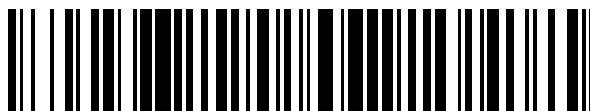


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 808**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/60** (2007.01)

**C08G 65/329** (2006.01)

**C08G 65/333** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2004** **E 13162374 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 2644206**

54 Título: **Derivados de PEG que contienen dos cadenas de PEG**

30 Prioridad:

**23.05.2003 US 473213 P**

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

**27.09.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARRIS, MILTON J.;  
KOZLOWSKI, ANTONI;  
MCMANUS, SAMUEL P.;  
BENTLEY, MICHAEL D. y  
CHARLES, STEPHEN A.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 725 808 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

Derivados de PEG que contienen dos cadenas de PEG

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a nuevos reactivos poliméricos que comprenden una orientación estructural interna particular, así como a productos conjugados de estos nuevos reactivos poliméricos. Además, la invención se refiere a métodos para sintetizar los reactivos poliméricos y métodos para conjugar los reactivos poliméricos con agentes activos y otras sustancias. Además, la invención también se refiere a preparaciones farmacéuticas, así como a métodos para administrar los productos conjugados a pacientes.

**Antecedentes de la invención**

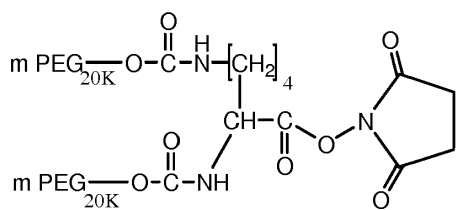
15 Los científicos y los analistas clínicos se enfrentan a una serie de desafíos en sus intentos por desarrollar agentes activos en formas adecuadas para ser suministradas a un paciente. Los agentes activos que son polipéptidos, por ejemplo, a menudo se suministran mediante inyección en lugar de por vía oral. De esta manera, el polipéptido se introduce en la circulación sistémica sin exposición al entorno proteolítico del estómago. La inyección de polipéptidos, sin embargo, tiene varios inconvenientes. Por ejemplo, muchos polipéptidos tienen una semivida relativamente corta, por lo que requieren inyecciones repetidas, que a menudo son inconvenientes y dolorosas. Además, algunos polipéptidos pueden provocar una o más respuestas inmunitarias con la consecuencia de que el sistema inmunitario del paciente puede activarse para degradar el polipéptido. Por lo tanto, la administración de agentes activos como los polipéptidos es a menudo problemática incluso cuando estos agentes se administran mediante inyección.

25 Se ha logrado cierto éxito al abordar los problemas de la administración de agentes activos mediante inyección. Por ejemplo, la conjugación del agente activo con un polímero soluble en agua ha dado lugar a productos conjugados de polímero-agente activo que tienen inmunogenicidad y antigenicidad reducidas. Además, estos productos conjugados de polímero-agente activo a menudo tienen semividas mucho mayores en comparación con sus contrapartes no conjugadas como resultado de la disminución del aclaramiento a través del riñón y/o la disminución de la degradación enzimática en la circulación general. Como resultado de tener una mayor semivida, el producto conjugado de polímero-agente activo requiere una dosificación menos frecuente, lo que a su vez reduce el número total de inyecciones dolorosas y las visitas inconvenientes a un profesional de la salud. Además, los agentes activos que son solo ligeramente solubles a menudo demuestran un aumento significativo de la solubilidad en agua cuando se conjugan con un polímero soluble en agua.

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

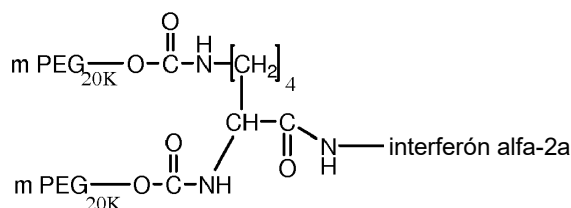
40 A pesar de estos éxitos, la conjugación de un polímero soluble en agua con un agente activo sigue siendo un desafío. Uno de estos desafíos es la desactivación del agente activo después del anclaje a una molécula de polietilenglicol relativamente larga. Aunque una molécula de polietilenglicol relativamente larga proporcionaría el producto conjugado de agente activo-polímero correspondiente con mayor solubilidad en agua, se sabe que los productos conjugados que portan tales restos de polietilenglicol largos son sustancialmente inactivos *en vivo*. Se ha planteado la hipótesis de que estos productos conjugados están inactivos debido a la longitud de la cadena de polietilenglicol relativamente, que se "envuelve" alrededor del agente activo completo, bloqueando así el acceso a los ligandos potenciales requeridos para la actividad.

55 El problema asociado con los productos conjugados inactivos que portan un resto de polietilenglicol relativamente grande se ha resuelto, en parte, mediante el uso de formas "ramificadas" de un polímero. Un ejemplo de tal polímero "ramificado" se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.932.462 de Harris et al. Como se describe en la presente memoria, la "mPEG2-N-hidroxisuccinimida" se puede unir a un grupo amino accesible (p. ej., un grupo amino que no está físicamente bloqueado debido a la estructura conformacional) en una proteína biológicamente activa. Este polímero ramificado (que tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000 Daltons) está disponible en Nektar Therapeutics (Huntsville, AL) y tiene la siguiente estructura:



en donde mPEG<sub>20K</sub> representa un derivado de polietilenglicol protegido terminalmente con metoxi que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Daltons.

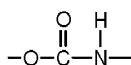
5 El acoplamiento de este polímero ramificado a interferón alfa-2a da como resultado un producto conjugado que contiene un enlace amida que conecta el interferón alfa-2a al polímero. Esquemáticamente, el producto conjugado se puede representar de la siguiente manera:



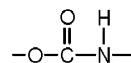
10 Este producto conjugado, disponible comercialmente como marca PEGASYS® de interferón alfa-2a PEGilado (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), está indicado para el tratamiento de la hepatitis C en adultos.

15 Aunque la utilización de un polímero ramificado puede resolver algunos de los problemas asociados con los polímeros lineales relativamente grandes, persisten otros desafíos para preparar productos conjugados útiles. Por ejemplo, la tasa de degradación *in vivo* del producto conjugado a menudo es inaceptable, ya sea por demasiado larga o demasiado corta. Específicamente, la tasa de degradación *in vivo* está generalmente (aunque no necesariamente) gobernada parcialmente por la tasa de hidrólisis que se produce en algún punto de la serie de átomos que conectan el agente activo al polímero. Por lo tanto, una velocidad hidrolítica relativamente rápida puede dar como resultado un producto conjugado inaceptable que tenga una demasiado corta *in vivo*, mientras que una hidrólisis relativamente lenta puede dar como resultado un producto conjugado inaceptable que tenga una semivida demasiado larga *in vivo*. En consecuencia, los polímeros que tienen una serie única de átomos (tanto en el propio polímero como en el producto conjugado correspondiente) pueden dar como resultado tasas únicas de hidrólisis, que a su vez influyen en la tasa de degradación del producto conjugado *in vivo*.

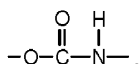
30 La hidrólisis de productos conjugados de ciertos agentes activos y mPEG2-N-hidroxisuccinimida se produce en la cadena de átomos que conecta una "rama" de mPEG con la otra, dado que uno de los metabolitos tiene un peso molecular de aproximadamente veinte mil Daltons. Una ubicación probable en la cadena de átomos para tal escisión está dentro del resto



35 que se encuentra inmediatamente adyacente a una de las porciones de mPEG en el polímero. El resto



40 representa la ubicación más probable para la escisión debido a que los únicos otros átomos en la cadena que conectan una rama de mPEG con la otra son una serie de átomos de carbono compuestos de grupos metileno, que son relativamente más estables a la degradación *in vivo* que el resto



45 Tras la escisión, la forma separada del polímero es mPEG-OH. Por lo tanto, basándose al menos en parte en la favorabilidad de la formación de mPEG-OH, se produce una única tasa de hidrólisis.

Sería deseable, sin embargo, poder proporcionar polímeros de modo que sus tasas de hidrólisis pudieran ser "adaptadas". Por ejemplo, con respecto a la administración semanal típica de interferón alfa-2a PEGilado, una tasa



(j) es de 0 a 20;

cada R<sup>1</sup> es independientemente H o un resto orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido;

X<sup>1</sup>, cuando está presente, es un primer resto espaciador;

5 X<sup>2</sup>, cuando está presente, es un segundo resto espaciador;

X<sup>5</sup>, cuando está presente, es un quinto resto espaciador;

X<sup>6</sup>, cuando está presente, es un sexto resto espaciador;

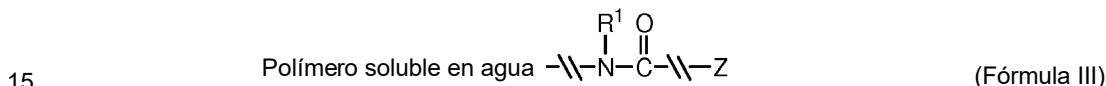
X<sup>7</sup>, cuando está presente, es un séptimo resto espaciador;

10 X<sup>8</sup>, cuando está presente, es un octavo resto espaciador;

R<sup>5</sup> es un resto ramificado; y

Z es un grupo reactivo.

En la presente memoria también se describe un reactivo polimérico que comprende la siguiente estructura:



en donde: el "polímero soluble en agua" es un polímero soluble en agua, cada "-\|" representa independientemente un enlace covalente directo o un resto espaciador; R<sup>1</sup> es H o un resto orgánico; y Z es un grupo reactivo. Como se muestra en la Fórmula (I), el polímero soluble en agua se encuentra en posición proximal con respecto al átomo de nitrógeno del resto

20



25 y el grupo reactivo, Z, se encuentra en posición proximal con respecto al átomo de carbono carbonílico del resto



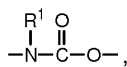
Aunque los reactivos poliméricos que portan un resto



están abarcados por la presente invención, se prefiere que tengan un átomo de oxígeno adyacente al átomo de carbono carbonílico del



lo que da como resultado un resto



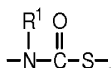
40 a menudo denominado grupo "carbamato" o "uretano". También pueden estar presentes en o sobre el reactivo polimérico otros grupos funcionales.

En la presente memoria se describe un reactivo polimérico en donde R<sup>1</sup> es H.

45 En la presente memoria se describe un reactivo polimérico en donde un átomo de azufre está unido al átomo de carbono carbonílico del resto



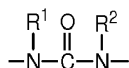
50 lo que da como resultado un



En la presente memoria se describe un reactivo polimérico en donde un radical  $-N(R^2)-$  está anclado al átomo de carbono carbonílico del resto



5 proporcionando así un resto



10 en donde  $R^2$  es H o un radical orgánico.

Es un objeto de la invención proporcionar un reactivo polimérico en el que el polímero soluble en agua es un poli(óxido de alquileo).

15 En la presente memoria se describe un método para preparar los reactivos poliméricos descritos anteriormente, en donde el método comprende las etapas de (i) proporcionar una molécula precursora que comprende un grupo reactivo protegido o un precursor de un grupo reactivo y uno o más grupos hidroxilo; (ii) activar al menos uno de los uno o más grupos hidroxilo de la molécula precursora para reaccionar con un grupo amino para formar una molécula precursora activada; (iii) poner en contacto en condiciones de acoplamiento covalente al menos uno de los uno o más grupos hidroxilo activados con un polímero soluble en agua que tiene un grupo amino, formando así un polímero que comprende una porción de polímero soluble en agua y el grupo reactivo protegido o el precursor del grupo reactivo; y (iv) desproteger el grupo reactivo protegido cuando esté presente.

25 Adicionalmente se describe un producto conjugado de polímero que comprende un polímero soluble en agua, un resto



30 y un agente farmacológicamente activo, en donde: (i) el polímero soluble en agua está conectado al átomo de nitrógeno del resto



35 a través de un enlace covalente directo o a través de un primer resto espaciador; (ii) el agente farmacológicamente activo está unido al átomo de carbono carbonílico del resto



40 a través de un enlace covalente directo o un segundo resto espaciador; y (iii)  $R^1$  es H o un radical orgánico.

45 Un objeto adicional de la invención es proporcionar un método para preparar un producto conjugado que comprenda la etapa de poner en contacto un reactivo polimérico según las presentes reivindicaciones con un agente activo en condiciones adecuadas para formar así el producto conjugado. Típicamente, el agente activo se ancla covalentemente al polímero a través de la reacción entre un grupo reactivo en el reactivo polimérico con un grupo funcional (p. ej., una amina) en el agente activo.

Otro objeto adicional de la invención es proporcionar una preparación farmacéutica que comprende el producto conjugado de agente activo-polímero como se proporciona en la presente memoria combinado con un excipiente farmacéutico.

50 En la presente memoria también se describe un método para administrar un agente farmacológicamente activo que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto conjugado de agente activo-polímero como se proporciona en la presente memoria.

55 Los objetos adicionales, ventajas y características novedosas de la invención se expondrán en la descripción que sigue, y en parte, resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras lo siguiente, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención.

En una realización de acuerdo con las presentes reivindicaciones, se proporciona un reactivo polimérico que comprende un resto



5 situado entre un polímero soluble en agua y un grupo reactivo. La disposición estructural interna es tal que (i) el nitrógeno en el resto



10 se encuentra en posición proximal con respecto al polímero soluble en agua, (ii) el átomo de carbono carbonílico del resto



15 se encuentra en posición proximal con respecto al grupo reactivo, y (iii) R<sup>1</sup> es H o un radical orgánico, en donde el radical orgánico se selecciona típicamente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

20 Los reactivos poliméricos de la invención también comprenden un polímero soluble en agua, un resto



25 y un grupo reactivo, en donde: (i) el polímero soluble en agua está conectado al átomo de nitrógeno del resto



30 a través de un enlace covalente directo o a través de un primer resto espaciador; (ii) el grupo reactivo está conectado al átomo de carbono carbonílico del resto



a través de un enlace covalente directo o un segundo resto espaciador; y (iii) R<sup>1</sup> se define como antes.

35 Los polímeros preferidos están protegidos terminalmente en un extremo terminal. Además, se prefieren los polímeros que tienen un peso molecular promedio en masa inferior a aproximadamente 120.000 Daltons.

En la presente memoria se describe un método para preparar los reactivos poliméricos de la invención. Brevemente, el método implica proporcionar una molécula precursora que comprende un grupo reactivo protegido o un precursor de un grupo reactivo y uno o más grupos hidroxilo. Al menos uno de los uno o más grupos hidroxilo de la molécula precursora está activado (formando así una molécula precursora activada) de manera que al menos uno de los uno o más grupos hidroxilo reaccionará con un grupo amino. Después de eso, la molécula precursora activada se coloca en condiciones de acoplamiento covalente y se permite que se ponga en contacto con un polímero soluble en agua que tiene un grupo amino, lo que permite que los dos reaccionen químicamente. La reacción resultante da como resultado la formación de un enlace covalente entre el polímero soluble en agua y la molécula precursora activada, que, a su vez, forma un polímero que comprende una porción de polímero soluble en agua y el grupo reactivo o precursor de grupo reactivo protegidos. Típicamente, este polímero puede reaccionar adicionalmente con diversos reactivos para funcionalizar el polímero con, por ejemplo, un grupo reactivo deseado. Cuando la molécula precursora comprende un grupo reactivo protegido, el método incluye ventajosamente una etapa de desprotección para eliminar el grupo que protege el grupo reactivo. Opcionalmente, se realiza una etapa para aislar el polímero de modo que el polímero pueda proporcionarse en una forma más pura.

También se describe un producto conjugado que comprende un polímero soluble en agua, un radical



55

y un agente activo, en donde: (i) el polímero soluble en agua está conectado al átomo de nitrógeno del resto



5 a través de un enlace covalente directo o a través de un primer resto espaciador; (ii) el agente farmacológicamente activo está conectado al carbono carbonílico del resto



10 a través de un enlace covalente directo o un segundo resto espaciador; y (iii) R<sup>1</sup> es H o un radical orgánico. Ventajosamente, se puede utilizar cualquier agente activo que se pueda acoplar a los reactivos poliméricos proporcionados en la presente memoria.

15 En otra realización más de la invención, se proporciona un método para preparar un producto conjugado que comprende la etapa de poner en contacto un reactivo polimérico como se proporciona en la presente memoria con un agente activo en condiciones adecuadas para proporcionar un producto conjugado.

20 En otra realización más de la invención, se proporcionan preparaciones farmacéuticas que comprenden un producto conjugado de la invención combinado con un excipiente farmacéutico. Las preparaciones farmacéuticas abarcan todo tipo de formulaciones y, en particular, aquellas que son adecuadas para inyección, por ejemplo, polvos que pueden reconstituirse, así como suspensiones y soluciones.

25 En la presente memoria también se describe un método para administrar un producto conjugado que comprende la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto conjugado proporcionado en la presente memoria. Típicamente, aunque no necesariamente, el producto conjugado se proporciona como parte de una preparación farmacéutica. Se puede utilizar cualquier enfoque para administrar el producto conjugado. Sin embargo, se prefiere que el producto conjugado se administre a través de inyección.

### 30 Descripción detallada de la invención

Antes de describir en detalle la presente invención, se debe entender que esta invención no está limitada a los polímeros, las técnicas sintéticas, los agentes activos concretos y similares, y como tales, pueden variar.

35 Se debe observar que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los 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 de los mismos o diferentes productos conjugados, la referencia a un "excipiente" incluye un solo excipiente así como dos o más de los mismos o diferentes excipientes, y similares.

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

45 "PEG", "polietilenglicol" y "poli(etilenglicol)" según se utilizan en la presente memoria, están destinados a abarcar cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua y se pueden utilizar indistintamente. Típicamente, los PEG para su uso en la presente invención comprenderán  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-$  o  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$  donde (m) es de 2 a 4000, y los grupos de terminales y la arquitectura del PEG general pueden variar. Según se utiliza en la presente memoria, PEG también incluye  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  y  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ , dependiendo de si los oxígenos terminales han sido desplazados o no. Cuando el PEG comprende adicionalmente un resto espaciador (que se describirá con mayor detalle a continuación), los átomos que comprenden el resto espaciador, cuando se unen covalentemente a un polímero soluble en agua, no dan lugar a la formación de un enlace oxígeno-oxígeno (es decir, una conexión "-O-O-" o peróxido). A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, debe recordarse que el término "PEG" incluye estructuras que tienen varios grupos terminales o "de protección terminal" etcétera. "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. Las formas de PEG específicas para uso en la invención incluyen PEG que tienen una variedad de pesos moleculares, estructuras o geometrías (por ejemplo, PEG ramificados, lineales, bifurcados, multifuncionales, multibrazo y similares), que se describirán con mayor detalle a continuación.

