstracción de base de un protón, (por ejemplo, un átomo de hidrógeno ionizable, H_a), como fuerza impulsora.

25

30

Una “unión enzimáticamente degradable” significa una unión que se somete a degradación mediante una o más enzimas.

Una unión o enlace “hidrolíticamente estable” se refiere a un enlace químico, normalmente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, que no experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas en ningún grado apreciable a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Los ejemplos de uniones hidrolíticamente estables incluyen pero sin limitarse a las siguientes: enlaces carbono-carbono (por ejemplo, en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos (carbamatos), y similares. Generalmente, una unión hidrolíticamente estable es una que presenta una tasa de hidrólisis de menos de aproximadamente el 1-2% por día en condiciones fisiológicas. Pueden encontrarse tasas de hidrólisis de enlaces químicos representativos en la mayoría de los libros de texto de química convencionales. Debe señalarse que algunas uniones pueden ser hidrolíticamente estables o hidrolizables, dependiendo de (por ejemplo) los átomos adyacentes y vecinos y de las condiciones ambientales. Un experto habitual en la técnica puede determinar si una unión o enlace dado es hidrolíticamente estable o hidrolizable en un contexto dado, por ejemplo, colocando una molécula de interés que contiene la unión en condiciones de interés y sometiendo a prueba la evidencia de hidrólisis (por ejemplo, la presencia y la cantidad de dos moléculas que resultan de la escisión de una única molécula). También pueden usarse otros enfoques conocidos por los expertos habituales en la técnica para determinar si una unión o enlace dado es hidrolíticamente estable o hidrolizable.

35

40

45

Los términos “principio activo”, “principio biológicamente activo” y “principio farmacológicamente activo” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se definen para incluir cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de materia o mezcla que proporciona algún efecto farmacológico, a menudo beneficioso, que puede demostrarse *in vivo* o *in vitro*. Esto incluye alimentos, complementos alimenticios, nutrientes, nutricoséuticos, fármacos, proteínas, vacunas, anticuerpos, vitaminas y otros agentes beneficiosos. Tal como se usa en el presente documento, estos términos incluyen además cualquier principio fisiológica o farmacológicamente activo que produce un efecto localizado o sistémico en un paciente.

50

55

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

60

“Cantidad farmacológicamente eficaz”, “cantidades fisiológicamente eficaces” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se usan de manera intercambiable en el presente documento refiriéndose a la cantidad de un conjugado de polímero-principio activo, normalmente presente en una preparación farmacéutica, que es necesaria para proporcionar un nivel deseado de principio activo y/o conjugado en el torrente sanguíneo o en un tejido diana. La cantidad exacta dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el principio activo particular, los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes prevista, las consideraciones de los

65

pacientes, y similares, y puede determinarse fácilmente por un experto habitual en la técnica, basándose en la información proporcionada en el presente documento y disponible en la bibliografía relevante.

5 “Multifuncional” en el contexto de un polímero de la invención significa un polímero que tiene 3 o más grupos
 10 funcionales contenidos en el mismo, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes. Los polímeros multifuncionales de la invención contendrán normalmente desde aproximadamente 3 hasta 100 grupos funcionales, o desde 3 hasta 50 grupos funcionales, o desde 3 hasta 25 grupos funcionales, o desde 3 hasta 15 grupos funcionales, o desde 3 hasta 10 grupos funcionales, o contendrán 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos funcionales dentro del polímero. Un polímero “difuncional” significa un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos en el mismo, o bien iguales (es decir, homodifuncional) o bien diferentes (es decir, heterodifuncional).

15 “Ramificado”, en referencia a la geometría o a la estructura global de un polímero, se refiere un polímero que tiene 2 o más “brazos” de polímero. Un polímero ramificado puede presentar 2 brazos de polímero, 3 brazos de polímero, 4 brazos de polímero, 6 brazos de polímero, 8 brazos de polímero o más. Un tipo particular de polímero altamente ramificado es un polímero dendrítico o dendrímero, que, para los fines de la invención, se considera que presenta una estructura distinta de la de un polímero ramificado.

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

25 Un reactante básico o ácido descrito en el presente documento incluye formas neutras, cargadas y de cualquier sal correspondiente del mismo.

El término “paciente”, se refiere a un organismo vivo que padece o que es propenso a padecer un estado que puede evitarse o tratarse mediante la administración de un conjugado tal como se proporciona en el presente documento, e incluye tanto seres humanos como animales.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “átomo de hidrógeno ionizable” (“H_α”) significa un átomo de hidrógeno que puede eliminarse en presencia de una base, a menudo un hidróxido o base de amina. Normalmente, el “átomo de hidrógeno ionizable” (“H_α”) será un átomo de hidrógeno unido a un átomo de carbono que, a su vez, se une a uno o más restos aromáticos o a otro grupo o grupos que estabilizan de alguna forma el carbanión que se formaría a partir de la pérdida del átomo de hidrógeno ionizable como protón (o el estado de transición que conduce a dicho carbanión).

40 Tal como se usa en el presente documento, “tasa de liberación de fármaco” significa una tasa (establecida como una semivida) en la que la mitad de la cantidad total de los conjugados de polímero-principio activo en un sistema se escindirán para dar el principio activo y un residuo polimérico.

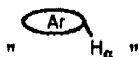
“Opcional” y “opcionalmente” significan que la circunstancia descrita posteriormente puede producirse o no, de modo que la descripción incluye casos en los que se produce la circunstancia y casos en los que no se produce.

45 Tal como se usa en el presente documento, el indicador “halo” (por ejemplo, flúor, cloro, yodo, bromo, etc.) se usa generalmente cuando el halógeno está unido a una molécula, mientras que el sufijo “uro” (por ejemplo, fluoruro, cloruro, yoduro, bromuro, etc.) se usa cuando el halógeno existe en su forma iónica independiente (por ejemplo, tal como cuando un grupo saliente sale de una molécula).

50 En el contexto de la presente discusión, debe reconocerse que la definición de una variable proporcionada con respecto a una estructura o fórmula es aplicable a la misma variable repetida en una estructura diferente, a menos que el contexto dicte otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la definición de “POLY”, “resto espaciador”, “R^{e1}” etc. con respecto a un reactivo polimérico es igualmente aplicable a un conjugado proporcionado en el presente documento.

55 Tal como se estableció anteriormente, la presente invención comprende (entre otras cosas) reactivos poliméricos útiles en proporcionar conjugados que tienen una unión degradable entre un polímero y otro resto. Sin desear restringirse a la teoría, se cree que los conjugados se degradan de tal manera que se minimiza o elimina completamente cualquier residuo o “etiqueta” del reactivo polimérico usado para formar el conjugado. Como consecuencia, es posible, tras la hidrólisis de un conjugado formado a partir de la reacción de un reactivo polimérico descrito en el presente documento con un principio activo que contiene amina, regenerar o recuperar la forma no conjugada y no modificada original del principio activo.

65 Tal como se comenta en el presente documento y tal como se demuestra por las fórmulas proporcionadas en el presente documento, los reactivos poliméricos de la invención comprenden uno o más polímeros solubles en agua (por ejemplo, “POLY¹” y “POLY²” tal como se expone en diversas fórmulas proporcionadas en el presente documento), un resto que contiene grupo aromático que porta un átomo de hidrógeno ionizable, H_α; (por ejemplo,



tal como se expone en diversas fórmulas proporcionadas en el presente documento), y un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable [por ejemplo, "(FG)" tal como se expone en diversas fórmulas proporcionadas en el presente documento]. Además, diversos componentes de los reactivos poliméricos descritos pueden unirse al resto del reactivo polimérico a través de un resto espaciador opcional (por ejemplo, como "X", "X¹", "X²" y "X³" tal como se expone en diversas fórmulas proporcionadas en el presente documento). Además uno, dos, tres, cuatro o más grupos de alteración de electrones (por ejemplo, "R^e", "R^{e1}", "R^{e2}", "R^{e3}", "R^{e4}" etc., tal como se expone en diversas fórmulas proporcionadas en el presente documento) pueden unirse al resto que contiene grupo aromático (tanto en el reactivo polimérico así como en el conjugado).

Antes de describir reactivos poliméricos a modo de ejemplo de la invención, se comentarán en primer lugar realizaciones de un polímero soluble en agua, un resto aromático, un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable, tal como una unión de carbamato, un grupo de alteración de electrones y un resto espaciador. Las siguientes descripciones de un polímero soluble en agua, un resto aromático, un grupo de alteración de electrones y un resto espaciador son aplicables no sólo al reactivo polimérico, sino a los conjugados correspondientes formados usando los reactivos poliméricos descritos.

Cada polímero soluble en agua es poli(etilenglicol). Un polímero soluble en agua puede ser lineal, pero también puede estar en otras formas (por ejemplo, ramificado, bifurcado, y similares) tal como se describirá en mayor detalle a continuación. En el contexto de estar presente dentro de una estructura global, un polímero soluble en agua tiene desde 1 hasta aproximadamente 300 extremos terminales.

Los polímeros solubles en agua dentro de una estructura dada son cada uno un poli(etilenglicol).

Aunque el peso molecular promedio en peso de cada polímero soluble en agua individual puede variar, el peso molecular promedio en peso de cualquier polímero soluble en agua dado normalmente estará en el siguiente intervalo: de más de 5.000 Daltons a aproximadamente 100.000 Daltons. Los intervalos a modo de ejemplo incluyen pesos moleculares promedio en peso en los siguientes intervalos: de más de 5.000 Daltons a aproximadamente 100.000 Daltons; en el intervalo de desde aproximadamente 6.000 Daltons hasta aproximadamente 90.000 Daltons; en el intervalo de desde aproximadamente 10.000 Daltons hasta aproximadamente 85.000 Daltons; en el intervalo de más de 10.000 Daltons hasta aproximadamente 85.000 Daltons; en el intervalo de desde aproximadamente 20.000 Daltons hasta aproximadamente 85.000 Daltons; en el intervalo de desde aproximadamente 53.000 Daltons hasta aproximadamente 85.000 Daltons.

Para cualquier polímero soluble en agua dado, se prefieren los PEG que tienen un peso molecular en uno o más de estos intervalos.

Los pesos moleculares promedio en peso a modo de ejemplo para el polímero soluble en agua incluyen aproximadamente 5.000 Daltons, aproximadamente 5.500 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 16.000 Daltons, aproximadamente 17.000 Daltons, aproximadamente 18.000 Daltons, aproximadamente 19.000 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 45.000 Daltons, aproximadamente 50.000 Daltons, aproximadamente 55.000 Daltons, aproximadamente 60.000 Daltons, aproximadamente 65.000 Daltons, aproximadamente 70.000 Daltons y aproximadamente 75.000 Daltons. También pueden usarse versiones ramificadas del polímero soluble en agua (por ejemplo, un polímero soluble en agua de 40.000 Daltons ramificado que comprende dos polímeros de 20.000 Daltons) que tiene un peso molecular promedio en peso total de cualquiera de los anteriores.

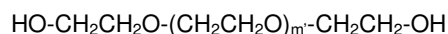
En una o más realizaciones de la invención, el reactivo polimérico comprenderá un polímero soluble en agua que tiene un tamaño en el intervalo adecuado para la tasa de liberación deseada del conjugado formado a partir del mismo. Por ejemplo, puede prepararse un conjugado que tiene una tasa de liberación relativamente larga a partir de un reactivo polimérico que tiene un tamaño adecuado para (a) circulación prolongada antes de la degradación del conjugado, y (b) aclaramiento moderadamente rápido *in vivo* del polímero soluble en agua que queda tras la degradación del conjugado. Asimismo, cuando el conjugado tiene una tasa de liberación relativamente rápida, entonces el reactivo polimérico tendría normalmente un peso molecular inferior.

El PEG comprende normalmente varios monómeros (OCH₂CH₂) [o monómeros (CH₂CH₂O), dependiendo de cómo

se defina el PEG]. Tal como se usa a lo largo de toda la descripción, el número de unidades de repetición se identifica mediante el subíndice "n" en "(OCH₂CH₂)_n". Por tanto, el valor de (n) normalmente se encuentra dentro de uno o más de los siguientes intervalos: desde aproximadamente 136 hasta aproximadamente 2050, desde aproximadamente 225 hasta aproximadamente 1930, desde aproximadamente 450 hasta aproximadamente 1930, desde aproximadamente 1200 hasta aproximadamente 1930 y desde aproximadamente 1.200 hasta aproximadamente 1.900. Para cualquier polímero dado en el que se conoce el peso molecular, es posible determinar el número de unidades de repetición (es decir, "n") dividiendo el peso molecular promedio en peso total del polímero entre el peso molecular del monómero de repetición.

Cada polímero soluble en agua normalmente es biocompatible y no inmunogénico. Con respecto a la biocompatibilidad, se considera que una sustancia es biocompatible si los efectos beneficiosos asociados con el uso de la sustancia sola o con otra sustancia (por ejemplo, un principio activo) en relación con tejidos vivos (por ejemplo, la administración a un paciente) compensan cualquier efecto perjudicial evaluado por un médico, por ejemplo, un doctor. Con respecto a la no inmunogenicidad, se considera que una sustancia no es inmunogénica si el uso de la sustancia sola o con otra sustancia en relación con tejidos vivos no produce una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la formación de anticuerpos) o, si se produce una respuesta inmunitaria, que tal respuesta no se considera clínicamente significativa o importante evaluado por un médico. Se prefiere particularmente que los polímeros solubles en agua, descritos en el presente documento así como conjugados de principios activos y los polímeros sean biocompatibles y no inmunogénicos.

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



en el que (m') normalmente oscila entre 136 y aproximadamente 2050.

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



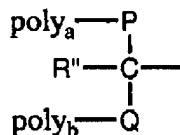
en la que (m') es tal como se definió anteriormente.

Otro tipo de PEG libre o no unido útil en la presente invención es metoxi-PEG-OH, o mPEG en forma resumida, en el que un extremo terminal es el grupo metoxilo relativamente inerte, mientras que el otro extremo terminal es un grupo hidroxilo. La estructura de mPEG se facilita a continuación.



en la que (m') es tal como se describió anteriormente.

También pueden usarse moléculas de PEG de múltiples brazos, o ramificadas, tales como las descritas en la patente estadounidense n.º 5.932.462, como polímero de PEG. Por ejemplo, PEG puede tener la estructura:



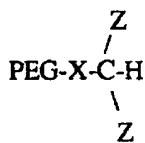
en la que:

poly_a y poly_b son estructuras principales de PEG (o bien iguales o bien diferentes), tales como metoxi-poli(etilenglicol);

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

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

Además, el PEG puede comprender un PEG bifurcado. Un ejemplo de un PEG bifurcado libre o no unido se representa mediante la siguiente fórmula:



en la que: X es un resto espaciador y cada Z es un grupo terminal activado unido a CH mediante una cadena de átomos de longitud definida. La cadena de átomos que une los grupos funcionales Z al átomo de carbono de ramificación sirve como grupo de fijación y puede comprender, por ejemplo, cadenas de alquilo, cadenas de éter, cadenas de éster, cadenas de amida y combinaciones de las mismas. La patente estadounidense n.º 6.362.254 da a conocer diversas estructuras de PEG bifurcadas que pueden usarse en la presente invención.

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

Además de las formas de PEG descritas anteriormente, cada polímero soluble en agua en el reactivo polimérico también puede prepararse con una o más uniones débiles o degradables en el polímero, incluyendo cualquiera de los polímeros descritos anteriormente. Por ejemplo, puede prepararse PEG con uniones de éster en el polímero que se someten a hidrólisis. Tal como se muestra a continuación, esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de peso molecular inferior:



Otras uniones hidrolíticamente degradables, útiles como unión degradable dentro de una estructura principal de polímero, incluyen uniones de carbonato; uniones de imina que resultan, por ejemplo, de la reacción de una amina y un aldehído (véase, por ejemplo, Ouchi *et al.* (1997) *Polymer Preprints* 38(1):582-3); uniones de éster de fosfato formadas, por ejemplo, haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; uniones de hidrazona que normalmente se forman mediante la reacción de una hidrazida y un aldehído; uniones de acetal que normalmente se forman mediante la reacción entre un aldehído y un alcohol; uniones de orto-éster que, por ejemplo, se forman mediante la reacción entre un formiato y un alcohol; uniones de amida formadas mediante un grupo amina, por ejemplo, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de otra cadena de PEG; uniones de uretano formadas a partir de la reacción de, por ejemplo, un PEG con un grupo isocianato terminal y un alcohol de PEG; uniones de péptido formadas mediante un grupo amina, por ejemplo, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y uniones de oligonucleótido formadas mediante, por ejemplo, un grupo fosforamídita, por ejemplo, en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo en 5' de un oligonucleótido.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término "polímero soluble en agua" se refiere tanto a una molécula así como al residuo de polímero soluble en agua que se ha unido a otro resto.

Cada polímero soluble en agua se une (o bien directamente o bien a través de un resto espaciador que comprende uno o más átomos) a un resto que contiene grupo aromático que porta un átomo de hidrógeno ionizable. Por tanto, el resto que contiene grupo aromático sirve como punto de unión para uno o más polímeros solubles en agua.

Sin desear restringirse a la teoría, se cree que es ventajoso tener el resto que contiene grupo aromático que sirve como punto de unión para uno o más polímeros solubles en agua. Específicamente, al tener cada polímero soluble en agua unido (o bien directamente o bien a través de un resto espaciador) al resto que contiene grupo aromático, pueden reducirse los efectos tóxicos a menudo asociados con las especies aromáticas a través de un efecto estérico o bloqueante proporcionado por el polímero soluble en agua. Este efecto estérico o bloqueante puede reducir o eliminar procesos metabólicos potencialmente perjudiciales que se producen potencialmente cuando se administran algunas sustancias aromáticas. Por tanto, los reactivos poliméricos descritos en el presente documento que tienen dos o más polímeros solubles en agua pueden proporcionar conjugados que se cree que tienen toxicidad reducida. Se cree que una ventaja de este tipo supone una diferencia con respecto a otros reactivos poliméricos (y conjugados correspondientes) en los que, por ejemplo, un único polímero soluble en agua ramificado se une a un resto que contiene grupo aromático.

Aunque puede usarse la mayoría de cualquier resto que contiene grupo aromático que porta un átomo de hidrógeno ionizable, el resto que contiene grupo aromático debe proporcionar un sitio o sitios para la unión de diversos componentes. Además, debe reconocerse que el resto que contiene grupo aromático no tiene que ser por sí mismo completamente aromático. El resto que contiene grupo aromático puede contener, por ejemplo, uno o más restos aromáticos separados unidos opcionalmente entre sí directamente o a través de un resto espaciador que comprende uno o más átomos.

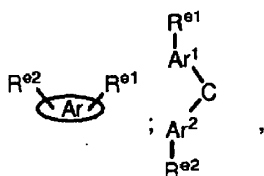
Los restos aromáticos (que pueden estar sustituidos adicionalmente con uno o más grupos de alteración de electrones tal como se explicará adicionalmente en el presente documento) son (cuando el átomo de hidrógeno ionizable de interés es un hidrógeno unido a un carbono alifático adyacente a uno o más de los anillos aromáticos, es decir, es bencílico o de tipo bencílico):

En una o más realizaciones, el resto que contiene grupo aromático que porta un átomo de hidrógeno ionizable incluye opcionalmente uno o más grupos de alteración de electrones ("R^{e1}", "R^{e2}", etc.). Un grupo de alteración de electrones es un grupo que es o bien electrodonador (y por tanto se denomina "grupo electrodonador") o bien electroaceptor (y por tanto se denomina "grupo electroaceptor"). Cuando se une al resto que contiene grupo aromático que porta un átomo de hidrógeno ionizable, un grupo electrodonador es un grupo que tiene la capacidad de colocar electrones lejos de sí mismo y más cerca de o dentro del resto que contiene grupo aromático. Cuando se une al resto que contiene grupo aromático que porta un átomo de hidrógeno ionizable, un grupo electroaceptor es un grupo que tiene la capacidad de colocar electrones hacia sí mismo y lejos del el resto que contiene grupo aromático. Se usa hidrógeno como patrón para la comparación en la determinación de si un grupo dado coloca electrones lejos o hacia sí mismo.

Aunque sin desear restringirse a la teoría, los grupos de alteración de electrones, al cambiar la posición de los electrones (es decir, la "densidad electrónica") del resto que contiene grupo aromático que porta un átomo de hidrógeno ionizable, influyen en la facilidad mediante la cual se ioniza el átomo de hidrógeno ionizable. Por tanto, se cree que los grupos electroaceptores aumentan la acidez del átomo de hidrógeno ionizable mientras que los grupos electrodonadores disminuyen la acidez del átomo de hidrógeno ionizable. Los grupos electrodonadores y electroaceptores que afectan a la acidez del átomo de hidrógeno ionizable incluyen grupos contenidos dentro de los restos espaciadores (por ejemplo, X¹, X², X³, etc.) que sirven para unir diversos constituyentes de la estructuras proporcionadas en el presente documento.

Los grupos electroaceptores a modo de ejemplo incluyen halo (por ejemplo, bromo, flúor, cloro y yodo), nitro, carboxilo, éster, formilo, ceto, azo, amidocarbonilo, amidosulfonilo, carboxamido, sulfonoxilo, sulfonamida, ureido y arilo. Los grupos electrodonadores a modo de ejemplo incluyen hidroxilo, alcoxilo inferior (por ejemplo, metoxilo, etoxilo y similares), alquilo inferior (tal como metilo, etilo, y similares), amino, alquilamino inferior, di-alquilamino inferior, ariloxilo (tal como fenoxilo y similares), arilalcoxilo (tal como fenoxilo y similares), aminoarilos (tales como p-dimetilaminofenilo y similares), mercapto y alquilitio.

En una o más realizaciones, el resto que contiene grupo aromático puede incluir (además de uno o más polímeros solubles en agua) uno, dos tres, cuatro o más grupos de alteración de electrones. Se muestran casos a modo de ejemplo en los que el resto que contiene grupo aromático incluye dos grupos de alteración de electrones en las siguientes estructuras a continuación:



en las que

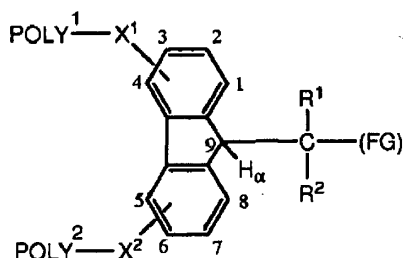


es un resto que contiene grupo aromático, Ar¹ es un primer resto aromático, Ar² es un segundo resto aromático, R^{e1} es un grupo de alteración de electrones y R^{e2} es un grupo de alteración de electrones, mientras que no se muestran el átomo de hidrógeno ionizable (es decir, H_α), el uno o más polímeros solubles en agua y cualquier otro constituyente que pueda estar presente. Cuando cada uno de R^{e1} y R^{e2} es diferente, (a) R^{e1} y R^{e2} pueden ser grupos electroaceptores diferentes, (b) R^{e1} y R^{e2} pueden ser grupos electrodonadores diferentes, (c) o R^{e1} y R^{e2} pueden ser tales que uno es un grupo electroaceptor y el otro es un grupo electrodonador. Sin embargo, en muchas circunstancias cada uno de R^{e1} y R^{e2} serán iguales.

Normalmente, aunque no necesariamente, la colocación de un grupo de alteración de electrones en el resto que contiene grupo aromático que porta un átomo de hidrógeno ionizable se determina a menudo mediante el punto de entrada preferido de los grupos de alteración de electrones añadidos a través de procedimientos de sustitución electrófila o nucleófila aromática. Por ejemplo, con un anillo de fluoreno, las posiciones típicas para la adición de grupos de alteración de electrones mediante sustitución aromática electrófila son las posiciones "2" y "7". Si estas posiciones están ocupadas por un resto espaciador (que se une a un polímero soluble en agua) se sustituirán otras posiciones en el anillo de fluoreno basándose en factores tales como (a) la capacidad de direccionamiento del resto

espaciador (por ejemplo, X^1 y X^2), y (b) influencias estéricas. A menudo, sin embargo, las posiciones "4" y "5" de un anillo de fluoreno representan los sitios más probables para la unión cuando las posiciones "2" y "7" no están disponibles y especialmente cuando el carbono alfa, es decir, la posición 9 en el fluoreno (es decir, el carbono que porta un átomo de hidrógeno ionizable, H_α), está sustituido. Para ilustración, las posiciones en el anillo de fluoreno se identifican en la siguiente estructura:

5



en la que, cada uno de $POLY^1$, $POLY^2$, X^1 , X^2 , R^1 , R^2 , H_α y (FG) es tal como se define con respecto a la fórmula I, citada más adelante. Aunque se ha hecho referencia a las posiciones a modo de ejemplo de los grupos de alteración de electrones y otros grupos con respecto a un anillo de fluoreno, la presente descripción de la ubicación de posición de los grupos de alteración de electrones es aplicable también a otros sistemas aromáticos. Un experto habitual en la técnica puede determinar las ubicaciones de posición en otros sistemas de anillos.

10

Tal como se indicó anteriormente, los grupos de alteración de electrones pueden influir en la acidez del átomo de hidrógeno ionizable del resto que contiene grupo aromático en diferentes formas dependiendo de la naturaleza del grupo de alteración de electrones particular. Por ejemplo, debido a la proximidad de los grupos de alteración de electrones en las posiciones "1" y "8" al átomo de hidrógeno ionizable en el anillo de fluoreno mostrado anteriormente, los grupos de alteración de electrones en estas posiciones tendrían la mayor influencia a través de efectos de enlace (inductivos). Sin embargo, cuando $POLY^1-X^1$ - y $POLY^2-X^2$ - se unen en las posiciones 2 y 7 es más probable la adición de un grupo de alteración de electrones en las posiciones 4 ó 5, por los motivos mencionados anteriormente (es decir, efectos de direccionamiento de los restos espaciadores y efectos estéricos). Los grupos de alteración de electrones que interactúan con el anillo a través de efectos de resonancia, tales como grupos amido, carboxilo, nitro y alcoxilo, pueden proporcionar el efecto de resonancia a una distancia significativa del hidrógeno alfa. Como consecuencia, su colocación relativamente cerca del átomo de hidrógeno ionizable puede ser menos importante. Desde otro punto de vista, puede ser ventajoso dejar posiciones relativamente cerca (por ejemplo, las posiciones "1" y "4") no sustituidas ya que el átomo de hidrógeno ionizable que se eliminará en última instancia probablemente se retardará mediante efectos estéricos de grupos de alteración de electrones en estas posiciones. De nuevo, aunque las posiciones a modo de ejemplo de los grupos de alteración de electrones y otros grupos se han nombrado con respecto a un anillo de fluoreno, la presente discusión de la ubicación de posición es aplicable también a otros sistemas de anillos; un experto habitual en la técnica puede determinar las ubicaciones de posición correspondientes en otros sistemas de anillos.

20

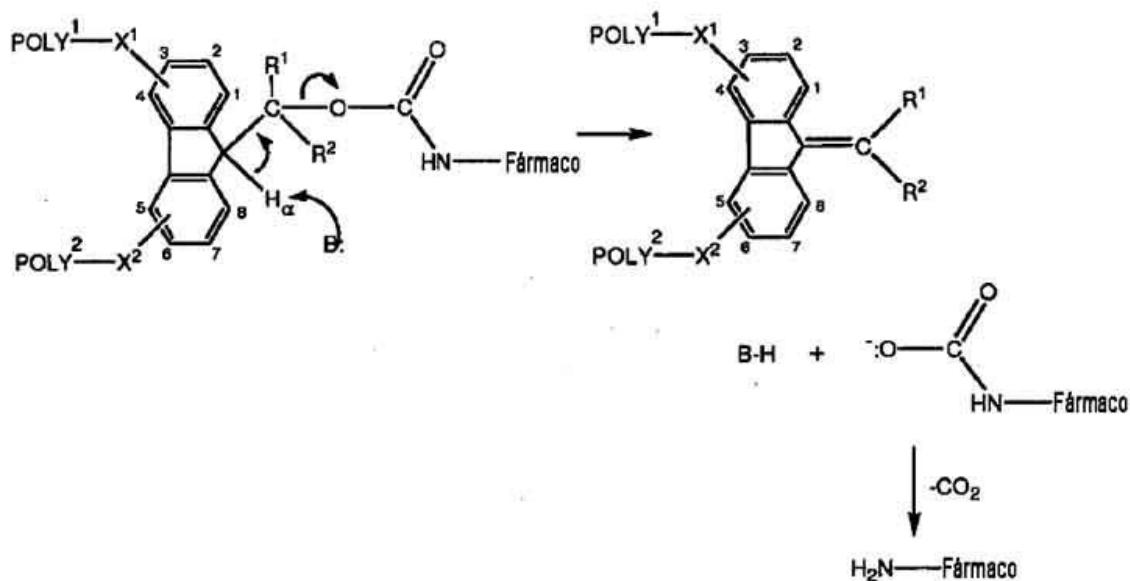
25

30

Para entender mejor la reacción de liberación de un conjugado formado con un reactivo polimérico de la invención (y también para demostrar el efecto de los grupos de alteración de electrones en este proceso) y sin pretender restringirse a la teoría, se proporciona un mecanismo propuesto del proceso de liberación. A continuación se muestra un esquema del mecanismo propuesto utilizando un resto de fluoreno como resto que contiene grupo aromático. En el esquema, se muestra un conjugado a modo de ejemplo de la invención en el que una unión de carbamato conecta el residuo del principio activo ("fármaco") al resto de la molécula. Las variables " $POLY^1$ ", " $POLY^2$ ", " X^1 ", " X^2 ", " R^1 " y " R^2 " son tal como se definieron anteriormente.

35

40



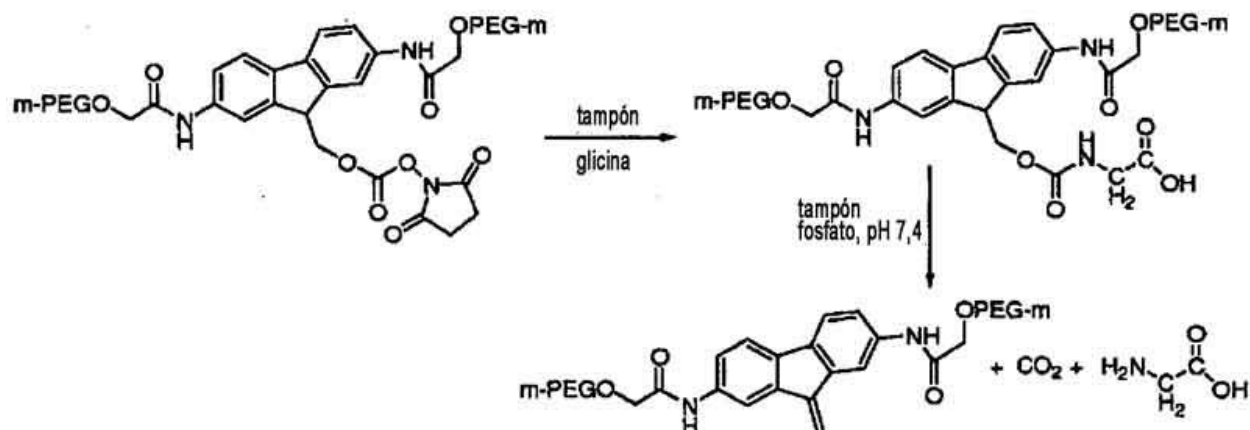
5 El proceso de liberación normalmente se inicia mediante el ataque de una especie, ion o molécula básica que tiene la capacidad de aceptar un protón en el proceso de transferencia ("B:" tal como se muestra en el esquema). *In vivo*, ésta puede ser una cualquiera de varios tipos de especies iónicas o una proteína, que tiene varios átomos básicos. La eliminación se produce para formar un resto de fulveno sustituido (o estructura correspondiente cuando se emplea una estructura distinta de fluoreno), liberando de ese modo el principio activo o especie de "fármaco", que puede unirse inicialmente a un grupo carboxilo, que se pierde rápidamente en condiciones fisiológicas.

