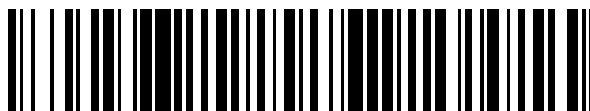


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 078**

51 Int. Cl.:

C07C 67/31 (2006.01)

C08F 8/12 (2006.01)

C08F 8/14 (2006.01)

C08G 65/332 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2005 PCT/US2005/001770**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2005 WO05070973**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2005 E 05711695 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 1756173**

54 Título: **Método para preparar polímeros terminados en ácido propiónico**

30 Prioridad:

21.01.2004 US 538006 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2019

73 Titular/es:

**NEKTAR THERAPEUTICS (100.0%)
455 Mission Bay Boulevard South, Suite 100
San Francisco, CA 94185, US**

72 Inventor/es:

**KOZLOWSKI, ANTONI y
MCMANUS, SAMUEL, P.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 720 078 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

Método para preparar polímeros terminados en ácido propiónico

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos para preparar poli(etilenglicol) que porta grupos funcionales de ácido propiónico sustituidos o no sustituidos.

10 Antecedentes de la invención

Los derivados de poli(etilenglicol) (PEG) activados con grupos electrófilos son útiles para el acoplamiento a grupos amino de moléculas biológicamente activas, tales como proteínas. En particular, se han utilizado ésteres activos de derivados de ácido carboxílico de PEG para anclar PEG a proteínas que portan grupos amino.

La Patente de Estados Unidos Núm. 5.672.662 describe derivados de PEG que tienen un radical de ácido propiónico o butanoico terminal que se pueden utilizar para preparar ésteres activos adecuados para la conjugación a proteínas u otras moléculas que portan grupos amino. El método sintético para el PEG sustituido con ácido propiónico descrito en la patente implica la adición de Michael de poli(etilenglicol) a acrilonitrilo seguida de hidrólisis del nitrilo para formar el grupo carboxilo. La hidrólisis del nitrilo requiere condiciones de reacción severas, tales como el tratamiento con ácido sulfúrico concentrado a 95°C o más. Los enlaces éter en PEG son sensibles a tales condiciones y puede producirse una escisión significativa de la cadena y una reducción en el rendimiento de este procedimiento, particularmente cuando están implicados polímeros de peso molecular relativamente alto, tales como polímeros que tienen un peso molecular superior a aproximadamente 10.000 Da.

La Patente de Estados Unidos Núm. 5.523.479 de Sanders et al. describe un método para formar ácidos etilcarboxílicos mediante la reacción de un alcohol que tiene un peso molecular de 32 a 6.000 Da con un éster alquílico terciario de un ácido carboxílico α,β -insaturado en presencia de un catalizador, tal como hidróxido de potasio, seguido de hidrólisis ácida. La patente de Sanders *et al.* no aborda el uso de reactivos de polímeros de mayor peso molecular, tales como los polímeros de PEG que tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 Da o más.

La patente JP-A-2000204153 describe un procedimiento para la preparación de derivados de ácido poli(etilenglicol)-omega-propiónico alfa-sustituidos que comprende la etapa de hacer reaccionar un monoalcohol de poli(etilenglicol) alfa-sustituido con 20 a 4.000 unidades de etilenglicol con un derivado de ácido acrílico tal como acrilato de t-butilo en presencia de hidróxido de potasio como catalizador.

La Patente de Estados Unidos Núm. 5 034 559 se refiere a un procedimiento para la preparación de ésteres polietercarboxílicos mediante la reacción de un politetrahidrofurano de fórmula $H-[O-(CH_2)_4]_n-OH$ donde n es de 3 a 70 con un acrilato tal como acrilato de t-butilo en presencia de una base, tal como un hidróxido de amonio cuaternario, como catalizador.

Existe una necesidad en la técnica de métodos alternativos para preparar polímeros terminados en ácido propiónico, particularmente polímeros de alto peso molecular, con alto rendimiento sin utilizar condiciones de reacción severas que puedan causar la escisión de la cadena dentro del esqueleto del polímero (p. ej., en el grupo metoxi terminal en el esqueleto del polímero).

Compendio de la invención

El presente método evita las duras condiciones de hidrólisis que caracterizan los métodos convencionales para producir polímeros terminados en ácido propiónico. En su lugar, el método de la invención primero implica una reacción de adición de Michael entre un acrilato de alquilo terciario y un polímero funcionalizado con al menos un grupo hidroxilo, seguida de la eliminación de un grupo alquilo terciario del éster terminal para formar un grupo carboxilo en condiciones relativamente suaves, tal como el tratamiento con ácido trifluoroacético a aproximadamente 50°C.

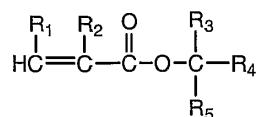
En un aspecto, la presente invención proporciona un método como se describe en la reivindicación 1 para preparar un poli(etilenglicol) funcionalizado con al menos un grupo ácido propiónico, comprendiendo el método:

- i) hacer reaccionar un poli(etilenglicol) que comprende al menos un grupo hidroxilo con un acrilato de alquilo terciario o acrilato de alquilo terciario sustituido en presencia de un catalizador para formar un éster de ácido propiónico sustituido o no sustituido del poli(etilenglicol), en donde el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso (o número) de al menos 10.000 Da; y
- ii) tratar el éster de ácido propiónico sustituido o no sustituido del poli(etilenglicol) con un ácido fuerte, tal

como (por ejemplo) ácido trifluoroacético, ácido trifluorometanosulfónico, ácido fórmico, ácido clorhídrico o ácido p-toluenosulfónico, para formar un propiónico o ácido propiónico sustituido del poli(etilenglicol).

El acrilato de alquilo terciario puede estar sustituido en la posición α o la posición 13 y los grupos sustituyentes ilustrativos incluyen halo, hidroxilo, tiol, alquiltio, acilo, aciloxi, nitro, ciano, azido, trihalometilo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido. En una realización preferida, el acrilato de alquilo terciario está sustituido en α o β , preferiblemente sustituido en α con metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo o bencilo. Los grupos alquilo terciarios preferidos del acrilato de alquilo terciario incluyen terc-butilo, terc-amilo, α,α' -dimetilbencilo, tritilo, 1-adamantilo y 2-metil-2-adamantilo.

En una o más realizaciones, el acrilato de alquilo terciario tiene la estructura:



(Fórmula I)

en donde:

R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, hidroxilo, tiol, alquiltio, acilo, aciloxi, nitro, ciano, azido, trihalometilo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y

R_3 - R_5 (es decir, cada uno de R_3 , R_4 y R_5) son cada uno independientemente alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido.

Preferiblemente, R_3 , R_4 y R_5 , son cada uno metilo, etilo o fenilo, y R_1 y R_2 son hidrógeno o R_1 es hidrógeno y R_2 es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo o bencilo.

El catalizador utilizado en la reacción de adición de Michael es una sal de amonio cuaternario seleccionada del grupo que consiste en hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio, hidróxido de tetrapropilamonio o hidróxido de tetrabutilamonio, así como los haluros correspondientes.

Tanto la etapa de reacción i) como la etapa de tratamiento ii) se pueden realizar en presencia de un solvente orgánico, tal como diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, tolueno, benceno, xileno, fenilacetónitrilo, nitrobenzono, tetracloroetileno, anisol, clorobenceno y terc-butanol.

El polímero tiene preferiblemente un peso molecular promedio en peso (o número) de 10.000 a 100.000 Da, más preferiblemente de 10.000 a 40.000 Da.

El polímero de PEG puede tener cualquiera de una variedad de estructuras y configuraciones geométricas, que incluyen, por ejemplo, PEG monofuncional, PEG difuncional y PEG ramificado.

Después de la formación del grupo ácido carboxílico, el polímero funcionalizado con ácido propiónico se puede derivatizar para formar un derivado ácido tal como haluro de acilo, pseudohaluro de acilo, éster, anhídrido, amida, imida o hidrazida. Además, el ácido o ciertos polímeros funcionalizados, p. ej. los ésteres activos se pueden utilizar como intermedios para reaccionar con reactivos apropiados u otras moléculas pequeñas o especies poliméricas cortas para formar derivados reactivos adicionales, tales como maleimidas, tioles, disulfuros reactivos, acetales, aldehídos y similares. En una realización, el polímero funcionalizado con ácido propiónico se derivatiza para formar un éster activo. Los ejemplos de grupos éster activos incluyen éster de N-hidroxisuccinimidilo, éster de o-, m- o p-nitrofenilo, éster de 1-hidroxibenzotriazolilo, éster de imidazolilo y éster de N-hidroxisulfosuccinimidilo.

En una realización preferida de la invención, el método para preparar un polímero de poli(etilenglicol) (PEG) funcionalizado con al menos un grupo ácido propiónico comprende:

i) hacer reaccionar un polímero de PEG con un acrilato de alquilo terciario o acrilato de alquilo terciario sustituido en presencia de un hidróxido de amonio cuaternario para formar un ácido propiónico o un éster de ácido propiónico sustituido de PEG, en donde el polímero de PEG es una molécula de PEG monofuncional, PEG difuncional, o PEG ramificado que comprende de 1 a aproximadamente 25 grupos hidroxilo y que tiene un peso molecular promedio en número de al menos aproximadamente 10.000 Da;

ii) tratar el ácido propiónico o el éster de ácido propiónico sustituido de PEG con un ácido fuerte, tal como (por ejemplo) ácido trifluoroacético, ácido trifluorometanosulfónico, ácido fórmico, ácido clorhídrico o ácido p-toluenosulfónico, para formar un polímero de PEG funcionalizado con al menos un grupo ácido propiónico o ácido propiónico sustituido;

iii) opcionalmente, purificar cromatográficamente el polímero de PEG funcionalizado con al menos un grupo ácido propiónico;

iii) opcionalmente, derivatizar el PEG funcionalizado con ácido propiónico o ácido propiónico sustituido para formar, por ejemplo, un éster activo seleccionado del grupo que consiste en éster de N-hidroxisuccinimidilo, éster de o-, m-, o p-nitrofenilo, éster de 1-hidroxibenzotriazolilo, éster de imidazolilo y éster de N-hidroxisulfosuccinimidilo; y

v) opcionalmente, purificar cromatográficamente el éster activo de PEG.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora más detalladamente a continuación. Sin embargo, esta invención se puede realizar de muchas formas diferentes y no se debe interpretar que está limitada a las realizaciones expuestas en la presente memoria; más bien, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta descripción sea exhaustiva y completa, y transmita completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

I. Definiciones

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

Cabe señalar que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un "polímero" incluye un solo polímero así como dos o más polímeros iguales o diferentes, la referencia a un "producto conjugado" se refiere a un solo producto conjugado así como dos o más productos conjugados iguales o diferentes, la referencia a un "excipiente" incluye un solo excipiente así como dos o más de los mismos o diferentes excipientes, y similares.

Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se describen a continuación.

Se pretende que "PEG" o "polietilenglicol", según se utilizan en la presente memoria, abarquen cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEG para uso en la presente invención comprenderán una de las dos estructuras siguientes: $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, donde (m) es de 3 a 3000, y los grupos terminales y la arquitectura del PEG general pueden variar. "PEG" significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más de 50%, de subunidades que son $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. Un PEG comúnmente empleado es el PEG con protección terminal. Cuando PEG se define como $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ el grupo de protección terminal es generalmente un grupo que contiene carbono que normalmente está compuesto de 1 a 20 carbonos y es preferiblemente alquilo (p. ej., metilo, etilo o bencilo) aunque sus formas saturadas e insaturadas, así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo y también se contemplan formas sustituidas de cualquiera de los anteriores. Cuando PEG se define como $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, el grupo de protección terminal es generalmente un grupo que contiene carbono típicamente compuesto por 1-20 átomos de carbono y un átomo de oxígeno que está unido covalentemente al grupo y está disponible para unirse covalentemente a un extremo del PEG. En este caso, el grupo es típicamente alcoxi (p. ej., metoxi, etoxi o benciloxi) y con respecto al grupo que contiene carbono puede estar opcionalmente saturado e insaturado, así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo y formas sustituidas de cualquiera de los anteriores. El otro extremo ("con protección terminal") es típicamente un hidroxilo, una amina o un grupo activado que se puede someter a una modificación química adicional cuando PEG se define como $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Además, el grupo de protección terminal también puede ser un silano. Las formas de PEG específicas para su uso en la invención incluyen PEG que tienen una variedad de pesos moleculares, estructuras o geometrías (p. ej., PEG ramificados, lineales, bifurcados, multifuncionales, y similares), que se describirán con mayor detalle a continuación.