60 Los términos "con protección terminal" o "protegidos terminalmente" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un extremo o punto final de un polímero que tiene un resto de protección terminal. Típicamente, con respecto a PEG, el resto de protección terminal final comprende un grupo hidroxilo o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>. Por lo tanto, los



ejemplos de restos de protección terminal incluyen alcoxi (p. ej., metoxi, etoxi y benciloxi), así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo y similares. Debe recordarse que los grupos hidroxilo y alcoxi terminales pueden incluir el átomo de oxígeno terminal de un monómero de óxido de etileno que se repite cuando se dibuja la estructura, dependiendo de cómo se defina el monómero de óxido de etileno que se repite [p. ej.,  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$  o

5  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ]. Además, se prevén formas saturadas, insaturadas, sustituidas y no sustituidas de cada uno de los restos de protección terminal de los extremos anteriores. Además, el grupo de protección de los extremos también puede ser un silano o un lípido (p. ej., un fosfolípido). 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 resto (p. ej., agente activo) al que se acopla el polímero el interés se puede determinar mediante el uso de un detector adecuado. Dichas marcas incluyen, sin limitación, sustancias fluorescentes, quimioluminiscentes, restos utilizados en el marcaje enzimático, sustancias colorimétricas (p. ej., colorantes), iones metálicos, restos radioactivos y similares. Los detectores adecuados incluyen fotómetros, películas, espectrómetros, y similares.

15 "No natural" con respecto a un polímero significa un polímero que en su totalidad no se encuentra en la naturaleza. Sin embargo, un polímero no natural puede contener una o más subunidades o segmentos de subunidades que son de origen natural, siempre que la estructura polimérica general no se encuentre en la naturaleza.

20 El término "soluble en agua" como en un "polímero soluble en agua" es un polímero que es soluble en agua a temperatura ambiente. Típicamente, una solución de un polímero soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de la luz, transmitida por la misma solución después de la filtración. Sobre una base en peso, un polímero soluble en agua o un segmento del mismo será preferiblemente al menos aproximadamente 35% (en peso) soluble en agua, más preferiblemente al menos aproximadamente 50% (en peso) soluble en agua, aún más preferiblemente aproximadamente 70% (en peso) soluble en agua, y aún más preferiblemente aproximadamente 85% (en peso) soluble en agua. Sin embargo, lo más preferido es que el polímero o segmento soluble en agua sea aproximadamente 95% (en peso) soluble en agua o completamente soluble en agua.

30 El peso molecular en el contexto de un polímero soluble en agua de la invención, tal como PEG, puede expresarse como un peso molecular medio numérico o un peso molecular medio ponderal. A menos que se indique lo contrario, todas las referencias al peso molecular en la presente memoria se refieren al peso molecular medio ponderal. Ambas determinaciones de peso molecular, medio numérico y medio ponderal, pueden medirse utilizando cromatografía de penetración en gel u otras técnicas de cromatografía líquida. También se pueden utilizar otros métodos para medir los valores de peso molecular, tal como el uso de análisis de grupo final o la medición de propiedades coligativas (p. ej., depresión del punto de congelación, elevación del punto de ebullición o presión osmótica) para determinar el peso molecular medio numérico o el uso de técnicas de dispersión de la luz, ultracentrifugación o viscosimetría para determinar el peso molecular medio ponderal. Los reactivos poliméricos de la invención son típicamente polidispersos (es decir, el peso molecular medio numérico y el peso molecular medio ponderal de los polímeros no son iguales), poseyendo valores de polidispersidad bajos de preferiblemente menos de aproximadamente 1,2, más preferiblemente de menos de aproximadamente 1,15, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1,10, incluso aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1,05, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 1,03.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "ácido carboxílico" es un resto que tiene un grupo funcional



50 [también representado como un  $-\text{COOH}$  o  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ], así como restos que son derivados de un ácido carboxílico, incluyendo tales derivados, por ejemplo, ácidos carboxílicos protegidos. Por lo tanto, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, el término ácido carboxílico incluye no solo la forma ácida, sino también los correspondientes ésteres y formas protegidas. Los grupos protectores ilustrativos para ácidos carboxílicos y otros grupos protectores son descritos por Greene et al., en "PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS", Capítulo 6, 3ª edición, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1999 (pág. 454-493).

55 El término "reactivo" o "activado" cuando se utiliza junto con un grupo funcional concreto, se refiere 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 poder reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

60 Los términos "protegido", "grupo protector" y "grupo de protección" se refieren a la presencia de un resto (es decir, el grupo protector) que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo concreto en una molécula bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo

químicamente reactivo que se protege, así como de las condiciones de reacción que se emplearán 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. *et al.*, más arriba.

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 nucleófila de acilo. Los ácidos carboxílicos activados incluyen, entre otros, haluros de ácido (tales como cloruros de ácido), anhídridos, amidas y ésteres.

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

15 Los términos "espaciador" y "resto espaciador" se utilizan en la presente memoria para referirse a un átomo o una colección de átomos opcionalmente usados para enlazar restos de interconexión tales como el extremo terminal de una porción de polímero soluble en agua y un grupo funcional. El resto espaciador puede ser hidrolíticamente estable o puede incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

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

25 "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, *iso*-butilo, y *terc*-butilo.

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

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.

35 El término "sustituido" como en, por ejemplo, "alquilo sustituido", se refiere a un resto (p. ej., un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes no interferentes, tales como, pero sin limitarse a: cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, p. ej., ciclopropilo, ciclobutilo y similares; halo, p. ej., flúor, cloro, bromo y yodo; ciano; alcoxi, fenilo; fenilo sustituido; y similares. "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).

40 "Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R, en donde R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (p. ej., metoxi, etoxi, propiloxi, benciloxi, etc.), preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>.

45 Según se utiliza 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" según se utiliza 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 triple enlace, etinilo, *n*-butinilo, isopentinilo, octinilo, decinilo, etc.

55 "Arilo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 o 6 átomos de carbono. Arilo incluye múltiples anillos de arilo que pueden estar fusionados, como en naftilo o no fusionados, como en bifenilo. Los anillos de arilo también pueden estar fusionados o no fusionados con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, heteroarílicos o heterocíclicos. Según se utiliza en la presente memoria, "arilo" incluye heteroarilo.

"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 se pueden fusionar con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, heterocíclico, arílicos o heteroarílicos.

60 "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 tienen al menos un átomo de anillo que no es un carbono. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno y nitrógeno.

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

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

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

10 "Nucleófilo" se refiere a un ion o átomo o colección de átomos, que pueden ser iónicos, que tienen un centro nucleofílico, es decir, un centro que busca un centro electrofílico o con un electrófilo.

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

20 Un "enlace enzimáticamente degradable" significa un enlace que está sujeto a degradación por una o más enzimas.

25 Una conexión o enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, no se hidroliza en condiciones fisiológicas en un grado apreciable durante un período prolongado de tiempo. Los ejemplos de enlaces hidrolíticamente estables incluyen, pero no están limitados a, los 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 convencionales.

30 Los términos "agente activo", "agente biológicamente activo" y "agente farmacológicamente activo" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se definen para incluir cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de materia o mezcla que proporcione algún efecto farmacológico, a menudo beneficioso, que pueda ser demostrado *in vivo* o *in vitro*. Esto incluye alimentos, suplementos alimenticios, nutrientes, productos nutracéuticos, medicamentos, vacunas, anticuerpos, vitaminas y otros agentes beneficiosos. Según se utiliza en la presente memoria, estos términos incluyen además cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produzca un efecto localizado o sistémico en un paciente.

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

45 "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 polímero-agente activo, típicamente presente en una preparación farmacéutica, que se necesita para proporcionar una nivel de agente activo y/o producto conjugado en el torrente sanguíneo o en el tejido diana. La cantidad exacta 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 determinado fácilmente por un experto en la técnica, en función de la información proporcionada en la presente memoria y disponible en la bibliografía relevante.

50 "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 de la cadena principal del polímero. Un polímero "difuncional" significa un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos en el mismo, ya sean iguales (es decir, homodifuncional) o diferentes (es decir, heterodifuncional).

60 "Bifurcado", en referencia a la geometría o estructura general de un polímero, se refiere a un polímero difuncional que tiene un "brazo" polimérico (es decir, un solo polímero soluble en agua) en donde ambos grupos funcionales están anclados (ya sea directamente o a través de uno o más átomos) a un átomo que sirve como un átomo de ramificación, que a su vez está anclado (ya sea directamente o a través de uno o más átomos) al polímero soluble en agua.

"Ramificado", en referencia a la geometría o estructura general de un polímero, se refiere al polímero que tiene 2 o

más "brazos" poliméricos. Un polímero ramificado puede poseer 2 brazos poliméricos, 3 brazos poliméricos, 4 brazos poliméricos, 6 brazos poliméricos, 8 brazos poliméricos o más. Un tipo concreto de polímero altamente ramificado es un polímero dendrítico o dendrímero, que, para los fines de la invención, se considera que posee una estructura distinta de la de un polímero ramificado.

5 Un "dendrímero" o polímero dendrítico es un polímero globular, monodisperso de tamaño en el que todos los enlaces emergen radialmente desde un punto focal central o núcleo con un patrón de ramificación regular y con unidades repetitivas que contribuyen cada una con un punto de ramificación. Los dendrímeros exhiben ciertas propiedades de estado dendrítico tales como la encapsulación del núcleo, lo que los hace únicos con respecto a  
10 otros tipos de polímeros, incluidos los polímeros ramificados.

Un reactivo alcalino o ácido descrito en la presente memoria incluye los neutros, cargados y cualquier forma de sal correspondiente de los mismos.

15 El término "paciente" se refiere a un organismo vivo que sufre o es propenso a una afección que se puede prevenir o tratar mediante la administración de un producto conjugado como el proporcionado en la presente memoria, e incluye tanto seres humanos como animales.

20 Un "radical orgánico" es un resto que contiene carbono que se puede unir a través de un enlace covalente a otro átomo. Los radicales orgánicos ilustrativos incluyen aquellos que se seleccionan del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

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

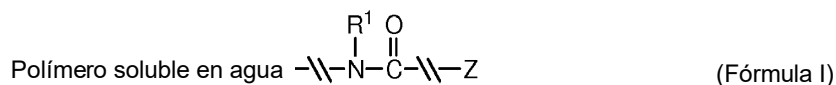
25 Según se utiliza en la presente memoria, el indicador "halo" (por ejemplo, flúor, cloro, yodo, bromo, etc.) se utiliza generalmente cuando el halógeno está unido a una molécula, mientras que el sufijo "uro" (por ejemplo, fluoruro, cloruro, yoduro, bromuro, etc.) se utiliza cuando la forma iónica se utiliza cuando el halógeno existe en su forma iónica independiente (por ejemplo, tal como cuando un grupo eliminable abandona una molécula).

30 En el contexto de la presente discusión, debe reconocerse que la definición de una variable proporcionada con respecto a una estructura o fórmula es aplicable a la misma variable repetida en una estructura diferente, a menos que el contexto indique lo contrario. Así, por ejemplo, las definiciones de "POLI", "un resto espaciador", "(Z)", etcétera con respecto a un reactivo polimérico son igualmente aplicables a un producto conjugado de polímero  
35 soluble en agua proporcionado en la presente memoria.

Pasando a una primera realización de la invención, a continuación, se proporciona un reactivo polimérico único. Aunque no deseen estar sujetos a ninguna teoría, los solicitantes creen que las propiedades distintivas de los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria son atribuibles a la orientación única de los átomos. Por  
40 ejemplo, cuando un reactivo polimérico descrito en la presente memoria se acopla a un agente activo para formar un producto conjugado, la tasa de hidrólisis del producto conjugado *en vivo* es diferente a la tasa de hidrólisis de un producto conjugado que tiene los mismos átomos, pero está dispuesto en una secuencia diferente. Además de proporcionar tasas alternativas de hidrólisis, los reactivos poliméricos proporcionados en la presente memoria tienen ventajas adicionales sobre los reactivos poliméricos de la técnica anterior.

45 Los polímeros de la invención comprenden tres componentes separados orientados de una manera específica. Los tres componentes son los siguientes: un polímero soluble en agua que comprende unidades monoméricas repetidas; un resto que comprende un átomo de nitrógeno unido covalentemente al átomo de carbono de un carbonilo; y un grupo reactivo. Los tres componentes del polímero están orientados específicamente de manera que el átomo de nitrógeno del resto mencionado anteriormente esté próximo a la porción monomérica repetida del polímero, mientras  
50 que el átomo de carbono está próximo al grupo reactivo. Se entenderá que el término "proximal" en el presente contexto se refiere a "más cercano" siguiendo el camino más cercano de conexión de los átomos en lugar de más cercano en términos de distancia espacial o absoluta.

55 Los polímeros descritos en la presente memoria pueden representarse esquemáticamente mediante la siguiente fórmula:



60 en donde: el "polímero soluble en agua" es un polímero soluble en agua que comprende unidades monoméricas repetitivas; cada "- \ \ " independientemente es un enlace covalente directo o un resto espaciador; R<sup>1</sup> es H o un radical orgánico; y Z es un grupo reactivo. Como se muestra en la Fórmula I, el nitrógeno del resto



se encuentra en posición proximal con respecto al polímero soluble en agua y el átomo de carbono del carbonilo está en posición proximal con respecto al grupo reactivo "Z".

5

Los reactivos poliméricos de la invención comprenden por lo tanto un resto



10 colocado entre un polímero soluble en agua y un grupo reactivo, en donde: (i) el átomo de nitrógeno en el resto



15 se encuentra en posición proximal con respecto al polímero soluble en agua; (ii) el átomo de carbono carbonílico del resto



20 se encuentra en posición proximal con respecto al grupo reactivo; y (iii) R<sup>1</sup> se define como antes. El polímero soluble en agua está unido al átomo de nitrógeno del resto



25 a través de un enlace covalente directo o a través de un primer resto espaciador. El grupo reactivo está unido al átomo de carbono carbonílico del resto



30 a través de un enlace covalente directo o un segundo resto espaciador.

Además, los reactivos poliméricos de la invención pueden describirse como que comprenden un polímero soluble en agua, un resto



35 y un grupo reactivo, en donde: (i) el polímero soluble en agua está conectado al átomo de nitrógeno del resto



40 a través de un enlace covalente directo o a través de un primer resto espaciador; (ii) el grupo reactivo está conectado al átomo de carbono carbonílico del resto



45 a través de un enlace covalente directo o un segundo resto espaciador; y (iii) R<sup>1</sup> se define como antes.

El resto



50 (donde R<sup>1</sup> es H o un radical orgánico) puede considerarse un resto amida cuando se considera aislado y aparte de los átomos adyacentes. Se debe recordar, sin embargo, que el resto



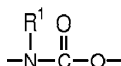
en el polímero es parte de una estructura más grande. Por ejemplo, de acuerdo con las presentes reivindicaciones, un átomo de oxígeno está unido directamente al átomo de carbono carbonílico del resto

5



proporcionando así un resto

10



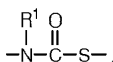
que a menudo se denomina "carbamato" o "uretano". También se describen otros reactivos en los que un átomo de azufre está unido al átomo de carbono carbonílico del resto

15



proporcionando así un resto

20

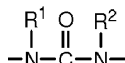


Además, se puede anclar un resto  $-\text{N}(\text{R}^2)-$  al carbono carbonílico del resto

25



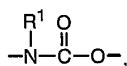
proporcionando así un resto



en donde  $\text{R}^2$  es H o un radical orgánico.

30

Con respecto al resto



35

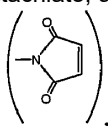
un enlace del átomo de nitrógeno se une al átomo de carbono del carbono carbonílico adyacente (el "carbono carbonílico"), otro enlace se une directamente al polímero soluble en agua o a un resto espaciador, y un tercer enlace se une a un sustituyente, "R<sup>1</sup>". R<sup>1</sup> es cualquier sustituyente no interferente. R<sup>1</sup> es típicamente, aunque no necesariamente, H o un radical orgánico. Sin embargo, es preferible que R<sup>1</sup> sea H. En esos casos cuando R<sup>1</sup> es un radical orgánico, los radicales orgánicos preferidos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en los seleccionados del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido. Los ejemplos específicos de radicales orgánicos preferidos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *tert*-pentilo, y piperidonilo.

40

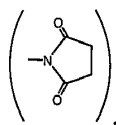
45

Con respecto al grupo reactivo, "Z", este grupo puede ser cualquier grupo que reaccione con un reactivo adecuado en las condiciones apropiadas. Los restos reactivos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en electrófilos y nucleófilos. Los ejemplos de tales grupos reactivos incluyen, pero no se limitan a aquellos seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo (-OH), éster, éster, ortoéster, carbonato, carbonato, acetal, aldehído, hidrato de aldehído, cetona, vinilcetona, hidrato de cetona, tiona, monotiohidrato, ditionhidrato, hemicetal, monotiocetal hemicetal, ditionhemicetal, cetal, ditiocetal, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, acrilamida.

50

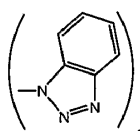


succinimida



5

benzotriazol



10 vinilsulfona, cloroetilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tiosulfonato, tresilato, silano,  $-(CH_2)_rCO_2H$ ,  $-(CH_2)_rCO_2NS$ ,  $-(CH_2)_rCO_2Bt$ ,  $-(CH_2)_rCH(O)_2$ ,  $-(CH_2)_rCHO$ ,  $-(CH_2)_2-NH_2$ ,  $-(CH_2)_rM$ ,  $-(CH_2)_r-S-SO_2-R$ , donde (r) es 1-12, (r') es 0-5, R es arilo o alquilo, NS es N-succinimidilo, Bt es 1-benzotriazolilo, y M es N-maleimidilo, y formas protegidas y activadas de cualquiera de los anteriores.