10 El proceso de liberación puede ser concertado o gradual. Independientemente de la naturaleza exacta de la etapa de eliminación del protón, o bien se forma un carbanión como producto intermedio o bien está implicado un estado de transición que tiene carácter carbaniónico. Por tanto, los grupos electrodonadores unidos a los anillos aromáticos, que retardan la formación de carbaniones, retardarán el proceso de formación de carbaniones, disminuyendo de ese modo la tasa de liberación. A la inversa, los grupos electroaceptores, que facilitan la formación de las especies carbaniónicas y estabilizan los estados de transición carbaniónica, acelerarán el proceso de formación de carbaniones, aumentando de ese modo la tasa de liberación.

20 Ventajosamente, incluyendo uno o más grupos de alteración de electrones en el resto que contiene grupo aromático, es posible proporcionar más estrechamente la tasa deseada de la liberación del principio activo. Incluyendo uno o más grupos electroaceptores en el resto que contiene grupo aromático, se cree que se aumenta la liberación, mientras que se cree que la presencia de uno o más grupos electrodonadores disminuye la tasa de liberación. Por tanto, se cree que la presencia de uno o más grupos de alteración de electrones puede proporcionar estabilidad o inestabilidad relativa de un producto intermedio cargado o estado de transición que puede estar implicado en la reacción de liberación. Por consiguiente, incluyendo uno o más de tales grupos de alteración de electrones en el resto que contiene grupo aromático, es posible adaptar mejor una tasa de liberación deseada del principio activo original que se conjugó con un reactivo polimérico de la invención.

30 Es posible determinar qué efecto tendrá un grupo de alteración de electrones de este tipo sobre la tasa de liberación de fármaco del conjugado preparando un reactivo polimérico que tiene el grupo de alteración de electrones propuesto, preparando un conjugado usando este reactivo polimérico, sometiendo a prueba el conjugado para determinar la tasa de liberación de fármaco a lo largo del tiempo y comparando la tasa de liberación de fármaco con un conjugado preparado con un reactivo polimérico de control.

35 Para determinar las tasas de liberación relativas de un conjugado *in vitro*, puede prepararse un conjugado y estudiarse. Véase el ejemplo 5, citado más adelante. La preparación de un conjugado de glicina se ilustra en el esquema a continuación (donde m-PEGO y OPEG-m se definen cada uno como -O-CH₂CH₂-(OCH₂CH₂)_n-OCl-I₃, en la que cada n es de desde 4 hasta 1500).



Se estudió la tasa de liberación de este conjugado en condiciones *in vivo* simuladas observando la reacción en un medio tamponado a pH casi neutro. Mediante el seguimiento de la aparición del resto que contiene fulveno a lo largo del tiempo, puede calcularse una semivida para la reacción que da como resultado liberación. Esta tasa de liberación puede compararse cualitativamente con las tasas de liberación de otros conjugados de glicina que difieren en el número y/o tipo de grupos de alteración de electrones. Al hacer esto, puede determinarse la tasa de liberación para cualquier especie dada.

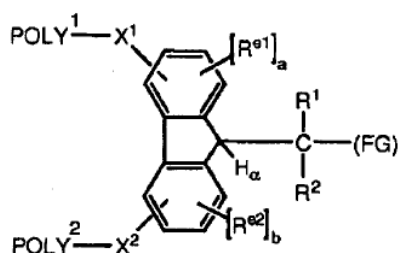
- 10 El grupo funcional de los reactivos poliméricos descritos en el presente documento es un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable, tal como una unión de carbamato. La invención no está limitada con respecto al grupo funcional específico siempre que el grupo funcional pueda reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable, tal como una unión de carbamato. Los grupos funcionales a modo de ejemplo que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo incluyen aquellos grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en carbonatos activos tales como N-succinimidilo, 1-benzotriazolilo, imidazol, haluros de carbonato (tales como cloruro de carbonato y bromuro de carbonato), fenolatos (tales como *p*-nitrofenolato), etc. Además, como caso especial, si el principio activo está disponible con el grupo amina activo convertido en un grupo isocianato o isotiocianato, entonces el grupo funcional del reactivo polimérico puede ser hidroxilo ya que la reacción de estos componentes proporciona un unión de carbamato degradable.

Un resto espaciador (por ejemplo, "X", "X¹", "X²", "X³", etc.) es cualquier átomo o serie de átomos que conectan una parte de una molécula con otra. Sin embargo, para los fines de la presente divulgación una serie de átomos no es un resto espaciador cuando la serie de átomos es inmediatamente adyacente a un polímero y la serie de átomos es otro monómero de manera que el resto espaciador propuesto representaría una mera extensión de la cadena de polímero. Por ejemplo, dada la estructura parcial "POLY-X-", y definiéndose POLY como "CH₃O(CH₂CH₂O)_m-" en la que (m) es 136 2050 y X se define como un resto espaciador, el resto espaciador no puede definirse como "-CH₂CH₂O-" puesto que tal definición representaría meramente una extensión del polímero. Sin embargo, en tal caso un resto espaciador aceptable podría definirse como "-CH₂CH₂-".

Los restos espaciadores a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a, -C(O)-, -S(O₂)-, -S(O)-, -NH-S(O₂)-, -S(O₂)-NH-, -CH=CH-, -O-CH=CH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-, -CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-, -CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-, -CH₂-S-CH₂-, -CH₂-S-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-S-CH₂-CH₂-, -CH₂-S-CH₂-S-CH₂-, -CH₂-S-CH₂-S-CH₂-, -CH₂-S-CH₂-S-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-S-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-S-CH₂-S-CH₂-, -CH₂-S-CH₂-S-CH₂-S-CH₂-, -CH₂-S-CH₂-S-CH₂-S-CH₂-S-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH=CH-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH₂-, -CH₂-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-O-CH₂-, -C(O)-O-CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -NH-CH₂-, -NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-, -C(O)-CH₂-, -C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-, CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-[CH₂]_n-(OCH₂CH₂)_j-, -NH-C(O)-O-[CH₂]_n-(OCH₂CH₂)_j-, grupo cicloalquilo bivalente, -O-, -S-, un aminoácido, -N(R⁶)-, y combinaciones de dos o más de cualquiera de los anteriores, en los que R⁶ es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno

Ahora se comentarán reactivos poliméricos a modo de ejemplo de la invención en más detalle. Debe recordarse que aunque la estereoquímica no se muestra específicamente en ninguna fórmula o estructura (ya sea para un reactivo polimérico, conjugado o cualquier otra fórmula o estructura), las fórmulas y estructuras proporcionadas contemplan tanto enantiómeros, así como composiciones que comprende mezclas de cada enantiómero en cantidades iguales (es decir, una mezcla racémica) y cantidades distintas.

Un reactivo polimérico preferido comprende la siguiente estructura:



(Fórmula V)

en la que:

POLY¹ es un primer poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 1000.000 Daltons;

POLY² es un segundo poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 1000.000 Daltons;

X¹ es un primer resto espaciador;

X² es un segundo resto espaciador;

H_α es un átomo de hidrógeno ionizable;

R¹ es H o un radical orgánico;

R² es H o un radical orgánico;

(a) es o bien cero o bien uno;

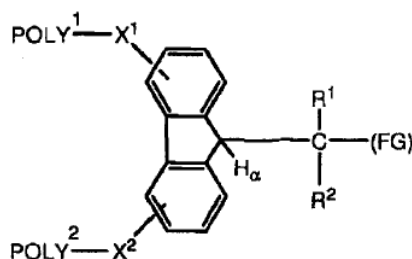
(b) es o bien cero o bien uno;

R^{e1}, cuando está presente, es un primer grupo de alteración de electrones;

R^{e2}, cuando está presente, es un segundo grupo de alteración de electrones; y

(FG) es un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable.

Cuando el reactivo polimérico correspondiente a la fórmula V no tiene grupos de alteración de electrones diferenciados [es decir, cuando (a) y (b) son ambos cero con respecto a la fórmula V], resulta un reactivo polimérico de la siguiente fórmula:



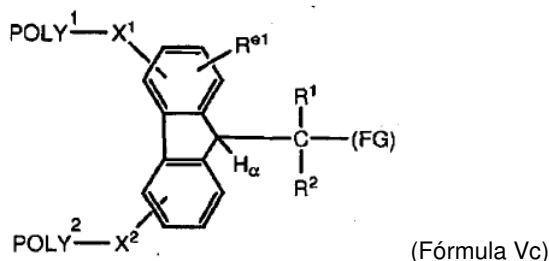
(Fórmula Va)

en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², H_α, R¹, R² y (FG) es tal como se definió anteriormente con respecto a

la fórmula V.

Cuando el reactivo polimérico correspondiente a la fórmula V tiene un único grupo de alteración de electrones diferenciado [por ejemplo, cuando (a) es uno y (b) es cero con respecto a la fórmula V], resulta un reactivo polimérico de la siguiente fórmula:

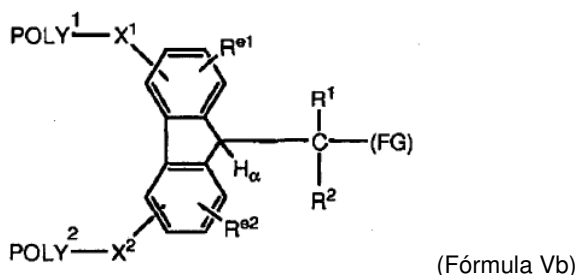
5



10 en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², H_α, R¹, R², R^{e1} y (FG) es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V.

Cuando el reactivo polimérico correspondiente a la fórmula V tiene dos grupos de alteración de electrones diferenciados [es decir, cuando (a) y (b) son ambos uno con respecto a la fórmula V], resulta un reactivo polimérico de la siguiente fórmula:

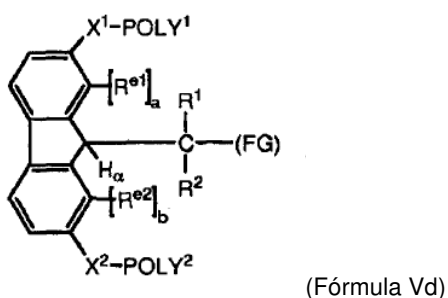
15



20 en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H_α, R^{e1}, R^{e2} y (FG) es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V

20

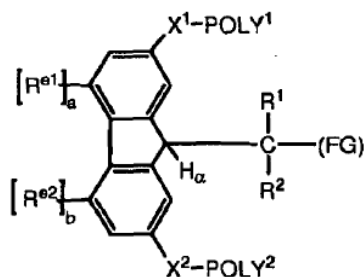
Todavía otro reactivo polimérico preferido es de la siguiente estructura:



25 en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H_α, R^{e1}, R^{e2}, (a), (b) y (FG) es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V, con la condición de que R^{e1} sea H cuando (a) es cero y R^{e2} sea H cuando (b) es cero.

30

Todavía otro reactivo polimérico preferido es de la siguiente estructura:

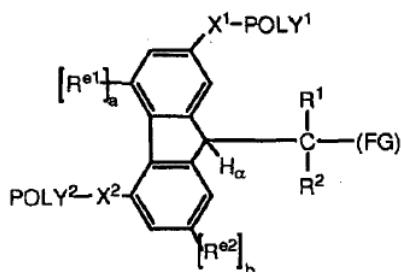


(Fórmula Ve)

en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H_α, R^{e1}, R^{e2} y (FG) es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V, con la condición de que R^{e1} sea H cuando (a) es cero y R^{e2} sea H cuando (b) es cero.

5

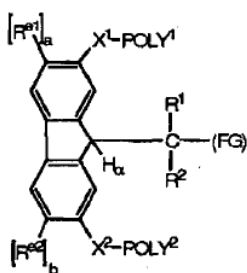
Todavía otro reactivo polimérico preferido es de la siguiente estructura:



(Fórmula Vf)

10 en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H_α, R^{e1}, R^{e2} y (FG) es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V, con la condición de que R^{e1} sea H cuando (a) es cero y R^{e2} sea H cuando (b) es cero.

Todavía otro reactivo polimérico preferido es de la siguiente estructura:



(Fórmula Vg)

en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H_α, R^{e1}, R^{e2}, (a), (b) y (FG) es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V, con la condición de que R^{e1} sea H cuando (a) es cero y R^{e2} sea H cuando (b) es cero.

20

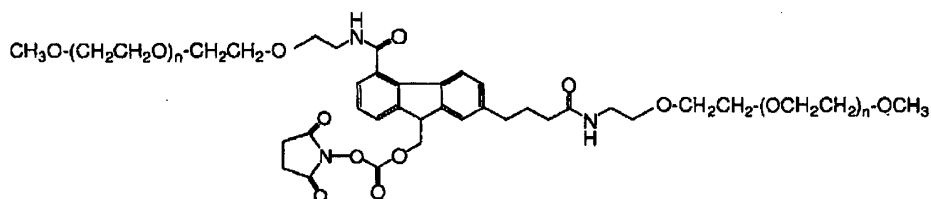
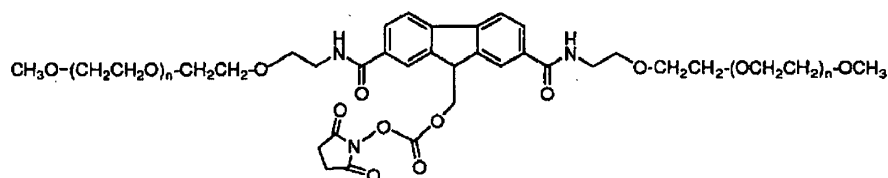
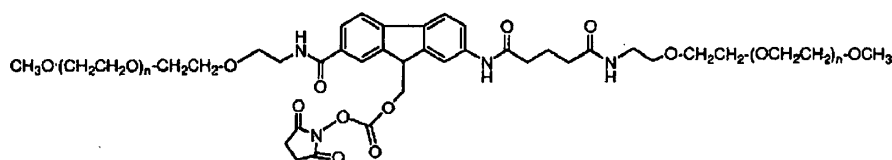
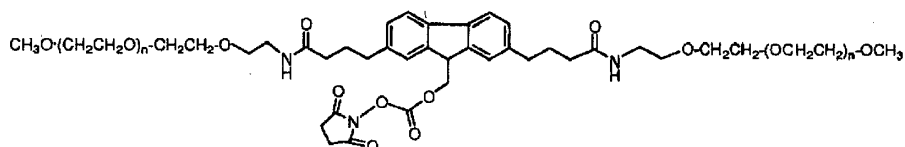
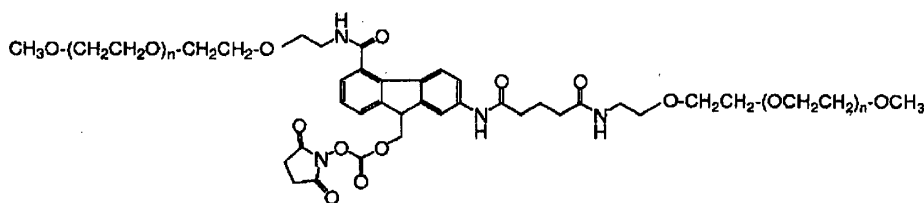
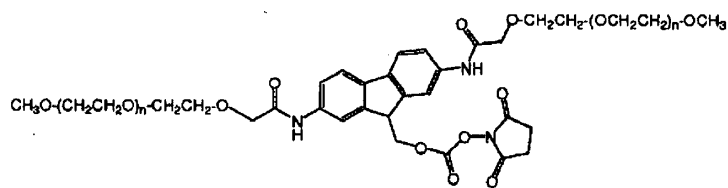
Normalmente, cada uno de POLY¹ y POLY² en cada uno de los reactivos poliméricos de fórmulas V, Va, Vb, Vc, Vd, Ve, Vf y Vg son iguales. Sin embargo, es posible tener reactivos poliméricos en los que cada uno de POLY¹ y POLY² es diferente. Además, para un poli(etilenglicol) dado, cada poli(etilenglicol) puede tener ocupación terminal con un grupo de ocupación de extremos seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxilo, alcoxilo sustituido, alquinoxilo, alquinoxilo sustituido, ariloxilo y ariloxilo sustituido. Sin embargo, los grupos de ocupación terminal preferidos incluyen metoxilo. Los pesos moleculares promedio en peso a modo de ejemplo para cada poli(etilenglicol) que sirve como POLY¹ y POLY² en las fórmulas V, Va, Vb, Vc, Vd, Ve, Vf y Vg incluyen uno o más de los siguientes: en el intervalo de desde aproximadamente 6.000 Daltons hasta aproximadamente 100.000 Daltons; en el intervalo de desde aproximadamente 10.000 Daltons hasta aproximadamente 85.000 Daltons; y en el intervalo de desde aproximadamente 20.000 Daltons hasta aproximadamente 85.000 Daltons. Las arquitecturas a modo de ejemplo para un poli(etilenglicol) dado que sirve como POLY¹ y POLY² en las fórmulas V, Va, Vb, Vc, Vd, Ve, Vf y Vg incluyen lineales y ramificadas. Los restos espaciadores primero y segundo a modo de ejemplo para cada una de las fórmulas V, Va, Vb, Vc, Vd, Ve, Vf y Vg incluyen los restos espaciadores X¹ y X² seleccionados independientemente del grupo que consiste en -NH-C(O)-

25

30

CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-O-, -O-CH₂-C(O)-NH-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-O- y -O-CH₂-CH₂-NH-C(O)-. También se prefiere, con respecto a las fórmulas V, Va, Vb, Vc, Vd, Ve, Vf y Vg que cada uno de R¹ y R² sea H, aunque también se contempla alquilo inferior (tal como metilo y etilo). Además, con respecto a cualquiera de los grupos de alteración de electrones presentes en cualquiera de las fórmulas V, Vb, Vc, Vd, Ve, Vf y Vg, cada grupo de alteración de electrones es preferiblemente halo, alquilo inferior, arilo, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, alcoxilo, ariloxilo, alquiltio, ariltio, CF₃, -CH₂CF₃, -CH₂C₆F₅, -CN, -NO₂, -S(O)R, -S(O)Ar, -S(O₂)R, S(O₂)Ar, -S(O₂)OR, -S(O₂)OAr, -S(O₂)NHR, -S(O₂)NHA, -C(O)R, -C(O)Ar, -C(O)OR, -C(O)NHR, y similares, en los que Ar es arilo y R es H o un radical orgánico.

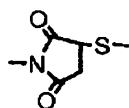
Los ejemplos de reactivos poliméricos de la invención incluyen los siguientes:



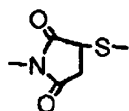
en las que cada (n) es de desde 136 hasta 2050.

Los reactivos poliméricos de la invención pueden prepararse en cualquier número de formas. Por consiguiente, los polímeros proporcionados en el presente documento no se limitan a la técnica o enfoque específico usado en su preparación. Sin embargo, los enfoques a modo de ejemplo para preparar los reactivos poliméricos descritos en el presente documento se comentarán en detalle a continuación.

5 En un método para preparar un reactivo polimérico, el método comprende: (a) proporcionar un resto que contiene grupo aromático que porta un primer sitio de unión, un segundo sitio de unión y un tercer sitio de unión opcional; (b) hacer reaccionar un reactivo de grupo funcional con el primer sitio de unión para dar como resultado el primer sitio de unión que porta un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo y dar como resultado unión degradable, tal como un carbamato; y (c) hacer reaccionar un polímero soluble en agua que porta un grupo reactivo con el segundo sitio de unión y, cuando está presente, el tercer sitio de unión opcional para dar como resultado (i) el segundo sitio de unión que porta un polímero soluble en agua a través de un resto espaciador, en el que el resto espaciador no incluye un resto

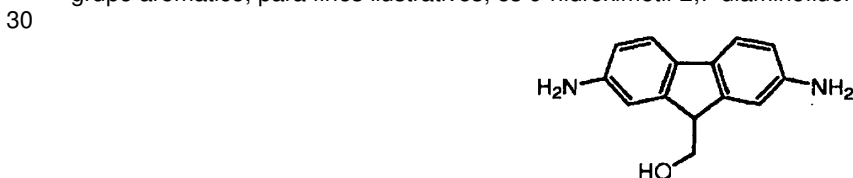


15 y (ii) el tercer sitio de unión opcional, cuando está presente, que porta un segundo polímero soluble en agua a través de un resto espaciador, en el que el resto espaciador no incluye un resto



20 En algunos casos, (b) se realiza antes de la etapa (c) mientras que en otros casos, (c) se realiza antes de la etapa (b).

25 Por tanto, en este método para preparar un reactivo polimérico, una etapa requerida es (a) proporcionar un resto que contiene grupo aromático que porta un primer sitio de unión, un segundo sitio de unión y un tercer sitio de unión opcional. En el contexto de una preparación de síntesis, se entiende que "proporcionar" un material significa obtener el material (por ejemplo, sintetizándolo u obteniéndolo comercialmente). Un resto a modo de ejemplo que contiene grupo aromático, para fines ilustrativos, es 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno, tal como se muestra a continuación.



30 Este resto que contiene grupo aromático, 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno, es un ejemplo de un resto que contiene grupo aromático que tiene tres sitios de unión: un grupo hidroxilo en la posición 9 y grupos amino en cada una de las posiciones 2 y 7. El resto que contiene grupo aromático puede proporcionarse en forma de base o sal. Con respecto a 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno, es posible usar la forma de diclorhidrato.

35 Habiendo proporcionado el resto que contiene grupo aromático, otra etapa en el método incluye ampliamente la etapa de hacer reaccionar un polímero soluble en agua que porta un grupo reactivo con el/los sitio(s) de unión en el resto que contiene grupo aromático. En este caso, puede usarse cualquier enfoque conocido en la técnica para unir un polímero soluble en agua a uno o más sitios de unión en el resto que contiene grupo aromático y el método no se limita al enfoque específico. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar un PEG reactivo con amina (tal como un mPEG terminado en éster de N-succinimidilo, formado por ejemplo a partir de la reacción de N-hidroxisuccinimida y $\text{CH}_3\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{OCH}_2\text{COOH}$ con dicitlohexilcarbodiimida (DCC) o diisopropilcarbodiimida (DIC) como agente de condensación y opcionalmente en presencia de una base) con amina que porta un resto que contiene grupo aromático tal como 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno.

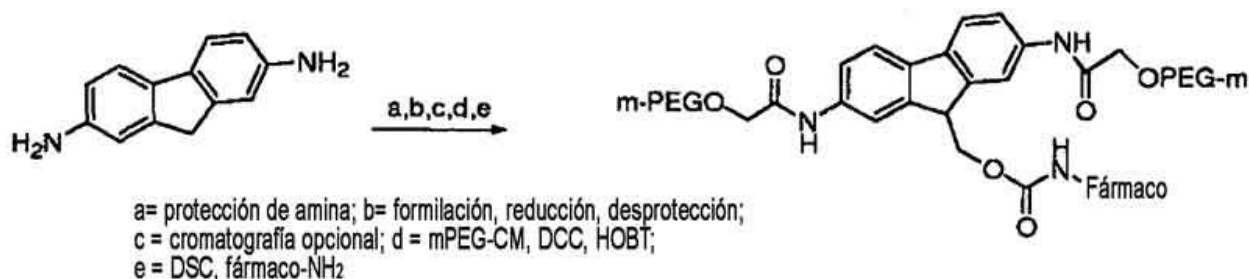
40 En algunos casos, la reacción del polímero soluble en agua que porta un grupo reactivo con el resto que contiene grupo aromático dará como resultado que todos los posibles sitios de unión tengan polímero soluble en agua unido al mismo. En tales circunstancias, es necesario retirar al menos un polímero soluble en agua de modo que esté disponible un sitio de unión para la reacción con un reactivo de grupo funcional. Por tanto, por ejemplo, la reacción del mPEG terminado en éster de N-succinimidilo comentado en el párrafo anterior con 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno da como resultado una mezcla que comprende (a) una especie que porta dos polímeros solubles en agua, uno en cada uno de los dos sitios de amina, y (b) una especie que porta tres polímeros solubles en agua, uno en cada uno de los dos sitios de amina, y uno en el sitio de hidroxilo. En este caso, es posible retirar y recoger

especies de peso molecular superior usando cromatografía de exclusión molecular. Además, es posible tratar la mezcla con pH alto [tratando, por ejemplo, la mezcla con hidróxido de litio (LiOH), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH)], seguido por cromatografía de intercambio iónico (IEC). En cualquier caso, el resultado es una composición que contiene principalmente 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno que porta dos polímeros solubles en agua, uno en cada uno de los dos sitios de amina. De ese modo está disponible un tercer sitio de hidroxilo para la reacción con un reactivo de grupo funcional.

La etapa final es hacer reaccionar un sitio reactivo del resto que contiene grupo aromático con un reactivo de grupo funcional. Un enfoque preferido es hacer reaccionar el 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno que contiene hidroxilo que porta dos polímeros solubles en agua, uno en cada uno de los dos sitios de amina con trifosgeno seguido por tratamiento con N-hidroxisuccinimida. De esta forma, se forma un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable, tal como una unión de carbamato (en este caso, un “carbonato activado”) en el sitio reactivo que contiene hidroxilo.

Las etapas del método tienen lugar en un disolvente apropiado. Un experto habitual en la técnica puede determinar si cualquier disolvente específico es apropiado para cualquier reacción dada. Sin embargo, normalmente el disolvente es preferiblemente un disolvente no polar o un disolvente aprótico polar. Los ejemplos no limitativos de disolventes no polares incluyen benceno, xileno, dioxano, tetrahidrofurano (THF), alcohol *t*-butílico y tolueno. Los disolventes no polares particularmente preferidos incluyen tolueno, xileno, dioxano, tetrahidrofurano y alcohol *t*-butílico. Los disolventes apróticos polares a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a, DMSO (dimetilsulfóxido), HMPA (hexametilfosforamida), DMF (dimetilformamida), DMA (dimetilacetamida), NMP (*N*-metilpirrolidinona).

Un enfoque alternativo comienza con fluorenodiamina, un material de partida fácilmente disponible. A continuación se muestra un esquema de la reacción (que muestra las etapas de síntesis suficientes para proporcionar un conjugado).



En este enfoque, puede hacerse reaccionar PEG terminado en carboximetilo (“PEG-CM” disponible de Nektar Therapeutics) con la fluorenodiamina para proporcionar un producto intermedio que posteriormente puede usarse para formar un conjugado con un principio activo (“fármaco-NH₂”). La fluorenodiamina tiene dos grupos amido unidos al núcleo aromático y por tanto tiene un efecto leve (en relación con los hidrógenos de esos grupos reemplazados) sobre la acidez (es decir, el valor de pKa) del átomo de hidrógeno ionizable (es decir, H_a). Por tanto, la tasa de liberación del fármaco es de moderada a lenta.

Asimismo, en otro enfoque basado en un reactivo de amina tal como el mPEG-éster de ácido propiónico disponible comercialmente, “mPEG-SPA”, la síntesis es ligeramente diferente pero el resultado neto sobre la tasa de liberación de fármaco es mínimo. A continuación se muestra un esquema de este enfoque (que muestra las etapas de síntesis suficientes para proporcionar un conjugado).



La diferencia en la tasa de liberación de fármaco es mínima porque los sustituyentes del anillo aromático que resultan de la reacción con mPEG-CM y mPEG-SPA son similares.

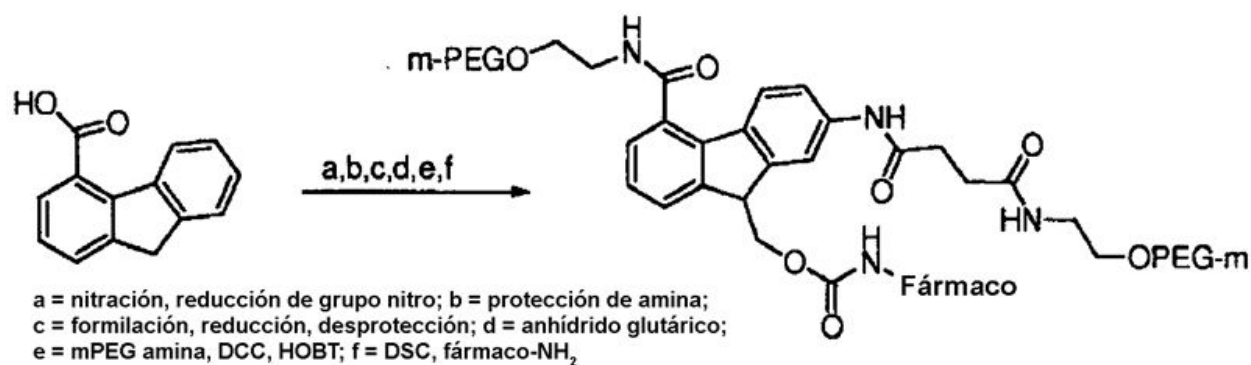
Puede modificarse el método de síntesis significativamente aumentando el grupo amina mediante la reacción con un reactivo como anhídrido succínico o anhídrido glutárico para dar un ácido carboxílico terminal. A continuación se muestra un esquema (que muestra las etapas de síntesis suficientes para proporcionar un conjugado) de este enfoque.



5 En este enfoque, el resultado permite el uso de una PEG amina como reactivo de pegilación en contraposición a PEG-ácido carboxílico o éster activo. Por tanto, es posible lograr aún otro método para la síntesis del reactivo, pero el resultando neto sobre la tasa de liberación del fármaco no cambia sustancialmente, ya que el sustituyente del anillo aromático sigue siendo un grupo amido.

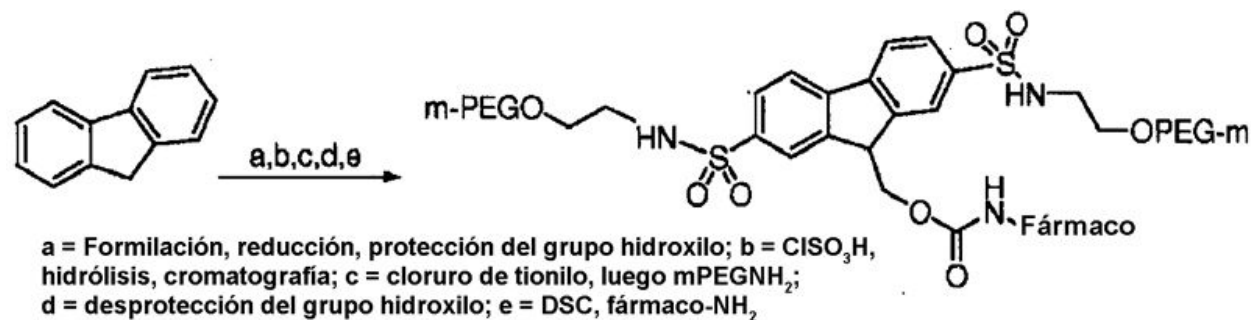
10 Puede hacerse que se produzca un cambio significativo en la tasa de liberación de fármaco si uno o más del anillo aromático de los tres reactivos anteriores, en alguna fase en la síntesis, se aumenta mediante sustitución adicional. Por ejemplo, puede producirse la sustitución del anillo con, por ejemplo, un grupo ácido sulfónico o un grupo nitro. Cualquiera de estos grupos, que es fuertemente electroceptor, tendría un efecto significativo sobre la acidez (valor de pKa) del átomo de hidrógeno ionizable (H_a).