El grupo de protección terminal también puede comprender ventajosamente una marca detectable. Cuando el polímero tiene un grupo de protección terminal que comprende una marca detectable, la cantidad o ubicación del polímero y/o el radical (p. ej., el agente activo) al que está unido el polímero se pueden determinar utilizando un detector adecuado. Tales marcas incluyen, sin limitación, fluorescentes, quimioluminiscentes, radicales utilizados en el marcaje de enzimas, colorimétricos (p. ej., colorantes), iones metálicos, radicales radiactivos y similares.

"Masa molecular" en el contexto de un polímero soluble en agua, no peptídico de la invención, tal como PEG, se

refiere al peso molecular promedio en peso de un polímero, típicamente determinado mediante cromatografía de exclusión de tamaño, técnicas de dispersión de luz, o determinación de viscosidad intrínseca en un disolvente orgánico como 1,2,4-triclorobenceno. Los polímeros de la invención son típicamente polidispersos, que poseen valores de polidispersidad bajos de menos de aproximadamente 1,05.

5 "Ácido carboxílico activado" significa un derivado funcional de un ácido carboxílico que es más reactivo que el ácido carboxílico original, en particular, con respecto a la sustitución de acilo nucleófila. Los ácidos carboxílicos activados incluyen, entre otros, haluros de ácido (tales como cloruros de ácido), anhídridos, amidas y ésteres.

10 Los términos "reactivo" o "activado" cuando se utilizan junto con un grupo funcional concreto, se refieren a un grupo funcional reactivo que reacciona fácilmente con un electrófilo o un nucleófilo en otra molécula. Esto contrasta con aquellos grupos que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción poco prácticas para reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

15 Los términos "protegido" o "grupo protector" o "grupo de protección" se refieren a la presencia de un radical (es decir, el grupo protector) que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo concreto en una molécula bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se proteja, así como de las condiciones de reacción que se vayan a emplear y la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula, si los hubiera. Los grupos protectores conocidos en la técnica se pueden encontrar en Greene, T.W., et al., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC
20 SYNTHESIS, 3ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1999).

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo abarque formas protegidas del mismo.

25 El término "espaciador" o "radical espaciador" se utiliza en la presente memoria para referirse a un átomo o una colección de átomos utilizados opcionalmente para enlazar radicales de interconexión tales como el extremo terminal de una porción de polímero soluble en agua y un electrófilo. Los radicales espaciadores de la invención pueden ser hidrolíticamente estables o pueden incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

30 "Alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada, que típicamente varía de aproximadamente 1 a 20 átomos de longitud. Tales cadenas hidrocarbonadas son preferiblemente, pero no necesariamente, saturadas y pueden ser de cadenas lineales o ramificadas, aunque se prefiere típicamente una cadena lineal. Los grupos alquilo ilustrativos incluyen etilo, propilo, butilo, pentilo, 2-metilbutilo, 2-metilpropilo (isobutilo), 3-metilpentilo, y similares. Como se
35 emplea en la presente memoria, "alquilo" incluye cicloalquilo o cicloalquilenos cuando se hace referencia a tres o más átomos de carbono.

"Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y puede ser de cadena lineal o ramificada, como se ilustra por metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo.

40 "Cicloalquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada cíclica saturada o insaturada, que incluye compuestos puenteados, fusionados o espiro cíclicos, formados preferiblemente de 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8.

45 Como se emplea en la presente memoria, "alqueno" 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.

50 El término "alquino", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado de 2 a 15 átomos de longitud, que contiene al menos un enlace triple, tal como etinilo, n-propinilo, isopentinilo, n-butinilo, octinilo, decinilo, etcétera.

"Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R, en donde R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C1-C20 (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, bencilo, etc.), preferiblemente C1-C8.

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

60 El término "sustituido" como por ejemplo en "alquilo sustituido", se refiere a un radical (p. ej., un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes no interferentes, tales como, pero sin limitarse a: cicloalquilo C3-C8, p. ej., ciclopropilo, ciclobutilo y similares; halo, p. ej., flúor, cloro, bromo y yodo; ciano alcoxi fenilo; fenilo sustituido; y similares.

"Ariilo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 o 6 átomos de carbono. Ariilo incluye múltiples anillos de

arilo que pueden fusionarse, como en naftilo o sin fusionar, como en bifenilo. Los anillos arilo también pueden estar fusionados o no fusionados con uno o más anillos cíclicos hidrocarbonados, heteroarílicos o heterocíclicos. Como se emplea en la presente memoria, "arilo" incluye heteroarilo.

5 "Arilo sustituido" es arilo que tiene uno o más grupos no interferentes como sustituyente. Para las sustituciones en un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta o para).

10 "Heterociclo" o "heterocíclico" significan uno o más anillos de 5 a 12 átomos, preferiblemente de 5 a 7 átomos, con o sin insaturación o carácter aromático y que tiene al menos un átomo anular que no es un carbono. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno y nitrógeno.

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

15 "Heteroarilo" es un grupo arilo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, preferiblemente N, O o S, o una combinación de los mismos. Los anillos de heteroarilo también pueden fusionarse con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, heterocíclicos, arílicos o heteroarílicos.

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

"Electrófilo" se refiere a un ion o átomo o una colección neutra o iónica de átomos que tienen un centro electrofílico, es decir, un centro que busca electrones o puede reaccionar con un nucleófilo.

25 "Nucleófilo" se refiere a un ion o átomo o una colección neutra o iónica de átomos que tienen un centro nucleofílico, es decir, un centro que está buscando un centro electrofílico o capaz de reaccionar con un electrófilo.

30 Una unión "fisiológicamente escindible" o "hidrolizable" o "degradable" es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no solo del tipo general de unión que conecta dos átomos centrales, sino también de los sustituyentes anclados a estos átomos centrales. Las uniones hidrolíticamente inestables o débiles apropiadas incluyen, pero no se limitan a, éster carboxilato, éster fosfato, anhídridos, acetales, cetales, éter aciloxialquílico, iminas, ortoésteres y oligonucleótidos.

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

40 Una unión o enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, no experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas en un grado apreciable durante un período prolongado de tiempo. Los ejemplos de uniones hidrolíticamente estables incluyen, entre otras, las siguientes: enlaces carbono-carbono (p. ej., en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos y similares. En general, un enlace hidrolíticamente estable es aquel que presenta una tasa de hidrólisis de menos de aproximadamente 1-2% por día en condiciones fisiológicas. Las tasas de hidrólisis de enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de los libros de texto de química de referencia.

45 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéuticamente aceptable" se refieren a un excipiente que se puede incluir en las composiciones de la invención y que no causa efectos toxicológicos adversos significativos para el paciente.

50 "Cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad fisiológicamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan indistintamente en la presente memoria para significar la cantidad de un producto conjugado de PEG- agente activo presente en una preparación farmacéutica que se necesita para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o producto conjugado en el torrente sanguíneo o en el tejido diana. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el agente activo concreto, los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes prevista, las consideraciones del paciente y similares, y puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica, basándose en la información proporcionada en la presente memoria y disponible en la bibliografía relevante.

60 "Multifuncional" en el contexto de un polímero de la invención significa un polímero que tiene 3 o más grupos funcionales contenidos en el mismo, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes. Los polímeros multifuncionales de la invención típicamente contendrán de aproximadamente 3 a 100 grupos funcionales, o de 3 a 50 grupos funcionales, o de 3 a 25 grupos funcionales, o de 3 a 15 grupos funcionales, o de 3 a 10 grupos funcionales, o contendrán 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grupos funcionales dentro del esqueleto del polímero.

Un polímero "difuncional" significa un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos en el mismo, iguales (es decir, homodifuncional) o diferentes (es decir, heterodifuncional).

Un reaccionante alcalino o ácido descrito en la presente memoria incluye reaccionantes neutros, cargados y cualquiera de sus formas de sal correspondientes.

5 El término "paciente" se refiere a un organismo vivo que sufre o es propenso a una afección que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de un producto conjugado, e incluye tanto seres humanos como animales.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita posteriormente puede o no ocurrir, de modo que la descripción incluye casos en los que ocurre la circunstancia y casos en los que no ocurre.

10 A menos que se indique lo contrario, el peso molecular se expresa en la presente memoria como peso molecular promedio en número (M_n), que se define como

$$\frac{\sum NiMi}{\sum Ni},$$

15 en donde Ni es el número de moléculas de polímero (o el número de moles de esas moléculas) que tienen el peso molecular Mi .

20 Como se emplea en la presente memoria, "no peptídico" se refiere a un esqueleto de polímero sustancialmente libre de enlaces peptídicos. Sin embargo, el esqueleto de polímero puede incluir un número menor de enlaces peptídicos espaciados a lo largo de la longitud del esqueleto, tal como, por ejemplo, no más de aproximadamente 1 enlace peptídico por aproximadamente 50 unidades monoméricas.

II. Método de preparación de polietilenglicol funcionalizado con ácido propiónico

25 El método de la invención proporciona una ruta sintética para formar poli(etilenglicol) funcionalizado con al menos un grupo ácido propiónico. El método implica la reacción de un poli(etilenglicol) que comprende al menos un grupo hidroxilo de una molécula de PEG monofuncional, difuncional o multifuncional, con un reactivo acrilato de alquilo terciario en una reacción de adición de Michael, que da como resultado un polímero sustituido con al menos un éster alquílico terciario de ácido propiónico. El éster se hidroliza a continuación en condiciones relativamente suaves en comparación con las condiciones de hidrólisis requeridas para un grupo nitrilo. Las condiciones de hidrólisis utilizadas en el método de la invención no causan una degradación que reduce el rendimiento y la escisión de la cadena del esqueleto del polímero, lo que hace que el método sea particularmente adecuado para polímeros de mayor peso molecular, tales como los polímeros que tienen un peso molecular mayor que aproximadamente 10.000 da.

35 Se utiliza un catalizador de sal de amonio cuaternario para promover la reacción de adición de Michael. La elección del catalizador es particularmente importante para las sustancias de partida poliméricas de mayor peso molecular debido a que, como se indica en el Ejemplo comparativo 1, ciertos catalizadores en la técnica no pueden hacer avanzar la reacción de adición de Michael en ningún grado significativo. Un catalizador preferido comprende un hidróxido de amonio cuaternario seleccionado del grupo que consiste en hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio, hidróxido de tetrapropilamonio e hidróxido de tetrabutilamonio. Los hidróxidos de amonio cuaternario pueden utilizarse directamente o generarse in situ a partir de las correspondientes sales de amonio cuaternario, preferiblemente haluros. Si se utiliza una sal haluro de amonio cuaternario, es necesario activar la sal de amonio mediante la adición de un hidróxido de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, tal como KOH o NaOH, como se muestra en los Ejemplos 1 y 3. El catalizador se puede disolver en el mismo disolvente orgánico que los reactivos de reacción o añadir en forma de una solución acuosa.

50 La hidrólisis del grupo éster alquílico terciario se puede realizar mediante tratamiento con cualquier ácido fuerte, tal como varias soluciones de ácidos minerales (p. ej., ácidos hidrohlogenados, ácido sulfúrico, ácido fosforoso y similares) o ácidos orgánicos. Un ácido preferido es el ácido trifluoroacético (TFA). Los ejemplos de otros ácidos adecuados incluyen ácido fórmico, ácido clorhídrico, ácido p-toluenosulfónico y ácido trifluorometanosulfónico.

Los reactivos tanto en la etapa de adición de Michael como en la subsiguiente etapa de hidrólisis se disuelven preferiblemente en un disolvente orgánico adecuado. Los solventes orgánicos ilustrativos incluyen diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, tolueno, benceno, benceno, xileno, fenilacetnitrilo, nitrobenceno, tetracloroetileno, anisol, clorobenceno, terc-butanol, y similares.