15 Con respecto a cualquier grupo reactivo, y en particular maleimida y aldehído, un adaptador opcional puede conectar el grupo reactivo al polímero. Así, por ejemplo, el adaptador puede conectar el grupo reactivo a un resto espaciador o un resto de ramificación (cuando está presente). Además, cuando no está presente un resto espaciador ni un resto de ramificación, el adaptador puede conectar el grupo reactivo directamente al carbono carbonílico del resto

20



El adaptador puede comprender hidrocarburos acíclicos saturados de cadena lineal que comprenden al menos cuatro átomos de carbono, tales como tetrametileno, pentametileno y hexametileno, así como hidrocarburos acíclicos saturados ramificados que comprenden al menos cuatro átomos de carbono. En una realización, la porción hidrocarbonada del enlace tiene la estructura  $-(CR^3R^4)_g-$ , en donde cada  $R^3$  es independientemente H, alquilo o cicloalquilo, cada  $R^4$  es independientemente H, alquilo o cicloalquilo, y (g) es de 3 a aproximadamente 20, preferiblemente de 4 a aproximadamente 12. En una realización preferida, cada  $R^3$  y  $R^4$  es H. En realizaciones de hidrocarburos acíclicos ramificados, es preferible que la ramificación se produzca en uno o más de los dos átomos de carbono más cercanos al grupo reactivo (p. ej., maleimida) para maximizar el impedimento estérico. En otra realización, la porción hidrocarbonada del enlace incluye un hidrocarburo alicíclico bivalente saturado y tiene la estructura  $-(CR^3R^4)_p$ -cicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>)-(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)<sub>q</sub>-, en donde p y q son cada uno independientemente de 0 a aproximadamente 10, preferiblemente de 0 a aproximadamente 6 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) y  $R^3$  y  $R^4$  son los definidos anteriormente. El grupo cicloalquilo bivalente (por ejemplo, cicloalquileno) es preferiblemente cicloalquileno C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, tales como diversas formas isoméricas de ciclopropadiilo (p. ej., 1,1-, cis-1,2- o trans-1,2-ciclopropileno), ciclobutadiilo, ciclopentadiilo, ciclohexadiilo y cicloheptadiilo. El grupo cicloalquileno puede estar sustituido con uno o más grupos alquilo, preferiblemente grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

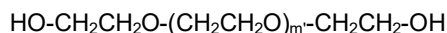
Con respecto al polímero soluble en agua, los reactivos poliméricos de la invención también comprenden al menos dos segmentos de polímero soluble en agua de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Los polímeros solubles en agua que son no peptídicos y solubles en agua, con 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en la invención. Los ejemplos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, poli(alquilenglicoles), tales como poli(etilenglicol) ("PEG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol que tienen solubilidad en agua, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmacrilamida), poli(hidroxiálquilmacrilato), poli(sacáridos), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolona, poli(N-acrilolmorfolina), tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.629.384. En algunas aplicaciones donde se desea una solubilidad en agua relativamente alta, el polímero soluble en agua no es poli(óxido de propileno).

Las unidades repetitivas en cada uno de los polímeros solubles en agua pueden tener varias disposiciones diferentes que incluyen, entre otras, las seleccionadas del grupo que consiste en homopolímero (en donde cada unidad monomérica que comprende el polímero soluble en agua es la misma), copolímero alterno (en donde una primera unidad monomérica se alterna de manera regular con una segunda unidad monomérica dentro del polímero soluble en agua), copolímero aleatorio (en donde una primera unidad monomérica se alterna de manera irregular con una segunda unidad monomérica dentro del polímero soluble en agua), copolímero de bloques, (en donde dos o más unidades de primer monómero alternan con dos o más unidades de segundo monómero dentro del polímero

soluble en agua), tripolímero alterno, tripolímero aleatorio y tripolímero de bloque.

5 El polímero soluble en agua es preferiblemente, aunque no necesariamente, un poli(etilenglicol) ("PEG") o un derivado del mismo. Sin embargo, se debe entender que los polímeros relacionados también son adecuados para el uso en la práctica de esta invención y que el uso del término "PEG" o "poli(etilenglicol)" pretende ser inclusivo y no exclusivo a este respecto. En consecuencia, el término "PEG" incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas lineales, ramificadas o de múltiples brazos, incluyendo alcoxi PEG, PEG bifuncional, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante o PEG con enlaces degradables en el mismo, que se va a describir con más detalle a continuación.

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



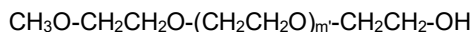
15 (m') típicamente varía de cero a aproximadamente 4.000.

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



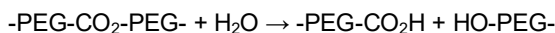
donde (m') es el definido más arriba.

25 Otro tipo de PEG útil en la presente invención es metoxi-PEG-OH, o resumiendo mPEG, en el que un extremo es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo. La estructura de mPEG se proporciona a continuación.



30 donde (m ') es el descrito más arriba.

Además de las formas de PEG descritas anteriormente, el polímero también se puede preparar con uno o más enlaces débiles o degradables en el polímero, incluyendo cualquiera de los polímeros descritos anteriormente. Por ejemplo, el PEG se puede preparar con enlaces éster en el polímero que están sujetos a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis produce la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular:



40 Otros enlaces hidrolíticamente degradables, útiles como enlaces degradables dentro de una cadena principal de polímero, incluyen: enlaces carbonato; enlaces imina resultantes, por ejemplo, de la reacción de una amina y un aldehído (véase, por ejemplo, Ouchi et al. (1997) Polymer Preprints 38(1):582-3); los enlaces éster fosfato formados, por ejemplo, haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que se forman típicamente haciendo reaccionar una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que se forman típicamente por reacción entre un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que se forman, por ejemplo, por reacción entre un formiato y un alcohol; enlaces amida formados por un grupo amina, por ejemplo, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de otra cadena de PEG; enlaces uretano formados a partir de la reacción de, por ejemplo, un PEG con un grupo isocianato terminal y un alcohol PEG; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, por ejemplo, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces de oligonucleótidos formados, por ejemplo, por un grupo fosforamidita, por ejemplo, al final de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

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

55 Aunque el peso molecular del polímero soluble en agua (así como el reactivo polimérico) puede variar, el peso molecular satisfará uno o más de los siguientes valores: mayor de 100 Daltons; mayor de 200 Daltons; mayor de 400 Daltons; mayor de 500 Daltons, mayor de 750 Daltons; mayor de 900 Daltons; mayor de 1.000 Daltons, mayor de 1.400 Daltons; mayor de 1.500 Daltons, mayor de 1.900 Daltons; mayor de 2.000 Daltons; mayor de 2.200 Daltons; mayor de 2.500 Daltons; mayor de 3.000 Daltons; mayor de 4.000 Daltons; mayor de 4.900 Daltons; mayor de 5.000 Daltons; mayor de 6.000 Daltons; mayor de 7.000 Daltons; mayor de 7.500 Daltons, mayor de 9.000 Daltons; mayor de 10.000 Daltons; mayor de 11.000 Daltons; mayor de 14.000 Daltons, mayor de 15.000 Daltons; mayor de 16.000 Daltons; mayor de 19.000 Daltons; mayor de 20.000 Daltons; mayor de 21.000 Daltons; mayor de 22.000 Daltons, mayor de 25.000 Daltons; y mayor de 30.000 Daltons. Se entiende que el límite máximo de peso molecular para cualquier segmento de polímero soluble en agua dado aquí útil es de aproximadamente 300.000 Daltons.



El peso molecular del polímero soluble en agua (así como el reactivo polimérico completo) también se puede expresar como un valor dentro de un intervalo de pesos moleculares. Los intervalos ilustrativos incluyen: de aproximadamente 100 Daltons a aproximadamente 100.000 Daltons; de aproximadamente 500 Daltons a aproximadamente 80.000 Daltons; de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 60.000 Daltons; de aproximadamente 2.000 Daltons a aproximadamente 50.000 Daltons; y de aproximadamente 5.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

Los pesos moleculares ilustrativos para cualquier polímero soluble en agua dado (así como el reactivo polimérico completo) dentro de un reactivo polimérico incluyen aproximadamente 100 Daltons, aproximadamente 200 Daltons, aproximadamente 300 Daltons, aproximadamente 400 Daltons, aproximadamente 500 Daltons, aproximadamente 600 Daltons, aproximadamente 700 Daltons, aproximadamente 750 Daltons, aproximadamente 800 Daltons, aproximadamente 900 Daltons, aproximadamente 1.000 Daltons, aproximadamente 2.000 Daltons, aproximadamente 2.200 Daltons, aproximadamente 2.500 Daltons, aproximadamente 3.000 Daltons, aproximadamente 4.000 Daltons, aproximadamente 4.400 Daltons, aproximadamente 5.000 Daltons, aproximadamente 6.000 Daltons, aproximadamente 7.000 Daltons, aproximadamente 7.500 Daltons, aproximadamente 8.000 Daltons, aproximadamente 9.000 Daltons, aproximadamente 10.000 Daltons, aproximadamente 11.000 Daltons, aproximadamente 12.000 Daltons, aproximadamente 13.000 Daltons, aproximadamente 14.000 Daltons, aproximadamente 15.000 Daltons, aproximadamente 20.000 Daltons, aproximadamente 22.000 Daltons, aproximadamente 25.000 Daltons, aproximadamente 25.000 Daltons, aproximadamente 30.000 Daltons, aproximadamente 40.000 Daltons, aproximadamente 50.000 Daltons, aproximadamente 60.000 Daltons, aproximadamente 75.000 Daltons, y aproximadamente 80.000 Daltons.

Con respecto al PEG, en donde se puede proporcionar una estructura que comprende un monómero de óxido de etileno que se repite, tal como  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$  o  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-$ , los valores preferidos para (m) incluyen: de aproximadamente 3 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 10 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 15 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 20 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 25 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 30 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 40 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 50 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 55 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 75 a aproximadamente 3.000; de aproximadamente 100 a aproximadamente 3.000; y de aproximadamente 225 a aproximadamente 3.000.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "polímero soluble en agua" incluye aquellos polímeros solubles en agua que son biocompatibles y no inmunogénicos y excluye específicamente cualquier segmento de polímero soluble en agua que no sea biocompatible y no inmunogénico. Con respecto a la biocompatibilidad, una sustancia se considera biocompatible si los efectos beneficiosos asociados con el uso de la sustancia sola o con otra sustancia (p. ej., agente activo) en relación con tejidos vivos (p. ej., administración a un paciente) supera cualquier efecto perjudicial según lo evaluado por un facultativo, por ejemplo, un médico. Con respecto a la no inmunogenicidad, una sustancia se considera no inmunogénica si el uso previsto de la sustancia *in vivo* no produce una respuesta inmunitaria no deseada (p. ej., la formación de anticuerpos) o, si se produce una respuesta inmunitaria, dicha respuesta no se considera clínicamente significativa o importante según lo evalúe un facultativo. Se prefiere particularmente que los segmentos poliméricos solubles en agua descritos en la presente memoria así como los productos conjugados sean biocompatibles y no inmunogénicos.

Aquellos expertos normales en la técnica reconocerán que la discusión anterior con respecto a un polímero sustancialmente soluble en agua no es de ninguna manera exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente. Según se utiliza en la presente memoria, el término "reactivo polimérico" generalmente se refiere a una molécula completa, que puede comprender un polímero soluble en agua y un grupo funcional. El término "polímero soluble en agua" generalmente se reserva para su uso en la discusión de una porción de una estructura molecular más grande, tal como un reactivo polimérico, una molécula precursora, un producto conjugado, etc.

Cada porción (p. ej., grupo funcional, agente activo, polímero soluble en agua, etc.) del reactivo polimérico y otras estructuras descritas en la presente memoria se pueden anclar directamente entre sí mediante un enlace covalente directo. Sin embargo, más típicamente, cada porción está unida a través de un resto espaciador compuesto por uno o más átomos que sirven para trabar cada porción en un todo unificado.

Los restos espaciadores preferidos a través de los cuales las diversas porciones de los reactivos poliméricos y otras estructuras descritas en la presente memoria incluyen una cadena de átomos formada por átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Anclados a esta cadena de átomos, puede haber uno o más átomos, tales como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre e hidrógeno. La cadena puede ser corta y comprender tan solo una cadena de dos a cinco átomos. También se contemplan cadenas más largas, por ejemplo, una cadena de átomos de diez, quince o más de longitud. Además, el resto espaciador puede comprender un anillo de átomos que puede estar saturado, insaturado, además de ser aromático. Cuando está presente, un resto espaciador comprende preferiblemente una secuencia de aproximadamente 1-20 átomos excluyendo cualquier átomo de ramificación.

Preferiblemente, los átomos que forman el resto espaciador (incluyendo cualquier átomo de ramificación) comprenden alguna combinación de átomos de oxígeno, carbono, nitrógeno, azufre e hidrógeno. Cada resto espaciador (p. ej., primer resto espaciador, segundo resto espaciador, tercer resto espaciador, etc.) en el reactivo polimérico puede ser igual o diferente de cualquier otro resto espaciador presente en el polímero.

5 Ejemplos no limitantes de un resto espaciador son aquellos seleccionados del grupo que consiste en -O-, -S-, -C(O)-, -O-C(O)-, -C(O)-O-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub>-, -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)-, -O-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, grupo cicloalquilo bivalente, -N(R<sup>2</sup>)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, O-C(O)-NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>f</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, y combinaciones de dos o más de cualesquiera de los anteriores, en donde (f) es de 0 a 6, (n) es de 0 a 20 (preferiblemente de 0 a 10, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y más preferiblemente 4), R<sup>2</sup> es H o un radical orgánico. Los grupos cicloalquilo bivalentes preferidos tienen la estructura -(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)<sub>p</sub>-cicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>)-(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)<sub>q</sub>-, en donde p y q son cada uno independientemente de 0 a aproximadamente 10, preferiblemente de 0 a aproximadamente 6 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6), cada R<sup>3</sup> es independientemente H, alquilo u otro cicloalquilo, y cada R<sup>4</sup> es independientemente H, alquilo, u otro cicloalquilo. Otros grupos cicloalquilo bivalentes (por ejemplo, cicloalquilenos) incluyen C<sub>3-8</sub>cicloalquilo, tal como diversos isómeros de ciclopropadiilo (p. ej., 1,1-, cis-11,2-, o trans-1,2-ciclopropileno), ciclobutadiilo, ciclopentadiilo, ciclohexadiilo y cicloheptadiilo. El grupo cicloalquilenos puede estar sustituido con uno o más grupos alquilo, preferiblemente grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

Para cualquier radical espaciador dado que comprenda tanto un átomo de carbonilo como un átomo de carbono adyacente al mismo, el resto espaciador incluye opcionalmente un radical orgánico anclado al átomo de carbono adyacente al carbonilo. Convencionalmente, el átomo de carbono inmediatamente adyacente al carbono carbonílico se denomina carbono alfa. Por lo tanto, un carbono alfa en cualquier resto espaciador dado puede tener un radical orgánico tal como un pequeño grupo alquilo (p. ej., un grupo metilo) anclado al mismo.

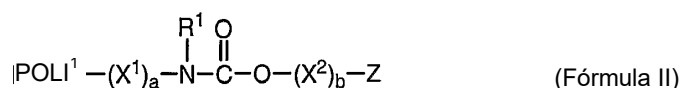
La estructura general de los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria puede adoptar cualquier número de formas diferentes. Por ejemplo, el reactivo polimérico puede ser lineal, ramificado, multibrazo, dendrítico o bifurcado. Las estructuras lineales corresponden a las Fórmulas II y Ila a continuación. Sin embargo, se prefiere que el reactivo polimérico tenga una estructura ramificada o multibrazo. En términos generales, tales polímeros poseen dos o más polímeros solubles en agua y crean una "nube" de polímero más grande y más densa que rodea a un agente activo, lo que reduce el número efectivo de sitios de unión disponibles que se acoplan. Las siguientes Fórmulas III, IIIa, IIIb y IIIb<sub>1</sub> son las estructuras ramificadas que comprenden dos polímeros solubles en agua. Las estructuras ramificadas también pueden comprender tres polímeros solubles en agua. Los polímeros multibrazo, por otra parte, comprenden cuatro o más de tales polímeros solubles en agua. Las formas dendríticas de los polímeros tienen varios (p. ej., 3 a 50) polímeros solubles en agua separados, conectados en última instancia a un núcleo que comprende uno o más átomos. Para cualquier reactivo polimérico concreto que comprenda dos o más polímeros solubles en agua, cada polímero soluble en agua puede ser igual o diferente. Además, se pueden utilizar combinaciones de los mismos y diferentes polímeros solubles en agua cuando el reactivo polimérico comprende tres o más polímeros solubles en agua, aunque se prefiere que cada polímero soluble en agua en el polímero sea el mismo que el otro o los otros.

Con respecto a las formas ramificadas del reactivo polimérico, los intervalos ilustrativos de tamaños adecuados 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 (nuevamente, expresado en términos de masa molecular): de aproximadamente 200 Daltons a aproximadamente 200.000 Daltons; de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 100.000 Daltons; de aproximadamente 2.000 Daltons a aproximadamente 120.000 Daltons; de aproximadamente 4.000 Daltons a aproximadamente 100.000 Daltons; de aproximadamente 5.000 Daltons a aproximadamente 90.000 Daltons, de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 80.000 Daltons, y de aproximadamente 15.000 Daltons a aproximadamente 60.000 Daltons. Más particularmente, la masa molecular total (en Daltons) de una versión ramificada del polímero de la invención corresponde a uno de los siguientes: aproximadamente 400; aproximadamente 1.000; aproximadamente 1.500; aproximadamente 2.000;

aproximadamente 3.000; aproximadamente 4.000; aproximadamente 10.000; aproximadamente 15.000; aproximadamente 20.000; aproximadamente 30.000; aproximadamente 40.000; aproximadamente 50.000; aproximadamente 60.000; aproximadamente 80.000, aproximadamente 90.000, aproximadamente 100.000, aproximadamente 120.000, aproximadamente 160.000 o aproximadamente 200.000.

5 Al considerar la estructura general de los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria, se reconocerán ciertas diferencias con respecto a los reactivos poliméricos descritos en la técnica anterior. Por ejemplo, muchos de los reactivos poliméricos de la técnica anterior sufren una serie de problemas que los hacen inadecuados para el acoplamiento a un agente activo. Por ejemplo, algunos reactivos poliméricos de la técnica anterior carecen de un grupo funcional fácilmente desplazable, tal como un grupo reactivo (p. ej., éster). Incluso si se intentara acoplar un reactivo polimérico que careciera de un grupo funcional fácilmente desplazable (p. ej., un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-)), las condiciones requeridas para hacerlo serían muy duras (p. ej., condiciones fuertemente alcalinas), por lo tanto, es probable que degraden el agente activo. Además, algunos reactivos poliméricos de la técnica anterior tienen dos grupos (p. ej., grupos carbonilo) sustituidos en el sitio potencial de unión, lo que a menudo conduce a una conjugación incompleta debido a efectos estéricos y/o reactividad reducida como consecuencia de la proximidad de los grupos.