15 Otro ejemplo para demostrar la capacidad para influir en la tasa de liberación de fármaco en el conjugado de reactivo-fármaco final se ilustra a continuación.



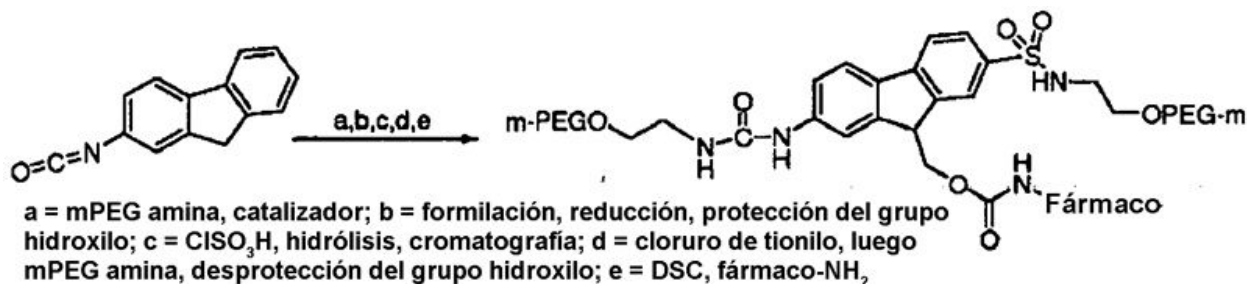
20 En este caso, el derivado de fluoreno de partida contiene un grupo ácido carboxílico. Este material de partida fácilmente disponible puede someterse a condiciones de reacción que permiten la introducción de un grupo amino en el anillo aromático remoto. Entonces, usando una química similar a la de los ejemplos anteriores, es posible proporcionar un reactivo que tiene un grupo amido en un anillo aromático y un grupo carboxamida en el otro anillo. Esta combinación de sustituyentes de anillo es electroceptora neta en comparación con los ejemplos anteriores que tienen dos grupos amido y por tanto el efecto sobre la acidez (valor de pKa) del átomo de hidrógeno ionizable (H_a) es tal que la tasa de liberación de fármaco se potencia.

30 Puede lograrse una potenciación más significativa de la tasa de liberación de fármacos usando un tipo diferente de unión de amida. Es posible preparar sulfonamidas usando la serie de reacciones ilustradas a continuación (que muestran las etapas de síntesis suficientes para proporcionar un conjugado).



35 Los grupos sulfonilo unidos a cada anillo, que son grupos altamente electronegativos, afectan a la acidez (valor de pKa) del átomo de hidrógeno ionizable (H_a). Por tanto, la tasa de liberación de fármacos de estos conjugados sería relativamente rápida.

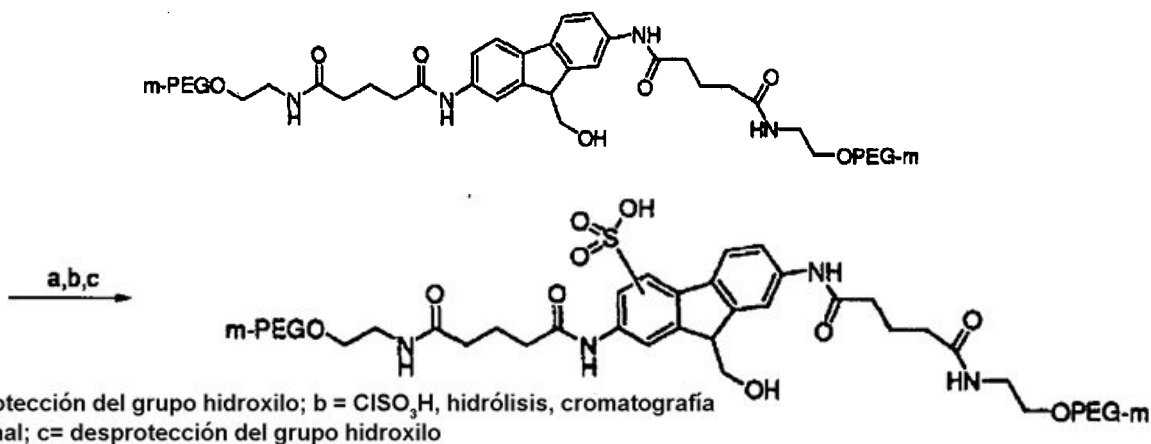
En otro ejemplo, se ilustra un conjugado de fármaco con una tasa de liberación intermedia (que muestra las etapas de síntesis suficientes para proporcionar un conjugado).



En este caso, usando el material de partida de isocianato disponible comercialmente, se unen un grupo ureido y un grupo sulfonamido a los núcleos aromáticos. El grupo ureido, como el grupo amido anterior, tiene un efecto leve pero el grupo sulfonamido tiene un efecto fuerte. El resultado neto es que los conjugados preparados a partir de este reactivo tendrían una tasa de liberación entre la del bis-sulfonamido recién comentado y los otros conjugados comentados anteriormente.

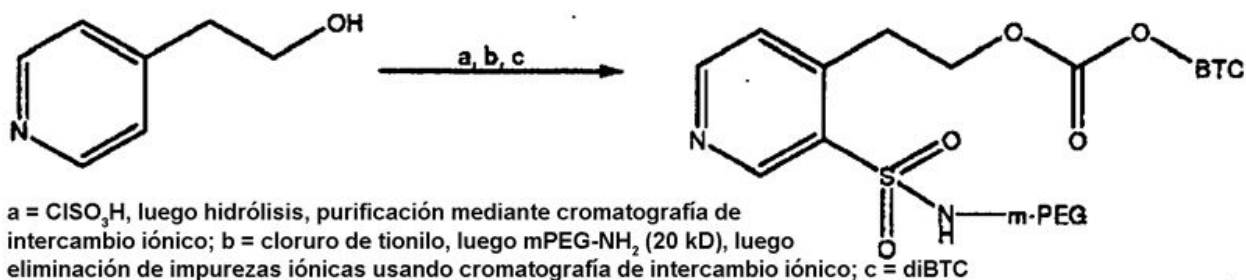
Una ventaja que tienen algunas rutas de síntesis con respecto a otras es el uso opcional de cromatografía de intercambio iónico para purificar el reactivo en una fase intermedia. Debido a que pueden formarse varias impurezas a lo largo de la ruta, esto puede ser una ventaja bastante significativa para un método.

Se muestra un ejemplo a continuación de la inserción por medio de reacción química de un grupo ácido sulfónico electroceptor en una fase intermedia en la preparación del diaminofluoreno modificado con ácido glutárico, a partir de una síntesis ilustrada anteriormente, "m-PEG" y "PEG-m" representan metoxipoli(etilenglicol).



En este caso, es posible bloquear el grupo hidroxilo para prevenir la formación del éster de sulfato y luego llevar a cabo un procedimiento de sulfonación aromática electrófila usando ácido clorosulfónico. Puede resultar una mezcla de productos de mono- y disulfonación. Esta mezcla, si se forma, puede purificarse fácilmente para proporcionar cualquier forma en un estado bastante puro. Además, puesto que la síntesis no tenía una etapa de cromatografía opcional ya dispuesta, esto proporciona una oportunidad para eliminar impurezas neutras que pueden haberse arrastrado desde etapas anteriores.

Un ejemplo de uso de un grupo sulfonilo para potenciar la acidez del hidrógeno alfa y como sitio para la adición de la cadena polimérica se muestra en el esquema a continuación. En este caso, el resto aromático contiene un único anillo de piridina en el alcohol disponible comercialmente, que sirve como punto de partida para preparar el reactivo polimérico. La presencia del nitrógeno en el anillo aromático hace que este anillo sea más electroceptor, en comparación con un anillo de fenilo, y por tanto la acidez del hidrógeno alfa aumenta. Sin embargo, la acidez del hidrógeno alfa puede aumentarse adicionalmente para hacerlo relativamente más eliminable. La unión de un grupo sulfonilo aumenta la acidez del hidrógeno. Las etapas requeridas para añadir el grupo sulfonilo se proporcionan en el esquema a continuación [en el que diBTC es di(1-benzotriazolil)carbonato y BTC es un radical benzotriazolilo].



El enfoque mostrado anteriormente demuestra la adición de un grupo de alteración electrónica (en un resto aromático con un único anillo y para un reactivo polimérico que contiene un único polímero soluble en agua. Aunque se prefieren los polímeros solubles en agua en algunas realizaciones, otras realizaciones preferirán la incorporación de un único polímero soluble en agua (por ejemplo, cuando se desea que el tamaño total del reactivo polimérico sea relativamente pequeño).

Pueden añadirse otros grupos de alteración de electrones de un modo similar. Por ejemplo, la nitración aromática combinando ácido nítrico en presencia de ácido sulfúrico da como resultado que se una un grupo nitro (es decir, $-\text{NO}_2$) al sistema aromático. Además, métodos de halogenación tales como combinar el sistema aromático con un halógeno en presencia de un catalizador de metal (tal como hierro) dan como resultado que se una un grupo halo al sistema aromático. Con respecto a métodos de halogenación en los que está presente un ion metálico, se prefiere (por los motivos explicados en el presente documento) llevar a cabo en primer lugar la etapa de añadir el grupo halo al sistema aromático y posteriormente eliminar cualquier ion metálico y luego unir uno o más polímeros solubles en agua al sistema aromático. Además, pueden usarse métodos de alquilación y acilación tales como una reacción de Friedel-Crafts para añadir un grupo alquilo o acilo de alteración de electrones (respectivamente) al sistema aromático añadiendo un haluro de alquilo (por ejemplo, cloruro de isobutilo) o haluro de acilo (por ejemplo, cloruro de propionilo) al sistema aromático en presencia de un catalizador de metal (tal como aluminio). De nuevo, debido a que normalmente se requiere un catalizador de metal para llevar a cabo tales reacciones, se prefiere llevar a cabo en primer lugar la etapa de añadir el grupo alquilo al sistema aromático y posteriormente eliminar cualquier ion metálico y luego unir uno o más polímeros solubles en agua al sistema aromático.

Durante la preparación y manipulación de los reactivos poliméricos (así como la preparación y manipulación de los correspondientes conjugados), se prefiere evitar la introducción de iones metálicos. Por ejemplo, debido a que se sabe bien que los iones metálicos se coordinan mediante PEG, se prefiere evitar iones metálicos. Además, se sabe que los iones metálicos catalizan la oxidación de la cadena de PEG. En particular, cuando se une PEG a un sistema aromático rico en electrones, la presencia de un ion metálico coordinado en la cadena de PEG puede proporcionar una vía para la transferencia de electrones desde el núcleo aromático hasta el complejo de PEG-ion metálico y facilitar la escisión de la cadena de PEG. Por tanto, la invención incluye métodos y composiciones en los que están sustancialmente ausentes iones metálicos.

Pueden usarse estos y otros enfoques para preparar los reactivos poliméricos descritos en el presente documento.

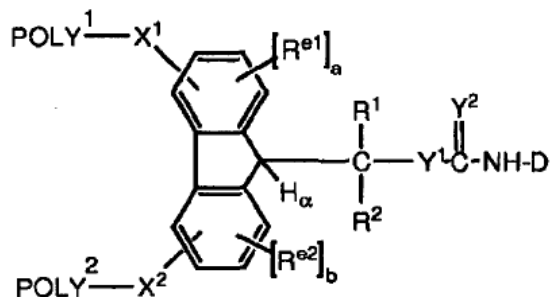
Una vez preparados, los reactivos poliméricos pueden aislarse. Pueden usarse métodos conocidos para aislar el reactivo polimérico, pero se prefiere particularmente usar cromatografía, por ejemplo, cromatografía de exclusión molecular. Alternativamente o además, el método incluye la etapa de purificar el reactivo polimérico una vez formado. De nuevo, pueden usarse métodos de purificación conocidos en la técnica convencionales para purificar el reactivo polimérico.

Los reactivos poliméricos de la invención son sensibles a la humedad y el oxígeno y se almacenan idealmente bajo una atmósfera inerte, tal como bajo argón o bajo nitrógeno, y a baja temperatura. De este modo, se reducen o se evitan por completos procesos potencialmente degradativos asociados con, por ejemplo, el oxígeno atmosférico. En algunos casos, para evitar la degradación oxidativa, pueden añadirse antioxidantes, tales como hidroxitolueno butilado (BHT), al reactivo polimérico antes del almacenamiento. Además, se prefiere minimizar la cantidad de humedad asociada con las condiciones de almacenamiento para reducir reacciones potencialmente dañinas asociadas con el agua, por ejemplo hidrólisis del éster activo. Además, se prefiere mantener las condiciones de almacenamiento en la oscuridad con el fin de evitar determinados procesos degradativos que implican luz. Por tanto, las condiciones de almacenamiento preferidas 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 (por ejemplo, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 partes por millón) de un antioxidante tal como BHT.

Los reactivos poliméricos descritos anteriormente son útiles para la conjugación con principios biológicamente activos. Por ejemplo, un grupo amino (por ejemplo, amina primaria) en un principio activo reaccionará con el grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable, tal como una unión de carbamato. Por tanto, la invención comprende un conjugado formado con cualquier reactivo

polimérico descrito en el presente documento.

Un conjugado preferido comprende la siguiente estructura:



(Fórmula V-C)

5

en la que:

10 POLY¹ es un primer poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 1000.000 Daltons;

POLY² es un segundo poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 1000.000 Daltons;

15 X¹ es un primer resto espaciador;

X² es un segundo resto espaciador;

20 Hₐ es un átomo de hidrógeno ionizable;

R¹ es H o un radical orgánico;

R² es H o un radical orgánico;

25 (a) es o bien cero o bien uno;

(b) es o bien cero o bien uno;

30 Rᵉ¹, cuando está presente, es un primer grupo de alteración de electrones;

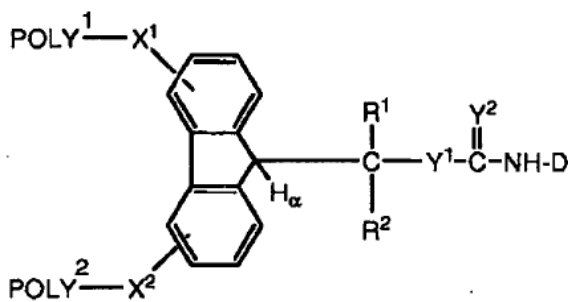
Rᵉ², cuando está presente, es un segundo grupo de alteración de electrones;

Y¹ es O o S;

35 Y₂ es O o S; y

D es un residuo de un principio biológicamente activo que porta un grupo funcional amina. Pueden prepararse conjugados correspondientes a esta fórmula V-C usando reactivos poliméricos correspondientes a la fórmula V.

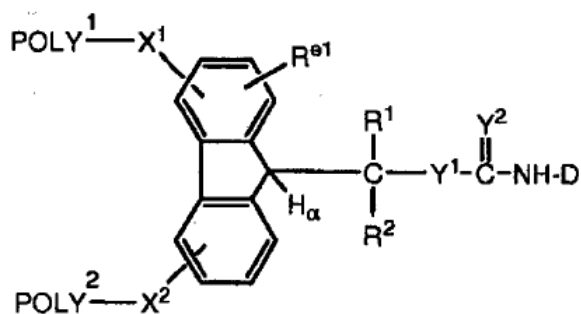
40 Cuando el conjugado correspondiente a la fórmula V-C no tiene grupos de alteración de electrones diferenciados [es decir, cuando (a) y (b) son ambos cero con respecto a la fórmula V-C], resulta un conjugado de la siguiente fórmula:



(Fórmula Va-C)

en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², H_α, R¹, R², Y¹, Y² y D es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V-C. Pueden prepararse conjugados correspondientes a esta fórmula Va-C usando reactivos poliméricos correspondientes a la fórmula Va.

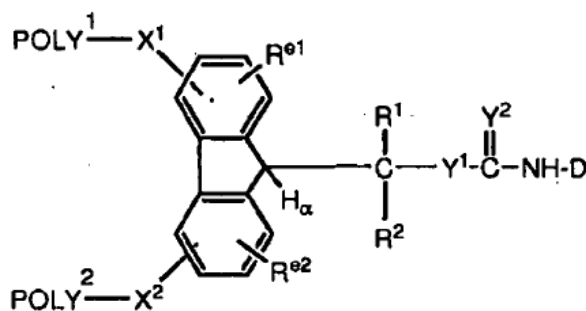
5 Cuando el conjugado correspondiente a la fórmula V-C tiene un único grupo de alteración de electrones diferenciado [por ejemplo, cuando (a) es uno y (b) es cero con respecto a la fórmula V-C], resulta un conjugado de la siguiente fórmula:



(Fórmula Vc-C)

en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², H_α, R¹, R², R^{e1}, Y¹, Y² y D es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V-C. Pueden prepararse conjugados correspondientes a esta fórmula Vc-C usando reactivos poliméricos correspondientes a la fórmula Vc.

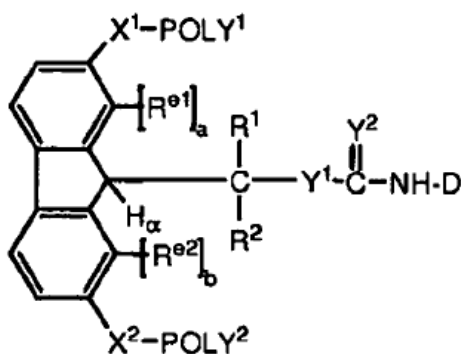
15 Cuando el conjugado correspondiente a la fórmula V-C tiene dos grupos de alteración de electrones diferenciados [es decir, cuando (a) y (b) son ambos uno con respecto a la fórmula V-C], resulta un conjugado de la siguiente fórmula:



(Fórmula Vb-C)

en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H_α, R^{e1}, R^{e2}, Y¹, Y² y D es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V-C. Pueden prepararse conjugados correspondientes a esta fórmula Vb-C usando reactivos poliméricos correspondientes a la fórmula Vb.

25 Todavía otro conjugado preferido es de la siguiente estructura:

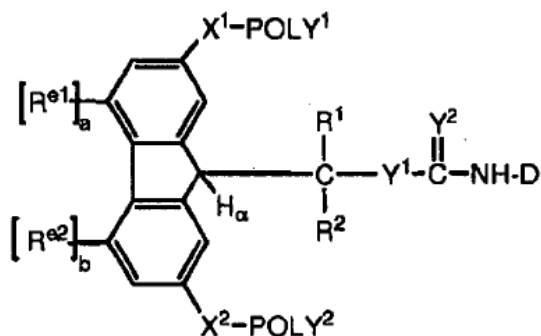


(Fórmula Vd-C)

30 en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H_α, R^{e1}, R^{e2}, (a), (b), Y¹, Y² y D es tal como se definió

anteriormente con respecto a la fórmula V-C, con la condición de que R^{e1} sea H cuando (a) es cero y R^2 sea H cuando (b) es cero. Pueden prepararse conjugados correspondientes a esta fórmula Vd-C usando reactivos poliméricos correspondientes a la fórmula Vd.

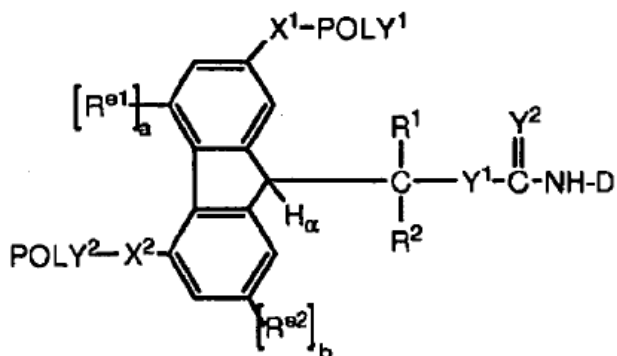
5 Todavía otro conjugado preferido es de la siguiente estructura:



(Fórmula Ve-C)

10 en la que cada uno de $POLY^1$, $POLY^2$, X^1 , X^2 , R^1 , R^2 , H_α , R^{e1} , R^{e2} , Y^1 , Y^2 y D es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V-C, con la condición de que R^{e1} sea H cuando (a) es cero y R^{e2} sea H cuando (b) es cero. Pueden prepararse conjugados correspondientes a esta fórmula Ve-C usando reactivos poliméricos correspondientes a la fórmula Ve.

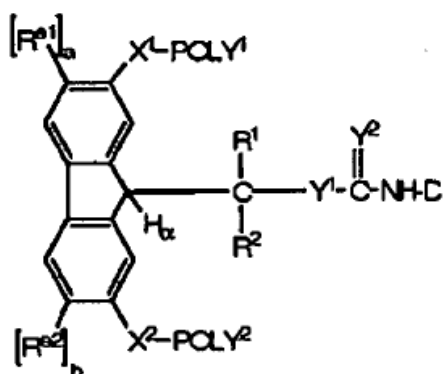
15 Todavía otro conjugado preferido es de la siguiente estructura:



(Fórmula Vf-C)

20 en la que cada uno de $POLY^1$, $POLY^2$, X^1 , X^2 , R^1 , R^2 , H_α , R^{e1} , R^{e2} , Y^1 , Y^2 y D es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V-C, con la condición de que R^{e1} sea H cuando (a) es cero y R^{e2} sea H cuando (b) es cero. Pueden prepararse conjugados correspondientes a esta fórmula Vf-C usando reactivos poliméricos correspondientes a la fórmula Vf.

Todavía otro conjugado preferido es de la siguiente estructura:



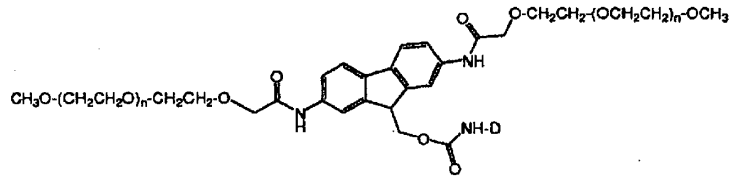
(Fórmula Vg-C)

25

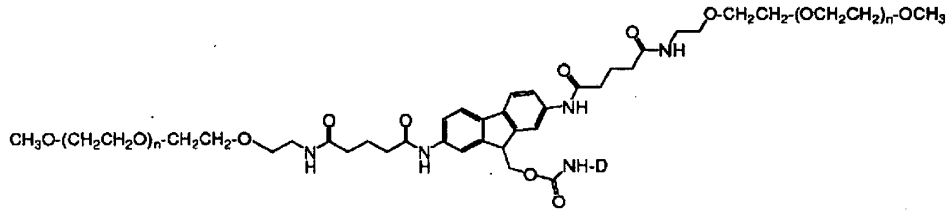
en la que cada uno de POLY¹, POLY², X¹, X², R¹, R², H₀, R^{e1}, R^{e2}, Y¹, Y² y D es tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula V-C, con la condición de que R^{e1} sea H cuando (a) es cero y R^{e2} sea H cuando (b) es cero. Pueden prepararse conjugados correspondientes a esta fórmula Vg-C usando reactivos poliméricos correspondientes a la fórmula Vg.

5

Los ejemplos de conjugados de la invención incluyen:

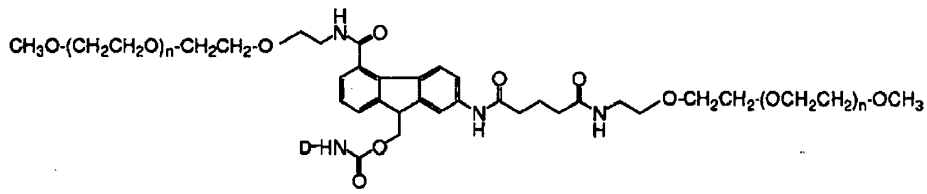


;

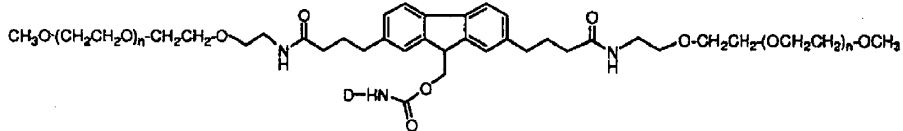


10

;

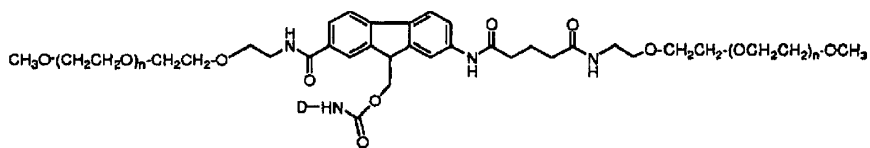


;

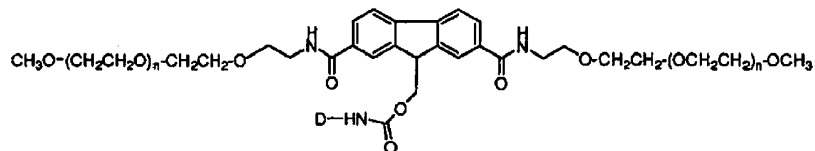


15

;

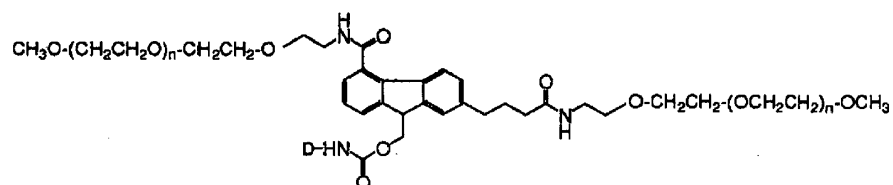


;



;

20 y



en las que cada (n) es de desde 136 hasta 2050.

El principio biológicamente activo al que puede conjugarse un reactivo polimérico tal como se describe en el presente documento es un principio biológicamente activo que contiene amina. En algunas realizaciones, el principio biológicamente activo será una molécula pequeña (por ejemplo, un principio biológicamente activo que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 3.500 Daltons. En otras realizaciones, el principio biológicamente activo será una macromolécula, tal como un polipéptido, que tiene un peso molecular mayor de aproximadamente 3.500 Daltons. Los polipéptidos farmacológicamente activos representan un tipo preferido de principio biológicamente activo. Debe entenderse que para los fines de la presente discusión, el término "polipéptido" será genérico para oligopéptidos y proteínas. Con respecto a polipéptidos, la amina con la que el reactivo polimérico se acopla puede estar sobre el extremo N-terminal o una cadena lateral que contiene amina de un aminoácido (tal como lisina) dentro del polipéptido.

La invención también proporciona un método de preparación de un conjugado que comprende la etapa de poner en contacto un reactivo polimérico de la invención con un principio biológicamente activo en condiciones adecuadas para formar una unión covalente entre el polímero y el principio biológicamente activo. Normalmente, el polímero se añade al principio activo o a la superficie en una cantidad equimolar (con respecto al número deseado de grupos adecuados para la reacción con el grupo reactivo) o en un exceso molar. Por ejemplo, el reactivo polimérico puede añadirse al principio activo diana en una razón molar de aproximadamente 1:1 (reactivo polimérico:principio activo), 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1 ó 10:1. Se permite que la reacción de conjugación avance hasta que no se produce sustancialmente conjugación adicional, lo que puede determinarse generalmente monitorizando el avance de la reacción a lo largo del tiempo. El avance de la reacción puede monitorizarse extrayendo alícuotas de la mezcla de reacción en diversos puntos de tiempo y analizando la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF o cualquier otro método analítico adecuado. Una vez que se alcanza una meseta con respecto a la cantidad de conjugado formada o la cantidad de polímero no conjugado restante, se supone que la reacción es completa. Normalmente, la reacción de conjugación tarda cualquier tiempo desde minutos hasta varias horas (por ejemplo, desde 5 minutos hasta 24 horas o más). La mezcla de productos resultante preferiblemente, aunque no necesariamente, se purifica, para separar reactivos en exceso, reactantes no conjugados (por ejemplo, principio activo), especies multi-conjugadas no deseadas y polímero libre o sin reaccionar. Los conjugados resultantes pueden caracterizarse adicionalmente usando métodos analíticos tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel y/o cromatografía.

Con respecto a conjugados de polímero-principio activo, los conjugados pueden purificarse para obtener/aislar diferentes especies conjugadas. Alternativamente, y más preferiblemente para polímeros de peso molecular inferior (por ejemplo, menos de aproximadamente 20 kiloDaltons, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 kiloDaltons), la mezcla de productos puede purificarse para obtener la distribución de segmentos de polímero soluble en agua por principio activo. Por ejemplo, la mezcla de productos puede purificarse para obtener un promedio de cualquiera de desde uno hasta cinco PEG por principio activo (por ejemplo, polipéptido). La estrategia para la purificación de la mezcla de reacción de conjugados final dependerá de varios 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, pueden aislarse conjugados que tienen diferentes pesos moleculares usando cromatografía de filtración en gel. Es decir, se usa cromatografía de filtración en gel para fraccionar razones de polímero con respecto a principio activo con números diferentes (por ejemplo, 1 mero, 2 meros, 3 meros, etc., en las que "1 mero" indica 1 polímero con respecto a principio activo, "2 meros" indica dos polímeros con respecto a principio activo, y así sucesivamente) basándose en sus pesos moleculares diferentes (en los que la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular promedio de segmentos de polímero soluble en agua). Por ejemplo, en una reacción a modo de ejemplo en la que se conjugaba aleatoriamente una proteína de 100 kDa con un reactivo polimérico que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, la mezcla de reacción resultante contendrá probablemente proteína no modificada (PM 100 kDa), proteína monopegilada (PM 120 kDa), proteína dipegilada (PM 140 kDa), etc. Aunque este enfoque puede usarse para separar PEG y otros conjugados de polímero que tienen diferentes pesos moleculares, este enfoque generalmente es ineficaz para separar isómeros de posición que tienen diferentes sitios de unión a polímero dentro de la proteína. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de filtración en gel para separar entre sí otras mezclas de PEG 1-mero, 2 meros, 3 meros, etc., aunque cada una de las composiciones de PEG-mero recuperadas pueden contener PEG unidos a diferentes grupos amino reactivos (por ejemplo, residuos de lisina) dentro del principio activo.

Las columnas de filtración en gel adecuadas para llevar a cabo este tipo de separación incluyen columnas Superdex™ y Sephadex™ disponibles de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). La selección de una columna particular dependerá del intervalo de fraccionamiento deseado. La elución se lleva a cabo generalmente usando un tampón adecuado, tal como fosfato, acetato o similar. Las fracciones recogidas pueden analizarse mediante varios métodos diferentes, por ejemplo, (i) densidad óptica (DO) a 280 nm para determinar el contenido en proteínas, (ii) análisis de proteínas de albúmina sérica bovina (BSA), (iii) pruebas de yodo para determinar el contenido en PEG [Sims *et al.* (1980) Anal. Biochem, 107:60-63] y (iv) electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS PAGE), seguido por tinción con yoduro de bario.

La separación de isómeros de posición se lleva a cabo mediante cromatografía de fase inversa usando una columna de cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) C 18 (Amersham Biosciences o Vydac) o mediante cromatografía de intercambio iónico usando una columna de intercambio iónico, por ejemplo, una columna de intercambio iónico Sepharose™ disponible de Amersham Biosciences. Puede usarse cualquier enfoque para separar isómeros de polímero-principio activo que tienen el mismo peso molecular (isómeros de posición).