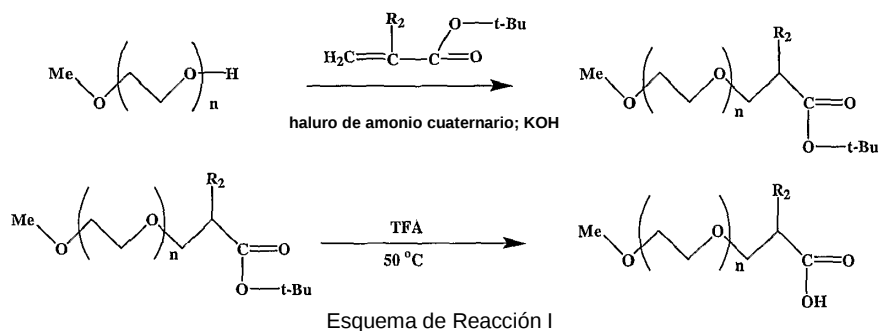
60 La reacción de adición de Michael se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que mantenga la sustancia de partida de poli(etilenglicol) en estado líquido. Preferiblemente, la temperatura es de aproximadamente 20 a aproximadamente 120°C, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60°C. Dichas temperaturas son más bajas que las que se sugieren típicamente y representan condiciones de reacción relativamente más suaves, especialmente en presencia de un catalizador alcalino, eliminando así prácticamente la

degradación y la escisión de la cadena del esqueleto del polímero. El tiempo de la reacción de adición de Michael es típicamente de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 24 horas. El poli(etilenglicol) se hace reaccionar típicamente con el acrilato de alquilo terciario utilizando un exceso del reactivo de acrilato (p. ej., hasta aproximadamente un exceso molar de 30 veces) para promover la conversión sustancialmente completa del alcohol polimérico. El catalizador está presente típicamente en una cantidad de aproximadamente 0,05 por ciento en peso a aproximadamente 20 por ciento en peso basándose en el peso del polímero de partida.

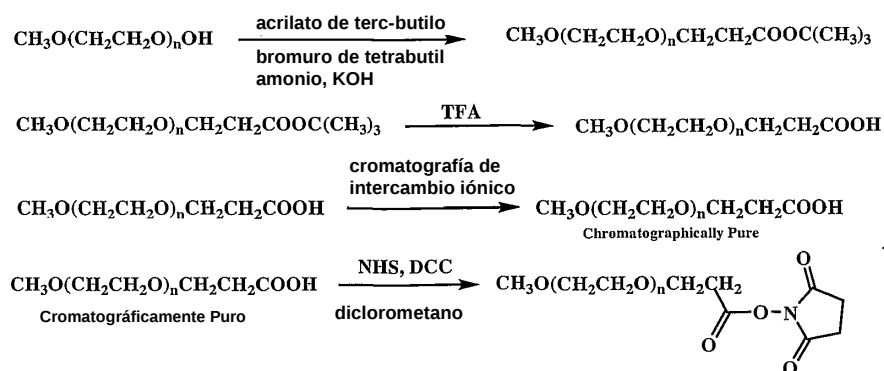
La etapa de hidrólisis promovida por ácido comprende típicamente tratar el éster de ácido propiónico del poli(etilenglicol) con un ácido fuerte, preferiblemente un ácido orgánico, a una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 100°C, preferiblemente en el extremo inferior del intervalo, durante aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 6 horas. El uso de ácidos orgánicos con temperaturas relativamente más bajas representa condiciones de reacción más suaves que las requeridas para la hidrólisis de, por ejemplo, nitrilos como se evidencia en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.672.662, con el resultado de eliminar prácticamente la degradación y la escisión de la cadena del esqueleto del polímero. Después de la conversión del éster en el ácido deseado, cualquier disolvente o ácido orgánico, tal como el ácido trifluoroacético, se puede eliminar por destilación. Posteriormente, el producto deseado se disuelve preferiblemente en agua desionizada y se trata con una base fuerte para hidrolizar cualquier éster de poli(etilenglicol) y ácido (por ejemplo, ácido trifluoroacético) residual, seguido de un tratamiento con un ácido mineral fuerte (para ajustar el pH) para convertir la sal resultante del PEG-ácido propiónico a la forma de ácido libre. El producto se extrae a continuación utilizando un disolvente clorado como el diclorometano y se concentra. El producto deseado se puede purificar a continuación utilizando métodos conocidos en la técnica para polímeros de este tipo.

Utilizando el método de la invención, se puede producir poli(etilenglicol) funcionalizado con ácido propiónico con un alto rendimiento con un alto grado de sustitución polimérica. Típicamente, el porcentaje de sustitución polimérica del éster de ácido propiónico sobre el poli(etilenglicol) es al menos aproximadamente 70%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de sustitución. El rendimiento de producto es típicamente al menos aproximadamente 60%, más preferiblemente al menos aproximadamente 70%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 80%.

Un esquema de reacción general de la presente invención, indicado como Esquema de Reacción I, se muestra a continuación. Como se muestra, una molécula de mPEG-OH reacciona con un acrilato de terc-butilo sustituido en el carbono α , como se describe con mayor detalle a continuación. Se utiliza un haluro de amonio cuaternario como se describe en la reivindicación 1 activado con KOH como catalizador para la etapa de adición de Michael. El ácido trifluoroacético ("TFA") se utiliza en una etapa de hidrólisis promovida por ácido para eliminar el grupo protector terc-butilo. En el Esquema de reacción I, "Me" representa metilo, "n" representa el número de monómeros de óxido de etileno que se repiten, "t-Bu" representa t-butilo y R_2 es como se define en la Sección II.B.



En el siguiente Esquema de Reacción II ilustrativo, se describe un método de acuerdo con la invención que incluye la formación de un éster de NHS activo a continuación de la purificación del polímero funcionalizado con ácido propiónico.



Esquema de Reacción II

Como se explica más detalladamente a continuación, la sustancia de partida de alcohol polimérico es un poli(etilenglicol) que tiene cualquiera de una amplia variedad de configuraciones geométricas (p. ej., lineal, ramificada, bifurcada, etc.). Por motivos de simplicidad, los esquemas de reacción anteriores ilustran el uso de un polímero monofuncional que tiene un solo grupo hidroxilo. Sin embargo, el polímero puede comprender más de un grupo hidroxilo, tal como de 1 a aproximadamente 25 grupos hidroxilo (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más grupos hidroxilo).

Si se utiliza metoxi-PEG-OH como materia prima, como se muestra en el Esquema de Reacción II, este procedimiento produce el éster activo con el impacto de la cadena principal del polímero. Es decir, no hay una escisión observable de la cadena a partir de la hidrólisis catalizada por ácido del éster. Si bien no desea estar sujeto a ninguna teoría, se cree que la ausencia de escisión de la cadena es el resultado del uso de temperaturas relativamente reducidas y un ácido orgánico más suave, tal como el ácido trifluoroacético, seguido de un tratamiento alcalino. Esta falta de escisión de la cadena y especialmente la falta de desmetilación terminal (lo que da como resultado una falta de producto desmetilado), da como resultado una diferencia y ventaja significativas sobre los polímeros terminados en ácido propiónico (y los correspondientes ésteres activos) preparados de acuerdo con el procedimiento descrito en el Patente de Estados Unidos Núm. 5.672.662. Además, los productos conjugados preparados a partir de reactivos activos derivados de PEG-ácido propiónico fabricados utilizando la Patente de Estados Unidos Núm. 5.672.662 resultarían desfavorecidos en comparación con los productos conjugados preparados utilizando el presente método.

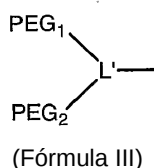
A. Polímeros de poli(etilenglicol)

El polímero es poli(etilenglicol) PEG. El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de una serie de geometrías o formas, incluidas formas lineales (p. ej., metoxi-PEG-OH, benciloxi-PEG-OH o HO-PEG-OH), ramificadas o formas de múltiples brazos (p. ej., PEG bifurcados o PEG unidos a un núcleo de poliol), PEG colgante o PEG con enlaces degradables, que se describen más detalladamente a continuación.

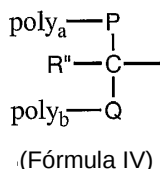
El polímero comprende al menos un grupo hidroxilo capaz de reaccionar con un reactivo de acrilato de alquilo terciario en una reacción de adición de Michael. Además de uno o más grupos hidroxilo, el polímero puede comprender otros grupos funcionales que no interferirían en la reacción de adición de Michael, tal como el acetal de un aldehído que tiene una longitud de carbono de 1 a 25 carbonos (p. ej., acetaldehído, propionaldehído y butiraldehído), alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, hidrazida, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxal, biotina, diona, mesilato, mesilato, tosilato, y tresilato.

El número de grupos hidroxilo portados por el polímero y la posición de los grupos funcionales puede variar. Típicamente, el polímero comprenderá de 1 a aproximadamente 25 grupos hidroxilo, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grupos hidroxilo. Los polímeros de PEG lineales comprenderán típicamente uno o dos grupos hidroxilo situados en el extremo de la cadena de polímero. Si el polímero de PEG es monofuncional (es decir, mPEG), el polímero incluirá un solo grupo hidroxilo. Si el polímero PEG es difuncional, el polímero puede contener dos grupos hidroxilo, uno en cada extremo de la cadena del polímero, o puede contener un solo grupo hidroxilo y un grupo funcional diferente en el extremo opuesto. Como se entenderá, los polímeros de múltiples brazos o ramificados pueden comprender un mayor número de grupos hidroxilo.

También se pueden utilizar moléculas de PEG de múltiples brazos o ramificadas, tales como las que se describen en Patente de Estados Unidos Núm. 5.932.462, como polímero PEG. En términos generales, un polímero de múltiples brazos o ramificado posee dos o más "brazos" de polímero que se extienden desde un punto de ramificación central. Por ejemplo, un polímero de PEG ramificado ilustrativo tiene la estructura:

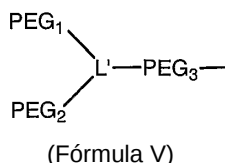


en donde PEG₁ y PEG₂ son polímeros de PEG en cualquiera de las formas o geometrías descritas en la presente memoria, y que pueden ser iguales o diferentes, y L' es un enlace hidrolíticamente estable. Un ejemplo de PEG ramificado de Fórmula III tiene la estructura:



en donde poly_a y poly_b son esqueletos de PEG, tales como metoxi poli(etilenglicol); R'' es un radical no reactivo, tal como H, metilo o una cadena principal de PEG; y P y Q son enlaces no reactivos. En una realización preferida, el polímero de PEG ramificado es lisina disustituida con metoxi poli(etilenglicol).

La estructura de PEG ramificada de Fórmula IV se puede unir a un tercer oligómero o cadena de polímero como se muestra a continuación:



en donde PEG₃ es un tercer oligómero o cadena de polímero de PEG, que puede ser igual o diferente de PEG₁ y PEG₂.

En otra realización de múltiples brazos, el polímero comprende una molécula núcleo central derivada de un poliol o poliamina, la molécula núcleo central proporciona una pluralidad de sitios de anclaje adecuados para anclar covalentemente los brazos del polímero a la molécula núcleo para formar una estructura polimérica de múltiples brazos. Un polímero de múltiples brazos ilustrativo de este tipo tiene la estructura:



en donde:

R es la cadena de hidrocarbonada de la molécula núcleo de poliol o poliamina, que típicamente comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 150 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 50 átomos de carbono, y lo más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10), opcionalmente sustituidos con uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, S o N) en la cadena hidrocarbonada, y que puede ser lineal o cíclica;

L'' es una unión formada a partir de la reacción del poliol o la molécula núcleo de poliamina con los brazos del polímero (p. ej., -O- o -NH-C(O)-), y puede servir como un radical espaciador;

PEG es un segmento de polímero de poli(etilenglicol); y

q es un número entero de 3 a aproximadamente 25, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 10, lo más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8 (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7 u 8).