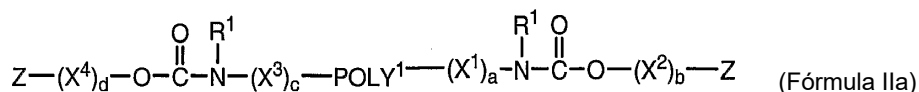
20 Cuando solo un polímero soluble en agua está presente en la estructura general del polímero, la estructura del polímero corresponde preferiblemente a la Fórmula (II):



en donde:

25 POLI<sup>1</sup> es un polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG o mPEG);  
 (a) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (b) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 R<sup>1</sup> es H o un radical orgánico (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido);  
 30 X<sup>1</sup>, cuando está presente, es un primer resto espaciador;  
 X<sup>2</sup>, cuando está presente, es un segundo resto espaciador; y  
 Z es un grupo reactivo.

35 Además, cuando el polímero comprende solo una única porción soluble en agua en la estructura general, la estructura también puede corresponder a la Fórmula IIa:



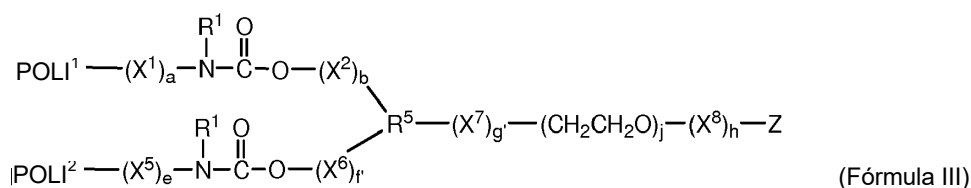
en donde:

40 POLI<sup>1</sup> es un polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG o mPEG);  
 (a) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (b) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (c) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 45 (d) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);

Cada R<sup>1</sup> es independientemente H o un radical orgánico (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido);

50 X<sup>1</sup>, cuando está presente, es un primer resto espaciador;  
 X<sup>2</sup>, cuando está presente, es un segundo resto espaciador;  
 X<sup>3</sup>, cuando está presente, es un tercer resto espaciador;  
 X<sup>4</sup>, cuando está presente, es un cuarto resto espaciador; y  
 cada Z es independientemente un grupo reactivo.

55 De acuerdo con las presentes reivindicaciones, cuando dos polímeros solubles en agua están presentes en la estructura global del reactivo polimérico, la estructura corresponde a la Fórmula III:



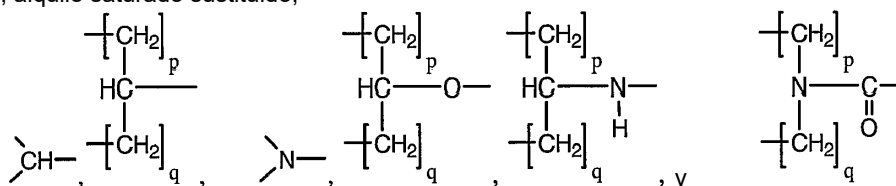
en donde:

- 5 POLI<sup>1</sup> es un poli(óxido de alquileno) (por ejemplo, PEG o mPEG);  
 POLI<sup>2</sup> es un óxido de polialileno (por ejemplo, PEG o mPEG);  
 (a) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (b) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (e) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 10 (f) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (g) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (h) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (j) es de 0 a 20 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20);  
 cada R<sup>1</sup> es independientemente H o un radical orgánico (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en  
 15 alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido);  
 X<sup>1</sup>, cuando está presente, es un primer resto espaciador;  
 X<sup>2</sup>, cuando está presente, es un segundo resto espaciador;  
 X<sup>5</sup>, cuando está presente, es un quinto resto espaciador;  
 X<sup>6</sup>, cuando está presente, es un sexto resto espaciador;  
 20 X<sup>7</sup>, cuando está presente, es un séptimo resto espaciador;  
 X<sup>8</sup>, cuando está presente, es un octavo resto espaciador;  
 R<sup>5</sup> es un radical ramificado; y  
 Z es un grupo reactivo.

- 25 Los reactivos poliméricos preferidos que tienen estructuras abarcadas por las Fórmulas II, (IIa) y III son aquellos en los que cada polímero soluble en agua (es decir, POLI<sup>1</sup> y/o POLI<sup>2</sup>) es un poli(óxido de alqueno) tal como poli(óxido de etileno). Preferiblemente, aunque no necesariamente, el poli(óxido de etileno) tendrá un extremo protegido terminalmente con un grupo tal como metilo, bencilo o hidroxilo. Un poli(óxido de etileno) con protección terminal particularmente preferido es uno que corresponde a una de las siguientes estructuras: H<sub>3</sub>C-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- o H<sub>3</sub>C-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-O-C(O)-NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>f</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, donde (m) es de 2 a 4000, (f) es de 0 a 6, (n) es de 0 a 20.

- Cada resto espaciador (ya sea un primer resto espaciador, un segundo resto espaciador o un tercer resto espaciador) que aparece en un polímero y está abarcado por las Fórmulas II, IIa o III se define independientemente como antes con respecto a los restos espaciadores en general. Sin embargo, se prefiere que cada uno de los restos espaciadores, tales como los designados como "X<sup>1n</sup>" y "X<sup>5n</sup>" se seleccione del grupo que consiste en -O-, -O-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, y -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-. Con respecto a los restos espaciadores designados como "X<sup>2n</sup>" y "X<sup>6n</sup>", el resto espaciador se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>(O<sup>2</sup>)-, -CH<sub>2</sub>-CH(O<sup>2</sup>)-CH(O<sup>2</sup>)-, -N(R<sup>2</sup>)-, y R<sup>2</sup> es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido. Con respecto a un resto espaciador designado en "X<sup>8n</sup>", el resto espaciador se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en -O-, -O-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, y -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, en donde (n) es de 0 a 20. Opcionalmente, X<sup>8</sup> puede incluir un punto de ramificación adicional o varios puntos de ramificación en los que pueden estar presentes grupos reactivos adicionales, proporcionando así una disposición "bifurcada". Otras disposiciones "bifurcadas" que se pueden utilizar en los presentes polímeros se describen más detalladamente en la Solicitud Internacional Núm. PCT/US99/05333.

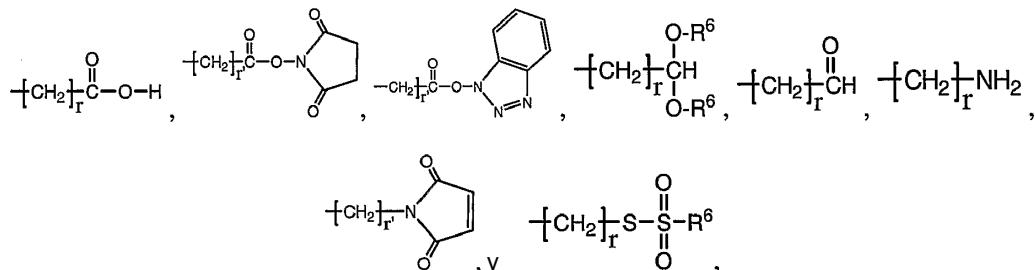
- El radical ramificado R<sup>5</sup> en la Fórmula III puede ser cualquier resto de ramificación que pueda proporcionar acoplamiento a al menos tres átomos. Preferiblemente, sin embargo, R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo saturado, alquilo saturado sustituido,



en donde (p) es 1-10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) y (q) es 1-10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o

10).

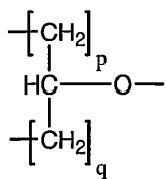
5 Aunque el grupo reactivo "Z" como se muestra en las Fórmulas II, IIa y III puede ser cualquier grupo reactivo descrito anteriormente, se prefiere que el grupo reactivo se seleccione del grupo que consiste en ácido carboxílico, aldehído, sulfona, éster, succinimida y maleimida. Los ejemplos ilustrativos de un resto espaciador (p. ej., X<sup>2</sup>, X<sup>4</sup> y X<sup>8</sup>) y combinaciones de Z incluyen



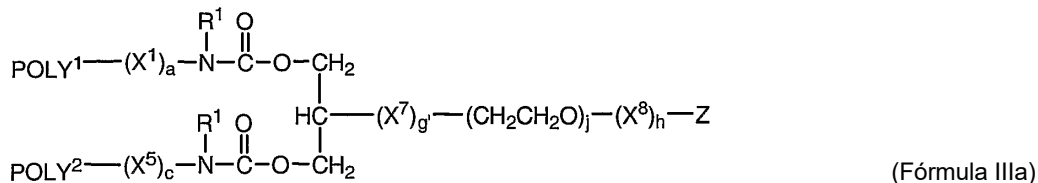
10 en donde (r) es 1-12 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12), (r') es 0-5 (p. ej., 0, 1, 2, 3, 4 o 5), y R<sup>6</sup> es arilo o alquilo.

15 Como apreciará un experto en la técnica, la presente invención abarca un gran número de polímeros. A continuación se proporcionan ejemplos de polímeros de acuerdo con la presente invención.

Por ejemplo, partiendo de la fórmula III y definiendo y R<sup>5</sup> como

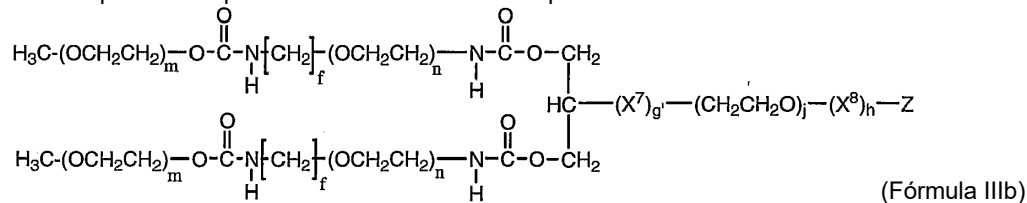


20 en donde cada uno de (p) y (q) es uno, y cada uno de (b) y (f) como cero, se obtiene un polímero que tiene una estructura correspondiente a la Fórmula (IIIa), siguiente.



25 en donde POLI<sup>1</sup>, POLI<sup>2</sup>, (a), (c), (g'), (j), (h), R<sup>1</sup>, X<sup>7</sup>, X<sup>8</sup> y Z se definen como antes.

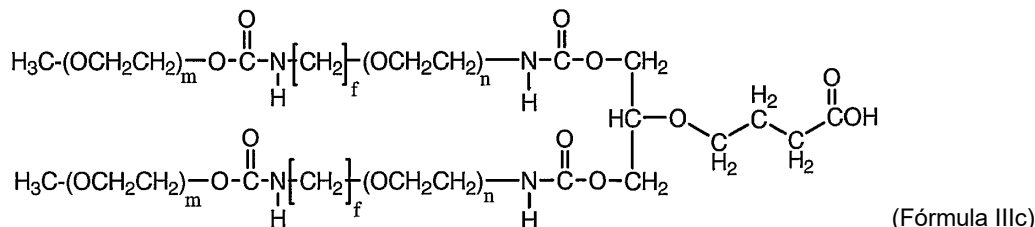
30 La fórmula IIIa puede, a su vez, definirse adicionalmente para proporcionar un reactivo polimérico que tiene una estructura correspondiente a la Fórmula IIIb. Específicamente, partiendo de la Fórmula IIIa y definiendo cada R<sup>1</sup> como H, cada uno de POLI<sup>1</sup> y POLI<sup>2</sup> como H<sub>3</sub>C-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- en donde (m) es de 2 a 4000, cada uno de (a) y (e) como uno, cada uno de X<sup>1</sup> y X<sup>5</sup> como -O-C(O)-NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>f</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- donde (f) es de 0 a 6 y (n) de 0 a 20, se obtiene un reactivo polimérico que tiene una estructura correspondiente a la fórmula IIIb:



35 en donde cada (m) es de 2 a 4000, cada (f) es independientemente de 0 a 6, y cada (n) es independientemente de 0 a 20, y (g'), (h), (j), X<sup>7</sup>, X<sup>8</sup> y Z se definen como antes.

La fórmula IIIb puede, a su vez, definirse adicionalmente para proporcionar un reactivo polimérico que tiene una estructura correspondiente a la Fórmula IIIc. Específicamente, partiendo de la Fórmula IIIb y definiendo cada uno de (g') y (j) como cero, (h) como uno, X<sup>8</sup> como -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, y Z como ácido carboxílico se obtiene un polímero que tiene una estructura correspondiente a la Fórmula IIIc, siguiente.

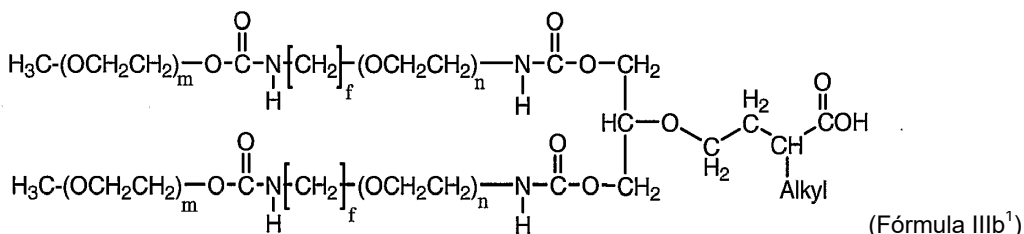
5



en donde cada (m) es de 2 a 4000, cada (f) es independientemente de 0 a 6, y cada (n) es independientemente de 0 a 20 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20).

10

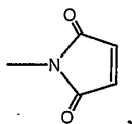
Opcionalmente, la Fórmula IIIc también puede incluir un grupo alquilo conectado al carbono alfa o beta del ácido carboxílico. Con respecto al grupo alquilo (p. ej., metilo) en el carbono alfa del ácido carboxílico, la estructura corresponde a la Fórmula IIIb<sup>1</sup>.



15

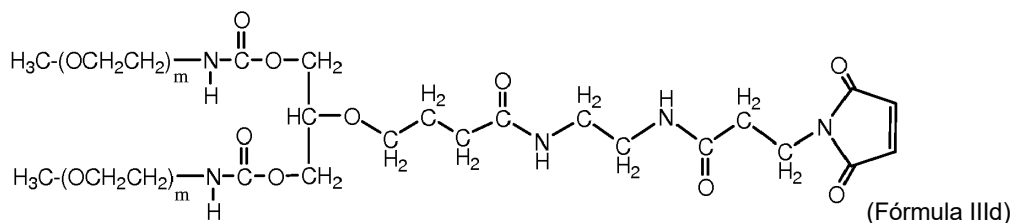
Además, la Fórmula IIIa puede definirse adicionalmente para proporcionar otro polímero preferido. Específicamente, partiendo de la fórmula IIIa y definiendo cada uno de POLI<sup>1</sup> y POLI<sup>2</sup> como H<sub>3</sub>C-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- en donde (m) es 2 a 4000, cada uno de (a), (c), (g') y (j) como cero, (h) como uno, X<sup>8</sup> como -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, y Z como

20



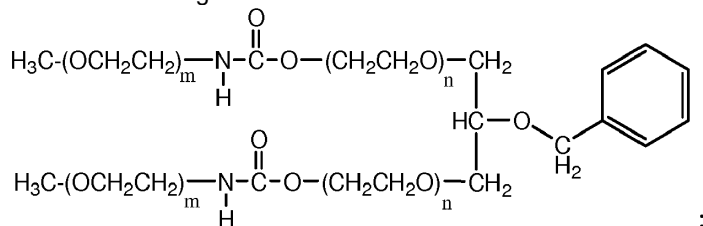
se obtiene un polímero que tiene la siguiente estructura:

25

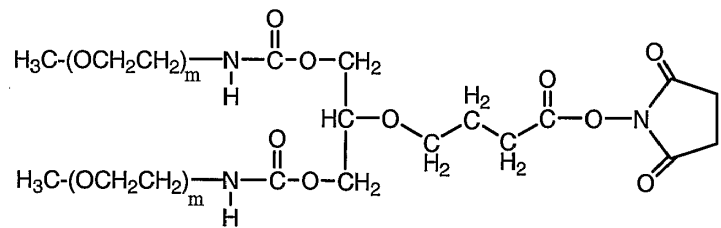
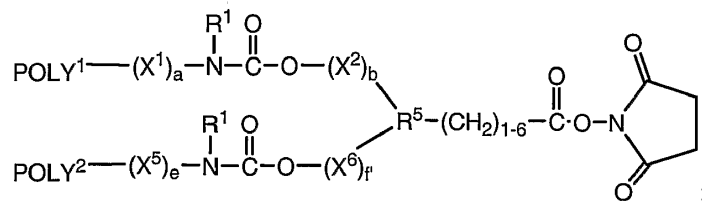
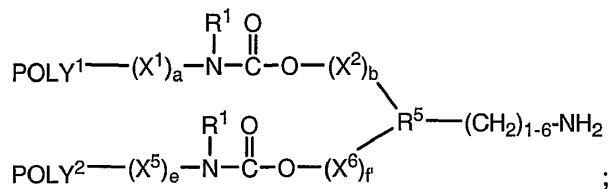
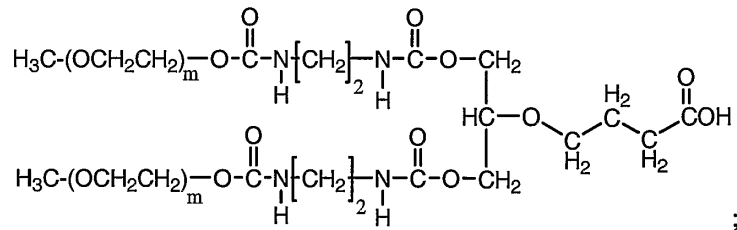
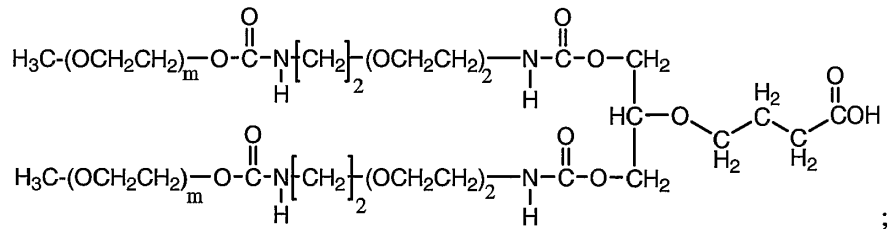
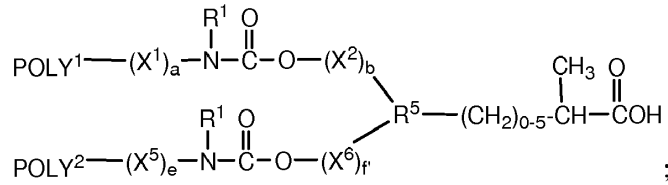
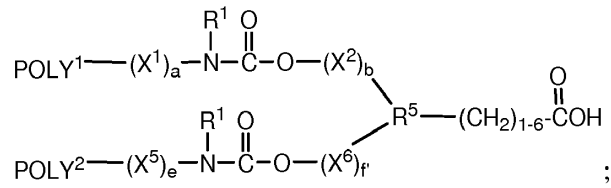