Tras la conjugación, y etapas de separación opcionalmente adicionales, la mezcla de conjugados puede concentrarse, esterilizarse por filtración y almacenarse a baja temperatura, normalmente desde aproximadamente -20°C hasta aproximadamente -80°C. Alternativamente, el conjugado puede liofilizarse, o bien con o bien sin tampón residual y almacenarse como un polvo liofilizado. En algunos casos, es preferible intercambiar un tampón usado para la conjugación, tal como acetato de sodio, por un tampón volátil tal como carbonato de amonio o acetato de amonio, que puede eliminarse fácilmente durante la liofilización, de modo que el polvo liofilizado carezca de tampón residual. Alternativamente, puede usarse una etapa de intercambio de tampón que emplea un tampón de formulación, de modo que el conjugado liofilizado está en una forma adecuada para su reconstitución en un tampón de formulación y en última instancia para su administración a un mamífero.

Un principio biológicamente activo para su uso en el acoplamiento con un polímero tal como se presenta en el presente documento puede ser uno cualquiera o más de los siguientes. Pueden seleccionarse principios adecuados de, por ejemplo, hipnóticos y sedantes, energizantes psíquicos, tranquilizantes, fármacos respiratorios, anticonvulsivos, relajantes musculares, agentes antiparkinsonianos (antagonistas de dopamina), analgésicos, antiinflamatorios, fármacos contra la ansiedad (ansiolíticos), supresores del apetito, agentes antimigrañosos, agentes de contracción muscular, antiinfecciosos (antibióticos, antivirales, antifúngicos, vacunas), antiartríticos, antimalariales, antieméticos, antiepilépticos, broncodilatadores, citocinas, factores de crecimiento, agentes anticancerígenos, agentes antitrombóticos, antihipertensores, fármacos cardiovasculares, antiarrítmicos, antioxidantes, agentes antiasmáticos, agentes hormonales incluyendo anticonceptivos, simpaticomiméticos, diuréticos, agentes reguladores de lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasitarios, anticoagulantes, neoplásicos, antineoplásicos, hipoglucémicos, agentes y complementos nutricionales, complementos del crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico y agentes de contraste.

Más particularmente, el principio activo puede encontrarse en una de varias clases estructurales, incluyendo pero sin limitarse a moléculas pequeñas (preferiblemente moléculas pequeñas insolubles), péptidos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, grasas, electrolitos y similares. Preferiblemente, un principio activo para acoplarse a un polímero tal como se describe en el presente documento presenta un grupo amino nativo, o alternativamente, se modifica para que contenga al menos un grupo amino reactivo adecuado para conjugarse con un polímero descrito en el presente documento.

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

Los excipientes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, los seleccionados del grupo que consiste en hidratos de carbono, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos.

Un hidrato de carbono tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar puede estar presente como excipiente. Los excipientes de hidratos de carbono específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosilorbitol, mioinositol, y similares.

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

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

También puede estar presente un antioxidante en la preparación. Se usan antioxidantes para impedir la oxidación, impidiendo de ese modo el deterioro del conjugado u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, formaldehído-

sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio y combinaciones de los mismos.

Puede estar presente un tensioactivo como excipiente. Los tensioactivos a modo de ejemplo incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80," y plurónicos tales como F68 y F88 (estando ambos disponibles de BASF, Mount Olive, Nueva Jersey); ésteres de sorbitano; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposómica), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, zinc y otros cationes adecuados.

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

Las preparaciones farmacéuticas engloban todos los tipos de formulaciones y en particular las que son adecuadas para inyección, por ejemplo, polvos que pueden reconstituirse así como suspensiones y disoluciones. La cantidad del conjugado (es decir, el conjugado formado entre el principio activo y el polímero descrito en el presente documento) en la composición variará dependiendo de varios factores, pero será de manera óptima una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacena en un recipiente de dosis unitaria (por ejemplo, un vial). Además, la preparación farmacéutica puede alojarse en una jeringa. Puede determinarse una dosis terapéuticamente eficaz de manera experimental mediante la administración repetida de cantidades crecientes del conjugado con el fin de determinar qué cantidad produce un resultado 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. Normalmente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de experimentación de rutina, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan entre bajas y altas), examinando la estabilidad y otros parámetros, y entonces determinando el intervalo al que se logra el rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos.

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

Estos excipientes farmacéuticos anteriores junto con otros excipientes se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), el "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 se administran normalmente, aunque no necesariamente, por medio de inyección y son por tanto disoluciones o suspensiones generalmente líquidas inmediatamente antes de su administración. La preparación farmacéutica también puede adoptar otras formas tales como jarabes, cremas, pomadas, comprimidos, polvos, y similares. También se incluyen otros modos de administración, tales como pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosa, oral, intratecal, subcutánea, intraarterial, etc.

Tal como se describió anteriormente, los conjugados pueden administrarse por vía parenteral mediante inyección intravenosa, o menos preferiblemente mediante inyección intramuscular o subcutánea. Los tipos de formulación adecuados para la administración parenteral incluyen disoluciones listas para inyección, polvos secos para su combinación con un disolvente antes de su uso, suspensiones listas para inyección, composiciones insolubles secas para su combinación con un vehículo antes de su uso y emulsiones y concentrados líquidos para su dilución antes de su administración, entre otros.

Se describe un método para administrar un conjugado tal como se proporciona en el presente documento a un paciente que padece un estado que responde al tratamiento con conjugado. El método comprende administrar, generalmente por medio de inyección, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado (preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica). El método de administración puede usarse para tratar cualquier estado que pueda remediarse o prevenirse mediante la administración del conjugado particular. Los expertos habituales en la técnica aprecian que pueden tratarse eficazmente estados con un conjugado específico. La dosis real que va a administrarse variará dependiendo de la edad, el peso y el estado general del sujeto así como de la gravedad del estado que está tratándose, el criterio del profesional sanitario y el conjugado que está administrándose. Los expertos en la técnica conocen cantidades terapéuticamente eficaces y/o se describen en la bibliografía y los textos de referencia pertinentes. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará entre aproximadamente 0,001 mg y 100 mg, preferiblemente en dosis de desde 0,01 mg/día hasta 75 mg/día, y más

preferiblemente en dosis de desde 0,10 mg/día hasta 50 mg/día.

- 5 La dosificación unitaria de cualquier conjugado dado (de nuevo, preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica) puede administrarse en una variedad de programas de dosificación dependiendo del criterio del médico, de las necesidades del paciente, etc. El programa de dosificación específico lo conocerán los expertos habituales en la técnica o puede determinarse experimentalmente usando métodos de rutina. Los programas de dosificación a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se ha logrado el resultado clínico, se detiene la dosificación de la composición.

PARTE EXPERIMENTAL

- 15 La práctica de la invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de síntesis orgánica y similares, que entienda un experto habitual en la técnica y se explican en la bibliografía. En los siguientes ejemplos, se han hecho esfuerzos por garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas y así sucesivamente), pero deben tenerse en cuenta algo de error experimental y desviación. A menos que se indique lo contrario, la temperatura es en grados Celsius y la presión es o está cerca de la presión atmosférica al nivel del mar. Se obtuvieron todos los reactivos comercialmente a menos que se indique lo contrario. Se obtuvieron todos los RMN a partir de un espectrómetro de RMN de 300 o 400 MHz fabricado por Bruker (Billerica, MA). Todo el procesamiento se lleva a cabo en recipientes de vidrio o revestidos de vidrio y se evita el contacto con equipo o recipientes que contienen metal.

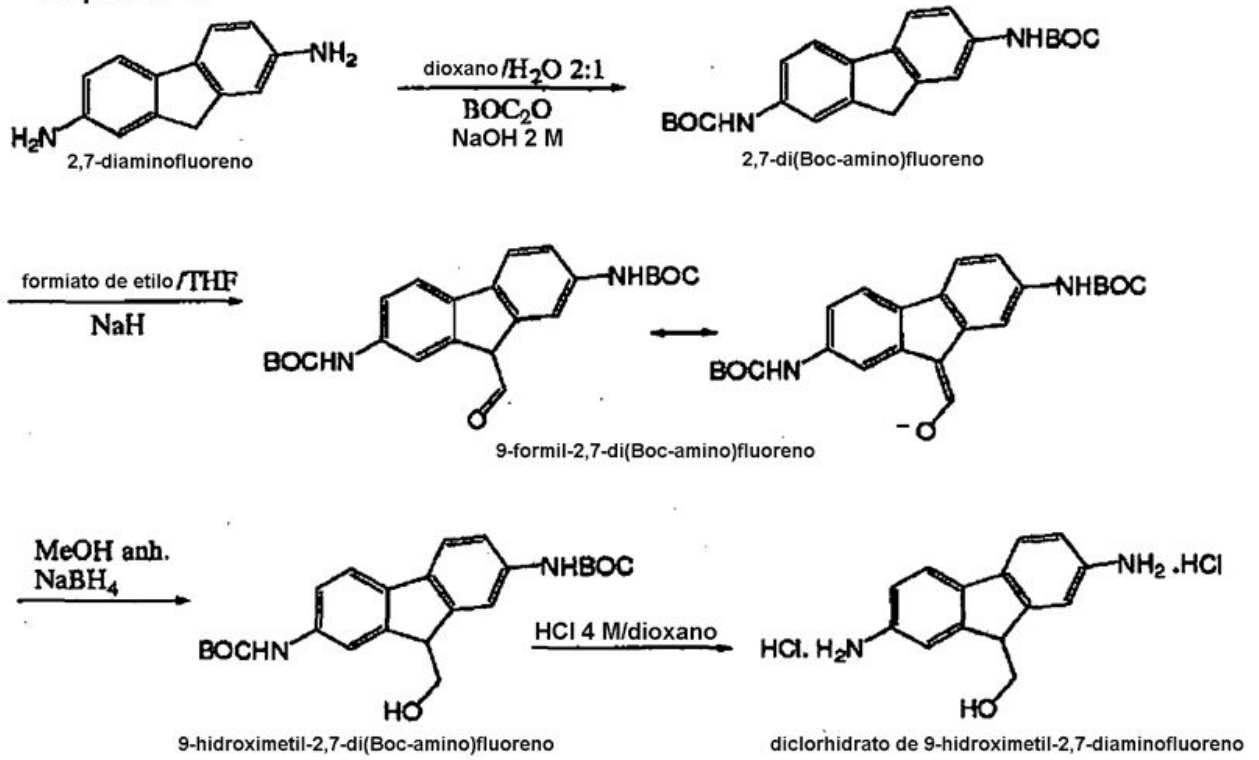
mPEG-CM	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$
anh.	anhidro
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
HCl	ácido clorhídrico
HEPES	4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico
RMN	resonancia magnética nuclear
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
PM	peso molecular
K o kDa	kiloDaltons
SEC	cromatografía de exclusión molecular
HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
SDS-PAGE	electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida
MALDI-TOF	ionización por desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo
CCF	cromatografía en capa fina
THF	tetrahidrofurano

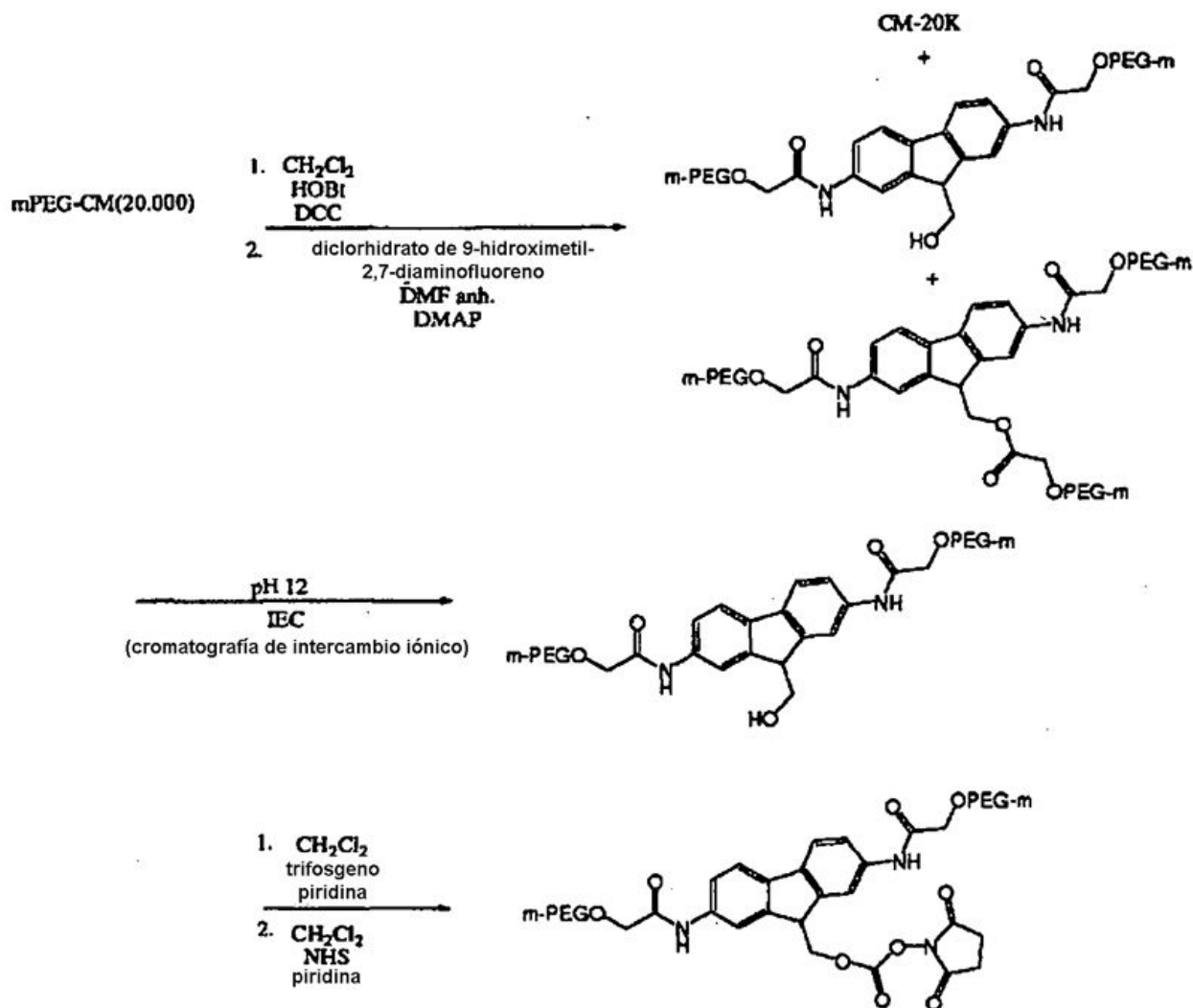
- 25 MATERIALES: Todos los reactivos poliméricos precursores a los que se hace referencia en estos ejemplos están disponibles comercialmente a menos que se indique lo contrario. El péptido I similar al glucagón (7-36, "GLP-1") usado en estos ejemplos se adquirió de American Peptide Company (Sunnyvale, CA).

Ejemplo 1

- 30 Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno-N-hidroxisuccinimida para pegilación reversible

Esquema 1.





A. Preparación de 2,7-di(Boc-amino)fluoreno

- 5 Bajo atmósfera de argón, se disolvió 2,7-diaminofluoreno (2,45 g, 12,5 mmol) en 1,4-dioxano (28 ml). Se añadieron sucesivamente agua desionizada (14 ml), NaOH 2 M (2,2 eq., 27,5 mmol, 13,8 ml) y dicarbonato de di-terc-butilo (Boc_2O) (2,5 eq., 31,3 mmol, 6,82 g). Se agitó la reacción vigorosamente durante 20 horas a temperatura ambiente. Precipitó el producto como un sólido marrón. Se extinguió la reacción mediante la adición de agua y acidificación hasta pH 3 con KHSO_4 1 M. Se extrajo el producto con cloroformo (3 X 400 ml) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera saturada a la mitad, se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron. Se purificó el producto mediante cromatografía ultrarrápida: gel de sílice de 60Å eluido con metanol al 1% en cloroformo. El sólido amarillo purificado (5,1 g, ~99%) era puro mediante CCF (tinción con ninhidrina). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,7 (sa, 2H, NH uretano); 7,6 (d, 2H, Ar); 7,2 (d, 2H, Ar); 6,5 (s, 2H, Ar); 3,8 (s, 2H, CH_2); 1,5 (s, 18H, Boc).
- 10

15 B. Preparación de 9-formil-2,7-di(Boc-amino)fluoreno

- Se disolvió 2,7-di(Boc-amino)fluoreno purificado (5 g, 12,5 mmol) (preparado a partir de la etapa A, anterior) en formiato de etilo (50 ml) y THF anhidro (60 ml) con calentamiento suave. (Nota: se almacenó el formiato de etilo sobre K_2CO_3 para eliminar el ácido fórmico). Se enfrió la disolución en un baño de hielo y se añadió en porciones hidruro de sodio al 60% en aceite mineral (5,5 eq., 69 mmol, 2,75 g). Se calentó lentamente la reacción hasta temperatura ambiente y entonces se calentó hasta 50°C tras ajustar un condensador de reflujo. Tras dos horas, se enfrió la reacción en un baño de hielo y se extinguió mediante la adición lenta de agua desionizada (50 ml). Se ajustó la fase acuosa a pH 5 con ácido acético glacial y se extrajo con acetato de etilo (2 X 400 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas con Na_2SO_4 , se filtraron y se evaporaron a presión reducida. Se purificó el producto en bruto (sólido de color marrón oscuro) mediante cromatografía ultrarrápida: elución en gradiente escalonado en gel de sílice de 60Å, metanol al 1-5% en cloroformo. Rendimiento (4,8 g, ~90%) de un sólido de amarillo a marrón, dependiendo de la pureza. $^1\text{H-RMN}$ ($d_6\text{-DMSO}$): δ (ppm) 11,0 (s, 0,9H, enol); 9,3 (2 s, 1,9H, NH uretano); 7,2-8,3 (m, Ar, C^{10} H enol); 6,5 (2 s, 0,1H, NH uretano); 4,1 (m, 0,3H, CH); 1,5 (s, 18H, Boc).
- 20
- 25

C. Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(Boc-amino)fluoreno

Se disolvió 9-formil-2,7-di(Boc-amino)fluoreno (0,47 g, 1,1 mmol) en metanol anhidro (MeOH) (5 ml) bajo atmósfera de argón. Se añadió NaBH₄ (1,2 eq., 1,3 mmol, 0,05 g) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante cinco horas. Se diluyó la reacción con agua desionizada y se acidificó hasta pH 5 con ácido acético glacial. Se extrajo la reacción con acetato de etilo (2 X 100 ml) y se lavaron las fases orgánicas con NaHCO₃ saturado (4 X 20 ml) y salmuera (3 X 20 ml). Se secaron las fases orgánicas sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron. Se purificó el producto en bruto, un sólido naranja, mediante cromatografía ultrarrápida: elución en gradiente en gel de sílice de 60Å, metanol al 1-5% en cloroformo (elución en gradiente alternativo con acetato de etilo al 15-20% en diclorometano, "DCM"). El producto era un sólido amarillo (0,39, 83%). ¹H-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 7,9 (s, 0,5H, NH uretano); 7,7 (s, 2H, Ar); 7,6 (d, 2H, Ar); 7,4 (d, 2H, Ar); 4,0 (m, 1H, CH); 3,9 (m, 2H, CH₂); 1,6 (s, 18H, Boc).

D. Preparación de clorhidrato de 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno

Se disolvió 9-hidroximetil-2,7-di(Boc-amino)fluoreno (0,39 g, 0,9 mmol) en 1,4-dioxano. A 0°C se añadió HCl concentrado (2,5 ml) y se agitó la reacción durante dos horas a 0°C y durante una hora a temperatura ambiente. Se eliminaron los disolventes de reacción a presión reducida (45°C). Se disolvió el producto en metanol y se evaporó (2 veces). Se disolvió el producto en metanol (8 ml) y se precipitó mediante la adición lenta de dietil éter y enfriamiento (repetición). El producto era un sólido rojo-anaranjado (0,25 g, 91%) que mostraba una única mancha mediante CCF (cloroformo/metano/ácido acético 85:15:3, tinción con ninhidrina). ¹H-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 8,1 (d, 2H, Ar); 7,8 (s, 2H, Ar); 7,5 (d, 2H, Ar); 4,3 (t, 1H, CH); 4,0 (d, 2H, CH₂)

E. Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno

Se destiló de manera azeotrópica mPEG-CM(20.000) (mPEG-CM que tenía un PM=19.458; 20 g, 1,03 mmol, 3,5 eq.), en tolueno anhidro (80 ml) a presión reducida a 60°C en un evaporador rotatorio. Se disolvieron los sólidos en diclorometano anhidro (40 ml) bajo atmósfera de argón seguido por la adición de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) anhidro (3,5 eq., 1,03 mmol, 139 mg) y 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (3,7 eq., 1,09 mmol, 224 mg). En un matraz separado, se disolvieron diclorhidrato de 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno (1 eq., 0,294 mmol, 88 mg) y 4-dimetilaminopiridina (2,2 eq., 0,65 mmol, 79 mg) en DMF anhidro (2,5 ml). Tras agitar la reacción de DCC durante varios minutos (5 - 15 minutos), se transfirió cuantitativamente la disolución en DMF de 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno a la reacción de DCC. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 27 horas antes de evaporarse el disolvente a presión reducida. Se disolvió el jarabe espeso en alcohol isopropílico seco ("IPA," 400 ml, adición lenta) con calentamiento suave. El producto de PEG precipitó en reposo a temperatura ambiente. Se añadió IPA adicional (100 ml) mientras se agitaba a 0°C durante 30 minutos. Se filtró el precipitado y se lavó con IPA/dietil éter 7:3 frío (80 ml) y dietil éter. Se secó el producto en bruto (polvo de color amarillo pálido, 9-(éster metílico de mPEG(20.000))-metil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno) a alto vacío (rendimiento de 18,3 g).

Bajo atmósfera de argón, se disolvió el producto en bruto (18,3 g) en agua desionizada y se ajustó a pH 12 ± 0,1 con NaOH 1 M. Se agitó la mezcla de reacción de hidrólisis a temperatura ambiente durante tres horas. Se ajustó el pH a 3,0 con ácido fosfórico al 10%. (Se filtró la disolución acuosa a través de un lecho de Celite y se aclaró con agua). Se disolvió NaCl (60 g) en la disolución acuosa y entonces se extrajo con DCM (2 X 150 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. Se disolvió el producto en bruto en agua desionizada y se desaló con resina de intercambio iónico. Se realizó la cromatografía de intercambio iónico de la disolución de PEG en DEAE Sepharose (0,9 l) eluyendo con agua. Se recogieron las fracciones que contenían PEG. El producto purificado (polvo de color amarillo pálido) carecía de mPEG-CM(20.000) (análisis de HPLC). Rendimiento de 7,3 g, 64% (que representa la cantidad total de material de PEG recuperado), sustitución del 75% o mejor (que representa el porcentaje de PEG, de la cantidad recuperada, que tiene la funcionalidad deseada). ¹H-RMN (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8,9 (s, 2H, NH amida); 7,9 (s, 2H, Ar); 7,7 (m, 4H, Ar); 4,1 (m, 5H, CH₂C=O, CH); 4,0 (d, 2H, CH₂); 3,6 (s, estructura principal de PEG); 3,3 (s, 3H, -OCH₃).

F. Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno-N-hidroxisuccinimida

Se destiló de manera azeotrópica 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno (0,5 g, 0,013 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 ml) a presión reducida a 50°C en un evaporador rotatorio. Se disolvió el sólido en DCM anhidro (2 ml, "CH₂Cl₂") seguido por adición de trifosgeno (se usó Care para atrapar el gas fosgeno en exceso de la reacción con trampa base) (1,4 eq., 0,018 mmol, 5 mg). Tras varios minutos, se añadió piridina anhidra (2 eq., 0,026 mmol, 2 µl de piridina en DCM [2 µl de piridina/50 µl de DCM]). A la hora y media se evaporó la mayor parte del disolvente de reacción y el fosgeno en exceso (uso de trampa base con ventilación) con calentamiento suave (40°C). Se disolvió el jarabe en DCM anhidro (2 ml) seguido por la adición de N-hidroxisuccinimida (5,3 eq., 0,068 mmol, 8 mg, "NHS") y piridina anhidra (3,2 eq., 0,041 mmol, 83 µl de la disolución anterior (2:50) en DCM). Tras cuatro horas, se evaporó el disolvente bajo una corriente de argón. Se disolvió el jarabe en IPA anhidro y precipitó a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado y se lavó con IPA frío y dietil éter. Se evaporaron los disolventes residuales a vacío para dar un polvo de color amarillo muy pálido. Rendimiento de 0,4 g, 80%, sustitución del 73% de carbonato de NHS mediante HPLC. ¹H-RMN (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8,9 (s, 2H, NH amida); 7,9 (s,

2H, Ar); 7,7 (m, 4H, Ar); 4,7 (d, 2H, CH₂), 4,3 (t, 1H, CH); 4,1 (s, 4H, CH₂C=O); 2,8 (s, 4H, CH₂CH₂ NHS).

Usando este mismo procedimiento, pueden prepararse reactivos poliméricos que tienen otros pesos moleculares sustituyendo un reactivo polimérico de mPEG-CM que tiene un peso molecular distinto de 20.000.

5

Ejemplo 2

Pegilación de insulina con Fmoc PEG2 40K carbamato

10 A. Pegilación

Se almacenó a -20°C el reactivo polimérico preparado en el ejemplo 1, 9-hidroxi-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno-N-hidroxisuccinimida, y se calentó hasta temperatura ambiente en un desecador. Se pesó insulina (8,9 mg) y se disolvió en 1 ml de DMSO. Se usó una razón molar de 3:1 (PEG:insulina). Se pesaron 184,6 mg de 9-hidroxi-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno-N-hidroxisuccinimida y se disolvieron en 1 ml de acetonitrilo y luego se añadieron a la insulina. Se agitó la reacción bajo nitrógeno durante una hora, y entonces se extinguió diluyéndola 1:5 con ácido acético 20 mM, pH 3,0 para disminuir el pH de la mezcla de reacción hasta pH 3,1. El pH bajo estabiliza el conjugado degradable.

15

20 B. Purificación

Se usó intercambio catiónico para purificar el conjugado de PEG-insulina de 1 mero, que es el conjugado que tiene pegilación en un sitio de insulina, del de 2 meros, que es el conjugado que tiene pegilación en dos sitios de insulina. Se usaron una columna SP650 de 20 ml y un sistema ÄKTA Basic (Amersham Biosciences, Piscataway NJ) para purificar los conjugados de PEG. El tampón de partida era HAc/NaAc 20 mM (ácido acético/acetato de sodio), pH 3,1 y el tampón de elución era HAc/NaAc 20 mM, NaCl 1 M, pH 3,1. La velocidad de flujo era de 10 ml/min, y la carga de muestra era de 9 mg, contenido en insulina. El método de purificación se enumera en la tabla 1.

25

Tabla 1

30

Método de purificación para conjugado degradable de PEG-insulina	
Volumen (ml)	PrimeMethod 109 % B
0	0
60	0
220	40
240	100
300	100
301	0
361	0

C. Caracterización y cuantificación de conjugados purificados

En la figura 1 se muestra el análisis de HPLC de la mezcla de reacción. La figura 2 muestra el análisis de HPLC del conjugado de 1 mero pegilado (o conjugado monopegilado). La pureza del conjugado de 1 mero pegilado es del 98,1% con un 1,9% de 2 meros.

35

D. Estudio de degradación del conjugado purificado

Se realizó un estudio de liberación *in vitro* sobre el conjugado purificado. Se realizó la prueba en un instrumento Agilent 1100 con un inyector automático termostatzado (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA). Se usó un método de HPLC para analizar la liberación de la proteína nativa y la reducción del conjugado. Se diluyó el conjugado de 1 mero (o conjugado monopegilado) 10:1 en tampón 10X PBS (solución salina tamponada con fosfato), pH 7,35. Se incubó a 37°C, y se retiraron alícuotas en puntos de tiempo. Se supuso que el tiempo 0 era antes de la dilución con PBS, de modo que se usaron los resultados de HPLC del conjugado de 1 mero. Se tomaron los puntos de tiempo a 5 horas, 15 horas y 28 horas, y luego una vez al día durante 8 días. En la figura 3 de muestran los resultados compilados.

45

Se representó gráficamente el porcentaje relativo de cada componente en la muestra en cada punto de tiempo usando el software de análisis Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego CA). Se ajustaron los datos a una ecuación no lineal, y se usó esta ecuación para estimar la semivida de 4,5 días para el conjugado de 1 mero en tampón.

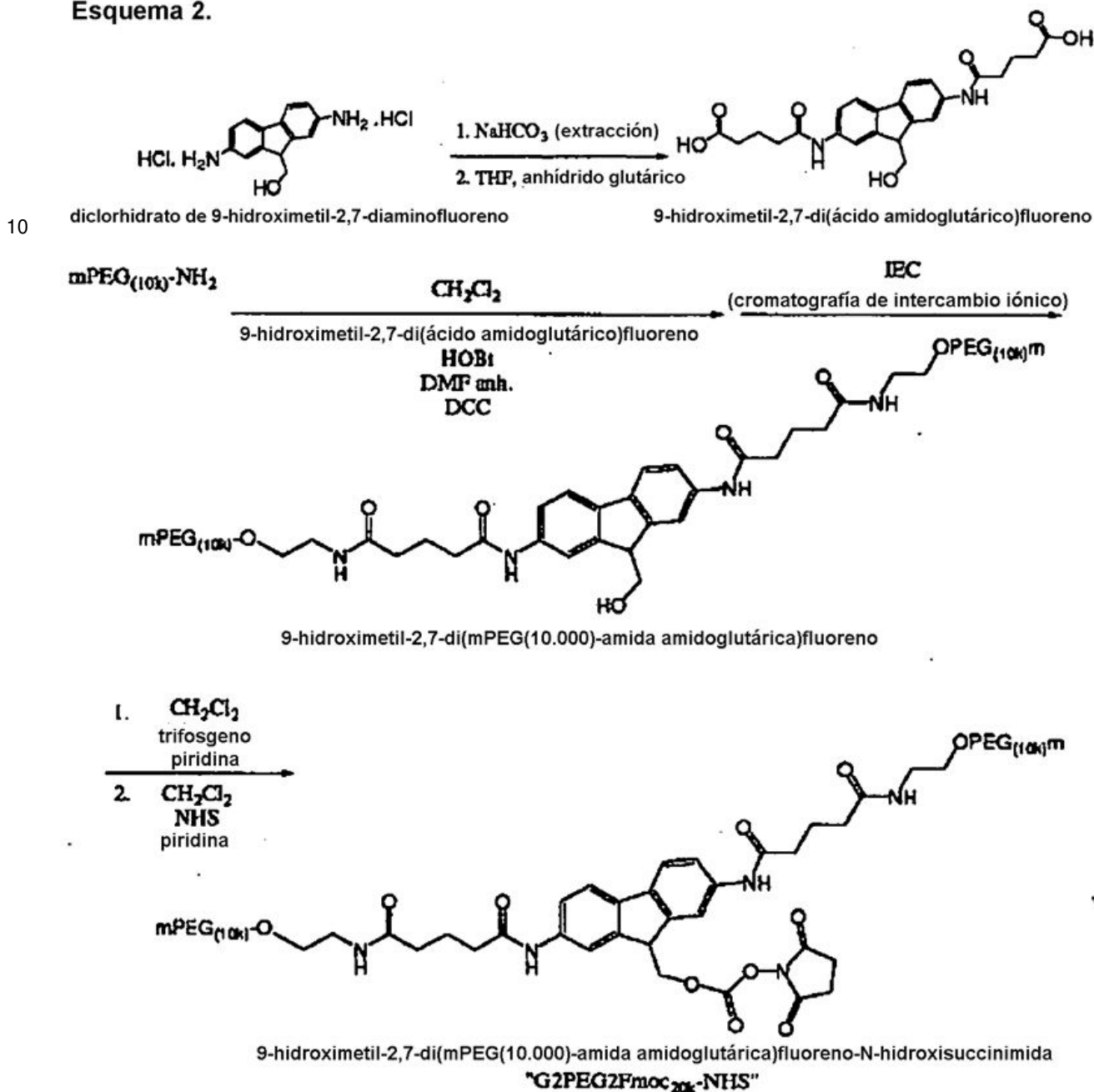
50

Ejemplo 3

Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(10.000)-amida amidoglutárica)fluoreno-N-hidroxisuccinimida (o "G2PEG2Fmoc_{20k}-NHS")

La síntesis de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(10.000)-amida amidoglutárica)fluoreno-N-hidroxisuccinimida se representa esquemáticamente en el esquema 2, a continuación.