La molécula núcleo central en la realización de múltiples brazos descrita anteriormente se deriva de una molécula que proporciona un número de sitios de anclaje de polímeros igual al número deseado de brazos de poli(etilenglicol). Preferiblemente, la molécula núcleo central de la estructura del polímero de múltiples brazos es el residuo de un poliol o una poliamina que contiene al menos tres grupos hidroxilo o amino disponibles para la unión del polímero. Un "poliol" es una molécula que comprende una pluralidad de grupos hidroxilo disponible. Una "poliamina" es una molécula que comprende una pluralidad de grupos amino disponibles. Dependiendo del número deseado de brazos de polímero, el poliol o poliamina comprenderán típicamente de 3 a aproximadamente 25 grupos hidroxilo o amino, preferiblemente de 3 a aproximadamente 10, lo más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8 (p. ej., 3, 4, 5, 6, 7,

o 8). El poliol o poliamina puede incluir otros grupos funcionales protegidos o desprotegidos sin apartarse de la invención. Aunque la separación entre los grupos hidroxilo o amino variará, típicamente hay de 1 a aproximadamente 20 átomos, tales como átomos de carbono, entre cada grupo hidroxilo o amino, preferiblemente de 1 a aproximadamente 5. El poliol o poliamina elegidos dependerán del número deseado de grupos hidroxilo o amino necesarios para el anclaje a los brazos poliméricos.

El núcleo de poliol o poliamina tendrá típicamente la estructura $R-(OH)_p$ o $R-(NH_2)_p$ antes de la reacción con los brazos del polímero, en donde R es una cadena hidrocarbonada, que típicamente comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 150 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 50 átomos de carbono, y lo más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10), opcionalmente sustituidos con uno o más heteroátomos (por ejemplo, O, S o N) en la cadena hidrocarbonada, y que puede ser lineal o cíclica, y p es el número de grupos hidroxilo o amino y es típicamente de 3 a aproximadamente 25, preferiblemente de 3 a aproximadamente 10, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8 (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7 u 8).

Los polioles que son adecuados para su uso como núcleo de polímero son casi ilimitados. Se pueden utilizar polioles alifáticos que tienen de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono y de 1 a aproximadamente 10 grupos hidroxilo, incluyendo etilenglicol, alcanodiolos, alquilglicoles, alquilidenoalquildiolos, alquilocicloalcanodiolos, 1,5-decalindiol, 4,8-bis(hidroxiometil)triciclododecano, cicloalquilidendiolos, dihidroxialcanos, trihidroxialcanos y similares. También se pueden emplear polioles cicloalifáticos, incluyendo azúcares de cadena lineal o de anillo cerrado y alcoholes de azúcares, tales como manitol, sorbitol, inositol, xilitol, quebraquitol, treitol, arabitól, eritritol, adonitol, dulcitol, facosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, ramnosa, galactosa, glucosa, fructosa, sorbosa, manosa, piranosa, altrosa, talosa, tagitosa, piranosida, sacarosa, lactosa, maltosa, y similares. Más ejemplos de polioles alifáticos incluyen derivados de gliceraldehído, glucosa, ribosa, manosa, galactosa y estereoisómeros relacionados. También se pueden utilizar polioles aromáticos, tales como 1,1,1-tris(4'-hidroxifenil)alcanos, tales como 1,1,1-tris(4'-hidroxifenil)etano, (1,3-adamantanodiol)difenol, 2,6-bis(hidroxialquil)cresoles, 2,2'-alquilen-bis(6-t-butil-4-alquifenoles), 2,2'-alquilen-bis(t-butilfenoles), catecol, alquilocatecoles, pirogalol, fluoroglicinol, 1,2,4-bencenotriol, resorcinol, alquilresorcinol, dialquilresorcinol, monohidrato de orcinol, olivetol, hidroquinona, alquilhidroquinonas, 1,1-bi-2-naftol, fenilhidroquinonas, dihidroxinaftalenos, 4,4'-(9-fluoreniliden)-difenol, antrarobina, ditranol, bis(hidroxifenil)metanobifenoles, dialquilestilbesteroles, bis(hidroxifenil)alcanos, bisfenol-A y sus derivados, meso-hexesterol, ácido nordihidroguayarático, calixarenos y derivados de los mismos, ácido tánico y similares. Otros polioles núcleo que se pueden utilizar incluyen éter corona, ciclodextrinas, dextrinas y otros carbohidratos (p. ej., monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, almidones y amilasas).

Los polioles preferidos incluyen glicerol, azúcares tales como sorbitol o pentaeritritol, y oligómeros de glicerol, tales como hexaglicerol. Un polímero de 21 brazos se puede sintetizar utilizando hidroxipropil- β -ciclodextrina, que tiene 21 grupos hidroxilo disponibles.

Las poliaminas ilustrativas incluyen poliaminas alifáticas tales como dietilentriamina, N,N',N''-trimetildietilentriamina, pentametildietilentriamina, trietilentetramina, tetraetilenpentamina, pentaetilenhexamina, dipropilentriamina, tripropilentetramina, bis-(3-aminopropil)-amina, bis-(3-aminopropil)-metilamina y N,N-dimetil-dipropilen-triamina. Las poliaminas de origen natural que se pueden utilizar en la presente invención incluyen putrescina, espermidina y espermina. Numerosos análogos adecuados de pentaminas, tetraminas, oligoaminas y pentamidina adecuados para su uso en la presente invención son descritos por Bacchi et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, enero de 2002, pág. 55-61, vol. 46, Núm. 1.

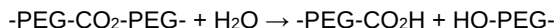
El polímero de PEG puede comprender alternativamente un PEG bifurcado. En términos generales, un polímero que tiene una estructura bifurcada se caracteriza por tener una cadena polimérica anclada a dos o más grupos funcionales a través de uniones covalentes que se extienden desde un punto de ramificación hidrolíticamente estable en el polímero. Un ejemplo de un PEG bifurcado está representado por $PEG-YCH(-L-Z)_2$, donde Y es un grupo conector y Z es un grupo terminal activado para el anclaje covalente a un agente biológicamente activo. El grupo Z está unido a CH por un conector, L, que es una cadena de átomos de longitud definida. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.362.254, describe diversas estructuras de PEG bifurcadas que se pueden utilizar en la presente invención. La cadena de átomos, L, que une los grupos funcionales Z (p. ej., grupos hidroxilo) al átomo de carbono ramificado sirve como grupo de enlace y puede comprender, por ejemplo, una cadena de alquilo, una unión éter, una unión éster, una unión amida o combinaciones de los mismos.

El polímero de PEG puede comprender una molécula de PEG colgante que tiene grupos reactivos (por ejemplo, grupos hidroxilo) anclados covalentemente a lo largo de la cadena principal de PEG en lugar de al final de la cadena de PEG. Los grupos reactivos colgantes se pueden anclar al esqueleto de PEG directamente o a través de un radical conector, tal como un grupo alquileo.

Aunque menos preferido, además de las formas de PEG descritas anteriormente, el polímero también puede prepararse con una unión enzimáticamente degradable o una o más uniones hidrolíticamente estables o

degradables en el esqueleto del polímero, incluyendo cualquiera de los polímeros descritos anteriormente. Por ejemplo, el PEG se puede preparar con uniones éster en el esqueleto del polímero que están sujetos a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis produce la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular:

5



10

Otras uniones hidrolíticamente degradables, útiles como uniones degradables dentro de una cadena principal de polímero, incluyen uniones carbonato; uniones imina resultantes, por ejemplo, de la reacción de una amina y un aldehído (véase, p. ej., Ouchi et al., Polymer Preprints, 38(1):582-3 (1997)), uniones éster fosfato formadas, por ejemplo, haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; uniones hidrazona que se forman típicamente por reacción de una hidrazida y un aldehído; uniones acetal que se forman típicamente por reacción entre un aldehído y un alcohol; uniones orto éster que se forman, por ejemplo, por reacción entre derivados ácido y un alcohol; y uniones oligonucleotídicos formados por, por ejemplo, un grupo fosforamidita, p. ej., al final de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

15

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

20

Se pueden incorporar diferentes polímeros al mismo esqueleto de polímero. Por ejemplo, una o más de las moléculas de PEG en las estructuras ramificadas mostradas en las Fórmulas III-VI se pueden reemplazar por un tipo de polímero diferente. Cualquier combinación de polímeros solubles en agua y no peptídicos está incluida dentro de la presente invención.

25

El peso molecular del poli(etilenglicol) variará dependiendo de la aplicación deseada, la configuración de la estructura del polímero, el grado de ramificación y similares. En general, los polímeros que tienen un peso molecular de 10.000 Da a 100.000 Da son útiles en la presente invención, preferiblemente de 10.000 Da a 60.000 Da, y más preferiblemente de 10.000 Da a 40.000 Da. Las realizaciones de polímeros ilustrativos tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 Da, 15.000 Da, 20.000 Da, 25.000 Da, 30.000 Da, 35.000 Da y 40.000 Da.

30

Los pesos moleculares promedio útiles de peso de los polímeros incluyen 10.000 Da, 11.000 Da, 12.000 Da, 12.500 Da, 15.000 Da, 20.000 Da, 25.000 Da, 30.000 Da, 40.000 Da, 50.000 Da, 60.000 Da, 70.000 Da, 75.000 Da, 80.000 Da, 85.000 Da, 90.000 Da, 100.000 Da, 120.000 Da.

35

Con respecto a las versiones ramificadas individualmente del polímero, los intervalos ilustrativos de tamaños útiles para el peso molecular total del polímero (basados esencialmente en los pesos combinados de las dos porciones de polímero soluble en agua) incluyen lo siguiente: de 10.000 Da a 40.000 Da. Más concretamente, el peso molecular promedio en peso total de una versión ramificada del polímero de la invención corresponde a uno de los siguientes: 10.000; 15.000; 20.000; 30.000; 40.000; 50.000; 60.000 o 80.000.

40

B. Reactivo de acrilato de alquilo terciario

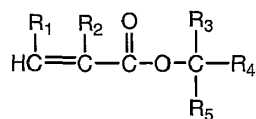
45

El acrilato de alquilo terciario puede estar sustituido en α o β . Los grupos sustituyentes ilustrativos incluyen halo, alquiltio, acilo, aciloxi, nitro, ciano, azido, trihalometilo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquilo, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido. El acrilato de alquilo terciario está preferiblemente sin sustituir en el carbono β . El reactivo de acrilato está ventajosamente sustituido en el carbono α con un grupo alquilo o arilo que proporciona un impedimento estérico al grupo ácido carboxílico final. Como se ilustra en Patente de Estados Unidos Núm. 6.495.659, los efectos estéricos de una cadena lateral anclada al carbono α pueden afectar favorablemente la estabilidad hidrolítica de los productos conjugados de fármacos formados utilizando el ácido polimérico. En una realización preferida, el acrilato de alquilo terciario está sustituido en α o β , preferiblemente sustituido en α con metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo o bencilo.

50

En una realización, el acrilato de alquilo terciario tiene la estructura:

55



(Fórmula I)

en donde:

60

R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquiltio,

acilo, aciloxi, nitro, ciano, azido, trihalometilo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, arilo, arilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y R_3 - R_5 son cada uno independientemente alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido.

5 Preferiblemente, R_3 , R_4 y R_5 , son cada uno metilo, etilo o fenilo, y R_1 y R_2 son hidrógeno o R_1 es hidrógeno y R_2 es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo o bencilo. En una realización preferida, el grupo alquilo terciario es terc-butilo (es decir, cada uno de R_3 - R_5 es metilo). Otros ejemplos de grupos alquilo terciarios incluyen terc-amilo, α,α' -dimetilbencilo, tritilo, 1-adamantilo y 2-metil-2-adamantilo.

10 Los acrilatos de alquilo terciarios preferidos incluyen acrilato de terc-butilo y metacrilato de terc-butilo, que están disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, Mo. Otros ejemplos de acrilatos de alquilo terciarios incluyen ésteres terc-butilílicos de ácido crotónico o ácido isocrotónico. Adicionalmente, otros acrilatos o metacrilatos de alquilo terciario o cicloalquilo terciario son adecuados para su uso en la presente invención.

15 C. El polímero que porta al menos un grupo ácido propiónico

Siguiendo el método descrito en la presente memoria, el poli(etilenglicol) portará al menos un grupo ácido propiónico terminal. Un polímero ilustrativo corresponderá a la siguiente estructura:

20
$$\text{POLI-CHR}_1\text{-CHR}_2\text{-COOH} \quad (\text{Fórmula VII})$$

en donde POLI es el residuo de PEG y R_1 y R_2 (como se comentó anteriormente en la Sección II.B) se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquiltio, acilo, aciloxi, nitro, ciano, azido, trihalometilo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, arilo, arilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido. PEG [p. ej., " $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ " o " $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-$ "] es un POLY particularmente preferido y se describe anteriormente en la Sección II.A. En una o más realizaciones, se prefieren las versiones ramificadas del polímero.