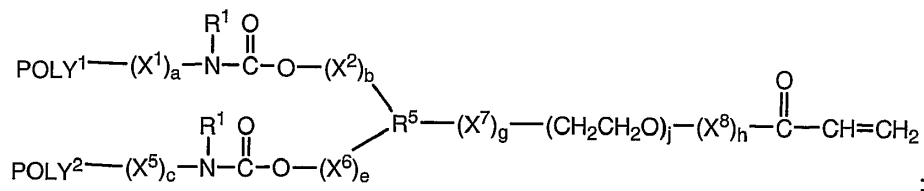
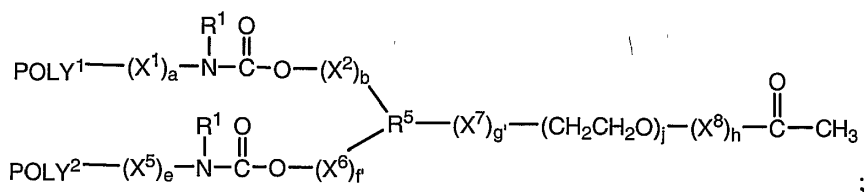
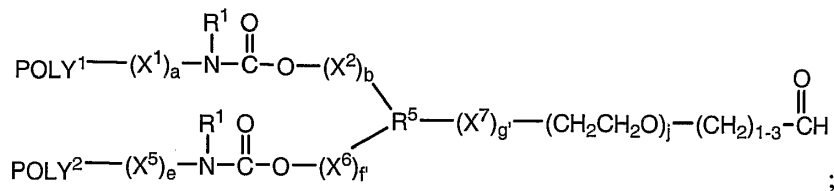
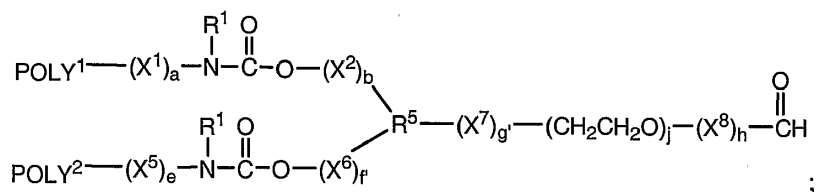
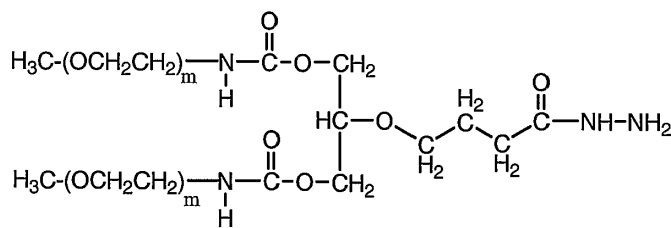
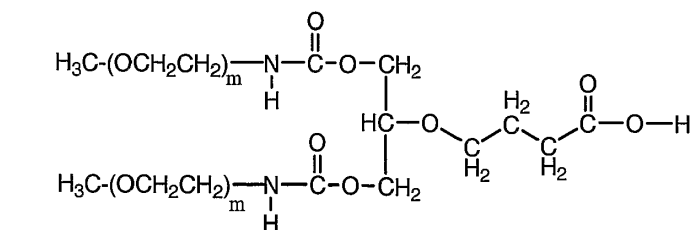
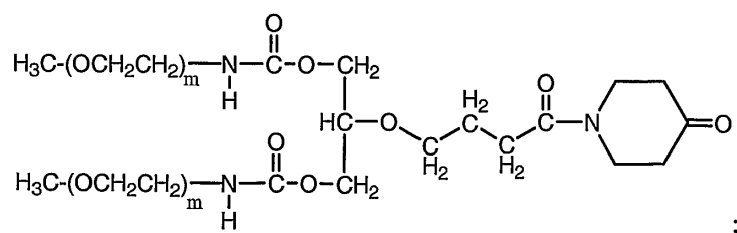
en donde cada (m) es de 2 a 4000.

Son reactivos poliméricos adicionales los siguientes:



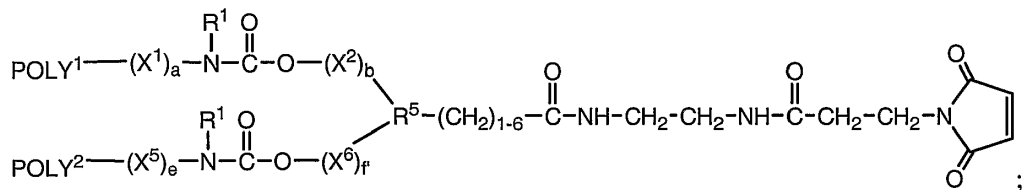
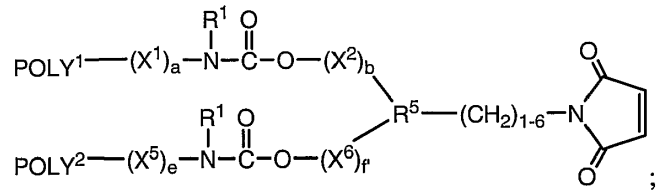
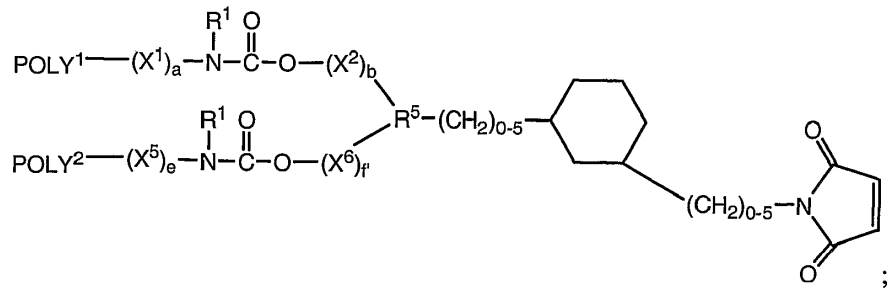
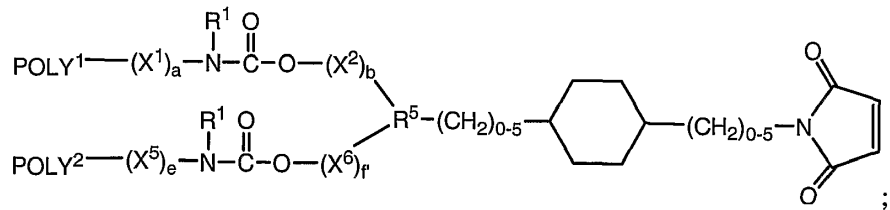
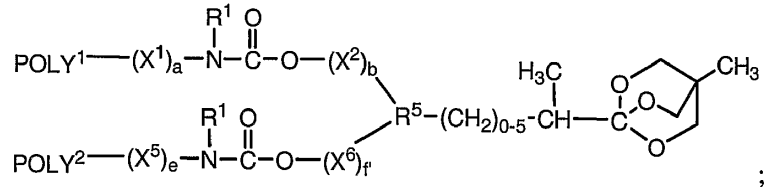
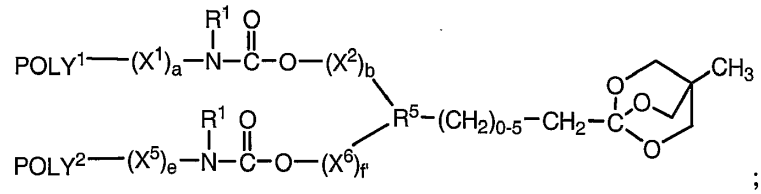
30

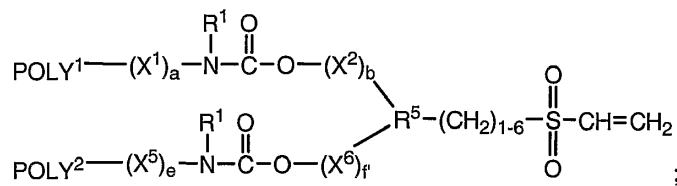
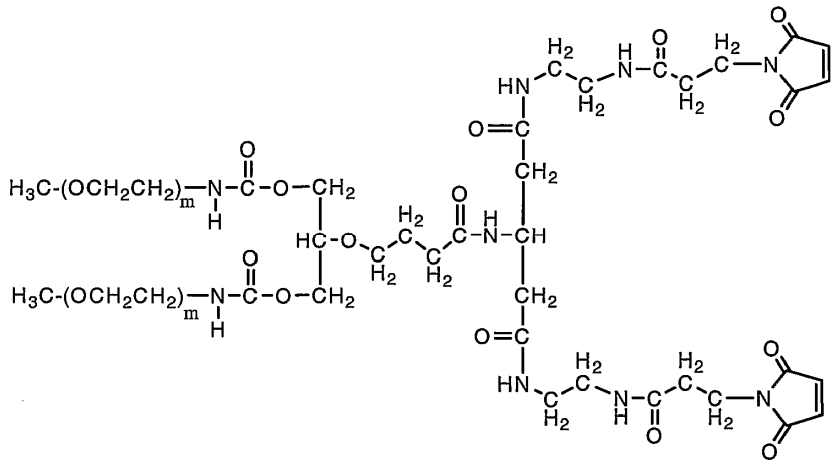
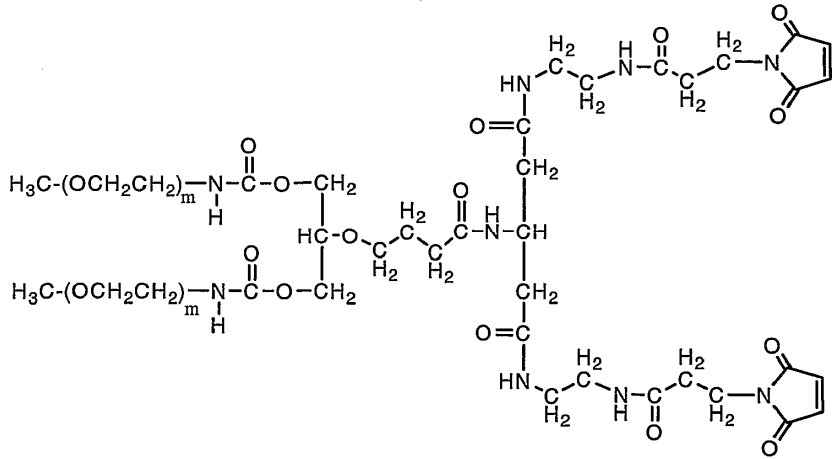
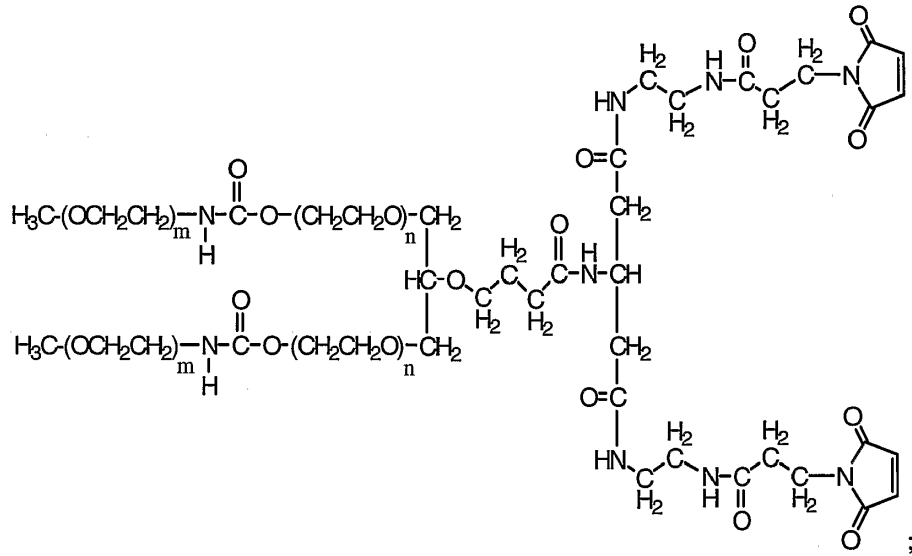


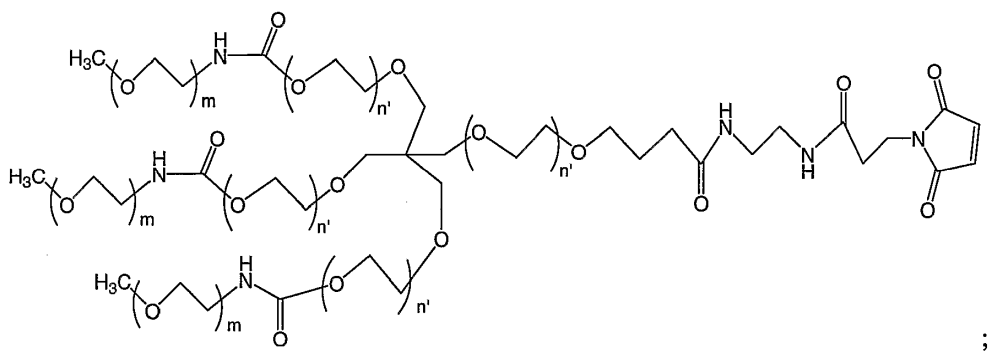
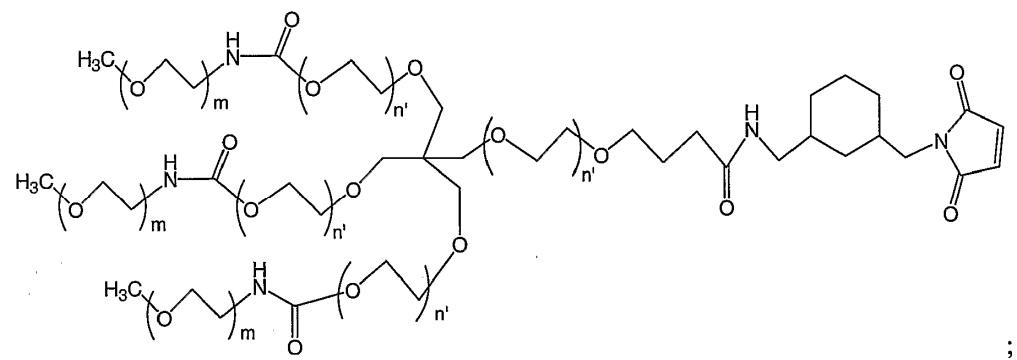
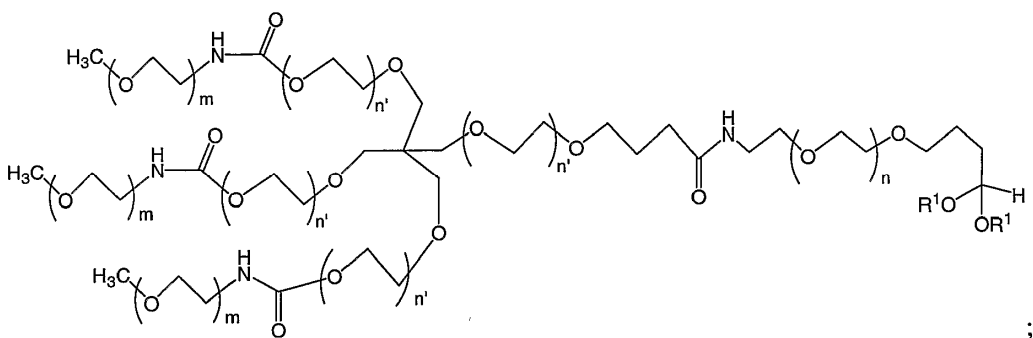
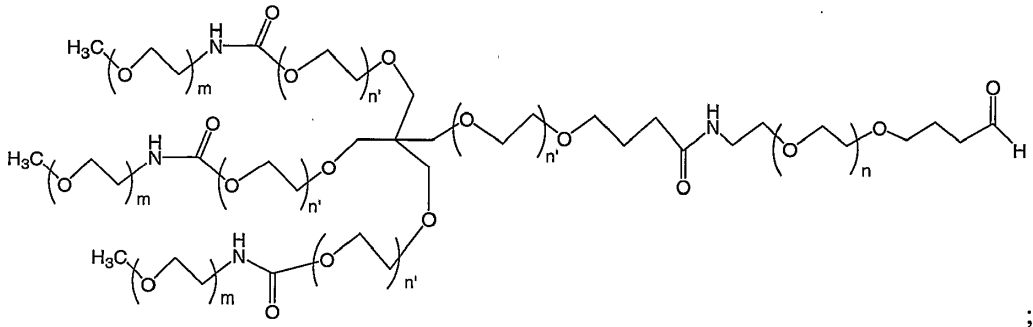
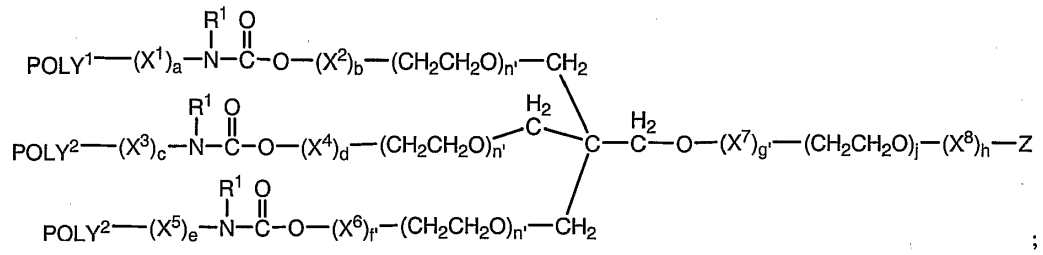