Esquema 2.



A. Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(ácido amidoglutárico)fluoreno

15 Bajo atmósfera de argón, se disolvió diclorhidrato de 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno (preparación descrita en las etapas A a D en el ejemplo 1) en agua desionizada y se ajustó a pH 8 con NaHCO₃ saturado. Se diluyó la mezcla a la mitad con salmuera y se extrajo el precipitado con acetato de etilo. Se secaron las fases de acetato de etilo sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para obtener 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno (polvo marrón, rendimiento

20 aislado del 84%).

Se disolvió 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno (0,38 g, 1,7 mmol) en tetrahidrofurano anhidro ("THF", 10 ml) y se añadió anhídrido glutárico (97%, 2,2 eq., 3,7 mmol, 0,435 g). Se agitó la reacción durante 4,5 horas y se confirmó la ausencia de amina mediante CCF (tinción con ninhidrina, acetato de etilo/metanol/ácido acético 90:10:3). Se diluyó la mezcla de reacción con hexanos (10 ml), se filtró y se lavó con THF/hexanos 1:1, luego hexanos. Se disolvió el producto en bruto en una cantidad mínima de metanol (1 ml) y THF (10 ml) y precipitó con la adición de hexanos (10 ml). Se enfrió la mezcla (4°C), se filtró y se lavó con THF/hexanos 1:1, luego hexanos. El rendimiento era de 0,59 g (77%) de polvo amarillo-anaranjado. ¹H-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 7,9 (s, 2H, Ar); 7,7 (d, 2H, Ar); 7,5 (dd, 2H, Ar); 4,0 (t, 1H, CH); 3,9 (d, 2H, CH₂); 2,5 (t, 4H, CH₂); 2,4 (t, 4H, CH₂); 2,0 (m, 4H, CH₂).

B. Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(10.000)-amida amidoglutárica)fluoreno

Se destiló de manera azeotrópica mPEG-NH₂(10.000) (M_n=10.200; purificado cromatográficamente, 12,75 g, 1,25 mmol) en tolueno anhidro (100 ml) a presión reducida a 50°C en un evaporador rotatorio. Se disolvieron los sólidos en DCM anhidro (50 ml) bajo atmósfera de argón. Se añadió cuantitativamente una disolución de 9-hidroximetil-2,7-di(ácido amidoglutárico)fluoreno (1 eq., 0,5 mmol, 0,225 g) y N-hidroxibenzotriazol (HOBt) anhidro (2,2 eq., 1,1 mmol, 149 mg) en DMF anhidra (5 ml) a la disolución de PEG (2,5 ml de DMF para aclarar). Entonces se añadió 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (2,4 eq., 1,2 mmol, 248 mg) a la disolución de reacción. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas antes de evaporar el disolvente a presión reducida. Se disolvió el jarabe espeso en IPA seco (500 ml, adición lenta) con calentamiento suave. El producto de PEG precipitó en reposo a temperatura ambiente. Se enfrió el precipitado hasta 10°C durante diez minutos, se filtró y se lavó con IPA frío (200 ml) y luego dietil éter (200 ml). Se secó el producto en bruto (polvo blanquecino) a alto vacío y luego se disolvió en agua desionizada. Se realizó cromatografía de intercambio iónico de la disolución de PEG en medios POROS (0,1 l, Boehringer-Mannheim, GmbH, Mannheim, Alemania) eluyendo con agua. Se recogieron las fracciones que contenían PEG neutro. El producto purificado no contenía mPEG-NH₂(10.000) (análisis de HPLC). Rendimiento de 5,5 g, 53%, sustitución del 85% o mejor. ¹H-RMN (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8,6 (s, 2H, ArNH amida); 7,9 (s, 2H, Ar); 7,6 (m, 4H, Ar); 6,4 (sa, 2H, NH amida); 4,1 (m, 1H, CH); 4,0 (d, 2H, CH₂); 3,6 (s, estructura principal de PEG); 3,3 (s, 3H, -OCH₃); 2,4 (t, 4H, CH₂); 2,3 (t, 4H, CH₂); 2,0 (m, 4H, CH₂).

C. Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(10.000)-amida amidoglutárica)-N-hidroxisuccinimida

Se destiló de manera azeotrópica 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(10.000)-amida amidoglutárica)fluoreno (5,3 g, 0,25 mmol) en acetonitrilo anhidro (100 ml) a presión reducida a 50°C en un evaporador rotatorio. Se disolvió el sólido en DCM anhidro (27 ml) seguido por la adición de trifosgeno (1,4 eq., 0,36 mmol, 106 mg). (Se usó Care para atrapar el gas fosgeno en exceso de la reacción con trampa base). Tras varios minutos, se añadió piridina anhidra (2 eq., 0,51 mmol, 41 μl). Tras hora y media, se evaporó la mayor parte del disolvente de reacción y el fosgeno en exceso (uso de trampa base con ventilación) con calentamiento suave (40°C). Se disolvió el jarabe en DCM anhidro (15 ml) seguido por la adición de N-hidroxisuccinimida (5,3 eq., 1,35 mmol, 155 mg, "NHS"). Tras 15 minutos se añadió piridina anhidra (3,2 eq., 0,81 mmol, 66 μl). Se agitó la reacción durante dos horas y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el jarabe en IPA anhidro (200 ml) y precipitó a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado y se lavó con IPA frío y dietil éter (150 ml que contenían 10 mg de BHT). Se evaporaron los disolventes residuales a vacío para proporcionar un polvo blanquecino. Rendimiento de 5,1 g, 95%, del sustitución de ~70% con carbonato de NHS mediante HPLC.

Se preparó otro reactivo polimérico usando este mismo enfoque excepto porque se sustituyó mPEG-NH₂(10.000) por mPEG-NH₂ (purificado cromatográficamente) que tenía un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 20.000. El reactivo polimérico resultante tenía un peso molecular total de aproximadamente 40.000 Daltons. El nombre del reactivo polimérico así preparado es 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-amida amidoglutárica)fluoreno-N-hidroxisuccinimida (o "G2PEG2FmoC_{40k}-NHS").

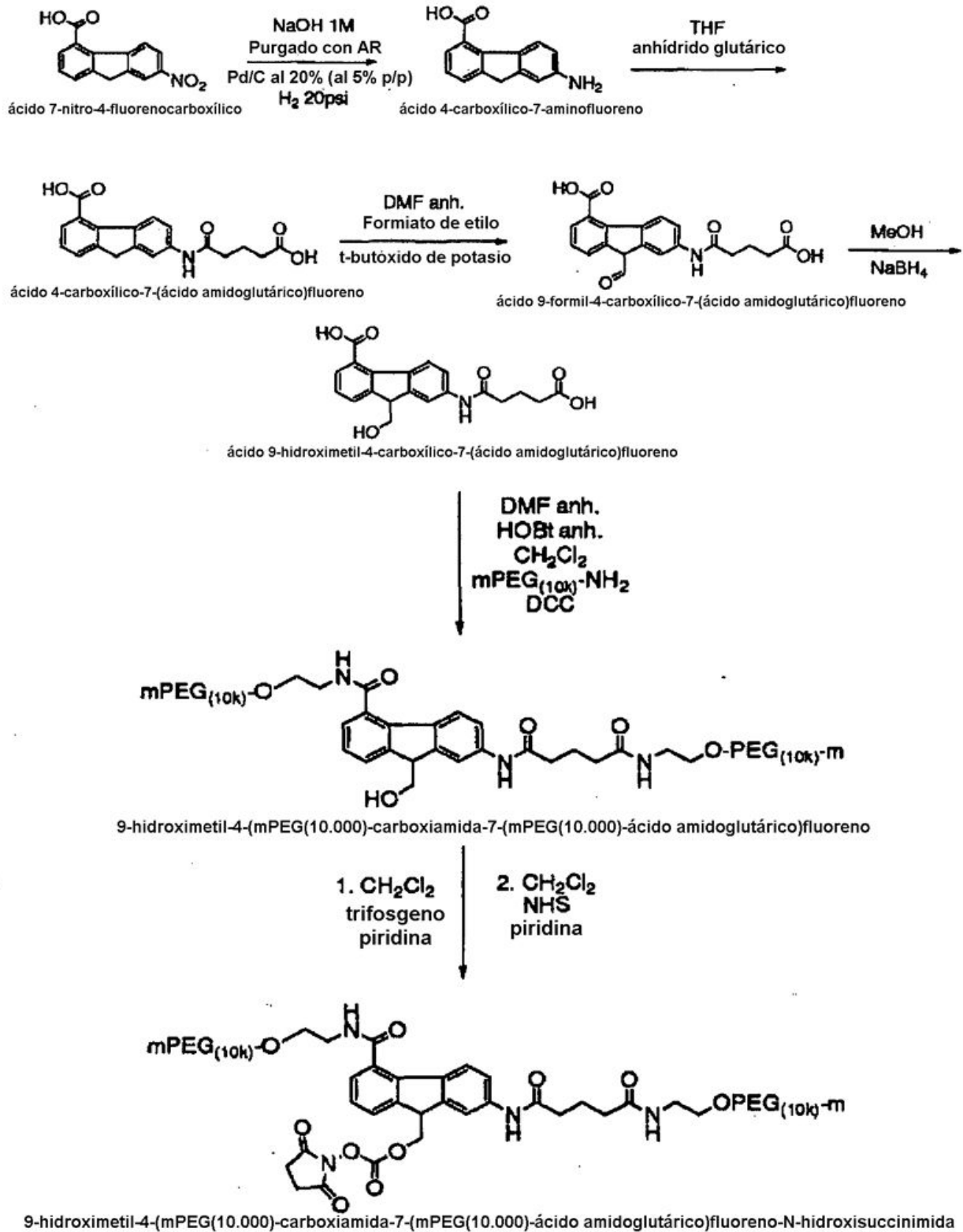
Se preparó otro reactivo polimérico usando este mismo enfoque excepto porque se sustituyó mPEG-NH₂(10.000) por mPEG-NH₂ (preparado con alta pureza usando métodos convencionales) que tenía un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 30.000. El reactivo polimérico resultante tenía un peso molecular total de aproximadamente 60.000 Daltons. El nombre del reactivo polimérico así preparado es 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(30.000)-amida amidoglutárica)fluoreno-N-hidroxisuccinimida (o "G2PEG2FmoC_{60k}-NHS").

Ejemplo 4

Preparación de 9-hidroximetil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(mPEG(10.000)amida amidoglutárica)fluoreno-N-hidroxisuccinimida

La síntesis de 9-hidroximetil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(mPEG(10.000)-amida amidoglutárica)fluoreno-N-hidroxisuccinimida se representa esquemáticamente en el esquema 4, a continuación.

Esquema 3.



5 A. Preparación de ácido 4-carboxílico-7-aminofluoreno

En un frasco de hidrogenación Parr (Parr Instrument Company, Moline IL) se disolvió ácido 7-nitro-4-fluorenocarboxílico (8,0 g, 0,031 mol) [preparado a partir de ácido difénico tal como se describe en Helvetica Chimica Acta (1984) 67, 2009-2016, y también disponible comercialmente de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO] en NaOH 1 M

purgado con argón (Ar) (250 ml, calentado ligeramente si es necesario). Tras la adición cuidadosa de Pd al 20%/C (humedecido con un 50% de agua), al 5% en peso (400 mg), se evacuó/llenó el frasco Parr 3 veces en un aparato Parr para garantizar una atmósfera de hidrógeno. Se agitó la suspensión bajo 20 psi de gas hidrógeno durante 18 horas y entonces se eliminó el hidrógeno restante a presión reducida. Se filtró la suspensión sobre un lecho de Celite, se aclaró con agua adicional y entonces se ajustó a pH 4 con ácido acético. Se extrajo el producto con salmuera y acetato de etilo (3 x 800 ml). Se lavó cada fase orgánica con una pequeña cantidad de salmuera. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. Se añadió tolueno y se evaporó a presión reducida para ayudar en la eliminación de ácido acético (repetido 2-3 veces si es necesario). La evaporación final fue a alto vacío durante uno o más días. El rendimiento era de 6,1 g (86%) ¹H-RMN (d₆-DMSO): δ (ppm) 8,1 (d, 1 H, Ar); 7,62 (d, 1 H, Ar); 7,58 (d, 1 H, Ar); 7,2 (t, 1 H, Ar); 6,8 (s, 1 H, Ar); 6,5 (d, 1 H, Ar); 3,8 (s, 2 H, CH₂); 1,9 (s, <0,25 H, HOAc).

B. Preparación de ácido 4-carboxílico-7-(ácido amidoglutárico)fluoreno

Se disolvió ácido 4-carboxílico-7-aminofluoreno (8,6 g, 0,038 mol) en THF anhidro (150 ml) y se añadió anhídrido glutárico (97%, 4,94 g, 0,042 mol). Se agitó la reacción durante 4,5 horas y se confirmó la ausencia de amina mediante CCF (tinción con ninhidrina, acetato de etilo/metanol/ácido acético 90:10:3, o similar). Se diluyó la mezcla de reacción con hexanos (150 ml), se enfrió, se filtró y se lavó con THF/hexanos frío 1:1, luego hexanos. Se evaporaron los disolventes residuales a presión reducida. El rendimiento era de 7,2 g (55%). ¹H-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 8,4 (d, 1 H, Ar); 8,0 (s, 1 H, Ar); 7,8 (d, 1 H, Ar); 7,7 (d, 1 H, Ar); 7,5 (d, 1 H, Ar); 7,4 (t, 1 H, Ar); 4,0 (s, 2 H, CH₂); 2,5 (t, 2 H, CH₂); 2,4 (t, 2 H, CH₂); 2,0 (m, 2 H, CH₂).

C. Preparación de ácido 9-formil-4-carboxílico-7-(ácido amidoglutárico)fluoreno

Se disolvió el diácido, ácido 4-carboxílico-7-(ácido amidoglutárico)fluoreno (7,16 g, 0,021 mol), en DMF anhidra (200 ml) y formiato de etilo (almacenado sobre K₂CO₃, 350 ml). Se añadió cuidadosamente terc-butóxido de potasio (95%, 19,9 g, 0,169 mol) en varias porciones. Se sometió a reflujo suave la reacción a 45°C durante 30 minutos y entonces se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. Se enfrió la disolución en un baño de hielo, luego se añadieron HCl 1 M (500 ml) y salmuera (350 ml). Se extrajo el producto con acetato de etilo (3 x 700 ml). Se lavaron las fases orgánicas con salmuera y entonces se secaron sobre Na₂SO₄. Se filtró el desecante y se evaporó el disolvente a presión reducida. El rendimiento era de > 7,8 g (100%) y contenía DMF residual. ¹H-RMN (d₆-DMSO): δ (ppm) 11,5 (d, 0,5 H, formilo); 11,4 (d, 0,5 H, formilo); 10,0 (d, 1 H, NH); 8,4-7,3 (m, 7 H, Ar); 2,4 (t, 2 H, CH₂); 2,3 (t, 2 H, CH₂); 1,8 (m, 2 H, CH₂).

D. Preparación de ácido 9-hidroximetil-4-carboxílico-7-(ácido amidoglutárico)fluoreno

Se disolvió el ácido 9-formil-4-carboxílico-7-(ácido amidoglutárico)fluoreno (7,8 g, 0,021 mol) en metanol anhidro (MeOH) (150 ml). Con el matraz en un baño a temperatura ambiente, se añadió cuidadosamente borohidruro de sodio (6,0 g, 0,159 mol) en varias porciones. A las dos horas y cuatro horas, se añadieron cuidadosamente porciones adicionales de borohidruro de sodio (2,0 g, 0,053 mol). Tras siete horas, se evaporó el disolvente a presión reducida, se disolvió el residuo en agua y entonces se acidificó con HCl 1 M. Se extrajo el precipitado amarillo con salmuera y acetato de etilo (4 x 700 ml). Se lavó cada fase de acetato de etilo con salmuera (2x), se combinaron y se secaron sobre Na₂SO₄. Se evaporó el disolvente y se recristalizó el producto en bruto en metanol/cloroformo. Rendimiento de 4,9 g (63%) de cristales amarillos. ¹H-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 8,4 (d, 1 H, Ar); 8,0 (s, 1 H, Ar); 7,85 (d, 1 H, Ar); 7,83 (d, 1 H, Ar); 7,5 (dd, 1 H, Ar); 7,4 (t, 1 H, Ar); 4,1-3,9 (m, 2 H, CH₂, CH); 2,5 (t, 2 H, CH₂); 2,4 (t, 2 H, CH₂); 2,0 (m, 2 H, CH₂).

E. Preparación de 9-hidroximetil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(mPEG(10.000)amida amidoglutárica)fluoreno

Se destiló de manera azeotrópica mPEG-NH₂(10.000) (M_n=9,418; purificado cromatográficamente, 75 g, 0,008 mol, también designado "mPEG_(10K)-NH₂") en tolueno anhidro (750 ml) a presión reducida a 50°C en un evaporador rotatorio. Se disolvieron los sólidos en DCM anhidro (CH₂Cl₂) (300 ml) bajo atmósfera de argón. Se añadió cuantitativamente una disolución de ácido 9-hidroximetil-4-carboxílico-7-(ácido amidoglutárico)fluoreno (1,3 g, 0,0036 mol) y N-hidroxibenzotriazol (HOBt) anhidro (1,0 g, 0,0076 mol) en DMF anhidra (33 ml) a la disolución de PEG (20 ml de DMF para aclarar). Entonces se añadió 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (1,65 g, 0,008 mol) a la disolución de reacción. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas antes de evaporar el disolvente a presión reducida. Se disolvió el jarabe espeso en IPA seco (3,6 l, adición lenta) con calentamiento suave. El producto de PEG precipitó en reposo a temperatura ambiente. Se enfrió el precipitado hasta 10°C durante diez minutos, se filtró y se lavó con IPA frío (400 ml) y luego dietil éter (400 ml). Se secó el producto en bruto (polvo blanquecino) a alto vacío y entonces se disolvió en agua desionizada. Se realizó cromatografía de intercambio iónico de la disolución de PEG en medios POROS (1 l) eluyendo con agua. Se recogieron las fracciones que contenían PEG neutro y se purificaron adicionalmente con medios de DEAE Sepharose (0,5 l). Se encontró que el producto purificado no contenía productos de ácido de mPEG-NH₂ (10.000) o monoPEG (análisis de HPLC). Rendimiento de 55 g, 79% (sustitución del 95%). ¹H-RMN (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8,7 (s, 1 H, ArNH amida); 8,0 (s, 1 H, Ar); 7,9 (d, 1 H, Ar); 7,7 (d, 1 H, Ar); 7,5 (d, 1 H, Ar); 7,4 (d, 1 H, Ar); 7,3 (t, 1 H, Ar); 6,7 (sa, 1 H, NH amida); 6,4 (sa, 1 H, NH amida);

4,0 (m, 3 H, CH, CH₂); 3,6 (s, estructura principal de PEG); 3,3 (s, 6 H, -OCH₃); 2,4 (t, 2 H, CH₂); 2,3 (t, 2 H, CH₂); 2,0 (m, 2 H, CH₂).

5 F. Preparación de 9-hidroximetil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(mPEG(10.000)amida amidoglutárica)fluoreno-N-hidroxisuccinimida

Se destiló de manera azeotrópica el 9-hidroximetil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(mPEG(10.000)amida amidoglutárica)fluoreno (14 g, 0,00072 mol) en tolueno anhidro (140 ml) a presión reducida a 45°C en un evaporador rotatorio. Se disolvió el sólido en DCM anhidro (56 ml, más aclarado con 7 ml) y se transfirió mediante jeringa a una disolución de trifosgeno recién preparada (se atrapó el gas fosgeno en exceso de la reacción con trampa base) (0,214 g, 0,00072 mol) y piridina anhidra (0,057 g, 0,00072 mol, añadida como disolución en CH₂Cl₂ (~ 5 ml)). A la hora, comenzó una corriente de argón rápida (mantenida a temperatura ambiente) para evaporar el fosgeno en exceso (uso de trampa base con ventilación). Tras 30 minutos de purga con argón, se añadió N-hidroxisuccinimida (NHS) (0,43 g, 0,0037 mol) y se agitó durante diez minutos. Se añadió piridina anhidra (0,285 g, 0,0036 mol, añadida como disolución en CH₂Cl₂ (~ 25 ml)). Se continuó la corriente de argón para evaporar la mayor parte del disolvente de reacción tras 1,5 horas. Se disolvió el jarabe espeso en IPA anhidro (700 ml) y precipitó a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado y se lavó con IPA frío y dietil éter (100 ml que contenían 10 mg de BHT). Se evaporaron los disolventes residuales a vacío para obtener un polvo blanquecino. Rendimiento de 13,5 g, 96%, sustitución del 87% con carbonato de NHS mediante HPLC. ¹H-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 8,7 (s, 1 H, NH Ar amida); 7,9 (m, 2 H, Ar); 7,6 (m, 2 H, Ar); 7,5 (d, 1 H, Ar); 7,3 (t, 1 H, Ar); 6,8 (sa, 1 H, NH); 6,4 (sa, 1 H, NH); 4,7 (m, 2 H, CH₂); 4,3 (t, 1 H, CH); 3,6 (s, estructura principal de PEG); 3,3 (s, 6 H, -OCH₃); 2,8 (s, 4 H, CH₂CH₂); 2,5 (t, 2 H, CH₂); 2,3 (t, 2 H, CH₂); 2,0 (m, 2 H, CH₂).

Se preparó otro reactivo polimérico usando este mismo enfoque excepto porque se sustituyó mPEG-NH₂(10.000) por mPEG-NH₂ (purificado cromatográficamente) que tenía un peso molecular promedio en peso de 20.000. El reactivo polimérico resultante tenía un peso molecular total de aproximadamente 40.000 Daltons.

Se preparó otro reactivo polimérico usando este mismo enfoque excepto porque se sustituyó mPEG-NH₂(10.000) por mPEG-NH₂ (preparado con alta pureza usando métodos convencionales) que tenía un peso molecular promedio en peso de 30.000. El reactivo polimérico resultante tenía un peso molecular total de aproximadamente 60.000 Daltons.

Ejemplo 5

Preparación de conjugados de glicina con reactivos poliméricos a modo de ejemplo y datos de liberación

Se disolvió 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno-N-hidroxisuccinimida (10 mg, NHS activa a -70%), preparada tal como se describe en el ejemplo 1, en una disolución tampón de glicina al 1% + HEPES 25 mM pH 7,4 (25 µl), se mezcló mediante vórtex y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos para formar una disolución de conjugado. Después de eso, se trataron dos alícuotas de la disolución de conjugado tal como sigue: se diluyó una alícuota con HEPES 25 mM pH 7,4 (1,25 ml), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos; se diluyó otra alícuota con HEPES 25 mM pH 8,2 (tampón), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos.

Se disolvió G2PEG2Fmoc_{20k}-NHS, preparada tal como se describe en el ejemplo 3, en una disolución tampón de glicina al 1% + HEPES 25 mM pH 7,4 (25 µl), se mezcló mediante vórtex y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos para formar una disolución de conjugado. Después de eso, se trataron dos alícuotas de la disolución de conjugado tal como sigue: se diluyó una alícuota con HEPES 25 mM pH 7,4 (1,25 ml), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos; se diluyó otra alícuota con HEPES 25 mM pH 8,2 (tampón), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos.

Se disolvió G2PEG2Fmoc_{40k}-NHS, preparada tal como se describe en el ejemplo 3, en una disolución tampón de glicina al 1% + HEPES 25 mM pH 7,4 (25 µl), se mezcló mediante vórtex y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos para formar una disolución de conjugado. Después de eso, se trataron dos alícuotas de la disolución de conjugado tal como sigue: se diluyó una alícuota con HEPES 25 mM pH 7,4 (1,25 ml), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos; se diluyó otra alícuota con HEPES 25 mM pH 8,2 (tampón), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos.

Se disolvió 9-hidroximetil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(mPEG(10.000)amida amidoglutárica)fluoreno-N-hidroxisuccinimida, preparada tal como se describe en el ejemplo 4, en una disolución tampón de glicina al 1% + HEPES 25 mM pH 7,4 (25 µl), se mezcló mediante vórtex y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos para formar una disolución de conjugado. Después de eso, se trataron dos alícuotas de la disolución de conjugado tal como sigue: se diluyó una alícuota con HEPES 25 mM pH 7,4 (1,25 ml), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos; se diluyó otra alícuota con HEPES 25 mM pH 8,2 (tampón), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos.

Se disolvió 4,7-CAC-PEG2-Fmoc_{20k}-NHS, preparada tal como se describe en el ejemplo 12, en una disolución tampón de glicina al 1% + HEPES 25 mM pH 7,4 (25 µl), se mezcló mediante vórtex y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos para formar una disolución de conjugado. Después de eso, se trataron dos alícuotas de la disolución de conjugado tal como sigue: se diluyó una alícuota con HEPES 25 mM pH 7,4 (1,25 ml), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos; se diluyó otra alícuota con HEPES 25 mM pH 8,2 (tampón), se incubó a 37°C y se inyectó en un sistema de HPLC a diversos intervalos.

Se obtuvieron datos de liberación para los valores de $t_{1/2}$ a partir de la pendiente del ajuste lineal a un gráfico de $\ln([\text{conjugado}])$ frente al tiempo, según la ley de velocidad de primer orden.

Datos de liberación para el conjugado de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(10.000)-metilamida)fluoreno-carbamato de glicina a 37°C: pH 7,4, $t_{1/2} = 9,9$ días; pH 8,2, $t_{1/2} = 5,5$ días (para un experimento).

Datos de liberación para el conjugado de G2PEG2Fmoc_{20k}-carbamato de glicina a 37°C: pH 7,52 \pm 0,13%, $t_{1/2} = 14,8 \pm 2,8$ días; pH 8,14 \pm 0,04, $t_{1/2} = 7,0 \pm 1$ días (en los que los intervalos de \pm representan dos experimentos).

Datos de liberación para el conjugado de G2PEG2Fmoc_{40k}-carbamato de glicina a 37°C: pH 7,52 \pm 0,13, $t_{1/2} = 12,2 \pm 2,6$ días; pH 8,14 \pm 0,04, $t_{1/2} = 6,7 \pm 0,1$ días (en los que los intervalos de \pm representan 2 experimentos).

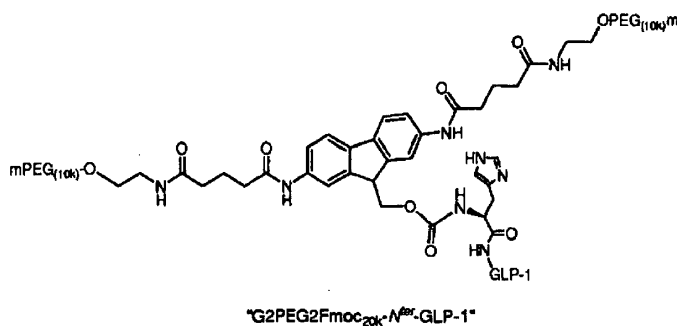
Datos de liberación para el conjugado de 9-hidroximetil-4-(carboxamido mPEG(10.000)-7-(amida amidoglutárica mPEG(10.000))fluoreno-carbamato de glicina a 37°C: pH 7,52 \pm 0,13, $t_{1/2} = 4,0 \pm 1$ días; pH 8,14 \pm 0,04, $t_{1/2} = 1,95 \pm 0,15$ días (en los que los intervalos de \pm representan dos experimentos).

Datos de liberación para el conjugado de 4,7-CAC-PEG2-Fmoc_{20k}-carbamato de glicina a 37°C: pH 7,4, $t_{1/2} = 18,0 \pm 0,1$ días; pH 8,2, $t_{1/2} = 7,5 \pm 0,1$ días (en los que los intervalos de \pm representan dos experimentos).

Ejemplo 6

Preparación de un conjugado de polímero-proteína a modo de ejemplo: Preparación de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1

Se unió covalentemente un reactivo polimérico ilustrativo, G2PEG2Fmoc_{20k}-NHS, al extremo N-terminal de un polipéptido ilustrativo, GLP-1, para proporcionar una forma de profármaco de la proteína en la que está unido un resto de PEG liberable. La naturaleza de dos brazos del reactivo polimérico proporciona un aumento de la estabilidad del resto GLP-1 posteriormente a su administración, para proporcionar de ese modo una formulación de liberación sostenida mediante la cual se libera GLP-1 del conjugado por medio de hidrólisis para proporcionar el precursor de GLP-1 nativo o no modificado. La estructura de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 se proporciona a continuación (en la estructura, "GLP-1" representa un residuo de GLP-1). Puede sustituirse GLP-1 por otros polipéptidos y proteínas.



El reactivo polimérico, G2PEG2Fmoc_{20k}-NHS, se preparó tal como se describió anteriormente en el ejemplo 3.

Se preparó una disolución de 50 mg de GLP-1 (nominalmente $1,2276 \times 10^{-5}$ mol) (la pureza real de GLP-1 era del 98,5% (mediante HPLC), y el contenido en péptido era del 82,2%) en 25 ml de tampón acetato de sodio 20 mM a pH 5,50, seguido por la adición de 876,8 mg de G2PEG2Fmoc_{20k}-NHS ($3,0692 \times 10^{-5}$ mol) con agitación. Se permitió que la disolución se agitase durante 16 horas a temperatura ambiente, permitiendo de ese modo la formación de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1, un conjugado de GLP-1 pegilado. Entonces se acidificó la mezcla de reacción hasta pH 4,30 mediante HAc 20 mM. Se monitorizó la reacción mediante análisis de SDS-PAGE (figura 4).