Si se desea, el poli(etilenglicol) funcionalizado con ácido propiónico se puede modificar adicionalmente para formar derivados reactivos útiles de ácidos carboxílicos utilizando una metodología conocida en la técnica. Por lo tanto, la invención incluye polímeros obtenibles de y/u obtenidos a partir de los polímeros funcionalizados con ácido propiónico descritos. Por ejemplo, el ácido carboxílico se puede derivatizar adicionalmente para formar haluros de acilo, pseudohaluros de acilo, tales como cianuro de acilo, isocianato de acilo y azida de acilo, sales neutras, tales como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos (p. ej., calcio, sodio o sales de bario), ésteres, anhídridos, amidas, imidas, hidrazidas y similares. Además, el ácido carboxílico se puede reducir para formar un aldehído, ya sea directamente a partir del ácido carboxílico utilizando un agente reductor adecuado, o indirectamente a través de una amida, nitrilo o éster utilizando un agente reductor adecuado. Además, el ácido o ciertos polímeros funcionalizados, p. ej. los ésteres activos, se pueden utilizar como intermedios para reaccionar con reactivos apropiados u otras moléculas pequeñas o especies poliméricas cortas para formar derivados reactivos adicionales, tales como maleimidas, tioles, disulfuros reactivos, acetales, aldehídos y similares.

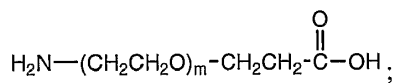
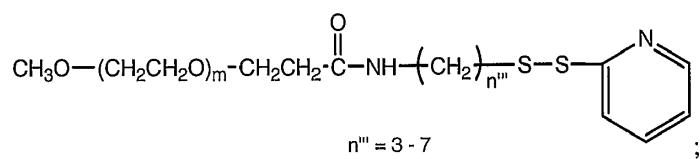
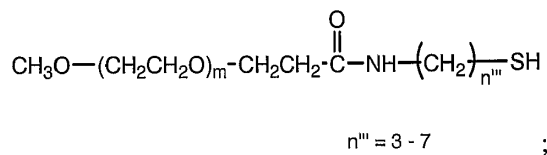
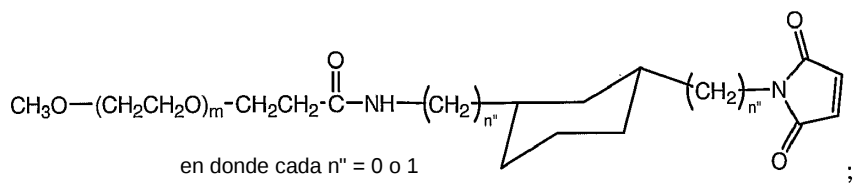
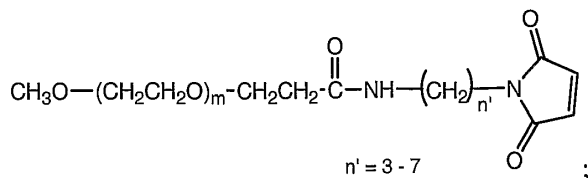
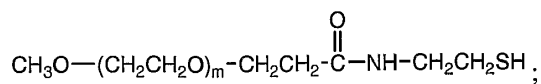
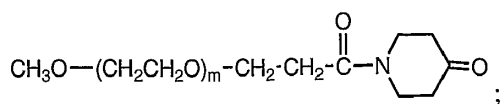
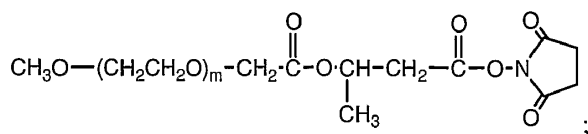
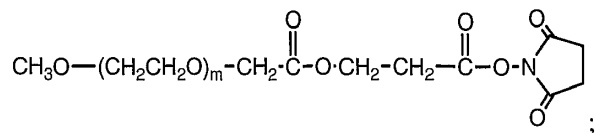
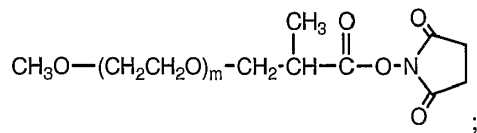
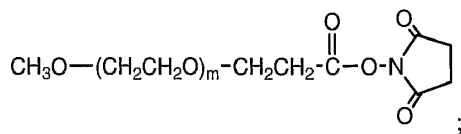
En una realización preferida, el ácido propiónico se esterifica para formar un éster activo, tal como un éster de N-hidroxisuccinimidilo, éster de o-, m- o p-nitrofenilo, éster de 1-hidroxibenzotriazol, éster de imidazol o éster de N-hidroxisulfosuccinimidilo. El ácido propiónico o derivado reactivo del mismo anclado al poli(etilenglicol) tiene preferiblemente la estructura:

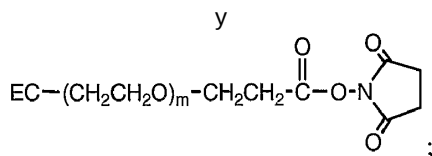
45
$$-\text{CHR}_1\text{-CHR}_2\text{-C(O)-Y} \quad (\text{Fórmula VIII})$$

en donde R_1 y R_2 (como comentó anteriormente en la Sección II.B) cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquiltio, acilo, aciloxi, nitro, ciano, azido, trihalometilo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, arilo, arilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, e Y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, amino sustituido, -NCO, -NCS, N_3 , -CN, y -O-R', en donde R' es N-succinimidilo, nitrofenilo, benzotriazolilo, imidazolilo, N-sulfosuccinimidilo, N-ftalimidilo, N-glutarimidilo, N-tetrahidroftalimidilo, N-norborneno-2,3-dicarboximidilo, e hidroxilo-7-azabenzotriazolilo.

En una realización, Y es un amino sustituido que tiene la estructura -NHR₆, en donde R₆ es cualquier grupo orgánico que puede contener grupos funcionales reactivos adicionales (p. ej., aldehído, maleimida, mercapto y similares) y donde el grupo o los grupos funcionales adicionales están separados del carbono carbonílico por una cadena de alquilenos (p. ej., cadena de alquilenos C1-C6) y, opcionalmente, un conector adicional, tal como una cadena corta de PEG y otra cadena de alquilenos (p. ej., alquilenos-PEG-alquilenos).

Los polímeros ilustrativos que se pueden preparar a través de los polímeros funcionalizados con ácido propiónico descritos incluyen los siguientes:





en donde m se define como en la Sección II.A, anterior, y EC es un residuo de un radical seleccionado del grupo que consiste en fluoresceína, biotina, acrilato, vinilsulfona, maleimida, terc-butilcarbonilo (t-Boc), y fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc).

En algunas situaciones, se prefiere que el polímero que porta un ácido propiónico no sea ácido metoxi PEG propiónico que tenga un peso molecular promedio en peso de 20.000 Da [es decir, $\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$, en donde m no da como resultado un peso molecular promedio en peso de 20.000 Da], ni ácido metoxi PEG propiónico que tiene un peso molecular promedio en peso de 30.000 Da [es decir, $\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$, en donde m no da como resultado un peso molecular promedio en peso de 30.000 Da]. Además, en algunas situaciones, se prefiere que el polímero que contiene un ácido propiónico no sea ácido metoxi PEG (u otro polímero) propiónico que tenga un peso molecular promedio en peso de entre 17.500 y 22.500 Da, ni ácido metoxi PEG propiónico que tenga un peso molecular promedio en peso de entre 27.500 Da y 32.500 Da. En otras situaciones más, se prefiere que el peso molecular promedio en peso del ácido metoxi PEG propiónico sea mayor que 35.000 Da. Los polímeros preferidos que portan un ácido propiónico comprenden estructuras ramificadas (es decir, ramificadas individualmente o multi-ramificadas) como se ha descrito anteriormente.

C. Moléculas biológicamente activas para su conjugación.

El poli(etilenglicol) terminado en ácido propiónico producido por el método de la invención, o un derivado reactivo del mismo, se pueden utilizar para formar productos conjugados con moléculas biológicamente activas, particularmente moléculas biológicamente activas que portan grupos funcionales nucleófilos, tales como grupos amino. Tales productos conjugados poliméricos se pueden formar utilizando técnicas conocidas para el anclaje covalente de un polímero activado, tal como un PEG activado, a un agente biológicamente activo (Véase, por ejemplo, POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, American Chemical Society, Washington, DC (1997)).

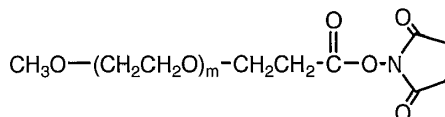
Con respecto a los polímeros utilizados en la conjugación, los derivados de polímeros activados de forma electrófila, tales como los ésteres activos, son útiles para la conjugación con grupos amino en proteínas u otras moléculas biológicamente activas. La conjugación de un polímero que porta un éster de ácido carboxílico activo con un grupo amino en una molécula biológicamente activa da como resultado la formación de un enlace amida estable entre el polímero y la molécula biológicamente activa.

Un agente biológicamente activo para utilizar en el acoplamiento al polímero formado por el método de la invención puede ser uno cualquiera o más de los siguientes. Los agentes adecuados pueden seleccionarse entre, por ejemplo, hipnóticos y sedantes, estimulantes psíquicos, tranquilizantes, medicamentos respiratorios, anticonvulsivos, relajantes musculares, agentes antiparkinsonianos (antagonistas de dopamina), analgésicos, antiinflamatorios, medicamentos contra la ansiedad (ansiolíticos), supresores del apetito, agentes antimigraña, agentes musculares, antiinfecciosos (antibióticos, antivirales, antifúngicos, vacunas), antiartríticos, antipalúdicos, antieméticos, anepilépticos, broncodilatadores, citoquinas, factores de crecimiento, agentes anticancerosos, agentes antitrombóticos, antihipertensivos, fármacos cardiovasculares, antiarrítmicos, antioxidantes, agentes antiasmáticos, agentes hormonales que incluyen anticonceptivos, simpaticomiméticos, diuréticos, agentes reguladores de lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasitarios, anticoagulantes, neoplásticos, antineoplásticos, hipoglucemiantes, agentes nutricionales y suplementos, suplementos de crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico y agentes contraste.

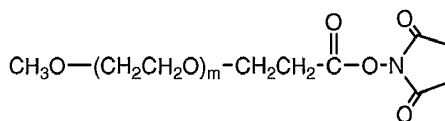
Los ejemplos de agentes activos adecuados para su uso en la unión covalente a un polímero preparado por el método de la invención incluyen, entre otros, calcitonina, eritropoyetina (EPO), Factor VIII, Factor IX, Ceredase, cerezima, ciclosporina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de la proteinasa alfa-1, elcatonina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), hormona del crecimiento, hormona del crecimiento humana (HGH), hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), heparina, heparina de bajo peso molecular (LMWH), interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleucina-1 receptor, interleucina-2, antagonista del receptor de interleucina-1, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-6, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), factor IX insulina, proinsulina, análogos de insulina (p. ej., Insulina monoacilada como se describe en Patente de Estados Unidos Núm. 5.922.675), amilina, péptido C, somatostatina, análogos de la somatostatina que incluyen octreotida, vasopresina, hormona estimulante del folículo (FSH), factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), insulintropina, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento tisular, factor de crecimiento de queratinocitos

(KGF), factor de crecimiento glial (GGF), factor de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento endotelial, hormona paratiroidea (PTH), péptido similar a glucagón timosina alfa 1, inhibidor de IIb/IIIa, antitripsina alfa-1, compuestos de fosfodiesterasa (PDE), inhibidores de VLA-4, bifosfonatos, anticuerpo del virus sincitial respiratorio, gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (ADNasa), proteína bactericida/potenciadora de la permeabilidad (BPI), anticuerpo anti-CMV, ácido 13-cis retinoico, macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davericina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, leucomicina, miocamicina, roquitamicina, andazitromicina, y suinholida A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trovafloxacina, alatrofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, lomefloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, pefloxacina, amifloxacina, fleroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina, y sitafloxacina, aminoglicósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amikacina, kanamicina, neomicina, y estreptomina, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato, polimixinas tales como polimixina B, capreomicina, bacitracina, penemos; penicilinas incluyendo agentes sensibles a penicilinas como penicilina G, penicilina V, agentes resistentes a la penicilinas como metilicina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos contra microorganismos gram negativos como ampicilina, amoxicilina, y hetacilina, cilina, y galampicilina; penicilinas antipseudomonadales como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, y piperacilina; cefalosporinas como cefpodoxima, cefprozil, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradria, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxilo, cefaloglicina, cefuroxima, ceforanida, cefotaxima, cefatrizina, cefacetilo, cefepima, cefixima, cefonicida, cefoperazona, cefotetan, cefmetazol, ceftazidima, loracarbef, y moxalactama, monobactamas como aztreonam; y carbapenemos tales como imipenemo, meropenemo, isetionato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaína, sulfato de metaproterenol, dipropionato beclometasona, acetónido de triamcinolona, acetónido de budesonida, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolina sódica, tartrato de ergotamina y cuando sean aplicables, análogos, agonistas, antagonistas, inhibidores y formas de sal farmacéuticamente aceptables de los anteriores. Con referencia a péptidos y proteínas, se pretende que la invención abarque formas PEGiladas sintéticas, nativas, glicosiladas, no glicosiladas, y fragmentos biológicamente activos y análogos de las mismas.