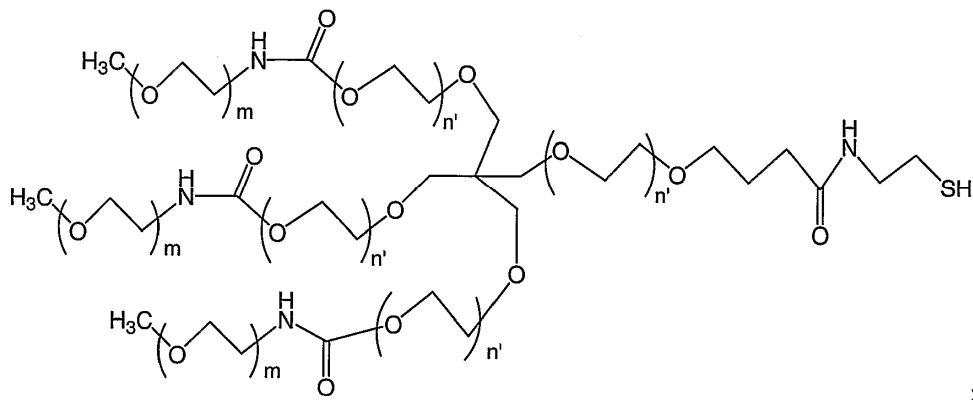
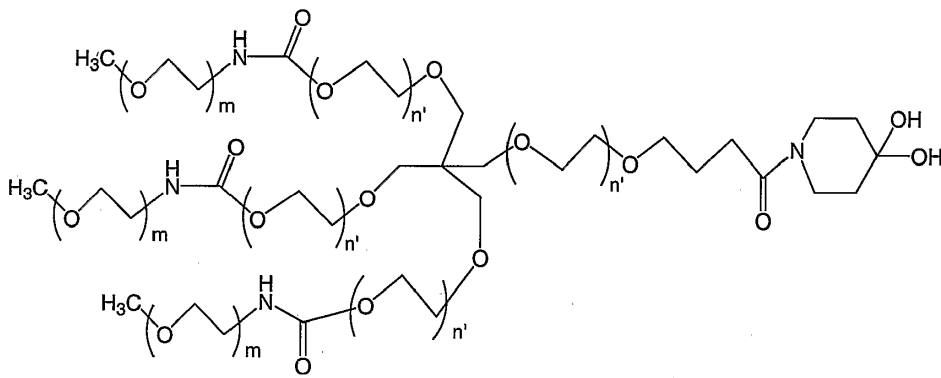
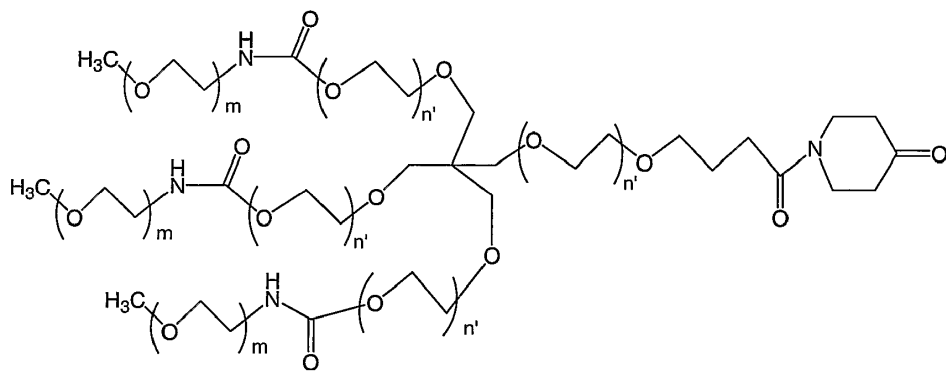
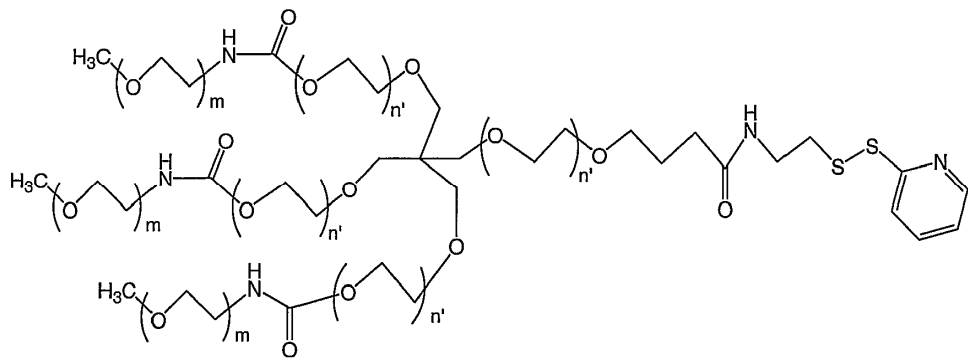


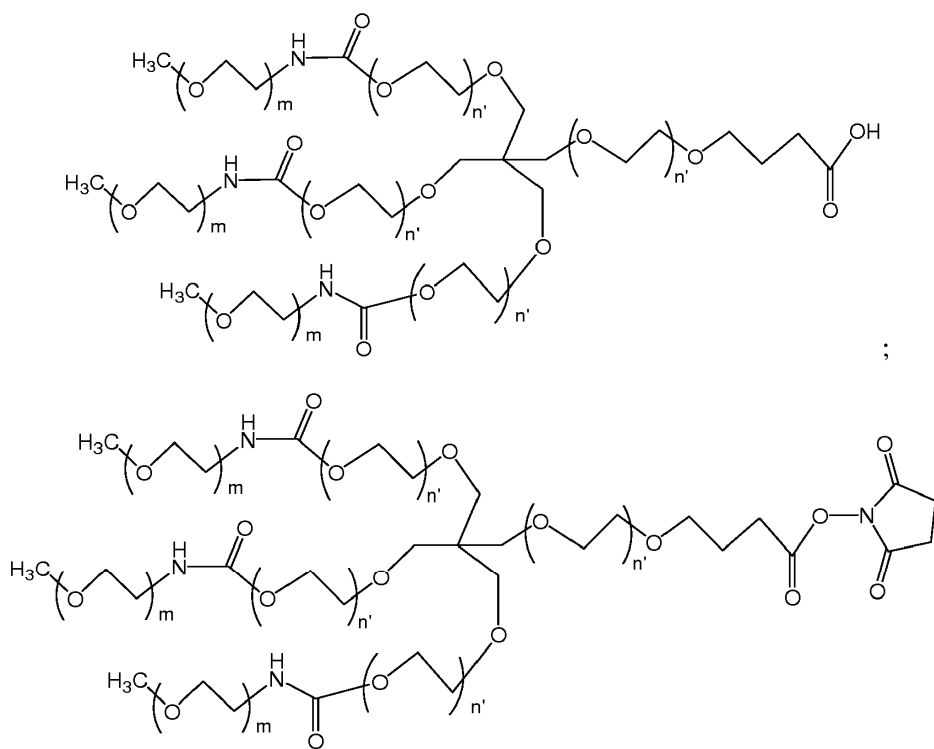










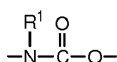


5 en donde todas las variables se definen como antes, en donde cada (n') es 0-100, más preferiblemente 0-40, y lo más preferiblemente 0-20.

10 En ciertos casos, los reactivos poliméricos de la invención no incluyen un resto cetona, es decir, un resto en el que dos átomos de carbono separados están anclados cada uno a un átomo de carbono de un resto carbonilo. Además, se prefiere que el resto



15 no sea parte de una estructura anillada (tal como una maleimida) en algunos casos. Además, también se prefiere que el resto

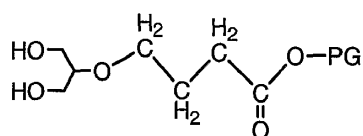


20 esté más cerca del polímero soluble en agua que el grupo reactivo, como se mide, por ejemplo, en términos del número de átomos necesarios para alcanzar el grupo reactivo a partir del átomo más cercano en el polímero soluble en agua en comparación con el número de átomos para alcanzar el grupo reactivo a partir del átomo más cercano en el grupo reactivo.

25 También se describe un método para preparar los reactivos poliméricos proporcionados en la presente memoria. El método comprende la etapa de (i) proporcionar una molécula precursora que comprende un grupo reactivo protegido (o grupo reactivo desprotegido si dicho grupo reactivo puede permanecer inalterado cuando se realizan las etapas del método) o un precursor de un grupo reactivo y uno o más grupos hidroxilo. Algunas moléculas precursoras que comprenden un grupo reactivo protegido o un grupo reactivo precursor y uno o más grupos hidroxilo pueden obtenerse comercialmente. Además, las formas no protegidas de la molécula precursora se pueden sintetizar y a

30 continuación proteger (si fuera necesario) utilizando técnicas convencionales.

Aunque hay muchas formas de moléculas precursoras adecuadas, una molécula precursora preferida tiene dos grupos hidroxilo. Un ejemplo de una molécula precursora adecuada preferida corresponde a la fórmula (IV), siguiente.



(Fórmula IV)

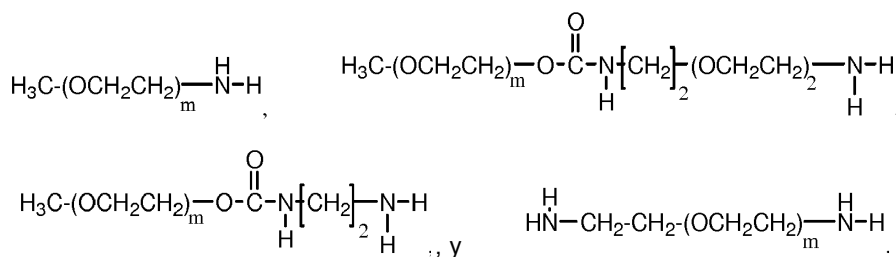
en donde PG es un grupo protector. Este reactivo se puede preparar sintéticamente, como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 1.

5 Los ejemplos de los grupos protectores preferidos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en metilo, etilo, *t*-butilo, y bencilo. Un grupo protector particularmente preferido es metilo.

10 Un método para preparar un reactivo polimérico de acuerdo con la presente invención incluye la etapa de (ii) activar al menos uno de los uno o más grupos hidroxilo de la molécula precursora su reacción con un grupo amino para formar una molécula precursora activada. Aunque se puede utilizar cualquier reactivo activador conocido en la técnica, se prefiere utilizar un agente activador seleccionado del grupo que consiste en carbonato de di (N-succinimidilo) (DSC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) (CDT), carbonato de bis(4-nitrofenilo), clorocarbonato de *p*-nitrofenilo, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), fosgeno, trifosgeno, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), carbonato de dibenzotriazolilo (diBTC), N-hidroxisuccinimida y DCC, N-hidroxifalimida y tiazolidinodiona. Típicamente, el agente activador se añade a un recipiente que contiene la molécula precursora, de modo que el agente activador puede entrar en contacto con uno o más grupos hidroxilo de la molécula precursora.

20 Otra etapa del método para preparar los reactivos poliméricos de la invención incluye (iii) poner en contacto en condiciones de acoplamiento covalente al menos uno de los uno o más grupos hidroxilo activados con un polímero soluble en agua que tiene un grupo amino, formando así un polímero que comprende la porción de polímero soluble en agua y el grupo reactivo protegido o precursor de un grupo reactivo. Los expertos en la técnica pueden determinar mediante experimentación de rutina qué condiciones de pH, temperatura, etc. son apropiadas para lograr un acoplamiento covalente. Por ejemplo, la etapa de acoplamiento se puede realizar varias veces, cada vez en un conjunto diferente de condiciones (p. ej., diferentes pH, diferentes temperaturas, disolventes, etc.). Al determinar la cantidad de polímero que comprende la porción de polímero soluble en agua y el grupo reactivo protegido (p. ej., mediante cromatografía de exclusión por tamaño) resultante de cada conjunto de condiciones, es posible determinar qué conjunto o conjuntos de condiciones son los más adecuados para realizar la etapa de acoplamiento.

30 Aunque se puede utilizar cualquier polímero soluble en agua que tenga un grupo amina, se prefiere particularmente utilizar uno de los siguientes polímeros:



40 en donde (m) es de 2 a 4000. Los polímeros solubles en agua que tienen un grupo amina se pueden sintetizar *de novo* utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden obtener comercialmente a través de proveedores tales como Nektar Therapeutics (Huntsville, AL).

45 Cuando está presente un grupo protector en la molécula precursora, el método para preparar los reactivos poliméricos también incluye la etapa de (iv) desproteger el grupo reactivo protegido, formando así el polímero. La etapa de desprotección se puede llevar a cabo utilizando cualquier método adecuado para eliminar el grupo protector concreto. Para cualquier grupo protector específico, los expertos en la técnica conocerán un enfoque de desprotección apropiado. Además, los enfoques de desprotección adecuados se describen en la bibliografía relevante, tal como, por ejemplo, Greene et al. más arriba. Un método preferido para desproteger un grupo ácido protegido como un éster de grupo alquilo (p. ej., un éster metílico) es exponer la molécula que porta el grupo protegido a hidrólisis catalizada por álcali. Los ejemplos de las bases adecuadas para añadir al recipiente de reacción que contiene la molécula que contiene el grupo reactivo protegido incluyen, sin limitación, hidróxidos inorgánicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y sales metálicas de ácidos débiles tales como acetato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, citrato de potasio, acetato de potasio, etc. La hidrólisis catalizada por ácido también puede efectuarse con ortoésteres, aunque se puede utilizar una combinación de hidrólisis catalizada por ácido seguida de hidrólisis

catalizada por álcali con esos derivados. Con los acetales, la hidrólisis catalizada por ácido es eficaz, mientras que la hidrólisis catalizada por álcali es ineficaz. Con los ésteres bencílicos o los éteres bencílicos, la reducción catalítica es eficaz, aunque la hidrólisis catalizada por ácidos o álcalis también es eficaz en los ésteres.

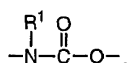
5 El método de preparación de los reactivos poliméricos comprende opcionalmente una etapa adicional de aislamiento del reactivo polimérico una vez que se forma. Se pueden utilizar métodos conocidos para aislar el polímero, pero se prefiere particularmente utilizar cromatografía, p. ej., cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño. Alternativamente o además, el método incluye la etapa de purificar el polímero una vez que se forma. De nuevo, se pueden utilizar métodos de purificación convencionales conocidos en la técnica para purificar el

10 polímero.  
Para cualquier polímero dado preparado por el presente método, el método proporciona ventajosamente la capacidad de transformar adicionalmente el polímero (ya sea antes o después de cualquier etapa de desprotección) para que porte un grupo reactivo específico. De este modo, utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, el

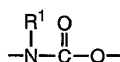
15 polímero puede funcionalizarse para incluir un grupo reactivo (p. ej., éster activo, tiol, maleimida, aldehído, cetona, etc.).

Las diversas etapas para preparar un reactivo polimérico se llevan a cabo en un disolvente adecuado. Un experto en la técnica puede determinar si algún disolvente específico es apropiado para cualquier etapa de reacción dada. Sin embargo, a menudo, el disolvente es preferiblemente un disolvente no polar o un disolvente polar. Los ejemplos de disolventes no polares incluyen benceno, xileno y tolueno. Los disolventes no polares particularmente preferidos incluyen tolueno, xileno, dioxano, tetrahidrofurano y alcohol *t*-butílico. Los disolventes polares ilustrativos incluyen dioxano, tetrahidrofurano (THF), alcohol *t*-butílico, DMSO (dimetilsulfóxido), HMPA (hexametilfosforamida), DMF (dimetilformamida), DMA (dimetilacetamida) y NMP (*N*-metilpirrolidinona).

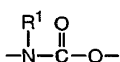
20 La presente invención también incluye productos conjugados que comprenden una porción de polímero soluble en agua, un resto



30 y un agente farmacológicamente activo. Los productos conjugados tienen la siguiente orientación estructural interna: (i) la porción de polímero soluble en agua se conecta al átomo de nitrógeno del resto



35 a través de un enlace covalente directo o a través de un primer resto espaciador; (ii) el agente farmacológicamente activo está unido al átomo de carbono carbonílico del resto



40 a través de un enlace covalente directo o un segundo resto espaciador; y (iii)  $\text{R}^1$  es H o un radical orgánico.

45 Cuando solo está presente un único polímero soluble en agua en la estructura global del producto conjugado, la estructura del producto conjugado corresponderá preferiblemente a la Fórmula V:

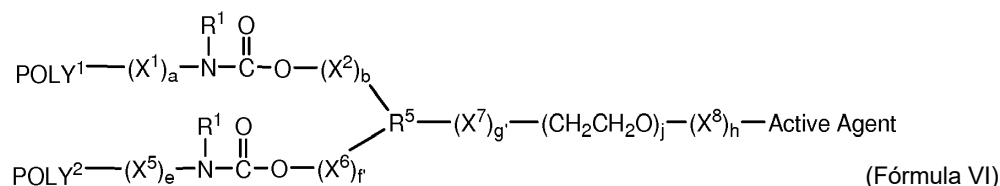


en donde:

50 POLI<sup>1</sup> es un polímero soluble en agua (p. ej., PEG o mPEG);  
(a) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
(b) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 $\text{R}^1$  es H o un radical orgánico (p. ej., seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido);  
55  $\text{X}^1$ , cuando está presente, es un primer resto espaciador;  
 $\text{X}^2$ , cuando está presente, es un segundo resto espaciador; y  
el agente activo es un agente farmacológicamente activo.



De acuerdo con las presentes reivindicaciones, cuando dos polímeros solubles en agua están presentes en la estructura global del producto conjugado, la estructura del producto conjugado se corresponderá preferiblemente con la Fórmula VI:



5

en donde:

- POLI<sup>1</sup> es un poli(óxido de alquileo) (p. ej., PEG o mPEG);  
 POLI<sup>2</sup> es un poli(óxido de alquileo) (p. ej., PEG o mPEG);  
 (a) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (b) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (e) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (f) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (g) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 (h) es 0, 1, 2 o 3 (y preferiblemente 0 o 1);  
 es de 0 a 20 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20);  
 cada R<sup>1</sup> es independientemente H o un radical orgánico (p. ej., seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo y arilo sustituido);  
 X<sup>1</sup>, cuando está presente, es un primer resto espaciador;  
 X<sup>2</sup>, cuando está presente, es un segundo resto espaciador;  
 X<sup>5</sup>, cuando está presente, es un quinto resto espaciador;  
 X<sup>6</sup>, cuando está presente, es un sexto resto espaciador;  
 X<sup>7</sup>, cuando está presente, es un séptimo resto espaciador;  
 X<sup>8</sup>, cuando está presente, es un octavo resto espaciador;  
 R<sup>5</sup> es un radical ramificado; y  
 el agente activo es un agente farmacológicamente activo.