Se purificó el G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 para obtener el conjugado monopegilado de GLP-1 mediante cromatografía de intercambio catiónico en un sistema ÄKTA Basic (figura 5) usando una fase móvil de tampón acetato de sodio 20 mM a pH 4,30 (disolución A) y tampón acetato de sodio 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,30 (disolución B). La columna era una HiTrapTM SP HP empacada con resina de 75 ml, disponible de Amersham Biosciences, empacada con medios de intercambio iónico de alta resolución de SP Sepharose, también

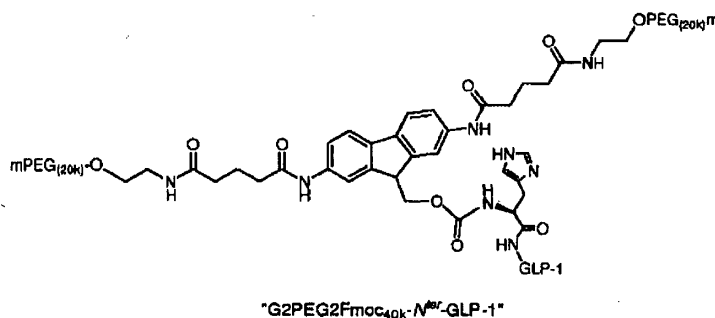
disponibles de Amersham Biosciences, y la velocidad de flujo en la columna era de 14 ml/min. Se cargó en primer lugar en la columna la disolución que va a purificarse. Entonces se eluyó el producto cargado mediante la fase móvil usando un gradiente. Se usó el siguiente gradiente: para volúmenes de retención de 0 ml a 550 ml, el 0% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 550 ml a 1041 ml, el 0% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 1041 ml a 1093 ml, el 10% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 1093 ml a 1338 ml, el 100% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 1338 ml a 1486 ml, el 100% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 1486 ml y superiores, el 0% de la fase móvil contenía disolución B. Se monitorizó la absorbancia de UV del eluyente a 215 nm. Se recogió la fracción correspondiente al pico de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 (forma monopegilada) a un volumen de retención de 689,3 ml (figura 5) y se liofilizó. Se disolvió el polvo liofilizado en 25 ml de tampón acetato de sodio 20 mM a pH 4,3, y se repitió el procedimiento de purificación de nuevo en las mismas condiciones de cromatografía de intercambio catiónico. Rendimiento: 179,4 mg.

Se analizó el G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 purificado mediante SDS-PAGE (figura 6, carril 2) y HPLC de fase inversa (figura 7A). También se estudió la naturaleza escindible del conjugado de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 en medios acuosos [disolución de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 50 mM, pH 10, durante la noche a 50°C] mediante tanto análisis de SDS-PAGE (figura 6, carril 3) como HPLC de fase inversa (figura 7B), a partir de lo cual se observó la liberación completa de GLP-1 del conjugado. La columna era una columna Betasil C18 de 100 mm X 2,1 mm de DI con partículas de 5 µm, disponible de Thermo Electron Corp. La HPLC de fase inversa usó una fase móvil de TFA al 0,1% en agua desionizada (disolución C) y TFA al 0,1% en acetonitrilo (solución D) realizada a 37°C. El gradiente usado para la HPLC de fase inversa fue tal como sigue: para un tiempo de 0,00 a 20,00 minutos, el 35% de la fase móvil contenía disolución D; para un tiempo de 20,00 a 21,00 minutos, el 55% de la fase móvil contenía disolución D; para un tiempo de 21,00 a 23,00 minutos, el 80% de la fase móvil contenía disolución D; para un tiempo de 23,00 a 24,00 minutos, el 80% de la fase móvil contenía disolución D; para un tiempo de 24,00 a 25,00 minutos, el 35% de la fase móvil contenía disolución D; para un tiempo de 25,00 y por encima, el 35% de la fase móvil contenía disolución D.

Se confirmó el sitio de pegilación N-terminal (*His*⁷) del conjugado de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 (una especie monopegilada) mediante análisis de MALDI-TOF tras digestión con proteasa del conjugado usando endoproteinasa Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8.

Ejemplo 7

Preparación de un conjugado de polímero-proteína a modo de ejemplo: Preparación de G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1



El reactivo polimérico, G2PEG2Fmoc_{40k}-NHS, se preparó tal como se describe anteriormente en el ejemplo 3.

Se preparó una disolución de 50 mg de GLP-1 (nominalmente $1,2276 \times 10^{-5}$ mol) (la pureza real de GLP-1 era del 98,5% (mediante HPLC), y el contenido en péptido era del 82,2%) en 25 ml de tampón acetato de sodio 20 mM a pH 5,50, seguido por la adición de 1,4971 g de G2PEG2Fmoc_{40k}-NHS ($3,0692 \times 10^{-5}$ mol) con agitación. Se permitió que la disolución se agitase durante 15 horas a temperatura ambiente, permitiendo de ese modo la formación de G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1, un conjugado de GLP-1 pegilado. Se acidificó la mezcla de reacción hasta pH 4,00 mediante HAc 2 N, seguido por dilución hasta 50 ml con tampón acetato de sodio 20 mM a pH 4,00.

Se purificó el G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1 para obtener el conjugado monopegilado de GLP-1 mediante cromatografía de intercambio catiónico en un sistema ÄKTA Basic (figura 8). La columna era una HiTrap™ SP HP empacquetada con resina de 75 ml, disponible de Amersham Biosciences, empacquetada con medios de intercambio iónico de alta resolución de SP Sepharose, también disponibles de Amersham Biosciences, y la velocidad de flujo en la columna era de 14 ml/min. La fase móvil usada para la purificación consistía en tampón acetato de sodio 20 mM a pH 4,00 (disolución A) y tampón acetato de sodio 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,00 (disolución B). Se cargó en primer lugar en la columna la disolución que iba a purificarse. Entonces se eluyó el producto cargado mediante la fase móvil usando un gradiente. Se usó el siguiente gradiente: para volúmenes de retención de 0 ml a 550 ml, el 0% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 550 ml a 1041 ml, el 0% de la fase móvil contenía

- disolución B; para volúmenes de retención de 1041 ml a 1093 ml, el 10% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 1093 ml a 1338 ml, el 100% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 1338 ml a 1486 ml, el 100% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 1486 ml y superiores, el 0% de la fase móvil contenía disolución B. Se monitorizó la absorbancia de UV del eluyente a 215 nm. Se recogió la fracción correspondiente al pico de mono G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1 a un volumen de retención de 668,4 ml (figura 8) y se liofilizó. Se disolvió el polvo liofilizado en 25 ml de tampón acetato de sodio 20 mM a pH 4,0, y se repitió el procedimiento de purificación de nuevo en las mismas condiciones de cromatografía de intercambio catiónico. Se liofilizó la fracción de recogida a 668 ml.
- 10 Se analizó el G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1 purificado mediante SDS-PAGE (figura 9, carril 2). También se estudió la naturaleza escindible del conjugado de G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1 en medios acuosos [disolución de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 50 mM, pH 10, durante la noche a 50°C] mediante análisis de SDS-PAGE (figura 9, carril 3), a partir de lo cual se observó la liberación completa de GLP-1 del conjugado.

15 Ejemplo 8

Preparación de un conjugado de polímero-proteína a modo de ejemplo: Preparación de G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1

- 20 El reactivo polimérico liberable a modo de ejemplo, G2PEG2Fmoc_{20k}-NHS, se unió de manera covalente y liberable a una posición de lisina de GLP-1, denominado en el presente documento pegilación "interna" de GLP-1.

- 25 Se preparó una disolución de 30 mg de GLP-1 (nominalmente $7,3658 \times 10^{-6}$ mol) (la pureza real de GLP-1 era del 98,5% (mediante HPLC), y el contenido en péptido era del 82,2%) en 24,5 ml de tampón carbonato-bicarbonato de sodio 20 mM a pH 10,0, seguido por la adición de 276,3 mg de G2PEG2Fmoc_{20k}-NHS ($1,1049 \times 10^{-5}$ mol, preparada tal como se describió anteriormente en el ejemplo 3) con agitación. Se permitió que la disolución se agitase durante diez minutos a temperatura ambiente. Entonces se acidificó la mezcla de reacción hasta pH 4,30 mediante HAC 2 N.

- 30 Para obtener el G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1 en forma monopegilada, se dividió la mezcla de reacción en cinco alícuotas, y se purificó individualmente cada alícuota mediante cromatografía de intercambio catiónico en un sistema ÄKTA Basic. La columna era una HiTrap™ SP HP empaquetada con resina de 5 ml, disponible de Amersham Biosciences, y la velocidad de flujo en la columna era de 5 ml/min. La fase móvil usada para la purificación fue tampón acetato de sodio 20 mM a pH 4,30 (disolución A) y tampón acetato de sodio 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,30 (disolución B). Se ejecutó la fase móvil usando un gradiente. Se usó el siguiente gradiente: de 0 ml a 118,6 ml, el 0% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 118,6 ml a 219,1 ml, el 0% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 219,1 ml a 229,2 ml, el 10% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 229,2 ml a 269,4 ml, el 100% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 269,4 ml a 279,4 ml, el 100% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 279,4 ml y superiores, el 0% de la fase móvil contenía disolución B. Se monitorizó la absorbancia de UV del eluyente a 215 nm. Se recogió la fracción de GLP-1 monopegilado correspondiente al pico de G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1 a un volumen de retención de 150,4 ml (figura 10) durante cada serie de purificación. Entonces se analizó el G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1 purificado (en la forma de GLP-1 monopegilado) de cada serie de purificación mediante SDS-PAGE (figura 11). Se combinaron las fracciones recogidas y se liofilizaron. Rendimiento: 41 mg.

45 Ejemplo 9

Preparación de un conjugado de polímero-proteína a modo de ejemplo: Preparación de G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1

- 50 El reactivo polimérico liberable a modo de ejemplo, G2PEG2Fmoc_{20k}-NHS, se unió de manera covalente y liberable a una posición de lisina de GLP-1, denominado en el presente documento pegilación "interna" de GLP-1.

- 55 Se preparó una disolución de 50 mg de GLP-1 (nominalmente $1,2276 \times 10^{-5}$ mol) (la pureza real de GLP-1 era del 98,5% (mediante HPLC), y el contenido en péptido era del 82,2%) en 45 ml de tampón carbonato-bicarbonato de sodio 20 mM a pH 10,0, seguido por la adición de 898,0 mg de G2PEG2Fmoc_{40k}-NHS ($1,8414 \times 10^{-5}$ mol, preparada tal como se describe en el ejemplo 3) con agitación. Se permitió que la disolución se agitase durante diez minutos a temperatura ambiente. Entonces se acidificó la mezcla de reacción hasta pH 4,00 mediante HAC 2 N.

- 60 Para obtener el G2PEG2Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1 en forma monopegilada, se dividió la mezcla de reacción acidificada (50 ml) en 10 alícuotas, y se purificó cada alícuota de 5 ml mediante cromatografía de intercambio catiónico en un sistema ÄKTA Basic. La columna era una HiTrap™ SP HP empaquetada con resina de 5 ml, disponible de Amersham Biosciences, y la velocidad de flujo en la columna era de 5 ml/min. La fase móvil usada para la purificación era tampón acetato de sodio 20 mM a pH 4,00 (disolución A) y tampón acetato de sodio 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,00 (disolución B). Se ejecutó la fase móvil usando un gradiente. Se usó el siguiente gradiente: de 0 ml a 118,6 ml, el 0% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 118,6 ml a 219,1 ml, el 0% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 219,1 ml a 229,2 ml, el 10% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 229,2 ml a 269,4 ml, el 100% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 269,4 ml y superiores, el 0% de la fase móvil contenía disolución B.

disolución B; para volúmenes de retención de 269,4 ml a 279,4 ml, el 100% de la fase móvil contenía disolución B; para volúmenes de retención de 279,4 ml y superiores, el 0% de la fase móvil contenía disolución B. Se monitorizó la absorbancia de UV del eluyente a 215 nm. Se recogió la fracción de GLP-1 monopegilado correspondiente al pico de G2PEG2-Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1 a un volumen de retención de 158,3 ml (figura 12) durante cada serie de purificación. Se analizó el G2PEG2Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1 purificado (en la forma de GLP-1 monopegilado) de cada serie de purificación mediante SDS-PAGE (figura 13). Se combinaron las fracciones recogidas, se concentraron mediante ultrafiltración y se liofilizaron. Rendimiento: 187,5 mg.

Ejemplo 10

Estudio *in vivo* en ratones para examinar los efectos hipoglucemiantes de conjugados de GLP-1-polímero ilustrativos

Se adquirieron ratones diabéticos macho (BKS.Cg-+Lepr db/+Lepr db/01aHsd) de Harlan Laboratories, Ltd. (Jerusalén, Israel). Se colocaron los animales de 8-9 semanas de edad (30-40 g) en jaulas para ratones (dos animales por jaula), y se les permitió al menos 48 horas de aclimatación antes del inicio del estudio.

Se describieron la preparación de G2PEG2Fmoc_{20k}-N^{ter}-GLP-1 (ejemplo 6), G2PEG2Fmoc_{40k}-N^{ter}-GLP-1 (ejemplo 7), G2PEG2Fmoc_{20k}-Lys-GLP-1 (ejemplo 8) y G2PEG2Fmoc_{40k}-Lys-GLP-1 (ejemplo 9) en los ejemplos anteriores. Se pesó con precisión cada compuesto en un vial de vidrio y se disolvió en solución salina normal con el fin de preparar una concentración que se adaptaría para la dosis (basándose en equivalentes de GLP-1) y el volumen de inyección de 100 µl.

Se dividió el estudio en dos fases: una fase de viabilidad y una fase de evaluación.

En la fase de viabilidad, se evaluó en primer lugar la viabilidad de usar ratones db/db diabéticos para someter a prueba la eficacia de GLP-1. Al llevar a cabo la fase de viabilidad, se usaron varios grupos de ratones usándose cuatro ratones en cada grupo. Se reunieron datos sobre los niveles de glucosa iniciales para cada ratón durante 2-3 días antes de la dosificación del fármaco. Se realizó esto para identificar cualquier resultado atípico en el grupo de animales. El día del tratamiento (día 0), se pesó cada animal. El día de tiempo 0 se recogió una muestra de sangre (de 5 a 10 µl) de la vena de la cola. Se midió el nivel de glucosa (mg/dl) usando un analizador de glucosa. Entonces se dosificó a cada animal por vía subcutánea (s.c.) por debajo de la piel en el lomo. La cantidad de artículo de prueba y la dosis (60 y 120 µg/ratón) administrada se basaba en el peso corporal promedio del animal, y el volumen total de la dosis no superaba 10 ml/kg. Entonces se les permitió a los animales volver a sus jaulas. Se extrajeron muestras de sangre de 5 a 10 µl (< 0,5% de un volumen de sangre de 2 ml para un ratón de 35 g) a través de un pinchazo con aguja/tubo capilar en los siguientes puntos de tiempo: -3, -2, -1, 0, 0,04, 0,16, 0,33, 1,0, 1,16 días. Se sometió a prueba cada muestra de sangre recogida para determinar su nivel de glucosa. Al final del estudio, se sacrificaron los animales de manera humanitaria mediante asfixia con dióxido de carbono.

En la fase de evaluación, se usaron los resultados de la fase de viabilidad para seleccionar las dosis apropiadas requeridas para lograr una administración sostenida de GLP-1 para obtener un efecto de 3-5 días. Al llevar a cabo la fase de evaluación, se usaron ocho ratones en cada grupo. Se reunieron datos sobre los niveles de glucosa iniciales para cada ratón tres días antes de la dosificación del fármaco. En el día del tratamiento (día 0) se pesó cada animal. El día de tiempo 0 se recogió una muestra de sangre (de 5 a 10 µl) de la vena de la cola. Se midió el nivel de glucosa (mg/dl) usando un analizador de glucosa. Entonces se dosificó a cada animal por vía subcutánea (s.c.) por debajo de la piel del lomo. La cantidad de artículo de prueba administrada se basaba en el peso corporal promedio del animal, y el volumen total de la dosis no superaba 10 ml/kg. Entonces se les permitió a los animales regresar a sus jaulas. Se extrajeron muestras de sangre de 5 a 10 µl (< 0,5% de un volumen de sangre de 2 ml para un ratón de 35 g) a través de un pinchazo con aguja/tubo capilar en los siguientes puntos de tiempo: -3, -2, -1, 0, 0,04, 0,16, 0,33, 0,5, 1, 2, 3, 6 días. Se sometió a prueba cada muestra de sangre recogida para determinar su nivel de glucosa. Se les retiró el alimento a los animales durante las primeras cuatro horas tras la dosificación. Al final del estudio, se sacrificaron los animales de manera humanitaria mediante asfixia con dióxido de carbono.

La tabla 2 a continuación describe los compuestos de prueba y la dosis para cada grupo de animales.

Tabla 2

Compuestos de prueba y dosis para cada grupo de animales			
Tratamiento	N. ^{os} de referencia o lote	Número de ratones por grupo	Dosis (en µg)
Control negativo (solución salina)	Baxter, lote C645028	8	-
Control positivo 2 (GLP-1)	American Peptide, lote T05128191	8	60, 120
G2PEG2Fmoc _{20k} -Lys _(26 o 34) -GLP1	ZH 071805	8	420

G2PEG2Fmoc _{40K} -Lys _(26 o 34) -GLP1	ZH 072305	8	420
G2PEG2Fmoc _{40K} -N ^{ter} -GLP1	ZH 082405 ZH 092105	8	420
G2PEG2Fmoc _{40K} -N ^{ter} -GLP1	ZH 082505 CP2F1 ZH 082505 CP2F2	8	420

Se recogieron los datos del estudio y se analizaron. Se observó que los animales toleraban la dosis subcutánea individual. Tal como se ilustra en la figura 14, se confirmó el efecto hipoglucemiante de GLP-1 y cada uno de los conjugados G2PEG2Fmoc_{20K}-Lys-GLP-1 (designado "PEG20-Lys-GLP1" en la figura) y G2PEG2Fmoc_{40K}-Lys-GLP-1 (designado "PEG40-Lys-GLP1" en la figura). Puede observarse a partir de las mediciones de farmacodinamia (PD) que GLP-1 se aclaraba rápidamente del ratón, pero que los conjugados de GLP-1 se liberaban del péptido a lo largo de un periodo de 3 a 4 días. Es decir, los conjugados degradables de GLP-1 a modo de ejemplo de la invención funcionan un tanto como una bomba molecular, liberando GLP-1 intacto a lo largo del tiempo mediante hidrólisis *in vivo*. El polímero hidrófilo unido covalentemente (es decir, PEG) funciona no sólo estabilizando el GLP-1 *in vivo* (es decir, protegiendo a la proteína frente a la degradación enzimática), sino también prolongando su semivida en circulación al liberar lentamente la proteína al torrente sanguíneo a lo largo de un periodo prolongado de 3 a 4 días. También se observó que el conjugado de PEG de 40 kiloDaltons tenía un efecto PD pequeño pero prolongado en comparación con el conjugado de PEG de 20 kiloDaltons.

Los datos de la figura 14 sugieren que: (a) GLP-1 se libera a la sangre del ratón desde el sitio de inyección mediante difusión y mediante hidrólisis del conjugado pegilado; y (b) la actividad hipoglucemiante del PEG-GLP1 conjugado con lisina puede deberse a la combinación de la actividad de los conjugados intactos y la liberación *in vivo* aparente del péptido de los conjugados objeto.

La figura 15 ilustra el efecto hipoglucemiante de GLP-1 y G2PEG2Fmoc_{20K}-N^{ter}-GLP-1 (designado "PEG20-His-GLP1" en la figura) y G2PEG2Fmoc_{40K}-N^{ter}-GLP-1 (designado "PEG40-His-GLP1" en la figura). Es evidente a partir de las mediciones de farmacodinamia (PD) que GLP-1 se aclara rápidamente del ratón, pero los conjugados de PEG-GLP-1 liberan el péptido a lo largo de un periodo de 3 a 4 días. También se observó que el conjugado de PEG de 40 kilodaltons tenía un efecto PD pequeño pero prolongado en comparación con el conjugado de PEG de 20 kilodaltons.

Este conjunto de datos (figura 15) sugieren que: (a) GLP-1 se libera a la sangre del ratón desde el sitio de inyección mediante difusión y mediante hidrólisis del conjugado pegilado; y (b) el PEG-GLP1 conjugado con histidina no es activo, y la actividad hipoglucemiante observada es el resultado de la liberación del péptido del conjugado.

Este estudio demuestra que una inyección de GLP-1 pegilado tal como se describe en el presente documento puede usarse para controlar la diabetes a lo largo de un periodo prolongado de más de 48 horas. Este estudio también demuestra la propiedad de liberación sostenida de los reactivos de G2PEG2Fmoc cuando se conjugan con GLP-1. Este estudio también mostró que GLP-1 puede pegilarse en el extremo N-terminal para proporcionar un producto para administración parenteral.

Ejemplo 11

Perfil de liberación *in vitro* de G2PEG2Fmoc_{20K}-N^{ter}-GLP-1.

Se determinó el perfil de liberación *in vitro* de G2PEG2Fmoc_{20K}-N^{ter}-GLP-1.

Se preparó G2PEG2Fmoc_{20K}-N^{ter}-GLP-1 (en la forma de GLP-1 monopegilado) tal como se describe en el ejemplo 6 y se usó para evaluar la liberación de una proteína.

Las condiciones usadas para determinar el perfil de liberación *in vitro* de G2PEG2Fmoc_{20K}-N^{ter}-GLP-1 incluían: G2PEG2Fmoc_{20K}-N^{ter}-GLP-1 2 mg/ml (forma de GLP-1 monopegilado) en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, 37°C, con muestras tomadas en diversos puntos de tiempo y sometidas a prueba para detectar la presencia de GLP-1 "libre" o no conjugado. Se monitorizó la liberación de GLP-1 mediante HPLC de fase inversa a 215 nm.

La figura 16 expone los resultados del experimento en forma de gráfico, en el que $Y = A_t/A_{max}$ (A_t es el área de pico de HPLC de GLP-1 liberado a tiempo de t (h) y A_{max} es el área de pico de HPLC de GLP-1 alcanzada su liberación máxima). Debido a que la cinética de reacción representa una reacción de primer orden debido a la linealidad del gráfico, puede concluirse que $\ln(1/(1-Y)) = kt$, en la que k es la pendiente, $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Ejemplo 12

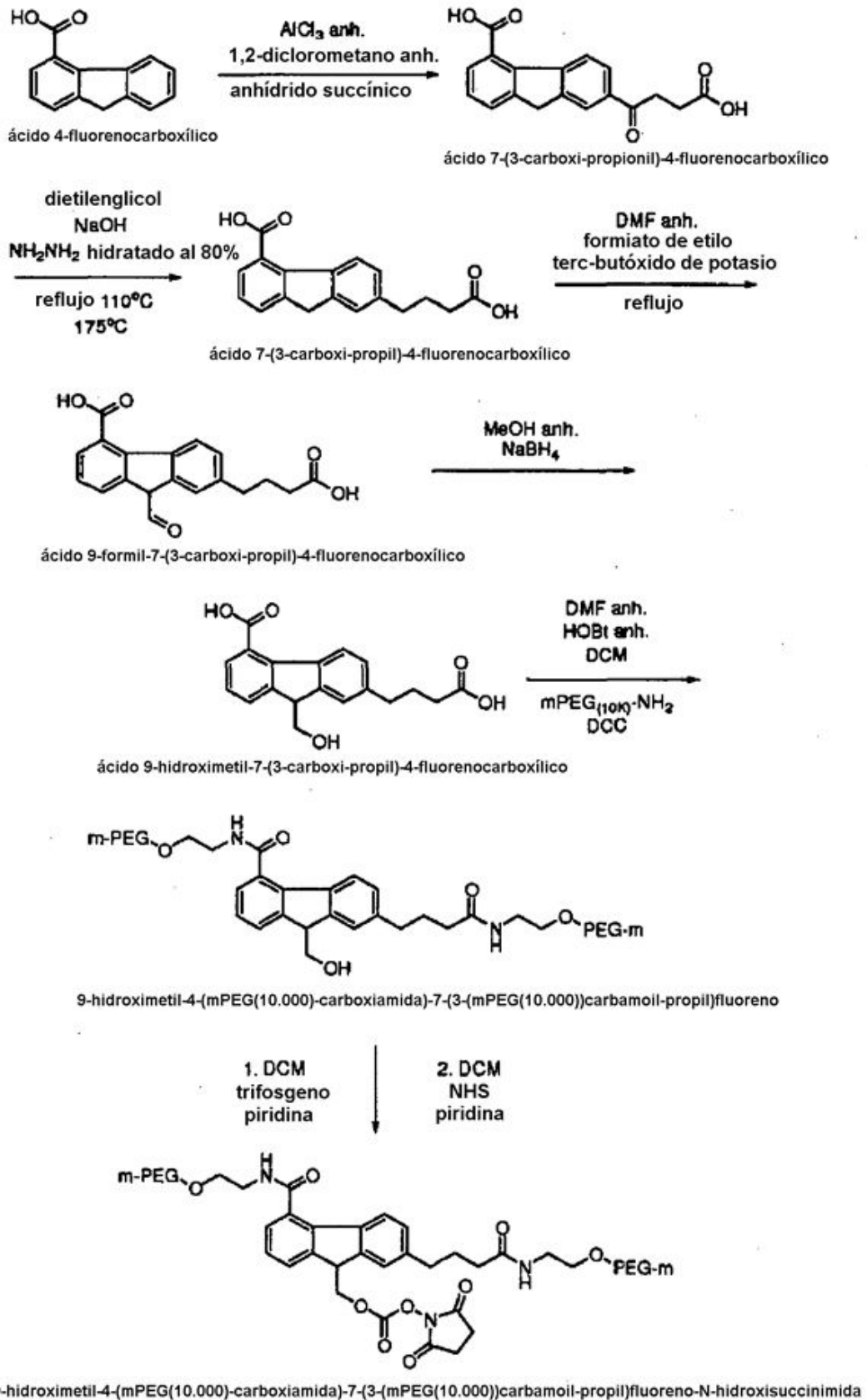
Preparación de 9-hidroximetil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(3-(mPEG(10.000)carbamoil-propil)fluoreno-N-

hidroxisuccinimida; (o "4,7-CAC-PEG2-Fmoc_{20K}-NHS")

La síntesis de 9-hidroximetil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(3-(mPEG(10.000))carbamoil-propil)fluoreno-N-hidroxisuccinimida se representa esquemáticamente en el esquema 4, a continuación.

5

Esquema 4.



A. Preparación de ácido 7-(3-carboxi-propionil)-4-fluorenocarboxílico

5 En un matraz de fondo redondo purgado con argón seco se suspendió AlCl_3 anhidro (26,9 g, 0,202 mol) en 1,2-dicloroetano anhidro (60 ml). Se añadió ácido 4-fluorenocarboxílico (10,0 g, 0,048 mol) a la suspensión. Se colocó el matraz de reacción en un baño a temperatura ambiente y se añadió cuidadosamente anhídrido succínico (5,72 g, 0,057 mol). Se agitó la reacción durante cinco horas y entonces se enfrió hasta 0°C . Se extinguió la reacción muy cuidadosamente mediante la adición en porciones lenta de HCl 3 M (atención, la reacción puede reaccionar violentamente cuando se añade el HCl demasiado rápidamente). La suspensión bien mezclada final era ácida y no era reactiva frente a la disolución de HCl adicional. Se eliminó el disolvente orgánico a presión reducida y se filtró el producto y se lavó bien con agua. Se disolvió el producto en bruto en disolución de NaOH caliente (aproximadamente $\text{NaOH} \leq 1 \text{ M}$), se filtró y se precipitó con la adición de HCl concentrado. Se filtró el producto, se lavó con agua y entonces se secó a presión reducida en presencia de P_2O_5 . El producto era un sólido de color amarillo pálido (14,3 g, 97%). $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO): δ (ppm) 8,4 (d, 1H, Ar); 8,2 (s, 1H, Ar); 8,0 (d, 1H, Ar); 7,8 (m, 2H, Ar); 7,5 (t, 1H, Ar); 4,1 (s, 2H, CH_2); 2,6 (t, 2H, CH_2) 2,5 (bajo DMSO, CH_2),

B. Preparación de ácido 7-(3-carboxi-propil)-4-fluorenocarboxílico

20 En un matraz purgado con argón, se suspendió ácido 7-(3-carboxi-propionil)-4-fluorenocarboxílico (14,0 g, 0,045 mol) en dietilenglicol (200 ml). Se colocó el matraz en un baño de aceite a temperatura ambiente y entonces se añadieron sucesivamente NaOH (18 g, 0,450 mol) y una disolución al 80% de hidrazina hidratada (13,6 ml, 0,223 mol). Se calentó lentamente la mezcla de reacción hasta 110°C y se sometió a reflujo durante aproximadamente dos horas. Se elevó la temperatura de reacción hasta 200°C con eliminación de agua durante el proceso de calentamiento. Tras tres horas a una temperatura de reacción de 200°C , se enfrió la reacción hasta aproximadamente 60°C . Se vertió cuidadosamente la mezcla de reacción en agua (aproximadamente 1 l) y se acidificó la mezcla hasta pH 2 con HCl concentrado. Se filtró el producto y se lavó con agua. Se disolvió el producto en disolución de NaOH caliente (0,5 M) y se precipitó mediante acidificación hasta pH 2 con HCl. Se filtró el producto y se lavó con agua. El producto era un sólido blanquecino (10,9 g, 82%). $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO): δ (ppm) 8,3 (d, 1H, Ar); 7,7 (m, 2H, Ar); 7,4 (s, 1H, Ar); 7,4 (t, 1H, Ar); 7,2 (d, 1H, Ar); 3,9 (s, 2H, CH_2); 2,7 (t, 2H, CH_2); 2,3 (t, 2H, CH_2); 1,9 (m, 2H, CH_2).

C. Preparación de ácido 9-formil-7-(3-carboxi-propil)-4-fluorenocarboxílico

35 En un matraz purgado con argón seco con un condensador de reflujo, se disolvió ácido 7-(3-carboxi-propil)-4-fluorenocarboxílico (4,0 g, 0,0135 mol) en DMF anh. (120 ml) a 40°C . Se añadió formiato de etilo (40 ml, almacenado sobre K_2CO_3 anh.) seguido por la adición de terc-butóxido de potasio al 95% (12,8 g, 0,108 mol, añadido en 2 porciones). Se agitó la reacción a aproximadamente 40°C - 50°C durante cuatro horas con la adición de DMF anh. (80 ml), THF anhidro (5 ml) y formiato de etilo (25 ml) a diversos intervalos para ayudar a la solubilidad. Entonces se agitó la reacción otras 17 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el formiato de etilo a presión reducida. Se extinguió la reacción con agua (150 ml) y se acidificó hasta pH 2 con HCl concentrado. Se extrajo el producto dos veces con acetato de etilo (600 ml, luego 200 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas 3 veces con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. El producto en bruto (4,7 g, ~100%, pureza del 80%) contenía algo de material de partida sin reaccionar. $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO): δ (ppm) 11,4 (s, 1H, formil); 8,3 - 7,0 (m, 7H, Ar); 2,7 (m, 2H, CH_2); 2,3 (m, 2H, CH_2); 1,9 (m, 2H, CH_2).