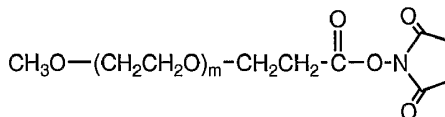
Por lo tanto, la invención incluye una composición que comprende un producto conjugado de un poli(etilenglicol) terminado en ácido propiónico (o un derivado reactivo del mismo) y una molécula biológicamente activa en la que el poli(etilenglicol) terminado en ácido propiónico se prepara de acuerdo con método descrito en la presente memoria. Así, por ejemplo, el producto conjugado en la composición puede formarse haciendo reaccionar



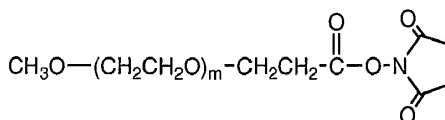
con un interferón, en donde m se define como en la Sección II.A. Además, el producto conjugado en la composición puede formarse haciendo reaccionar



con un receptor del factor de necrosis tumoral TNFR, donde m se define como en la Sección II.A. Adicionalmente, el producto conjugado en la composición puede formarse haciendo reaccionar

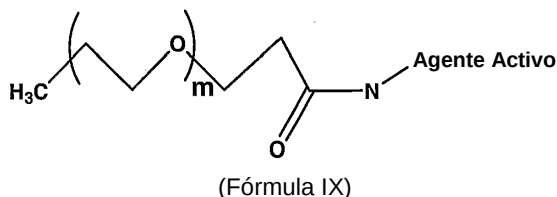


con eritropoyetina, donde m se define como en la Sección II.A. Además, el producto conjugado en la composición puede formarse haciendo reaccionar



con hormona de crecimiento humana, en donde m se define como en la Sección II.A. Las variantes y los

compuestos miméticos del interferón, TNFR, eritropoyetina y hormona de crecimiento humana se pueden sustituir como el agente biológicamente activo en estos productos conjugados. Un producto conjugado ilustrativo comprenderá una estructura correspondiente a la Fórmula IX:



en donde el agente activo representa un residuo de un agente activo que contiene amina y m se define como en la Sección II.A.

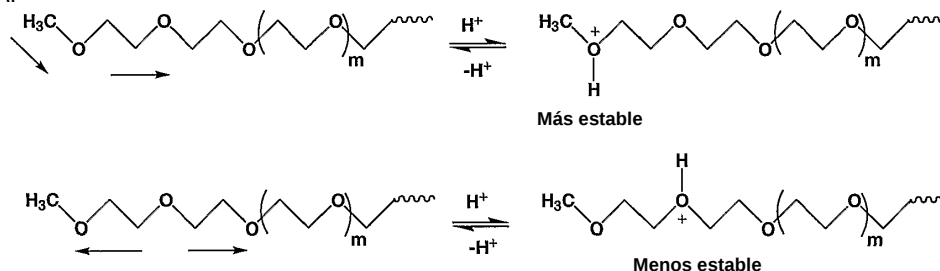
Debido a que las composiciones incluyen productos conjugados preparados a partir de poli(etilenglicol) terminado en ácido propiónico formado por el método descrito actualmente, que da como resultado una reducción de la degradación y la escisión de la cadena del esqueleto del polímero, los productos conjugados y las composiciones resultantes también tienen una disminución de la degradación y una escisión de la cadena del esqueleto del polímero, al menos en comparación con los productos conjugados preparados a partir de polímeros terminados en ácido propiónico (o derivados reactivos de los mismos) preparados por métodos alternativos (es decir, métodos diferentes del método descrito actualmente para sintetizar polímeros terminados en ácido propiónico, o derivados reactivos de los mismos).

En particular, el método descrito actualmente inesperada y ventajosamente proporciona poli(etilenglicol) terminado en ácido propiónico (así como derivados reactivos y productos conjugados) que son más puros como resultado de la disminución de la degradación y la escisión de la cadena. El método mejora particularmente la pureza cuando el polímero terminado en ácido propiónico comprende poli(óxido de etileno) terminado en ácido propiónico que porta una protección terminal de metoxi.

Por ejemplo, un poli(óxido de etileno) terminado en ácido propiónico que tiene una protección terminal de metoxi [p. ej., $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$] comprende grupos éter, teniendo cada grupo éter un átomo de oxígeno con cierta sensibilidad a la escisión mediante un ataque nucleofílico. Si bien no desea estar sujeto a ninguna teoría, parece que al menos por tres razones, el grupo éter más sensible en el polímero propenso a escindirse es el grupo éter asociado con la protección terminal de metoxi.

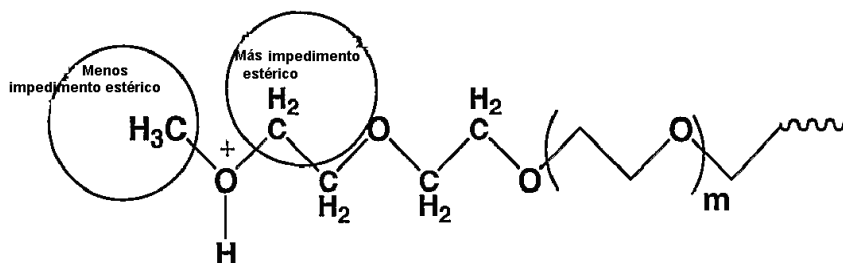
En primer lugar, por razones de accesibilidad, el grupo éter asociado con la protección terminal de metoxi es el más expuesto y, por lo tanto, está relativamente disponible para un ataque nucleofílico que escinde la cadena. En segundo lugar, el oxígeno en el grupo éter asociado con la protección terminal de metoxi es más alcalino que los oxígenos en los grupos éter asociados con los monómeros de óxido de etileno que se repiten. Esto es así porque los oxígenos en los grupos éter asociados con los monómeros de óxido de etileno que se repiten tienen el beneficio de dos oxígenos de éter próximos (y sus efectos de captación de electrones), mientras que el oxígeno asociado con la protección terminal de metoxi tiene solo un único oxígeno de éter próximo. En tercer lugar, mientras que el oxígeno en el grupo éter más cercano al grupo ácido carboxílico también tiene un solo oxígeno de éter próximo, este oxígeno se beneficia del grupo de ácido carboxílico próximo y que mejora la estabilidad que sirve como sumidero de electrones.

El análisis anterior se puede ilustrar en el Esquema A, donde las flechas en las estructuras de la izquierda muestran los efectos de la donación y la captación de electrones de los grupos anclados y las estructuras de la derecha se comparan para determinar la estabilidad relativa de las formas protonadas. En el Esquema A, m se define como en la Sección II.A.



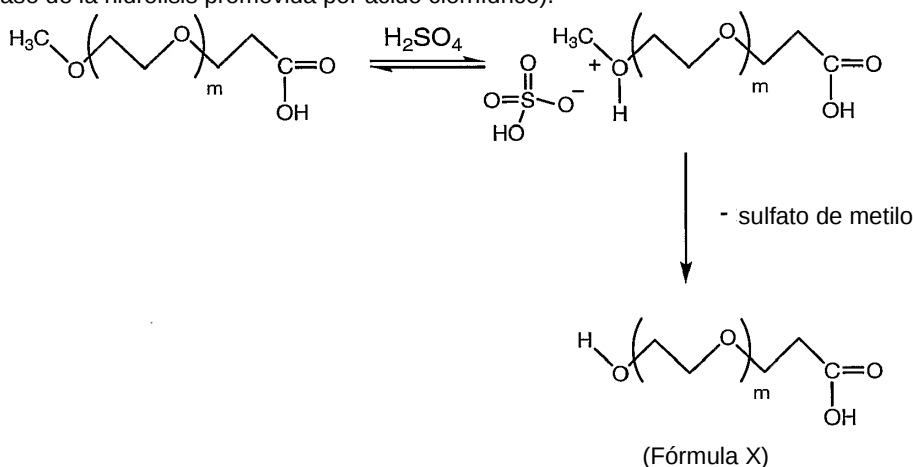
De nuevo, aunque no se desea estar sujeto a ninguna teoría, se cree que de las dos estructuras de la derecha en el

esquema anterior, es más probable que un nucleófilo ataque por un desplazamiento nucleofílico trasero en el carbono en el oxígeno del metoxi protonado (arriba, estructura de la derecha en el esquema anterior). Las razones de esta preferencia incluyen un menor grado de impedimento estérico en el grupo metilo (favoreciendo así el desplazamiento del grupo metilo) y un mayor grado de impedimento estérico dentro de la cadena principal del polímero, como se muestra en el Esquema B. En el Esquema B, m se define como en la Sección II.A.



Esquema B

Así, por ejemplo, si un anión sulfato de hidrógeno es el nucleófilo que producirá la escisión de la cadena, se cree que la vía favorecida para la escisión es la pérdida del grupo metilo de la protección terminal de metoxi. Véase el Esquema C, en donde m se define como en la Sección II.A. Este procedimiento conducirá a la formación de una protección terminal de hidroxilo en lugar de la protección terminal de metoxi (un "polímero desmetilado"). No se observó ni se informó sobre esta impureza del producto secundario con protección terminal de hidroxilo en el método "basado en nitrilo" descrito en Patente de Estados Unidos Núm. 5.672.662 debido a que el polímero con protección terminal de hidroxilo tiene esencialmente las mismas propiedades de retención de la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") que las correspondientes especies con protección terminal de metoxi correspondientes, ya que cada una tiene esencialmente el mismo peso molecular. Se recordará que el método "basado en nitrilo" descrito para preparar polímeros terminados en ácido propiónico en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.672.662 requiere el uso de condiciones relativamente rigurosas tales como uno o más de (a) uso de ácidos minerales concentrados fuertes como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, (b) altas temperaturas y (c) tiempos de reacción muy prolongados (más de 30 horas en el caso de la hidrólisis promovida por ácido clorhídrico).



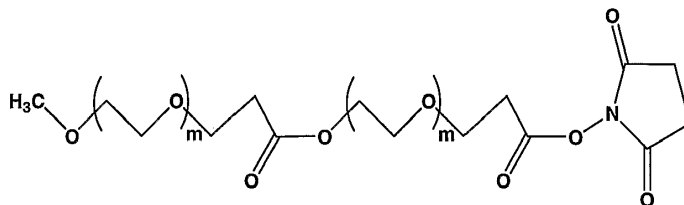
(Fórmula X)

Esquema C

Se prefiere, en ese caso, que una composición descrita en la invención esté sustancialmente libre de impurezas de productos secundarios que porten una protección terminal de hidroxilo (p. ej., sustancialmente libre de especies de HO-(CH₂CH₂O)_m-CH₂CH₂COOH). A este respecto, una composición que está sustancialmente libre de impurezas de productos secundarios que porten una protección terminal de hidroxilo contendrá menos de aproximadamente 15% en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente 10% en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente 5% en peso, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 3% en peso, aún más preferiblemente todavía menos de aproximadamente 2% en peso de impurezas de productos secundarios que portan una protección terminal de hidroxilo, siendo más preferido menos de aproximadamente 1% en peso.