Los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria son útiles para la conjugación con agentes o superficies biológicamente activos. Los grupos preferidos adecuados para la reacción con los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria son grupos electrófilos y nucleófilos. Los grupos ilustrativos incluyen aminas primarias (p. ej., aminas primarias de la cadena lateral de un residuo de lisina o el extremo N de un polipéptido), alcoholes (p. ej., un alcohol primario de la cadena lateral de un residuo de serina o treonina), tioles, hidrazinas, hidrazidas y sulfhidrilos. Tales grupos adecuados para reaccionar con los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria son conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, la invención proporciona un método para preparar un producto conjugado que comprende la etapa de poner en contacto, en condiciones de conjugación, un agente activo con un reactivo polimérico descrito en la presente memoria.

Las condiciones de conjugación adecuadas son las condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración del reactivo, grupo o grupos funcionales del reactivo, grupos funcionales disponibles en el agente activo, disolvente y similares, suficientes para efectuar la conjugación entre un reactivo polimérico y un agente activo. Como se conoce en la técnica, las condiciones específicas dependen, entre otras cosas, del agente activo, el tipo de conjugación deseada, la presencia de otros materiales en la mezcla de reacción, etc. Un experto con un conocimiento práctico normal de la técnica puede determinar las condiciones suficientes para efectuar la conjugación en cualquier caso concreto, mediante una lectura de la descripción en la presente memoria, la referencia a la bibliografía relevante, y/o mediante experimentación rutinaria.

Por ejemplo, cuando el reactivo polimérico contiene un éster activo de N-hidroxisuccinimida (p. ej., succinato de succinimidilo, propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo), y el agente activo contiene un grupo amina (p. ej., un grupo amino terminal en un polipéptido y/o un épsilon amina de un polipéptido que contiene lisina), la conjugación se puede efectuar a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,5 a temperatura ambiente. Además, cuando el reactivo polimérico contiene un grupo reactivo vinilsulfona o un grupo maleimida y el agente farmacológicamente activo contiene un grupo sulfhidrilo (p. ej., un grupo sulfhidrilo de un polipéptido que contiene cisteína o metionina), la conjugación se puede efectuar a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,5 a temperatura ambiente. Además, cuando el grupo reactivo asociado con el reactivo polimérico es un aldehído o cetona y el agente farmacológicamente activo contiene una amina primaria, la conjugación puede efectuarse por aminación reductiva en donde la amina primaria del agente farmacológicamente activo reacciona con el aldehído o la cetona del polímero. Teniendo lugar a pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9,5, la aminación reductiva

da como resultado inicialmente un producto conjugado en el que el agente farmacológicamente activo y el polímero se conectan a través de un enlace imina. El tratamiento subsiguiente del producto conjugado que contiene imina con un agente reductor adecuado, tal como  $\text{NaCNBH}_3$  reduce la imina a una amina secundaria. Para obtener información adicional sobre estas y otras reacciones de conjugación, se hace referencia a Hermanson "Bioconjugate Techniques", Academic Press, 1996.

Las condiciones de conjugación ilustrativas incluyen llevar a cabo la reacción de conjugación a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, y a, por ejemplo, un pH de aproximadamente 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10,0. Se deja que la reacción prosiga de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 72 horas, preferiblemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas, y más preferiblemente de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas. La temperatura bajo la cual puede tener lugar la conjugación es típicamente, aunque no necesariamente, en el intervalo de aproximadamente  $0^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $40^\circ\text{C}$ , y es a menudo a temperatura ambiente o menos. Las reacciones de conjugación a menudo se llevan a cabo utilizando una solución tampón de fosfato, acetato de sodio o un sistema similar.

Con respecto a la concentración de reactivo, un exceso del reactivo polimérico se combina típicamente con el agente activo. En algunos casos, sin embargo, se prefiere tener cantidades estequiométricas de grupos reactivos en el reactivo polimérico con respecto a los grupos reactivos del agente activo. Así, por ejemplo, un mol de un reactivo polimérico que porta dos grupos reactivos se combina con dos moles de agente activo. Las relaciones ilustrativas de reactivo polimérico con respecto al agente activo incluyen razones molares de aproximadamente 1:1 (reactivo polimérico: agente activo), 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1, o 10:1. Se permite que la reacción de conjugación continúe hasta que sustancialmente no se produzca más conjugación, lo que generalmente se puede determinar controlando el progreso de la reacción a lo largo del tiempo.

El progreso de la reacción se puede controlar extrayendo alícuotas de la mezcla de reacción en varios puntos temporales y analizando la mezcla de reacción mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF o cualquier otro método analítico adecuado. Una vez que se alcanza una meseta con respecto a la cantidad de producto conjugado formado o la cantidad de reactivo polimérico no conjugado restante, se supone que se ha completado la reacción. Por lo general, la reacción de conjugación tarda de minutos a varias horas (p. ej., de 5 minutos a 24 horas o más). La mezcla de producto resultante preferiblemente, pero no necesariamente, se purifica para separar el exceso de reactivo polimérico, los reaccionantes no conjugados (p. ej., el agente activo) y las especies multiconjugadas no deseadas. Los productos conjugados resultantes se pueden caracterizar posteriormente utilizando métodos analíticos tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel y/o cromatografía.

Los productos conjugados de polímero-agente activo se pueden purificar para obtener/aislar diferentes especies conjugadas. Alternativamente, y más preferiblemente para reactivos poliméricos de peso molecular más bajo (p. ej., menos de aproximadamente 20.000 Dalton, más preferiblemente menos de aproximadamente 10.000 Dalton) utilizados para formar productos conjugados, la mezcla del producto se puede purificar para obtener la distribución de segmentos poliméricos solubles en agua por agente activo. Por ejemplo, la mezcla del producto se puede purificar para obtener un promedio de entre uno, dos, tres, cuatro o cinco anclajes del reactivo polimérico por agente activo (p. ej., proteína), típicamente un promedio de anclajes aproximados por agente activo (p. ej., proteína). La estrategia para la purificación de la mezcla de reacción conjugada final dependerá de una serie de factores, entre los que se incluyen, por ejemplo, el peso molecular del reactivo polimérico empleado, el agente activo concreto, el régimen de dosificación deseado, y la actividad residual y las propiedades *in vivo* de los productos conjugados individuales.

Si se desea, los productos conjugados que tienen diferentes pesos moleculares se pueden aislar utilizando cromatografía de filtración en gel. Es decir, la cromatografía de filtración en gel se utiliza para fraccionar razones de reactivo polimérico por agente activo de diferente numeración (p. ej., 1-mero, 2-mero, 3-mero, etc.), en donde "1-mero" indica 1 reactivo polimérico por agente activo, "2-mero" indica dos reactivos poliméricos por agente activo, y así sucesivamente, basándose en sus diferentes pesos moleculares (donde la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular promedio de los segmentos poliméricos solubles en agua). Por ejemplo, en una reacción ilustrativa donde una proteína de 100.000 Daltons se conjuga aleatoriamente con un PEG ramificado que tiene un peso molecular total de aproximadamente 20.000 Daltons (en donde cada "brazo" del polímero del PEG ramificado tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 Daltons), la mezcla de reacción resultante puede contener proteína no modificada (que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 Daltons), proteína monoPEGilada (que tiene un peso molecular de aproximadamente 120.000 Daltons), proteína desPEGilada (que tiene un peso molecular de aproximadamente 140.000 Daltons), y así sucesivamente.

Si bien este enfoque se puede utilizar para separar PEG y otros productos conjugados de polímero-agente activo que tienen diferentes pesos moleculares, este enfoque generalmente es ineficaz para separar isómeros posicionales que tienen diferentes sitios de unión de polímero dentro de la proteína. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel se puede utilizar para separar unas de otras mezclas de 1-mero, 2-mero, 3-mero de PEG, etc., aunque cada una

de las composiciones de PEG-mero recuperadas puede contener PEG anclados a diferentes grupos amino reactivos. (p. ej., residuos de lisina) dentro del agente activo.

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

La separación de los isómeros posicionales se realiza mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna C18 de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) (Amersham Biosciences o Vydac) o mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de intercambio iónico, por ejemplo, una columna de intercambio iónico Sepharose™ disponible de Amersham Biosciences. Se puede utilizar cualquiera de los dos métodos para separar los isómeros de agente activo de polímero que tienen el mismo peso molecular (isómeros de posición).

Los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria se pueden anclar, ya sea de forma covalente o no covalente, a una serie de entidades que incluyen películas, separación química y superficies de purificación, soportes sólidos, superficies metálicas tales como oro, titanio, tantalio, niobio, aluminio, acero y sus óxidos, óxido de silicio, macromoléculas (p. ej., proteínas, polipéptidos, etc.) y moléculas pequeñas. Adicionalmente, los reactivos poliméricos también se pueden utilizar en sensores bioquímicos, interruptores bioelectrónicos y compuertas. Los reactivos poliméricos también se pueden emplear como vehículos para la síntesis de péptidos, para la preparación de superficies recubiertas con polímeros e injertos de polímeros, para preparar productos conjugados de polímero-ligando para el reparto por afinidad, para preparar hidrogeles entrecruzados o no entrecruzados, y para preparar aductos de polímero-cofactor para biorreactores.

Un agente biológicamente activo para su uso en el acoplamiento a un reactivo polimérico como se presenta en la presente memoria puede ser uno o más de los siguientes. Los agentes adecuados se pueden seleccionar entre, por ejemplo, hipnóticos y sedantes, estimulantes psíquicos, tranquilizantes, medicamentos respiratorios, anticonvulsivos, relajantes musculares, agentes antiparkinsonianos (antagonistas de la 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 antineoplásicos, agentes antitrombóticos, antihipertensivos, fármacos cardiovasculares, antiaritmicos, antioxidantes, agentes antasmáticos, 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 de contraste.

Más particularmente, el agente activo puede encajar en una de varias clases estructurales, que incluyen pero no se limitan a moléculas pequeñas (preferiblemente moléculas pequeñas insolubles), péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polisacáridos, esteroides, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, grasas, electrolitos y similares. Preferiblemente, un agente activo para el acoplamiento a un polímero como se describe en la presente memoria posee un grupo amino nativo, o alternativamente, se modifica para contener al menos un grupo amino reactivo adecuado para su conjugación con un polímero descrito en la presente memoria.

Los ejemplos específicos de agentes activos adecuados para el anclaje covalente incluyen agalsidasa, alefacept, aspariginasa, amdoxovir (DAPD), antide, becapermina, calcitoninas, cianovirina, denileucina difitox, eritropoyetina (EPO), agonistas de EPO (p. ej., péptidos de aproximadamente 10-40 aminoácidos de longitud y que comprende una secuencia central particular como se describe en el documento WO 96/40749), dornasa alfa, proteína estimulante de la eritropoyesis (NESP), factores de coagulación tales como Factor V, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XII, Factor XIII, Factor de von Willebrand; ceredasa, cerezima, alfa-glucosidasa, colágeno, ciclosporina, alfa defensinas, beta defensinas, desmopresina, exedina-4, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de la alfa-1 proteinasa, elcatonina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), fibrinógeno, filgrastim, hormonas de crecimiento, hormona de crecimiento humano (hGH), somatropina, hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), GRO-beta, anticuerpo GRO-beta, proteínas morfogénicas óseas tales como proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 6, OP-1; factor de crecimiento fibroblástico ácido, factor de crecimiento fibroblástico básico, ligando CD-40, heparina, albúmina sérica humana, heparina de bajo peso molecular (LMWH), interferones tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, interferón consenso; interleucinas y receptores de interleucina tales como receptor de interleucina 1, interleucina 2, proteínas de fusión con interleucina 2,

antagonista del receptor de la interleucina 1, interleucina 3, interleucina 4, receptor de interleucina 4, interleucina 6, interleucina 8, interleucina 12, receptor de interleucina 13, receptor de interleucina 17; lactoferrina y fragmentos de lactoferrina, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), insulina, proinsulina, análogos de insulina (p. ej., insulina monoacilada como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.922.675), amilina, péptido C, 5 somatostatina, análogos de la somatostatina que incluyen octreotida, vasopresina, hormona folículo estimulante (FSH), vacuna contra la influenza, factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), insulintropina, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), activadores del plasminógeno tales como alteplasa, uroquinasa, reteplasa, estreptoquinasa, pamiteplasa, lanoteplasa y tenetepalasa; factor de crecimiento nervioso (NGF), osteoprotegerina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento tisular, factor de crecimiento transformante-1, factor de crecimiento endotelial vascular, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento glial (GGF), receptores de Células T, moléculas de CD/antígenos, factor de necrosis tumoral (TNF), proteína quimioatrayente de monocitos 1, factores de crecimiento endotelial, hormona paratiroidea (PTH), péptido similar al glucagón, somatotropina, timosina alfa 1, rasburicasa, timosina alfa 1 inhibidora de IIb/IIIa, timosina beta 9, timosina beta 4, alfa-1 antitripsina, compuestos de fosfodiesterasa 15 (PDE), VLA-4 (antígeno-4 muy tardío), inhibidores de VLA-4, bifosfonatos, anticuerpo del virus sincitial respiratorio, gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (Dnasa), proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad (BPI) y anticuerpo anti-CMV. Los anticuerpos monoclonales ilustrativos incluyen etanercept (una proteína de fusión dimérica que consiste en la porción de unión al ligando extracelular del receptor humano de TNF de 75 kD conectado a la porción Fc de IgG1), abcximab, adalimumab, afelimomab, alemtuzumab, anticuerpo contra linfocitos B, atlizumab, basiliximab, bevacizumab, biciromab, bertilimumab, CDP-571, CDP-860, 20 CDP-870, cetuximab, clenoliximab, daclizumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, epratuzumab, fontolizumab, gavilimomab, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab tiuxetán, infliximab, inolimomab, keliximab, labetuzumab, lerdelimomab, olizumab, lym-1 radiomarcado, metilimumab, mepolizumab, mitumomab, muromonad-CD3, nebacumab, natalizumab, odulimomab, omalizumab, oregovomab, palivizumab, pemtumomab, pexelizumab, 25 rhuMAb-VEGF, rituximab, satumomab pendetida, sevirumab, sipilizumab, tositumomab, I<sup>131</sup> tositumomab, trastuzumab, tuvirumab y visilizumab.

Los agentes adicionales adecuados para la unión covalente incluyen tacrina, memantina, rivastigmina, galantamina, donepezilo, levetiracetam, repaglinida, atorvastatina, alefacept, tadalafilo, vardenafilo, sildenafil, fosamprenavir, 30 oseltamivir, valaciclovir y valganciclovir, abarelix, adefovir, alfuzosina, alosetrón, amifostina, amiodarona, ácido aminocaproico, aminohipurato sódico, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, amlodipino, amsacrina, anagrelida, anastrozol, aprepitant, aripiprazol, asparraginas, atazanavir, atomoxetina, antraciclinas, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, buserelina, busulfán, cabergolina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucina, cilastatina sódica, cisplatino, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, 35 camptotecinas, ácido 13-cis retinoico, ácido todo trans retinoico; dacarbazina, dactinomicina, daptomicina, daunorubicina, deferoxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilstilbestrol, docetaxel, doxorubicina, dutasterida, eletriptán, emtricitabina, enfuvirtida, eplerenona, epirubicina, estramustina, etinil estradiol, etopósido, exemestano, ezetimiba, fentanilo, fexofenadina, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, fluticazona, fondaparinux, fulvestrant, gamma-hidroxi butirato, gefitinib, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidroxurea, icodextrina, 40 idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, itraconazol, goserelina, laronidasa, lansoprazol, letrozol, leucovorina, levamisol, lisinopril, lovotiroxina sódica, lomustina, mecloretamina, medroxi progesterona, megestrol, melfalán, memantina, mercaptopurina, mequinol, bitartrato de metaraminol, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, miglustat, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, modafinilo, naloxona, naproxeno, nevirapina, nicotina, nilutamida, nitazoxanida, nitisinona, noretindrona, octreotida, oxaliplatino, palonosetrón, pamidronato, pemetrexed, pergolida, 45 pentostatina, pilcamicina, porfímero, prednisona, procarbazona, proclorperazina, ondansetrón, palonosetrón, oxaliplatino, raltitrexed, rosuvastatina, sirólimus, estreptozocina, pimecrolimus, sertaconazol, tacrólimus, tamoxifeno, tegaserod, temozolomida, tenipósido, testosterona, tetrahydrocannabinol, talidomida, tioguanina, tiotepa, tiotropio, topiramato, topotecán, treprostín, tretinoína, valdecoxib, celecoxib, rofecoxib, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, voriconazol, dolasetrón, granisetrón, formoterol, fluticasona, leuprolida, midazolam, 50 alprazolam, amfotericina B, podofilotoxinas, antivirales nucleosídicos, aroil hidrazonas, sumatriptán, eletriptán; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davercina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, loratadina, desloratadina, leucomicina, miocamicina, roquitamicina, andazitromicina, y suinolida A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trovafloxacina, alatrofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, enoxacina, gatifloxacina, 55 gemifloxacina, grepafloxacina, lomefloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, pefloxacina, amifloxacina, fleroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina, y sitafloxacina; aminoglicósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amiacina, kanamicina, neomicina, y estreptomycin, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato; polimixinas tales como polymixina B, capreomicina, bacitracina, penemos; penicilinas including agentes sensibles a la penicilinas como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a la penicilinas como metecilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, 60 floxacilina, nafcilina; agentes activos contra microorganismos gram negativos como ampicilina, amoxicilina, y hetacilina, cilina, y galampicilina; penicilinas antipseudomonales como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, y piperacilina; cefalosporinas como cefpodoxima, cefprozil, ceftbuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradrina, 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, y ertapenemo, isetionato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaína, sulfato de metaproterenol, dipropionato de beclometasona, acetónido de triamcinolona, acetónido de budesonida, salmeterol, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolina sódica, y tartrato de ergotamina; taxanos tales como paclitaxel; SN-38, y tirfostinas.

Las moléculas pequeñas preferidas para el acoplamiento a un polímero como se describe en la presente memoria son aquellas que tienen al menos un grupo amino de origen natural. Las moléculas preferidas tales como estas incluyen aminohipurato de sodio, anfotericina B, doxorubicina, ácido aminocaproico, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, bitartrato de metaraminol, pamidronato disódico, daunorrubicina, levotiroxina sódica, lisinopril, cilastatina sódica, mexiletina, cefalexina, deferoxamina, y amifostina.