D. Preparación de ácido 9-hidroximetil-7-(3-carboxi-propil)-4-fluorenocarboxílico

50 En un matraz purgado con argón, se disolvió ácido 9-formil-7-(3-carboxi-propil)-4-fluorenocarboxílico en bruto (4,0 g, 0,0123 mol) en metanol anhidro (50 ml). Se colocó el matraz en un baño a temperatura ambiente y se añadió cuidadosamente borohidruro de sodio (2,3 g, 0,0615 mol) a la reacción en porciones (atención, desprendimiento de gas inflamable). Se agitó la reacción durante dos horas y se añadió otra porción de borohidruro de sodio (1,2 g, 0,031 mol). Tras otras seis horas, se trató la reacción con una pequeña cantidad de agua. Se eliminó parcialmente el disolvente orgánico a presión reducida y se acidificó la mezcla con HCl concentrado. Se añadió salmuera y se extrajo el producto dos veces con acetato de etilo (300 ml y 100 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. Se purificó el producto en bruto (3,3 g, 83%) mediante cromatografía ultrarrápida: gel de sílice de 60 Å eluido con acetato de etilo/cloroformo/ácido acético glacial 50:50:2. El producto purificado era un sólido naranja (1,7 g, 43%). $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): δ (ppm) 8,3 (d, 1H, Ar); 7,8 (m, 2H, Ar); 7,6 (s, 1H, Ar); 7,4 (t, 1H, Ar); 7,2 (m, 1H, Ar); 4,0 (m, 2H, CH_2); 3,9 (m, 1H, CH); 2,8 (t, 2H, CH_2); 2,4 (t, 2H, CH_2); 2,0 (m, 2H, CH_2).

E. Preparación de 9-hidroximetil-4-mPEG(10.000)-carboxiamida-7-(3-(mPEG(10.000))carbamoil-propil)fluoreno

65 Se destiló de manera azeotrópica mPEG-NH₂(10.000) ($M_n=9,418$; purificado cromatográficamente, 25,8 g, 0,0026 mol, también designado "mPEG_(10k)-NH₂") en tolueno anhidro (250 ml) a presión reducida a 45°C en un evaporador rotatorio. Se disolvieron los sólidos en DCM anhidro (CH_2Cl_2) (130 ml) bajo una atmósfera inerte. Se

añadió cuantitativamente una disolución de ácido 9-hidroxi-metil-7-(3-carboxi-propil)-4-fluorenocarboxílico (0,38 g, 0,0012 mol) y N-hidroxibenzotriazol anhidro (HOBt) (0,33 g, 0,0025 mol) en DMF anhidra (12,5 ml) a la disolución de PEG (5 ml de DMF para aclarar). Entonces se añadió 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,54 g, 0,0026 mol) a la disolución de reacción. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 21 horas antes de evaporar el disolvente a presión reducida. Se disolvió el jarabe espeso en IPA seco (900 ml, adición lenta) con calentamiento suave. El producto de PEG precipitó mediante la adición de dietil éter (400 ml) a temperatura ambiente. Se enfrió el precipitado hasta 10°C durante diez minutos, se filtró y se lavó con IPA frío (300 ml) y luego dietil éter (300 ml). Se secó el producto en bruto (polvo blanquecino) a alto vacío y entonces se disolvió en agua desionizada. Se realizó cromatografía de intercambio iónico de la disolución de PEG en medios POROS (500 ml) eluyendo con agua. Se recogieron las fracciones que contenían PEG neutro y se purificaron adicionalmente con medios de DEAE Sepharose (200 ml). No se encontró que el producto purificado contuviese productos de ácido de monoPEG o mPEG-NH₂ (10.000) (análisis de HPLC). Rendimiento de 17 g, 71% (sustitución del 95%). ¹H-RMN (CD₂Cl₂): δ (ppm) 7,9 (d, 1H, Ar); 7,7 (d, 1H, Ar); 7,5 (s, 1H, Ar); 7,4 (m, 1H, Ar); 7,3 (t, 1H, Ar); 7,2 (d, 1H, Ar); 6,7 (sa, 1H, amida); 6,2 (sa, 1H, amida); 4,1 (m, 2H, CH₂); 3,8 (m, 1H, CH); 3,6 (s, estructura principal de PEG); 3,3 (s, 6 H, -OCH₃); 2,7 (m, 2H, CH₂); 2,2 (m, 2H, CH₂); 1,9 (agua + m, 2H, CH₂).

F. Preparación de 9-hidroxi-metil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(3-(mPEG(10.000))carbamoil-propil)fluoreno-N-hidroxisuccinimida

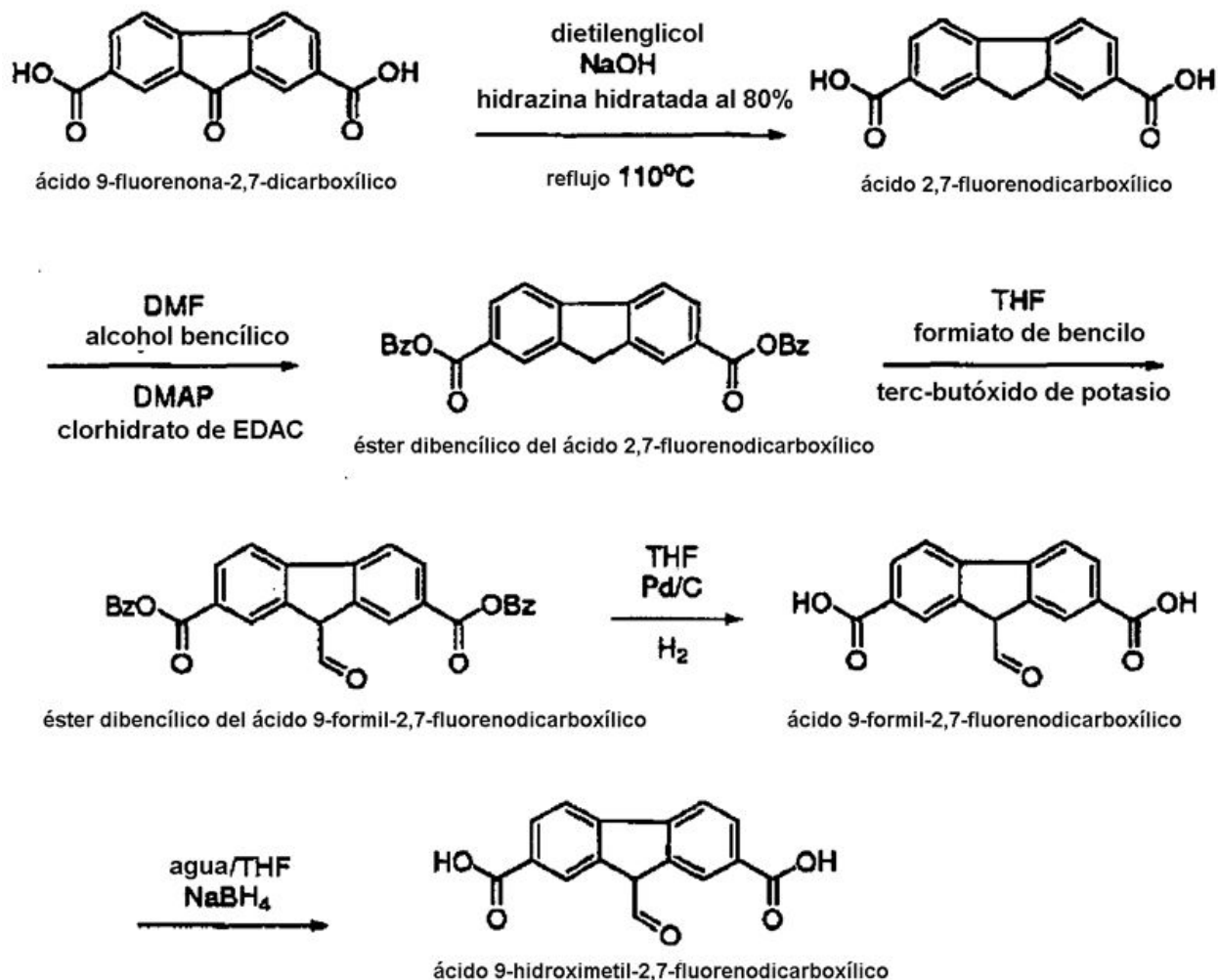
Se destiló de manera azeotrópica el 9-hidroxi-metil-4-(mPEG(10.000)-carboxiamida)-7-(3-(mPEG(10.000))carbamoil-propil)fluoreno (2,9 g, 0,00015 mol) en tolueno anhidro (50 ml) a presión reducida a 45°C en un evaporador rotatorio. Se disolvió el sólido en DCM anhidro (15 ml, más aclarado de 1 ml) y se transfirió mediante jeringa a una disolución de trifosgeno recién preparada (se atrapó el gas fosgeno en exceso de la reacción con trampa base) (0,047 g, 0,00016 mol) y piridina anhidra (0,013 g, 0,00016 mol, añadida como disolución en CH₂Cl₂ (~ 0,9 ml)). A la hora, comenzó una corriente de argón rápida (mantenida a temperatura ambiente) para evaporar el fosgeno en exceso (uso de trampa base con ventilación). Tras 30 minutos de purga con argón, se añadió N-hidroxisuccinimida (NHS) (0,09 g, 0,00078 mol) y se agitó durante diez minutos. Se añadió piridina anhidra (0,059 g, 0,00075 mol, añadida como disolución en CH₂Cl₂ (~ 4,5 ml)). Se continuó la corriente de argón para evaporar la mayor parte del disolvente de reacción tras 1,5 horas. Se disolvió el jarabe espeso en IPA anhidro (150 ml) y precipitó a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado y se lavó con IPA frío y dietil éter (30 ml que contenían 5 mg de BHT). Se evaporaron los disolventes residuales a vacío para obtener un polvo blanquecino. Rendimiento de 2,7 g, 90%, sustitución del 76% con carbonato de NHS mediante HPLC. ¹H-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 7,9 (m, 1H, Ar); 7,7 (m, 1H, Ar); 7,5 (m, 2H, Ar); 7,4 (m, 1H, Ar); 7,2 (m, 1H, Ar); 6,8 (sa, 1H, amida); 6,1 (sa, 1H, amida); 4,7 (m, 2H, CH₂); 4,3 (t, 1H, CH); 3,6 (s, estructura principal de PEG); 3,3 (s, 6 H, -OCH₃); 2,7 (s, 4 H, CH₂CH₂); 2,7 (m, 2H, CH₂); 2,2 (t, 2H, CH₂); 2,0 (m, 2H, CH₂).

Ejemplo 13

Preparación de ácido 9-hidroxi-metil-2,7-fluorenodicarboxílico, un producto intermedio para la preparación de 9-hidroxi-metil-2,7-(bis-mPEG_{10K}-carboxiamida)-fluoreno-N-hidroxisuccinimida (2,7-C2-PEG2-Fmoc_{20K}-NHS)

La síntesis de ácido 9-hidroxi-metil-2,7-fluorenodicarboxílico se representa esquemáticamente en el esquema 5, a continuación.

Esquema 5.



A. Preparación de ácido 2,7-fluorenodicarboxílico

- 5 En un matraz purgado con argón, se suspendió ácido 9-fluorenona-2,7-dicarboxílico (10,0 g, 0,037 mol) en dietilenglicol (75 ml). Se colocó el matraz en un baño de aceite a temperatura ambiente, entonces se añadieron sucesivamente NaOH (6,2 g, 0,155 mol) y una disolución al 80% de hidrazina hidratada (7,4 ml, 0,12 mol). Se calentó lentamente la mezcla de reacción hasta 110°C y se sometió a reflujo durante aproximadamente cuatro horas. Se enfrió la mezcla de reacción, se vertió cuidadosamente en agua y se acidificó hasta pH 2 con HCl concentrado.
- 10 Se filtró el producto y se lavó con agua. Se disolvió el producto en disolución de NaOH caliente (0,5 M, caliente) y se precipitó mediante acidificación hasta pH 2 con HCl. Se filtró el producto y se lavó con agua. El producto era un sólido amarillo (9,0 g, 96°C), $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO): δ (ppm) 8,2 (s, 2H, Ar); 8,1 (m, 2H, Ar); 8,0 (m, 2H, Ar); 4,1 (s, 2H, CH₂).

15 B. Preparación de éster dibencílico del ácido 2,7-fluorenodicarboxílico

- En un matraz seco purgado con nitrógeno, se disolvió ácido 2,7-fluorenodicarboxílico (8,0 g, 0,031 mol) en DMF anhidra (400 ml). Se añadieron alcohol bencílico anhidro (82 ml, 0,788 mol), DMAP (0,58 g, 0,0047 mol) y clorhidrato de EDAC (16 g, 0,082 mol) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Tras agitar durante 24 horas, se calentó la mezcla de reacción y se extinguió mediante la adición de HCl muy diluido (1,5 l). Se enfrió la suspensión, se filtró y se lavó con agua. Se disolvió el producto en acetona caliente (800 ml) y se filtró mientras estaba caliente. Se evaporó el filtrado hasta sequedad a presión reducida (rendimiento de 5,9 g, 43%) ("Bz" en el esquema 5 representa bencilo). $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO): δ (ppm) 8,3 (s, 2H, Ar); 8,2 (m, 2H, Ar); 8,1 (m, 2H, Ar); 7,5-7,4 (m, 10H, Bz); 5,4 (s, 4H CH₂); 4,1 (s, 2H, Ar).

25

C. Preparación de éster dibencílico del ácido 9-formil-2,7-fluorenodicarboxílico

En un matraz purgado con argón seco, se disolvió éster dibencílico del ácido 2,7-fluorenodicarboxílico (3,0 g, 0,0065 mol) en THF anh. (60 ml) a temperatura ambiente. Se añadió formiato de bencilo (4,2 ml, 0,035 mol, almacenado sobre K_2CO_3 anhidro) seguido por la adición de terc-butóxido de potasio al 95% (2,7 g, 0,023 mol). Se agitó la reacción durante tres horas, entonces se extinguió la reacción con la adición de agua y se acidificó con HCl hasta pH 2. Se evaporó parcialmente el disolvente orgánico a presión reducida. Se extrajo el producto dos veces con acetato de etilo (600 ml, luego 200 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas tres veces con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. Se lavó el producto en bruto con hexanos y metanol (1,9 g, 60°C). 1H -RMN (d_6 -DMSO): δ (ppm) 11,9 (s, ~1H, formilo); 8,8 (s, 1H, Ar); 8,5 (s, 1H, Ar); 8,4 (s, 1H, Ar); 8,2 (m, 2H, Ar); 7,9 (m, 2H, Ar); 7,5-7,4 (m, 10H, Bz); 5,4 (s, 4H, Ar).

D. Preparación de ácido 9-formil-2,7-fluorenodicarboxílico

En un frasco de hidrogenación Parr (Parr Instrument Company, Moline IL), se disolvió éster dibencílico del ácido 9-formil-2,7-fluorenodicarboxílico (3,0 g, 0,0061 mol) en THF anh. (350 ml). Tras la adición cuidadosa de Pd al 20%/C (humedecido con un 50% de agua) al 20% en peso (600 mg), se evacuó/lleó el frasco Parr 3 veces en un aparato Parr para garantizar una atmósfera de hidrógeno. Se agitó la suspensión bajo 20-30 psi de gas hidrógeno durante aproximadamente 60 horas y entonces se eliminó el hidrógeno restante a presión reducida. Se filtró la suspensión sobre un lecho de Celite, se aclaró con THF adicional y se evaporó. 1H -RMN (d_6 -DMSO): δ (ppm) 9,0 (s, 1H, Ar); 8,5-8,1 (m, 6H, Ar).

E. Preparación de ácido 9-hidroximetil-2,7-fluorenodicarboxílico

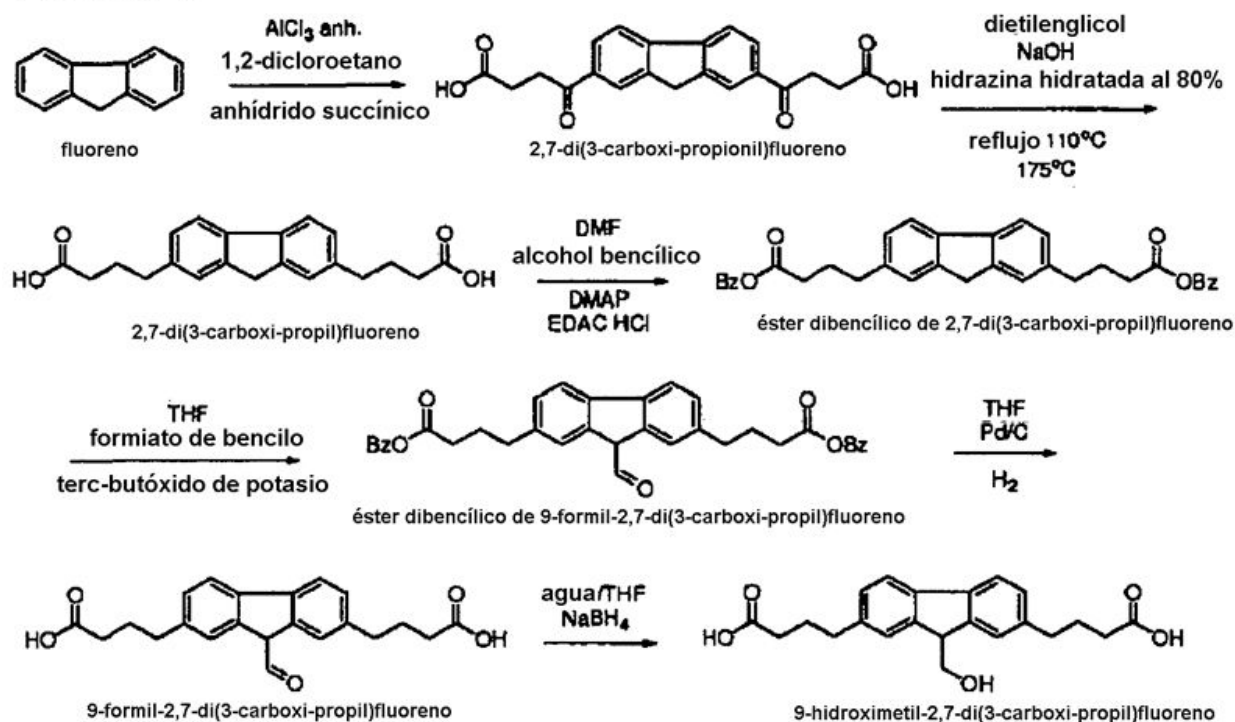
Se disolvió una pequeña muestra de ácido 9-formil-2,7-fluorenodicarboxílico (5-10 mg en agua con una pequeña cantidad de THF). Se añadió una cantidad en exceso de borohidruro de sodio y se permitió que reaccionara durante dos horas. Se extinguió la reacción con la adición cuidadosa de HCl 1 M hasta que era ácida. Se extrajo el producto con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta sequedad. 1H -RMN (CD_3OD): δ (ppm) 8,4 (s, 2H, Ar); 8,2 (m, 2H, Ar); 8,0 (m, 2H, Ar); 4,2 (t, 1H, CH); 4,0 (d, 2H, CH_2).

Ejemplo 14

Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(3-carboxi-propil)fluoreno, un producto intermedio para la preparación de 9-hidroximetil-2,7-bis-(3-(mPEG_{10K} carbamoil-propil))fluoreno-N-hidroxisuccinimida; (2,7-CA2-PEG2-Fmoc_{20K}-NHS)

La síntesis de 9-hidroximetil-2,7-di(3-carboxi-propil)fluoreno se representa esquemáticamente en el esquema 6, a continuación.

Esquema 6.



A. Preparación de 2,7-di(3-carboxi-propionil)fluoreno

En un matraz de fondo redondo purgado con argón seco, se suspendió AlCl_3 anhidro (98 g, 0,735 mol) en 1,2-dicloroetano anhidro (140 ml). En un matraz separado, se disolvió fluoreno (23 g, 0,138 mol) en 1,2-dicloroetano anh. (125 ml), entonces se añadió a la suspensión de AlCl_3 . Se colocó el matraz de reacción en un baño a temperatura ambiente y se añadió cuidadosamente anhídrido succínico (34,5 g, 0,345 mol). Se agitó la reacción durante 16 horas y entonces se extinguió muy cuidadosamente mediante adición lenta a HCl 3 M frío (atención, la reacción puede reaccionar violentamente cuando se añade el HCl demasiado rápidamente). La suspensión bien mezclada final era ácida y no era reactiva frente a la disolución de HCl adicional. Se eliminó el disolvente orgánico a presión reducida, entonces se filtró el producto y se lavó bien con agua. Se disolvió el producto en bruto en disolución de NaOH caliente (aproximadamente NaOH <1 M), se filtró y se precipitó con la adición de HCl concentrado. Se filtró el producto, se lavó con agua y entonces se secó a presión reducida en presencia de P_2O_5 . El producto era un sólido de color amarillo pálido (49,3 g, 97%). $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): δ (ppm) 8,3 (s, 2H, Ar); 8,2 (m, 2H, Ar); 8,1 (m, 2H, Ar); 4,1 (s, 2H, CH_2); 3,5 (t, 4H, CH_2); 2,8 (t, 4H, CH_2).

B. Preparación de 2,7-di(3-carboxi-propil)fluoreno

En un matraz purgado con argón se suspendió 2,7-di(3-carboxi-propionil)fluoreno (12,8 g, 0,035 mol) en dietilenglicol (150 ml). Se colocó el matraz en un baño de aceite a temperatura ambiente, entonces se añadieron NaOH (14 g, 0,35 mol) y una disolución al 80% de hidrazina hidratada (13,1 ml, 0,21 mol). Se calentó lentamente la mezcla de reacción hasta 110°C y se sometió a reflujo durante aproximadamente dos horas. Se elevó la temperatura de reacción hasta 200°C con eliminación de agua durante el proceso de calentamiento. Tras tres horas a una temperatura de reacción de 200°C , se enfrió la reacción hasta aproximadamente 60°C . Se vertió cuidadosamente la mezcla de reacción en agua (500 ml) y se acidificó la mezcla hasta pH 2 con HCl concentrado. Se filtró el producto y se lavó con agua. Se disolvió el producto en disolución de NaOH caliente (0,5 M) y se precipitó mediante acidificación hasta pH 2 con HCl. Se filtró el producto y se lavó con agua (rendimiento de 10,9 g, 92%). $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO): δ (ppm) 12,0 (s, 2H, COOH); 7,8 (m 2H, Ar); 7,4 (s, 2H, Ar); 7,2 (m, 2H, Ar); 3,9 (s, 2H, CH_2); 2,7 (t, 4H, CH_2); 2,3 (t, 4H, CH_2); 1,8 (m, 4H, CH_2).

C. Preparación de éster dibencílico de 2,7-di(3-carboxi-propil)fluoreno

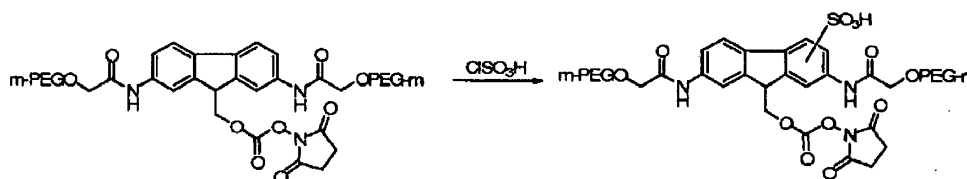
En un matraz seco purgado con nitrógeno, se disolvió 2,7-di(3-carboxi-propil)fluoreno (3,0 g, 0,009 mol) en DMF anhidra (50 ml). Se añadieron alcohol bencílico anhidro (23 ml, 0,22 mol), DMAP (0,27 g, 0,0022 mol) y clorhidrato de EDAC (4,5 g, 0,023 mol) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Tras agitar durante 21 horas, se calentó la mezcla de reacción y se extinguió mediante la adición de HCl muy diluido (400 ml). Se enfrió la suspensión, se filtró y se lavó con agua. Se disolvió el producto en acetona caliente y se filtró mientras estaba caliente. Se evaporó el filtrado hasta sequedad a presión reducida (rendimiento de 3,8 g, 78°C). $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO): δ (ppm) 7,7 (m, 2H, Ar); 7,4 (m, 12H, Ar); 7,1 (m, 2H, Ar); 5,1 (s, 4H, CH_2); 3,8 (s, 2H, CH_2); 2,7 (t, 4H, CH_2); 2,4 (t, 4H, CH_2); 1,9 (m, 4H, CH_2).

D. Preparación de éster dibencílico de 9-formil-2,7-di(3-carboxi-propil)fluoreno

En un matraz purgado con argón seco, se disolvió éster dibencílico de 2,7-di(3-carboxi-propil)fluoreno (2,0 g, 0,0039 mol) se disolvió en THF anh. (40 ml) a temperatura ambiente. Se añadió formiato de bencilo (2,3 ml, 0,019 mol, almacenado sobre K_2CO_3 anh.) seguido por la adición de terc-butóxido de potasio al 95% (1,5 g, 0,013 mol). Se agitó la reacción durante cuatro horas, entonces se extinguió la reacción con la adición de agua y se acidificó con HCl hasta pH 2. Se evaporó parcialmente el disolvente orgánico a presión reducida. Se extrajo el producto dos veces con acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas tres veces con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. Se trituró el producto en bruto con hexanos (queda algo de formiato de bencilo). $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO): δ (ppm) 11,0 (s, ~1H, formilo); 8,0 (s, 1H, Ar); 7,9 (s, 1H, Ar); 7,7 (m, 2H, Ar); 7,6 (s, 1H, Ar); 7,4-7,2 (m, Bz); 7,0 (m, 2H, Ar); 5,0 (s, 4H, CH_2); 2,7 (m, 4H, CH_2); 2,4 (m, 4H, CH_2); 1,9 (m, 4H, CH_2).

Ejemplo 15

Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)-ácido sulfónico-fluoreno-N-hidroxisuccinimida



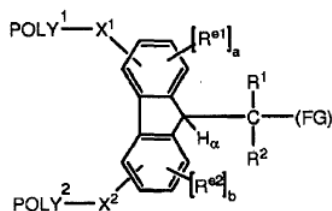
En un matraz purgado con argón seco, se disolvió 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno-N-

hidroxisuccinimida (1 g, 0,026 mmol) en DCM anhidro (10 ml). Se añadió una disolución de ácido clorosulfónico (0,05 ml en 50 ml de ácido trifluoroacético, 2,1 ml) a la mezcla de reacción. A lo largo de las siguientes varias horas, se añadió ácido clorosulfónico adicional (0,287 ml) a la reacción y se agitó durante más de cinco horas. Se evaporó el disolvente a presión reducida y luego se disolvió en DCM. Se evaporó de nuevo el disolvente a presión reducida.

- 5 El producto en bruto demostró la presencia de estructura modificada por ácido sulfónico mediante análisis de HPLC. ¹H-RMN (d₆-DMSO): δ (ppm) 8,2 (sa, 1H, NH amida); 7,6 (m, 1H, Ar); 7,5 (m, 1H, Ar); 7,2 (t, 1H, Ar); 6,7 (s, 1H, Ar); 6,5 (d, 1H, Ar); 5,3 (sa, 1H, NH amida); 3,8 (s, 2H, CH₂); 3,5 (s); 3,3 (sa, estructura principal de PEG); estaban presentes desplazamientos de contaminación adicional por debajo de 2,5 ppm en el producto en bruto.
- 10 Puede añadirse el grupo de alteración de electrones de ácido sulfónico a reactivos poliméricos distintos de 9-hidroxi-metil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno-N-hidroxisuccinimida englobados por la presente invención (incluyendo los reactivos poliméricos descritos en la parte experimental).

REIVINDICACIONES

1. Reactivo polimérico de fórmula V:



(Fórmula V)

en la que:

POLY¹ es un primer poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 100.000 Daltons;

POLY² es un segundo poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de más de 5.000 Daltons a 100.000 Daltons;

X¹ es un primer resto espaciador;

X² es un segundo resto espaciador;

H es un átomo de hidrógeno ionizable;

R¹ es H o un radical orgánico;

R² es H o un radical orgánico;

(a) es o bien cero o bien uno;

(b) es o bien cero o bien uno;

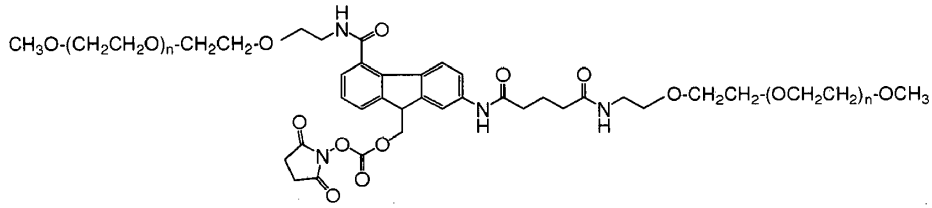
R^{e1}, cuando está presente, es un primer grupo de alteración de electrones;

R^{e2}, cuando está presente, es un segundo grupo de alteración de electrones; y

(FG) es un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo amino de un principio activo para formar una unión degradable.

2. Reactivo polimérico según la reivindicación 1, en el que cada poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de desde aproximadamente 6.000 Daltons hasta aproximadamente 100.000 Daltons.

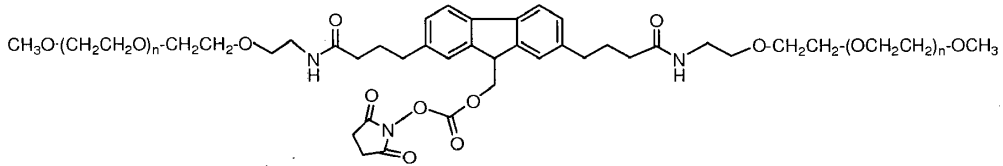
3. Reactivo polimérico según la reivindicación 1, en el que el primer resto espaciador se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-NH-CH₂CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, NH-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₁₋₃-NH-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂-CH₂)₁₋₃-CH₂-CH₂-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₁₋₃-NH-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂CH₂)₁₋₃-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-O-, -O-CH₂-C(O)-NH-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-O- y -O-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, y el segundo resto espaciador se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-



en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050.

5

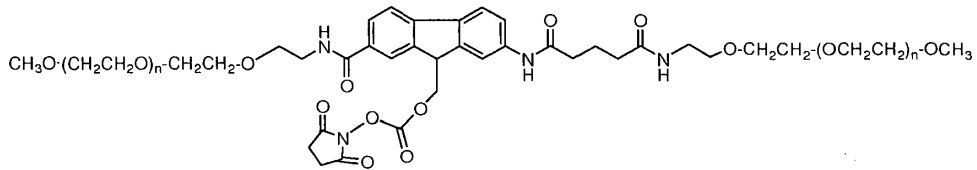
12. Reactivo polimérico según la reivindicación 1, de fórmula:



10

en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050.

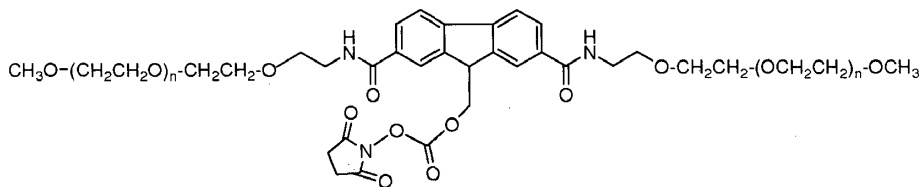
13. Reactivo polimérico según la reivindicación 1, de fórmula:



15

en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050.

14. Reactivo polimérico según la reivindicación 1; de fórmula:

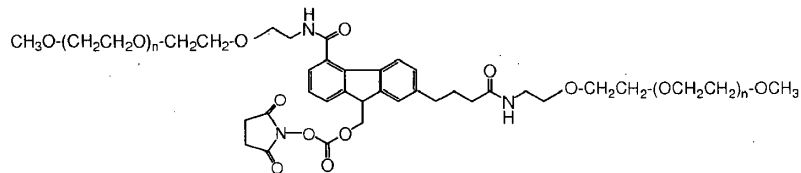


20

en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050.

15. Reactivo polimérico según la reivindicación 1, de fórmula:

25



en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050.