La impureza de producto secundario, que porta una protección terminal de hidroxilo como se muestra en la Fórmula X, puede introducir especies no deseadas adicionales en una composición. En particular, una impureza que contiene la protección terminal de hidroxilo (como la que se muestra en la Fórmula X) puede (i) competir con un componente reactivo de otra molécula (p. ej., el grupo hidroxilo de un reactivo utilizado para formar derivados de polímeros), y/o (ii) finalmente, dar como resultado una o más especies de productos conjugados terminados en hidroxilo.

La impureza del producto secundario (como la que se muestra en la Fórmula X) puede reaccionar con otras moléculas para formar especies adicionales que no se desea que estén presentes en la composición. Por ejemplo, durante la esterificación para formar un éster reactivo, la impureza del producto secundario que porta una protección terminal de hidroxilo competirá con el grupo hidroxilo del reactivo de N-hidroxisuccinimida formador de éster, formando así una especie dimérica en la que se unen dos polímeros. Esta reacción no pretendida se produce cuando, por ejemplo, una impureza del producto secundario correspondiente a la Fórmula X está presente en la mezcla de reacción, dando como resultado la formulación de la especie dimérica mostrada en la Fórmula XI:

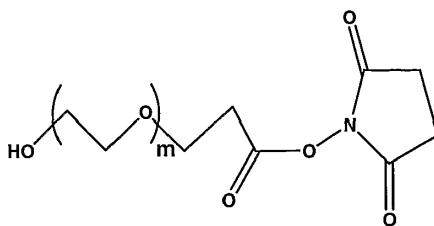


(Fórmula XI)

en donde m se define como en la Sección II.A. En contraste con una impureza simplemente desmetilada, la especie dimérica es fácilmente observable por cromatografía de penetración en gel (GPC) o HPLC debido a que esta tiene un peso molecular más alto.

Se prefiere, en ese caso, que una composición descrita en la invención esté sustancialmente libre de especies que comprenden una estructura correspondiente a una especie dimérica (p. ej., con protección terminal de hidroxilo y con protección terminal de metoxi como se muestra en la Fórmula XI). A este respecto, una composición que está sustancialmente libre de especies diméricas contendrá menos de aproximadamente 10% en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente 5% en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente 4% en peso, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 3% en peso, aún más preferiblemente todavía menos de aproximadamente 2% en peso de especies diméricas, siendo más preferido aproximadamente menos de aproximadamente 1% en peso.

Como se indicó anteriormente, la impureza que contiene la protección terminal de hidroxilo (tal como la que se muestra en la Fórmula X) puede dar como resultado en última instancia una o más especies de productos conjugados de polímero con protección terminal de hidroxilo-agente activo. Así, por ejemplo, una impureza que tiene una estructura que comprende una estructura correspondiente a la fórmula X puede, cuando se somete a una reacción de esterificación con N-hidroxisuccinimida, dar como resultado una especie que comprende una estructura correspondiente a la fórmula XII:

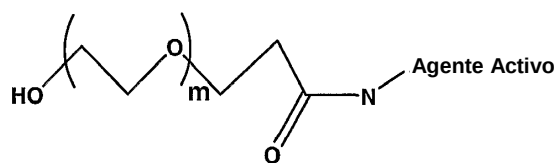


(Fórmula XII)

en donde m se define como en la Sección II.A.

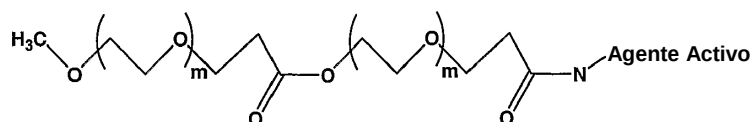
También se debe tener en cuenta que se puede obtener una especie que comprende una estructura correspondiente a la Fórmula XII a través de una reacción de esterificación si la sustancia de poli(etilenglicol) con protección terminal de metoxi inicial utilizada para preparar un polímero terminado en ácido propiónico está contaminada con "diol" poli(etilenglicol), es decir, HO-(CH₂CH₂O)_m-H. A este respecto, se prefiere utilizar composiciones de poli(etilenglicol) con protección terminal de metoxi de partida que comprenden menos de 2% en peso de "diol" poli(etilenglicol) de.

Si una especie que comprende una estructura correspondiente a la Fórmula XII se combina posteriormente con un agente activo que contiene amina, se puede formar un producto conjugado con protección terminal en el extremo hidroxilo que tiene una especie que comprende una estructura correspondiente a la Fórmula XIII:



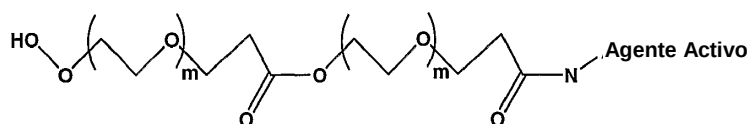
(Fórmula XIII)

en el que el agente activo representa un residuo de un agente activo que contiene amina y m se define como en la Sección II.A. Una especie que comprende una estructura correspondiente a la Fórmula XII también podría conducir a un producto conjugado que comprende una estructura correspondiente a la Fórmula XIV:



(Fórmula XIV)

en donde el Agente Activo representa un residuo de un agente activo que contiene amina y m se define como en la Sección II.A. Además, una especie que comprende una estructura correspondiente a la Fórmula XII podría dar como resultado un producto conjugado que comprende una estructura con protección terminal de hidroxilo correspondiente a la Fórmula XV:



(Fórmula XV)

en donde el agente activo representa un residuo de un agente activo que contiene amina y m se define como en la Sección II.A.

Cada una de las impurezas que comprende una estructura correspondiente a una de las Fórmulas X, XII y XIII incluye una protección terminal de hidroxilo (o un grupo "desmetilado"). Como se señaló anteriormente, la preocupación especial con una composición que comprende una cantidad relativamente grande de una o más de estas u otras especies con protección terminal de hidroxilo es la capacidad de la impureza para reaccionar con un agente activo cuando la composición se utiliza en una reacción de conjugación. El resultado puede ser la formación de la segunda, tercera y cuarta especies conjugadas, tal como el producto conjugado deseado (p. ej., una especie que comprende una estructura correspondiente a la Fórmula IX), y uno o más productos conjugados no deseados (p. ej., una o más especies que comprenden una estructura correspondiente a las Fórmulas XIII o XIV. Se ha encontrado que las mezclas de varias especies conjugadas reducen la uniformidad, el rendimiento y la reproducibilidad de la composición resultante.

Se prefiere que la composición esté sustancialmente libre de especies conjugadas correspondientes a una cualquiera de las fórmulas XIII, XIV y XV o una combinación de ellas. A este respecto, una composición que está sustancialmente libre de especies conjugadas correspondientes a una cualquiera de las fórmulas XIII, XIV y XV o una combinación de ellas contendrá menos de aproximadamente 10% en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente 5% en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente 4% en peso, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 3% en peso, y aún más preferiblemente menos de aproximadamente 2% en peso de especies conjugadas correspondientes a una cualquiera de las Fórmulas XIII, XIV y XV o una combinación de ellas, siendo lo más preferido menos de aproximadamente 1% en peso.

Sección experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, pero no se deben considerar limitantes de la invención. Por ejemplo, aunque los reactivos de PEG monofuncionales se utilizan en los ejemplos para ilustrar la invención, también podrían utilizarse en la presente invención polímeros de PEG difuncionales o multifuncionales.

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos PEG a los que se hace referencia en los ejemplos adjuntos están disponibles en Nektar AL de Huntsville, AL. Todos los datos de RMN fueron generados por un espectrómetro de RMN a 300 o 400 MHz fabricado por Bruker.

El ejemplo 1 ilustra la formación de un polímero de mPEG-ácido propiónico de 20.000 Da que utiliza acrilato de terc-butilo como reactivo de acrilato de alquilo terciario e hidróxido de tetrabutilamonio, formado in situ a partir de bromuro de tetrabutilamonio e hidróxido de potasio, como catalizador de adición de Michael. Se utiliza TFA para escindir el grupo terc-butilo. El Ejemplo 2 es similar al Ejemplo 1, excepto que se forma un polímero de benciloxi-PEG-ácido propiónico de 20.000 Da utilizando la adición directa de hidróxido de tetrabutilamonio como catalizador. El Ejemplo 3 es similar al Ejemplo 1, excepto que el mPEG tiene un peso molecular de 30.000 Da.

El Ejemplo comparativo 1 muestra que el método de síntesis descrito en el Ejemplo 1 de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.523.479 de Sanders et al. no produce el ácido propiónico deseado, éster terc-butílico, cuando se utiliza una sustancia de partida polimérica de 20.000 Da. Se cree que el método descrito en Patente de Estados Unidos Núm. 5.523.479 es ineficaz en la formación de polímeros funcionalizados con ácido propiónico de peso molecular más alto del tipo utilizado en la presente invención. En particular, se cree que los catalizadores sugeridos en la patente de Sanders son incapaces de promover la reacción de adición de Michael en un grado significativo cuando se utiliza una sustancia de partida polimérica de mayor peso molecular.

El Ejemplo comparativo 2 muestra que el método de síntesis descrito en el Ejemplo 1 de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.672.662 de Harris et al. no produce m-PEG(20.000 Da)-ácido propiónico puro cuando se utiliza una sustancia de partida de PEG protegido terminalmente con metoxi contaminada con bajo contenido de diol y de 20.000 Da, debido a que las condiciones de reacción relativamente rigurosas conducen a la desmetilación y la escisión de la cadena de la protección terminal de metoxi y producen una cantidad sustancial de ácido propiónico HO-PEG (20.000 Da).

Ejemplo 1

Síntesis de mPEG(20.000 Da)-Ácido Propiónico

A. mPEG(20.000 Da)-Ácido propiónico, Éster terc-Butílico

Una solución de mPEG (20.000 Da) (35,0 g, 0,00175 moles) (NOF Corporation) y bromuro de tetrabutilamonio (0,6 g) en tolueno (125 ml) se secó azeotrópicamente destilando 105 ml de tolueno. Se añadió hidróxido de potasio (0,15 g) en forma de polvo fino y la mezcla se calentó a 60°C en atmósfera de argón. A continuación se añadió acrilato de terc-butilo (2,0 ml, 0,01365 moles, exceso de 7,8 veces) durante 2 horas y la mezcla se agitó durante la noche a 60°C en atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (400 ml). La solución resultante se lavó dos veces con agua desionizada (2 x 50 ml) y a continuación se secó con sulfato de magnesio anhidro. A continuación, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. Rendimiento 28,5 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,40 ppm (s, $(CH_3)_3C$ -, 9H), 2,41 ppm (t, $-CH_2-COO-$, 2H), 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); sustitución 69,1%.

B. mPEG(20.000 Da)-Ácido Propiónico

Se disolvió mPEG(20.000 Da)-ácido propiónico, éster terc-butílico (20 g) de la Etapa A en una mezcla de diclorometano/ácido trifluoroacético (1:1; 120 ml) y la solución se agitó 1 h a 60°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió diclorometano (400 ml) a la mezcla de reacción y la solución resultante se lavó con agua desionizada (400 ml) y se secó con sulfato de magnesio anhidro. A continuación, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en agua desionizada (400 ml) y el pH de la solución se ajustó a 12 con NaOH 1,0 M. La solución se agitó 2 h a pH = 12. A continuación se añadió NaCl (40 g) y el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. El producto se extrajo con diclorometano, la solución se secó con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida proporcionando 16,5 g de un producto sólido de color blanco. La cromatografía de intercambio aniónico mostró que el producto contenía: 68,2% de m-PEG(20.000 Da)-ácido propiónico y 31,8% de m-PEG-20K. A continuación, el producto se purificó cromatográficamente utilizando medios de cromatografía de intercambio aniónico típicos, proporcionando 100% de PEG(20.000 Da)-ácido propiónico puro (9,8 g). A este respecto, "PEG(20.000 Da)-ácido propiónico al 100%" significa de PEG(20.000 Da)-ácido monopropiónico puro al 100%.

RMN (d_6 -DMSO): 2,43 ppm (t, $-CH_2-COO-$, 2H), 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); No se detectaron grupos de PEG-OH mediante RMN (sin triplete a 4,58 ppm); Este resultado experimental significa que el producto era mPEG(20.000 Da)-ácido monopropiónico puro al 100% sin presencia de HO-PEG(20.000 Da)-ácido propiónico detectable.