30

16. Conjugado de fórmula V-C:

-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-, -NH-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₁₋₃-NH-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂CH₂O)₁₋₃-CH₂-CH₂-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₁₋₃-NH-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂CH₂O)₁₋₃-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-O-, -O-CH₂-C(O)-NH-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-O- y -O-CH₂-CH₂-NH-C(O)-.

19. Conjugado según la reivindicación 16, en el que R¹ es H y R² es H.

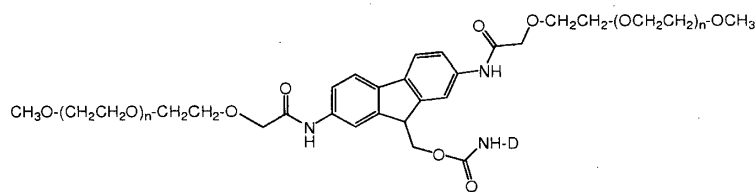
20. Conjugado según la reivindicación 16, en el que Y¹ es O e Y² es O.

21. Conjugado según la reivindicación 16, en el que el principio biológicamente activo es un polipéptido.

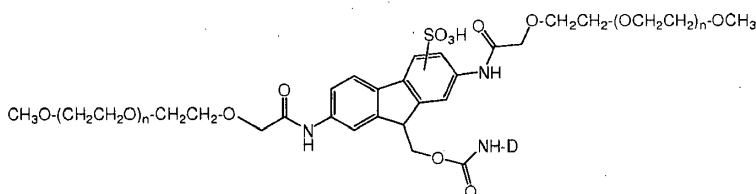
22. Conjugado según la reivindicación 16, en el que (a) es cero y (b) es cero.

23. Conjugado según la reivindicación 16, en el que (a) es uno, (b) es cero y el primer grupo de alteración de electrones se selecciona del grupo que consiste en halo, alquilo inferior, arilo, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, alcoxilo, ariloxilo, alquiltio, ariltio, CF₃, -CH₂CF₃, -CH₂C₆F₅, -CN, -NO₂, -S(O)R, -S(O)Ar, -S(O)R, -S(O₂)Ar, -S(O₂)OR, -S(O₂)OAr, -S(O₂)NHR, -S(O₂)NHAr, -C(O)R, -C(O)Ar, -C(O)OH y -C(O)NHR, en los que Ar es arilo y R es H o un radical orgánico.

24. Conjugado según la reivindicación 16, seleccionado del grupo que consiste en:

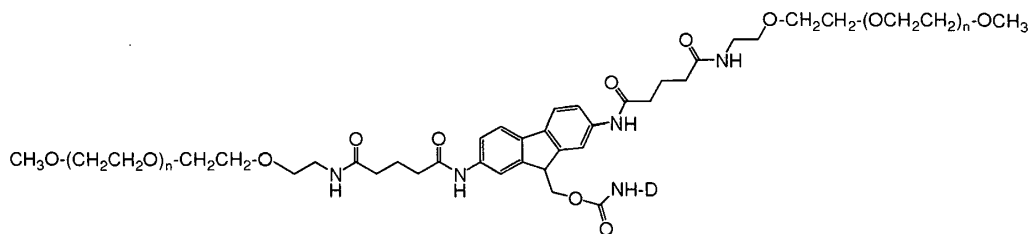


y



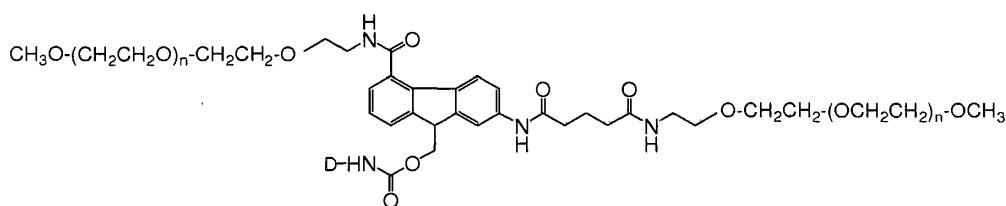
en las que, para cada estructura, cada (n) es de desde 136 hasta 2050 y D es un residuo de un principio biológicamente activo.

25. Conjugado según la reivindicación 16, de fórmula:



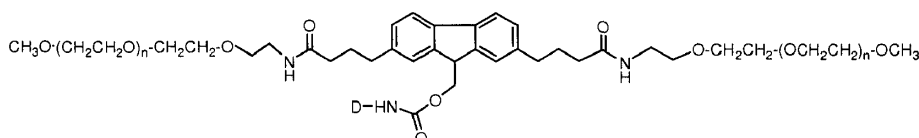
en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050 y D es un residuo de un principio biológicamente activo.

26. Conjugado según la reivindicación 16, de fórmula:



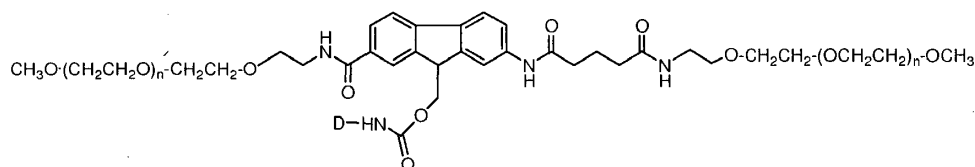
en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050 y D es un residuo de un principio biológicamente activo.

- 5 27. Conjugado según la reivindicación 16, de fórmula:



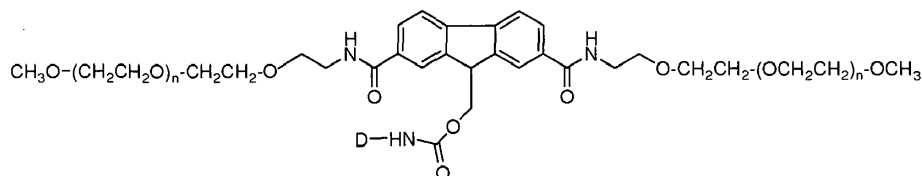
en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050 y D es un residuo de un principio biológicamente activo.

- 10 28. Conjugado según la reivindicación 16, de fórmula:



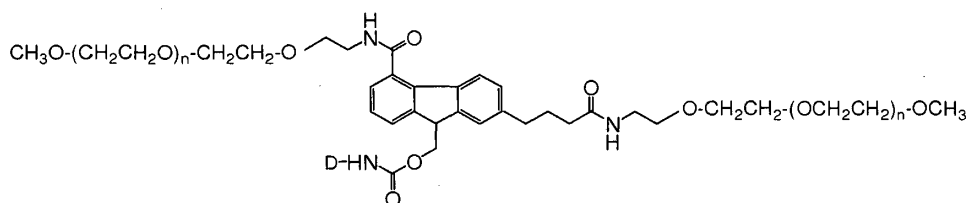
15 en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050 y D es un residuo de un principio biológicamente activo.

29. Conjugado según la reivindicación 16, de fórmula:



20 en la que cada (n) es de desde 4 hasta 1500 y D es un residuo de un principio biológicamente activo.

30. Conjugado según la reivindicación 16, de fórmula:



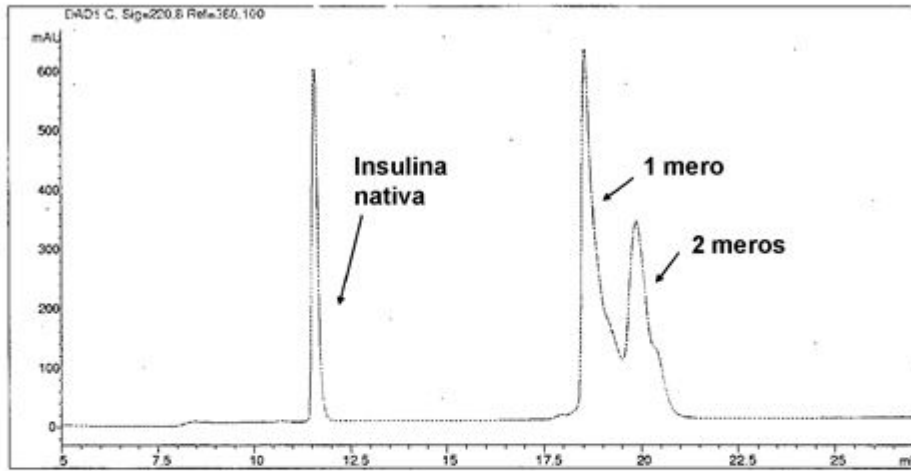
25 en la que cada (n) es de desde 136 hasta 2050 y D es un residuo de un principio biológicamente activo.

- 30 31. Método para preparar un conjugado, que comprende hacer reaccionar en condiciones de conjugación un reactivo polimérico según la reivindicación 1 con un principio biológicamente activo que contiene amina.

32. Conjugado preparado mediante el método según la reivindicación 31.

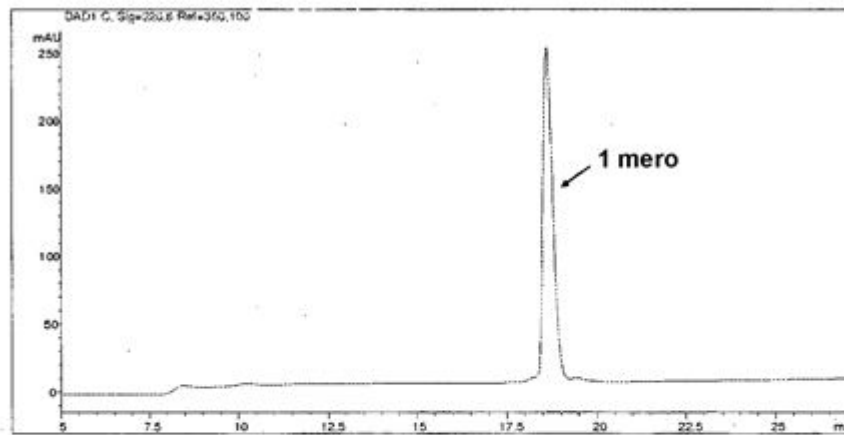
- 35 33. Composición farmacéutica que comprende un conjugado según la reivindicación 32 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

34. Composición farmacéutica según la reivindicación 33, en forma liofilizada.
- 5 35. Composición farmacéutica según la reivindicación 33, que comprende además un diluyente líquido.
36. Composición farmacéutica según la reivindicación 35, en la que el diluyente líquido se selecciona del grupo que consiste en agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5% en agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada y combinaciones de las mismas.
- 10 37. Composición farmacéutica según la reivindicación 33, en forma farmacéutica unitaria.
38. Composición farmacéutica según la reivindicación 37, alojada en un vial de vidrio.
- 15 39. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 38 para su uso en terapia.



Especie	% de área
Insulina	17.1
1 mero	47.6
2 meros	35.3

FIG. 1



Especie	% de área
Insulina	0
1 mero	98.1
2 meros	1.9

FIG. 2

Estudio de degradación de PEG-insulina

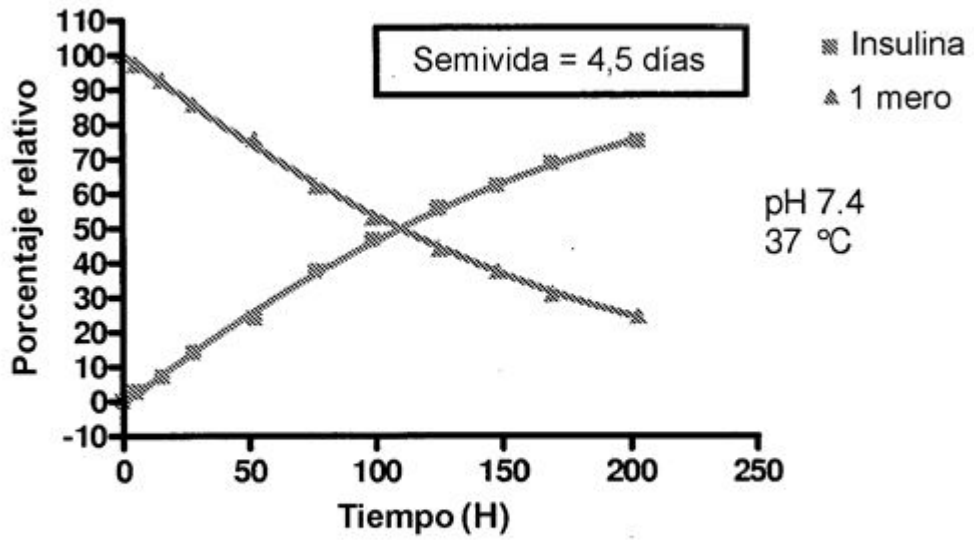


FIG. 3

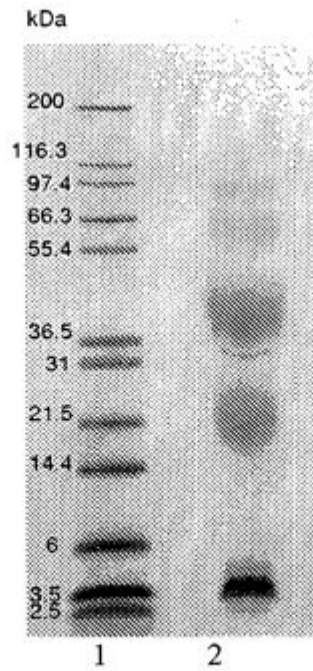


FIG. 4

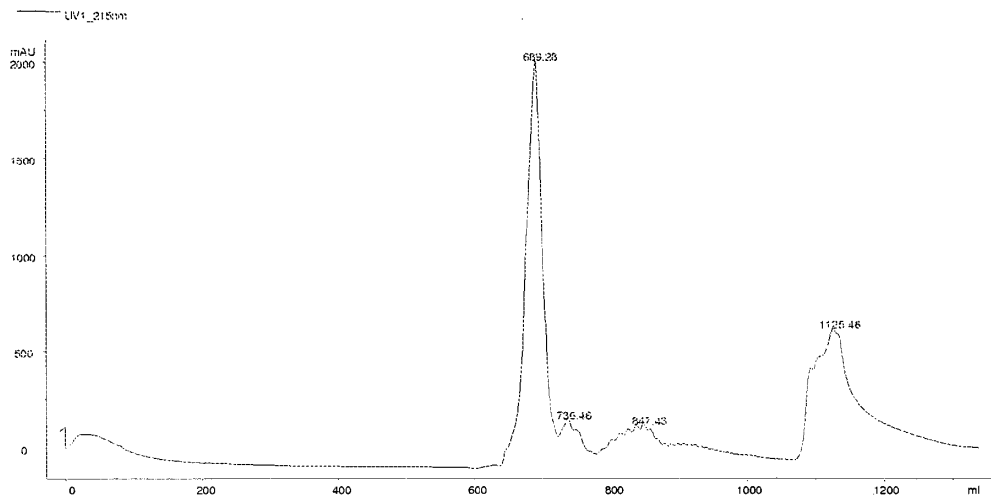


FIG. 5

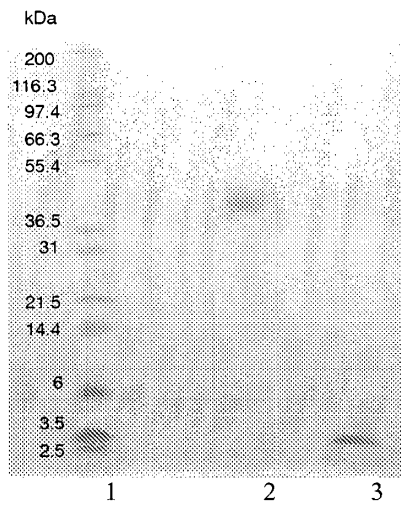
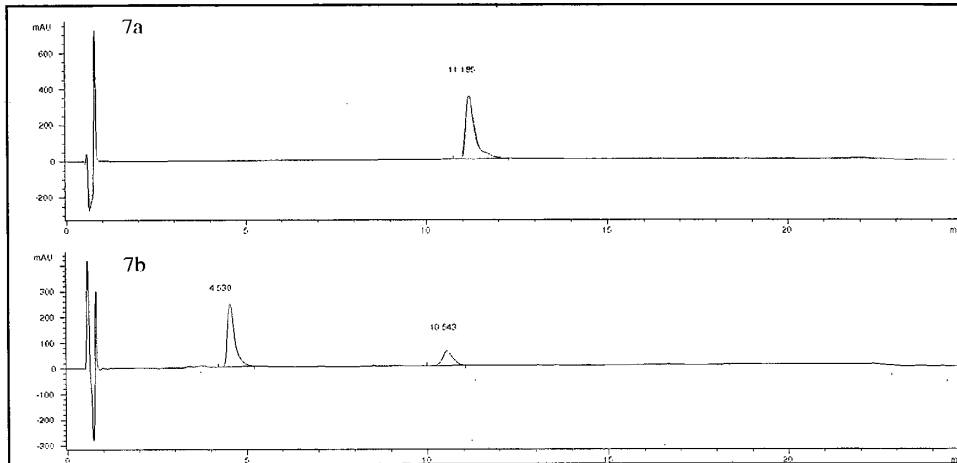


FIG. 6



FIGS. 7A, 7B

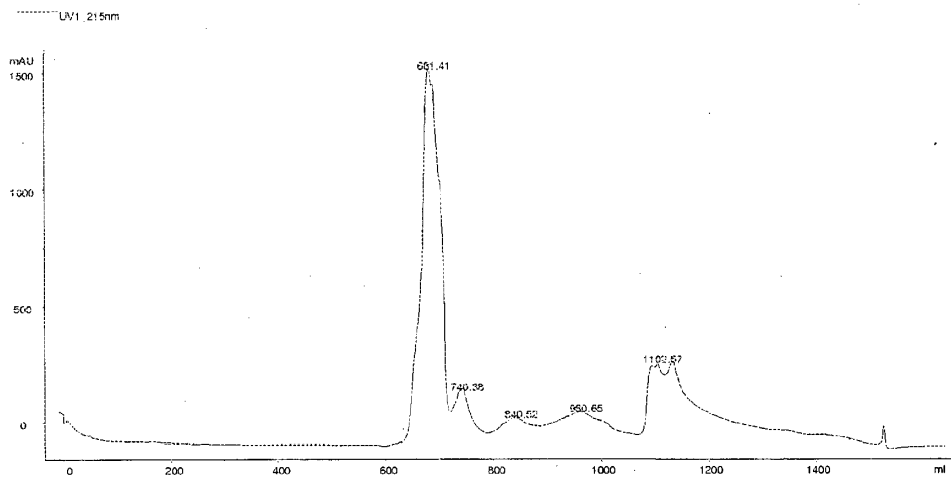


FIG. 8

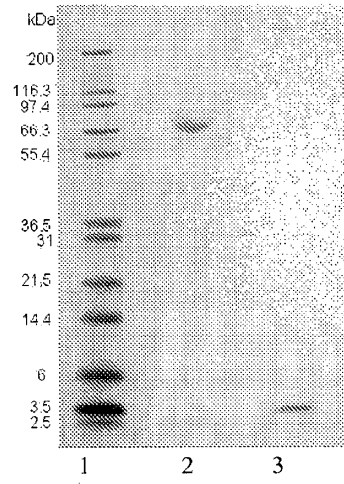


FIG. 9

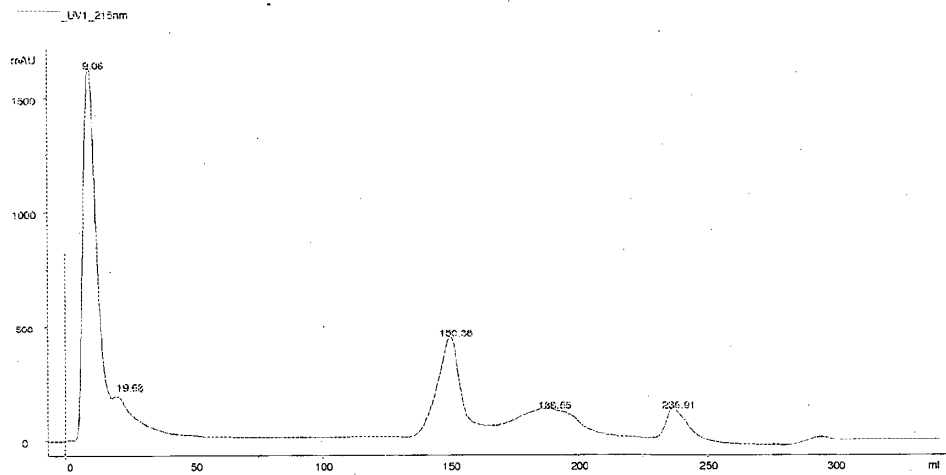


FIG. 10

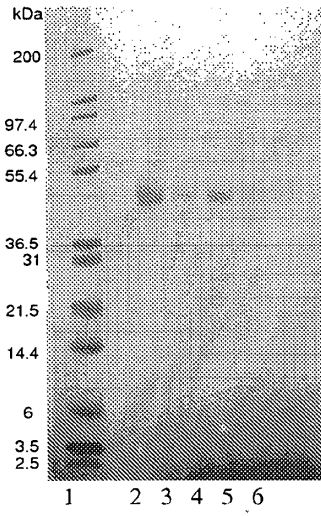


FIG. 11

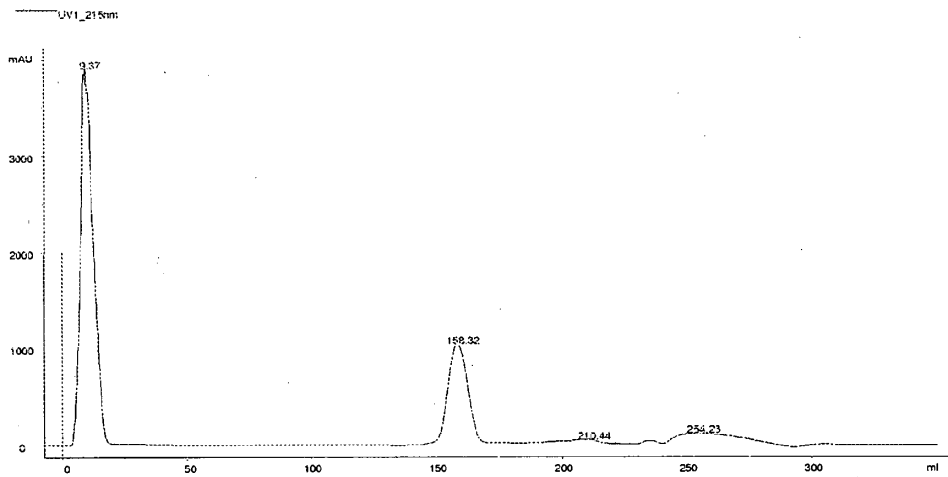


FIG. 12

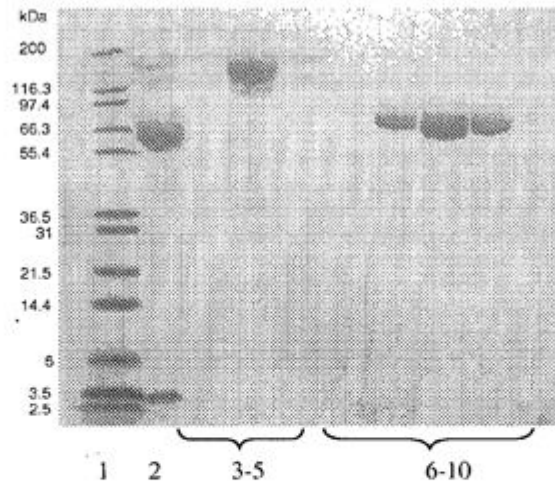


FIG. 13

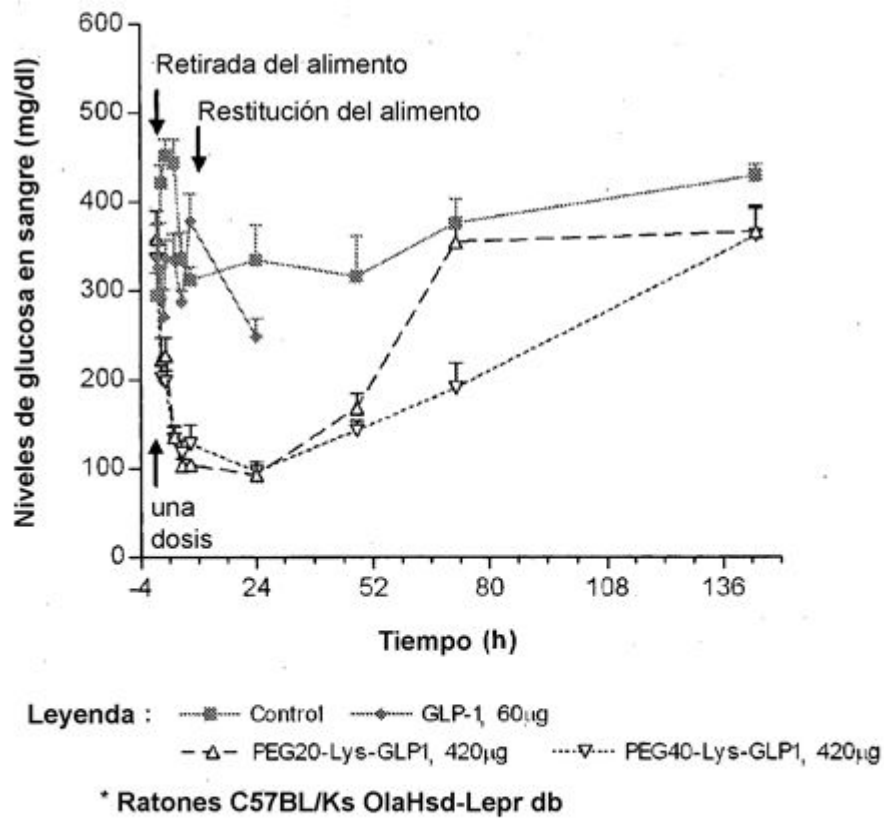
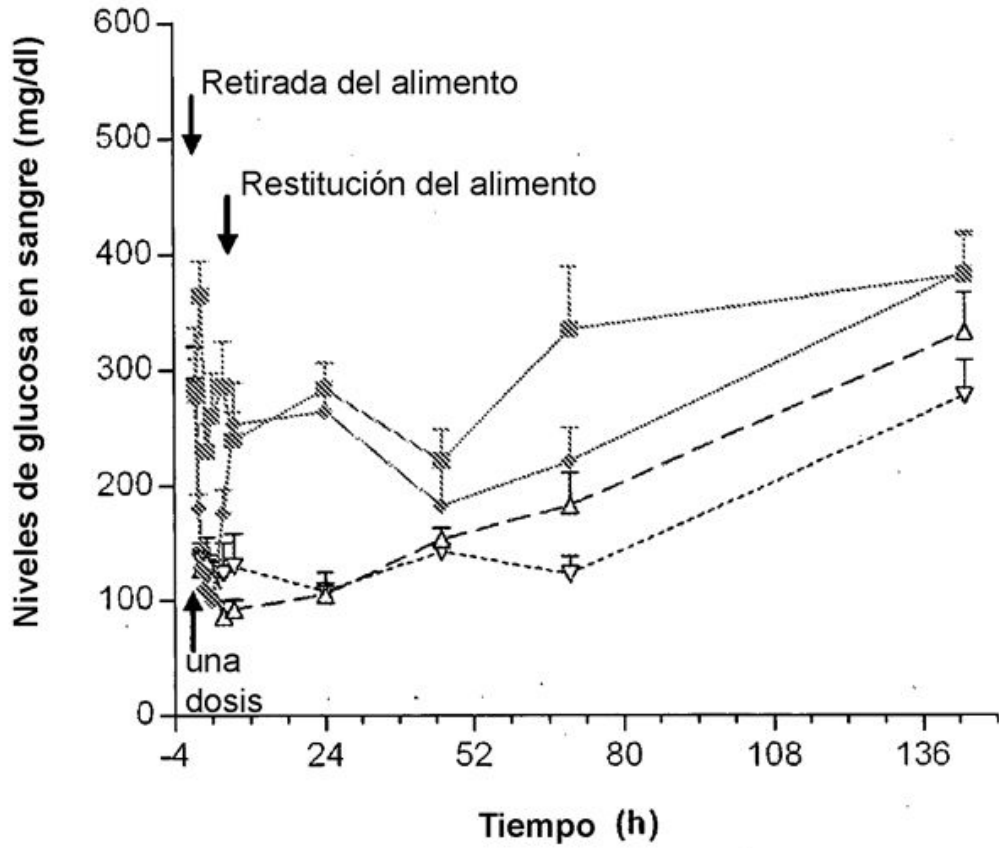


FIG. 14



Leyenda :
 -■- Control -◆- GLP-1, 120µg
 -△- PEG20-His-GLP1, 420µg -▽- PEG40-His-GLP1, 420µg

* Ratones C57BL/Ks OlaHsd-Lepr db

FIG. 15

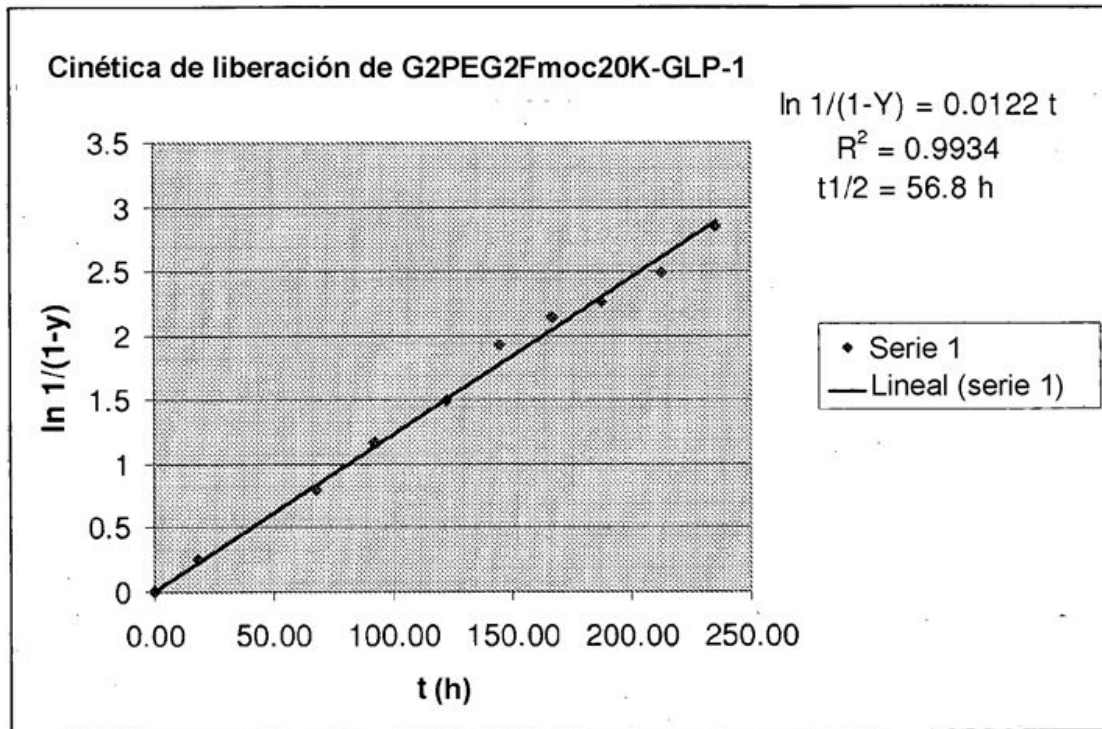


FIG. 16