Ejemplo 2

Síntesis de Benciloxi-PEG(20.000 Da)-Ácido Propiónico

Una solución de benciloxi-PEG (20.000 Da) (35,0 g, 0,00175 moles) (NOF Corporation) e hidróxido de

tetrabutylamonio (2,0 g de una solución al 40% en agua) en tolueno (200 ml) se secó azeotrópicamente mediante destilación de 175 ml de tolueno. La solución obtenida se calentó a 65°C bajo atmósfera de argón. A continuación se añadió acrilato de terc-butilo (1,5 ml, 0,01024 moles, 5,85 veces en exceso) durante 3,5 horas y la mezcla se agitó durante la noche a 60-65°C bajo atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (40 ml).

Se añadió ácido trifluoroacético (40 ml) y la solución se calentó hasta ebullición durante 2 h. El diclorometano y el ácido trifluoroacético se eliminaron mediante destilación a presión reducida y el producto bruto se disolvió en 400 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 12 con NaOH 1,0 M y la solución se agitó 2 h a pH = 12. A continuación se añadió NaCl (40 g) y el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. El producto se extrajo con diclorometano, el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida proporcionando 28,5 g de un producto sólido de color blanco. La cromatografía de intercambio aniónico mostró que el producto contenía: 69,7% de PEG(20.000 Da)-ácido monopropiónico y 30,3% de PEG (20.000 Da). A continuación, el producto se purificó cromatográficamente proporcionando PEG(20.000 Da)-ácido monopropiónico puro al 100%. RMN (d_6 -DMSO): 2,43 ppm (t, $-CH_2-COO-$, 2H), 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,49 ppm (s, $-CH_2-$, benciloxi, 2H), 7,33 ppm (m, C_6H_5- , 5H). No se detectaron grupos de PEG-OH (sin triplete a 4,58 ppm); Esto significa que el producto era benciloxi-PEG(20.000 Da)-ácido propiónico puro al 100%.

Ejemplo 3

Síntesis de mPEG (30.000 Da)-Ácido Propiónico

A. mPEG (30.000 Da)-Ácido Propiónico, Éster terc-Butílico

Una solución de mPEG(30.000 Da) (50,0 g, 0,00167 moles) (NOF Corporation) y bromuro de tetrabutylamonio (0,8 g) en tolueno (200 ml) se secó azeotrópicamente destilando 100 ml de tolueno. Se añadió hidróxido de potasio (0,16 g) en forma de polvo fino y la mezcla se calentó a 60°C en atmósfera de argón. A continuación, se añadió acrilato de terc-butilo (2,5 ml, 0,01707 moles, exceso de 10,2 veces) durante 4 horas y la mezcla se agitó durante la noche a 60°C bajo una atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (400 ml). La solución obtenida se lavó dos veces con agua desionizada (2 x 100 ml) y a continuación se secó con sulfato de magnesio anhidro. A continuación, el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida, proporcionando 42,5 g de producto sólido. RMN (d_6 -DMSO): 1,40 ppm (s, $(CH_3)_3C-$, 9H) 2,41 ppm (t, $-CH_2-COO-$, 2H), 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG); sustitución de 73,8%.

B. mPEG (30.000 Da)-Ácido Propiónico

Se disolvió mPEG (30.000 Da)-Ácido Propiónico, Éster terc-Butílico (40 g) de la Etapa A en una mezcla de diclorometano/ácido trifluoroacético (1:1; 150 ml) y la solución se agitó durante 1 h a 55°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió diclorometano (600 ml) a la mezcla de reacción y la solución se lavó con agua desionizada (400 ml) y se secó con sulfato de magnesio anhidro. A continuación, el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en agua desionizada (800 ml) y el pH de la solución se ajustó a 12 con NaOH 1,0M. La solución se agitó 2 h a pH = 12. A continuación, se añadió NaCl (80 g) y el pH se reajustó a 3 con ácido fosfórico al 10%. El producto se extrajo con diclorometano proporcionando 33,5 g de producto sólido de color blanco. La cromatografía de intercambio aniónico mostró que el producto contenía: PEG(30.000 Da)-ácido monopropiónico 67,7% y PEG(30.000 Da) 32,3%. A continuación, el producto se purificó cromatográficamente utilizando medios de cromatografía de intercambio aniónico típicos, proporcionando PEG(30.000 Da)-ácido monopropiónico puro al 100% (25,3 g).

RMN (d_6 -DMSO): 2,43 ppm (t, $-CH_2-COO-$, 2H), 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG). No se detectaron grupos de PEG-OH (sin triplete a 4,58 ppm); Esto significa que el producto era mPEG (30.000 Da)-ácido propiónico puro al 100%.

Ejemplo comparativo 1

Intento de síntesis de mPEG(20.000 Da)-Ácido Propiónico, Éster terc-Butílico

Utilizando el método descrito en el Ejemplo 1 de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.523.479, una solución de mPEG (20.000 Da) (35,0 g, 0,00175 moles) (NOF Corporation) en tolueno (125 ml) se secó azeotrópicamente mediante destilación de 105 ml de disolvente. Se añadió hidróxido de potasio (0,15 g) en forma de polvo fino y la mezcla se calentó a 60°C en atmósfera de argón. A continuación se añadió acrilato de terc-butilo (2,0 ml, 0,01365 moles, 7,8 veces en exceso) durante 2 horas y la mezcla se agitó durante la noche a 60°C en atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida. Rendimiento 36,5 g. El análisis de RMN mostró que la sustancia de partida del polímero no había cambiado: mPEG (20.000 Da). RMN (d_6 -DMSO): 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 3H), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG), 4,58 ppm (t, $-OH$, 1H).

Ejemplo comparativo 2

Síntesis de mPEG(20.000 Da)-Ácido propiónico según el documento US 5.672.662

5 A. mPEG(20.000 Da)-Propionitrilo

10 Una mezcla de mPEG (20.000 Da) (25,0 g, 0,00125 moles) (NOF Corporation), agua destilada (25,0 ml) e hidróxido de potasio (0,5 g) se enfrió a 0-5°C en un baño de hielo. Se añadió lentamente acrilonitrilo (3,4 g) y la solución se agitó durante tres horas a 0-5°C. Se añadió solución de NaCl al 10% (225 ml) a la mezcla de reacción y el producto se extrajo con diclorometano (200, 100 y 50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en diclorometano (35 ml) y se precipitó con isopropanol (225 ml) a temperatura ambiente. El precipitado se eliminó mediante filtración y se secó al vacío. Rendimiento de M-PEG-nitrilo 23,5 g.

15 B. mPEG(20.000 Da)-Propionamida

20 Una mezcla de M-PEG-nitrilo de la etapa anterior (23,5 g) y ácido clorhídrico concentrado (117,5 g) se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La solución se diluyó con un litro de agua y se extrajo con diclorometano (200, 150 y 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron dos veces con agua, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad por evaporación rotatoria. Rendimiento de PEG-amida 21,5 g.

C. mPEG(20.000 Da)-Ácido Propiónico

25 El M-PEG-amida de la etapa anterior (16,0 g) se disolvió en 1150 ml de agua destilada, se añadieron 100 g de hidróxido de potasio y la solución se agitó durante 22 horas a temperatura ambiente. Se añadió cloruro de sodio (150 g) y la solución se extrajo con diclorometano (150 ml x 3). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con ácido fosfórico al 5%, agua (dos veces) y se secaron sobre sulfato de magnesio. A continuación, el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida, proporcionando 14,0 g de un producto sólido de color blanco. La cromatografía de intercambio aniónico mostró que el producto contenía: 62,5% de PEG(20.000 Da)-ácido propiónico; y 37,5% de PEG-20K. A continuación, el producto se purificó cromatográficamente utilizando medios de cromatografía de intercambio aniónico típicos, proporcionando PEG(20.000 Da)-ácido monopropiónico al 100% (6,5 g). RMN (d_6 -DMSO): 2,43 ppm (t, $-CH_2-COO-$, 2H), 3,24 ppm (s, $-OCH_3$, 2,61 H), 3,51 ppm (s, esqueleto de PEG, 1725 H), 4,58 ppm (t, PEG-OH, 0,13 H). El análisis de RMN (triplete a 4,58) mostró que el producto contenía 13% en moles de grupos PEG-OH; esto significa que el producto era una mezcla del mPEG(20.000 Da)-Ácido Propiónico deseado (87%) y HO-PEG (20.000)-Ácido Propiónico (13%).

35

40 A los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención se les ocurrirán muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención que tiene el beneficio de las enseñanzas presentadas en la descripción anterior. Por lo tanto, se debe entender que la invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas y que se pretende que se incluyan modificaciones y otras realizaciones. Aunque en la presente memoria se emplean términos específicos, se utilizan solo en un sentido genérico y descriptivo y no con fines limitantes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un poli(etilenglicol) funcionalizado con al menos un grupo ácido propiónico, comprendiendo el método:

i) hacer reaccionar un poli(etilenglicol) que comprende al menos un grupo hidroxilo con un acrilato de alquilo terciario en presencia de un catalizador que comprende una sal de amonio cuaternario seleccionada del grupo que consiste en haluro de tetrametilamonio, haluro de tetraetilamonio, haluro de tetrapropilamonio, haluro de tetrabutilamonio, hidróxido de tetrametilamonio, hidróxido de tetraetilamonio, hidróxido de tetrapropilamonio e hidróxido de tetrabutilamonio para formar un éster de ácido propiónico del poli(etilenglicol), en donde el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 10.000 Da; y

ii) tratar el éster de ácido propiónico del poli(etilenglicol) con un ácido fuerte para formar un poli(etilenglicol) funcionalizado con ácido propiónico.

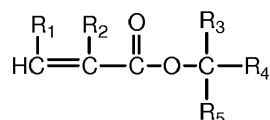
2. El método de la reivindicación 1, en donde el acrilato de alquilo terciario está sustituido en α o β con un grupo sustituyente.

3. El método de la Reivindicación 2, en donde el grupo sustituyente se selecciona del grupo que consiste en halo, hidroxilo, tiol, alquiltio, acilo, aciloxi, nitro, ciano, azido, trihalometilo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido.

4. El método de la Reivindicación 3, en donde el grupo sustituyente se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo y bencilo.

5. El método de cualquiera de las Reivindicaciones anteriores, en donde el acrilato de alquilo terciario comprende un grupo alquilo terciario seleccionado del grupo que consiste en un grupo terc-butilo, un grupo terc-amilo, un grupo α,α' -dimetilbencilo, un grupo trítalo, un grupo 1-adamantilo, y un grupo 2-metil-2-adamantilo.

6. El método de la reivindicación 1, en donde el acrilato de alquilo terciario tiene la estructura:



en donde:

R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, hidroxilo, tiol, alquiltio, acilo, aciloxi, nitro, ciano, azido, trihalometilo, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y

R_3 - R_5 son cada uno independientemente alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido.

7. El método de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde R_3 , R_4 y R_5 , son cada uno metilo, etilo o fenilo.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde R_1 y R_2 son hidrogeno

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde R_1 es hidrógeno y R_2 se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo y bencilo.

10. El método de cualquiera de las Reivindicaciones anteriores, en donde el ácido fuerte es ácido trifluoroacético, ácido trifluorometanosulfónico, ácido fórmico, ácido clorhídrico o ácido p-toluenosulfónico.

11. El método de cualquiera de las Reivindicaciones anteriores, en donde dicha etapa de reacción y dicha etapa de tratamiento se llevan a cabo en presencia de un disolvente orgánico.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en diclorometano, tetrahidrofurano, dimetilformamida, acetonitrilo, tolueno, xileno, fenilacetoneitrilo, nitrobenzeno, tetracloroetileno, anisol y clorobenzeno.

13. El método de la reivindicación 1, en donde el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso de 10.000 a 100.000 Da.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso de 20.000 a 40.000 Da.
- 5 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en donde el poli(etilenglicol) se selecciona del grupo que consiste en PEG monofuncional, PEG difuncional y PEG ramificado.
16. El método de la reivindicación 14, en donde el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 Da.
- 10 17. El método de la reivindicación 16, en donde el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Da.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende adicionalmente la etapa de derivatizar el polímero funcionalizado con ácido propiónico para formar un éster activo.
- 15 19. El método de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente la etapa de formar un producto conjugado haciendo reaccionar el éster activo con una molécula biológicamente activa que contiene un grupo amino.