Los péptidos o proteínas preferidos para el acoplamiento a un polímero como se describe en la presente memoria incluyen EPO, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN consenso, Factor VIII, factor VIII con dominio B suprimido, Factor IX, GCSF, GMCSF, hGH, insulina, FSH, péptidos que tienen actividad GLP-1, desmopresina, amdoxvir y PTH.

Se pretende que los ejemplos de los agentes biológicamente activos anteriores abarquen, cuando sea aplicable, análogos, agonistas, antagonistas, inhibidores, isómeros y formas de sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Con referencia a péptidos y proteínas, se pretende que la invención abarque formas sintéticas, recombinantes, nativas, glicosiladas y no glicosiladas, así como fragmentos biológicamente activos de las mismas. Además, se pretende que el término "agente activo" abarque el agente activo antes de la conjugación, así como el "residuo" del agente activo después de la conjugación.

Un agente farmacológicamente activo particularmente preferido es un péptido que tiene actividad agonística o antagónica frente al receptor del péptido similar a glucagón (GLP-1). El GLP-1 y sus derivados agonistas farmacológicamente activos estimulan la secreción de insulina por las células beta e inhiben la secreción de glucagón *in vivo*. Tales agonistas para el receptor de GLP-1 son útiles en la regulación de la producción de insulina.

Los ejemplos de agentes relacionados con GLP-1 que son adecuados para la unión covalente incluyen los siguientes: GLP-1 nativo; exendina-3; exendina-4; exendina-4 (1-30); exendina-4 (1-30) amida; exendina-4 (1-28) amida; <sup>14</sup>Leu <sup>25</sup>Phe exendina-4 amida; <sup>14</sup>Leu <sup>25</sup>Phe exendina-4 (1-28) amida; <sup>14</sup>Leu <sup>22</sup>Ala <sup>25</sup>Phe exendina-4 (1-28) amida, o un derivado farmacológicamente activo de los mismos. Estos y otros agentes que tienen actividad agonística frente al receptor de GLP-1 se describen en el documento WO99/07404 e incluyen agentes que tienen una estructura correspondiente a la fórmula general Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Gly Thr Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Ser Lys Gln Xaa<sub>9</sub> Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> Xaa<sub>12</sub> Xaa<sub>13</sub> Leu Lys Asn Gly Gly Xaa<sub>14</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub> -Z, (SEQ. ID. NO: 1) en donde: Xaa<sub>1</sub> es His, Arg o Tyr; Xaa<sub>2</sub> es Ser, Gly, Ala o Thr; Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu; Xaa<sub>4</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa<sub>5</sub> es Thr r Ser; Xaa<sub>6</sub> es Ser o Thr; Xaa<sub>7</sub> es Asp o Glu; Xaa<sub>8</sub> es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met; Xaa<sub>9</sub> es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met; Xaa<sub>10</sub>, es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met; Xaa<sub>12</sub> es Glu o Asp; Xaa<sub>13</sub> es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina; Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina; Xaa<sub>18</sub> es Ser, Thr o Tyr; y Z es -OH o -NH<sub>2</sub>.

Otros agonistas de GLP-1 se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.583.111. Los agonistas particularmente preferidos descritos en esta referencia incluyen NH<sub>2</sub>-His<sup>7</sup>-Ala-Glu-Gly<sup>10</sup>-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp<sup>15</sup>-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu<sup>20</sup>-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala<sup>25</sup>-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala<sup>30</sup>-Trp-Leu-Val-Lys-Gly<sup>35</sup>-Arg-Gly<sup>37</sup>-OH (SEQ ID NO: 2), NH<sub>2</sub>-His<sup>7</sup>-Ala-Glu-Gly<sup>10</sup>-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp<sup>15</sup>-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu<sup>20</sup>-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala<sup>25</sup>-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala<sup>30</sup>-Trp-Leu-Val-Lys-Gly<sup>35</sup>-Arg-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3), y NH<sub>2</sub>-His<sup>7</sup>-Val-Glu-Gly<sup>10</sup>-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp<sup>15</sup>-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu<sup>20</sup>-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala<sup>25</sup>-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala<sup>30</sup>-Trp-Leu-Val-Lys-Gly<sup>35</sup>-Arg-Gly<sup>37</sup>-OH (SEQ ID NO: 4).

Los ejemplos adicionales de agentes que son adecuados para la unión covalente incluyen los descritos en el documento WO 01/23420. Como se describe en la presente memoria, muchos de los siguientes polipéptidos pueden fabricarse mediante técnicas sintéticas convencionales basadas en estado sólido (como se describe en Peptide Synthesis Protocols (1994), volumen 35 de Micheal W. Pennington y Ben M. Dunn) y/o mediante técnicas basadas recombinación. Las secuencias particularmente preferidas incluyen:

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
Ac-HSDAVFTENYTKLRKQNIeAAKKYLNDLKKGGT-NH <sub>2</sub>	5
Ac-HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGT-NH <sub>2</sub>	6
Ac-HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGT	7

ES 2 725 808 T3

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGT	8
Ac-HSDAVFTEN(CH30-Y)TKLRKQNIeAAKKYLNDLKK	9
HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKK	10
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKK-NH <sub>2</sub>	11
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKKGGT	12
HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLLNGGT	13
HSDAVFTDNYTKLRKQLAAKKYLNDILNGGT	14
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKGGT	15
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKK-NH <sub>2</sub>	16
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNDLKKGGT	17
HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGTSWCEPGWCR	18
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNDIKKGGT	19
HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNDIKKGGT	20
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNSIKKGGT	21
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKNNGGT	22
HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNSIKKGGT	23
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKKGGT	24
HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNDIKNNGGT	25
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNSIKNNGGT	26
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKGG	27
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKG	28
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKK	29
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKQ	30
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKNQ	31
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKKRY	32
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKK	33
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKN	34
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILK	35
HSDAVFTDNYTELKQMAVKKYLNSILN	36

ES 2 725 808 T3

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
HSDAVFTDNYTRLREOMAVKKYLNSILN	37
HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNSILN	38
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSILN	39
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNDILN	40
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKN	41
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSILK	42
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKK	43
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKKKRY	44
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKKKR	45
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSI KKK	46
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKRY	47
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKKKRY	48
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKKKR	49
DAVFTDNYTRLRKQ MAVKKYLN SIKKK	50
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKNKRY	51
HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKK	52
HSDAVFTDNYTRLRKQIAAKKYLQTIKK	53
HSDGIFTESYSRYRKQMAVKKYLAALKKKRYKQRVKNK	57
HSDAVFTENYTRLRKQMAVKKYLNSLKK-NH <sub>2</sub>	58
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLSAVRHGQT-NH <sub>2</sub>	59
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKQGGT-NH <sub>2</sub>	60
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKKYLAAVRHG-NH <sub>2</sub>	61
SWCEPGWCRHSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGT	62
HSDAVFTDNYTRLRKOLAAKKYLNDILKGGT	63
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDILNGGT	64
HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNDILKGGT	65
HSDGIFTDSYSRYRKQLAAKKYLADVKKGGT	66
HSDGIFTDSYSRYRKQLAAKKYLADVKK	67
HSDGIFTDSYSRYRKQLAVKKYLAAVKK	68

ES 2 725 808 T3

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKK	69
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLNSIKK	70
HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLNSIKNKR	71
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKNKRY	72
HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNTIKNKRY	73
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLNSIKNKRY	74
HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKNKRY	75
HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLNTIKNKRY	76
HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLNSIKNKRY	77
HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLNTIKNKRY	78
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAHKYLNSIKNKRY	79
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKHYLNSIKNKRY	80
HSDAVFTDQYTRLRKQLAAHKYLNTIKNKRY	81
HSDAVFTDQYTRLRKOLAAKHYLNTIKNKRY	82
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKKKR	83
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLNSIKKKR	84
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLNSIKNKRY	85
HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKKR	86
HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKK	87
HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKNKRY	88
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKKRY	89
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKKR	90
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKK	91
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKNK	92
HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKRY	93
HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLOSILKKR	94
HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKK	95
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKNKRY	97
HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKNR	98



ES 2 725 808 T3

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSI LNK	99
HSDAVFTDNYTRLRKQMACKKYLNSIKNKR	100
HSDAVFTDNYTRLRKQMADKKYLNSIKNKR	101
HSDAVFTDNYTRLRKQMAEKKYLNSIKNKR	102
HSDAVFTDNYTRLRKQMAFKKYLNSIKNKR	103
HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLNSIKNKR	104
HSDAVFTDNYTRLRKQMAHKKYLNSIKNKR	105
HSDAVFTDNYTRLRKQMAIKKYLNSIKNKR	106
HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNSIKNKR	107
HSDAVFTDNYTRLRKQMALKKYLNSIKNKR	108
HSDAVFTDNYTRLRKQMAMKKYLNSIKNKR	109
HSDAVFTDNYTRLRKQMANKKYLNSIKNKR	110
HSDAVFTDNYTRLRKQMAPKKYLNSIKNKR	111
HSDAVFTDNYTRLRKQMAQKKYLNSIKNKR	112
HSDAVFTDNYTRLRKOMARKKYLNSIKNKR	113
HSDAVFTDNYTRLRKOMASKKYLNSIKNKR	114
HSDAVFTDNYTRLRKQMATKKYLNSIKNKR	115
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKNKR	116
HSDAVFTDNYTRLRKQMAWKKYLNSIKNKR	117
HSDAVFTDNYTRLRKQMAYKKYLNSIKNKR	118
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIANKR	119
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSICNKR	120
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIDNKR	121
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIENKR	122
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIFNKR	123
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIGNKR	124
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIHNKR	125
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIINKR	126
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIMNKR	127

ES 2 725 808 T3

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSINNKR	128
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIPNKR	129
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIQNKR	130
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIRNKR	131
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSISNKR	132
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSITNKR	133
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIVNKR	134
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIWNKR	135
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIYNKR	136
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNAR	137
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNCR	138
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNDR	139
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNER	140
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNFR	141
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNGR	142
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNHR	143
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNIR	144
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNLR	145
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNMR	146
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNNR	147
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNPR	148
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNQR	149
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNRR	150
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNSR	151
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNTR	152
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNVR	153
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNWR	154
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNYR	155
HSDA VFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKA	156

ES 2 725 808 T3

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKD	157
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKE	158
HSDA VFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKF	159
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKG	160
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKH	161
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKI	162
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKK	163
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKL	164
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKM	165
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKN	166
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKP	167
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKQ	168
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKS	169
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKT	170
HSDA VFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKV	171
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKW	172
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKY	173
HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKNKRYSWCEPGWCR	174
HSDAVFTDDYTRLRKEVAAKKYLESIKDKRY	175
ESDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	176
HKDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	177
HSKGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	178
HSDKIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	179
HSDGKFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	180
HSDGIKTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	181
HSDGIFKDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	182
HSDGIFTKSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	183
HSDGIFTDKSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	184
HSDGIFTDSKSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	185

ES 2 725 808 T3

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
HSDGIFTDSYKRYRKQMAVKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	186
HSDGIFTDSYSEYRKQMAVKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	187
HSDGIFTDSYSRKRKQMAVKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	188
HSDGIFTDSYSRYEKQMAVKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	189
HSDGIFTDSYSRYREOMAVKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	190
HSDGIFTDSYSRYRKKMAVKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	191
HSDGIFTDSYSRYRKOKAVKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	192
HSDGIFTDSYSRYRKQMKVKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	193
HSDGIFTDSYSRYRKQMAKKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	194
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVEKYLAAVL-NH <sub>2</sub>	195
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKEYLAAVL-NH <sub>2</sub>	196
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKKLAAVL-NH <sub>2</sub>	197
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYKAAVL-NH <sub>2</sub>	198
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLKAVL-NH <sub>2</sub>	199
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAKVL-NH <sub>2</sub>	200
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAACL-NH <sub>2</sub>	201
HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVK-NH <sub>2</sub>	202
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNRI	322
HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLNSIKNRI	323
HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNSIKNRI	324
HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNSIKNRI	325
HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLNSIKNRI	326
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIPNRI	327
HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLNSIPNRI	328
HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNSIPNRI	329
HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNSIPNRI	330
HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLNSIPNRI	331
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIQNRI	332
HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLNSIQNRI	333

Polipéptido	SEQ. ID. No.:
HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNSIONRI	334
HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKKYLNSIQNRI	335
HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKKYLNSIQNRI	336
HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIRNRI	337
HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLNSIRNRI	338
HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNSIRNRI	339
HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKKYLNSIRNRI	340
HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKKYLNSIRNRI	341

Los ejemplos adicionales de agonistas peptídicos que tienen actividad GLP-1 se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.528.486 e incluyen, por ejemplo, H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 342), H-Lys<sub>6</sub>-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 343), H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 344), H-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 345), H-Asn-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 346), H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 347), H-(Lys)<sub>6</sub>-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 348), y H-Asp-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 349);

Todas las abreviaturas de aminoácidos utilizan formas convencionales y comúnmente aceptadas, como sigue: Fenilalanina es Phe o F; Leucina es Leu o L; Isoleucina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o q; Asparragina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido Aspártico es Asp o D; Ácido Glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y Glicina es Gly o G. Los péptidos acetilados poseen el prefijo "Ac".

La presente invención también incluye preparaciones farmacéuticas que comprenden un producto conjugado como el proporcionado en la presente memoria combinado con un excipiente farmacéutico. En general, el propio producto conjugado estará en forma sólida (p. ej., un precipitado), que se puede combinar con un excipiente farmacéutico adecuado que puede estar en forma sólida o líquida.

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

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

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

45

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

También puede estar presente en la preparación un antioxidante. Los antioxidantes se utilizan para prevenir la oxidación, evitando así el deterioro del producto conjugado u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monoglicérol, galato de propilo, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio y combinaciones de los mismos.

Puede estar presente como excipiente un tensioactivo. Los tensioactivos ilustrativos incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80", y plurónicos tales como F68 y F88 (ambos disponibles de BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como el colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, cinc y otros cationes adecuados.

Los ácidos o bases pueden estar presentes como excipiente en la preparación. Los ejemplos de ácidos que se pueden utilizar incluyen aquellos ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio, y combinaciones de los mismos.

Las preparaciones farmacéuticas abarcan todo tipo de formulaciones y, en particular, aquellas que son adecuadas para su inyección, p. ej., polvos que pueden reconstituirse, así como suspensiones y soluciones. La cantidad de producto conjugado (es decir, el producto conjugado formado entre el agente activo y el polímero descrito en la presente memoria) en la composición variará dependiendo de una serie de factores, pero será una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacene en un recipiente de dosis unitaria (p. ej., un vial). Además, la preparación farmacéutica se puede alojar en una jeringa. Una dosis terapéuticamente eficaz se puede determinar experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades crecientes del producto conjugado para determinar qué cantidad produce un criterio de valoración clínicamente deseado.

La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la actividad del excipiente y las necesidades concretas de la composición. Por lo general, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de la experimentación rutinaria, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan de bajas a altas), examinando la estabilidad y otros parámetros, y a continuación determinando el intervalo en el que se logra el rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos.

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

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

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

Como se describió previamente, los productos conjugados se pueden administrar inyectados parenteralmente por inyección intravenosa, o menos preferiblemente por inyección intramuscular o subcutánea. Los tipos de formulación adecuados para administración parenteral incluyen soluciones listas para su inyección, polvos secos para combinación con un disolvente antes de su uso, suspensiones listas para su inyección, composiciones secas insolubles para combinación con un vehículo antes de su uso, y emulsiones y productos concentrados líquidos para su dilución antes de la administración, entre otros.

En la presente memoria también se describe un método para administrar un producto conjugado como se

proporciona en la presente memoria a un paciente que padece una afección que responde al tratamiento con el producto conjugado. El método comprende administrar, generalmente mediante inyección, una cantidad terapéuticamente eficaz del producto conjugado (preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica). El método de administración se puede utilizar para tratar cualquier afección que pueda remediarse o prevenirse mediante la administración del producto conjugado concreto. Los expertos en la técnica apreciarán que afecciones puede tratar eficazmente un producto conjugado específico. La dosis real que se administrará dependerá de la edad, el peso y el estado general del sujeto, así como de la gravedad de la afección que se esté tratando, el criterio del profesional de la salud y la administración del producto conjugado. Los expertos en la técnica conocen cantidades terapéuticamente eficaces y/o se describen en los textos de referencia pertinentes y en la bibliografía. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará entre aproximadamente 0,001 mg y 100 mg, preferiblemente en dosis de 0,01 mg/día a 75 mg/día, y más preferiblemente en dosis de 0,10 mg/día a 50 mg/día.

La dosis unitaria de cualquier producto conjugado dado (una vez más, preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica) se puede administrar en una variedad de programas de dosificación según el criterio del facultativo, las necesidades del paciente, etc. El programa de dosificación específico será conocido por los expertos en la técnica o se puede determinar experimentalmente utilizando métodos de rutina. Los programas de dosis ilustrativos incluyen la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de las mismas. Una vez que se ha alcanzado el criterio de valoración clínico, se detiene la dosificación de la composición.

Una ventaja de la administración de los productos conjugados de la presente invención es que las porciones de polímero solubles en agua se pueden escindir. Este resultado es ventajoso cuando el aclaramiento del organismo es potencialmente un problema debido al tamaño del polímero. De manera óptima, la escisión de cada porción de polímero soluble en agua se facilita mediante el uso de enlaces fisiológicamente escindibles y/o enzimáticamente degradables, tales como enlaces que contienen uretano, amida, carbonato o éster. De esta manera, el aclaramiento del producto conjugado (a través de la escisión de porciones individuales de polímero solubles en agua) se puede modular seleccionando el tamaño molecular del polímero y el tipo de grupo funcional que proporcionaría las propiedades deseadas de aclaramiento. Un experto en la técnica puede determinar el tamaño molecular apropiado del polímero así como el grupo funcional escindible. Por ejemplo, un experto en la técnica, utilizando experimentación rutinaria, puede determinar un tamaño molecular apropiado y un grupo funcional escindible, preparando primero una variedad de derivados poliméricos con diferentes pesos de polímeros y grupos funcionales escindibles, y obteniendo a continuación el perfil de aclaramiento (p. ej., a través de muestras periódicas de sangre u orina) administrando el derivado de polímero a un paciente y tomando muestras periódicas de sangre y/o orina. Una vez que se ha obtenido una serie de perfiles de aclaramiento para cada producto conjugado probado, se puede identificar un producto conjugado adecuado.

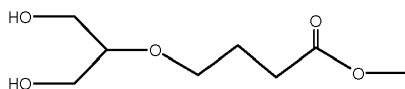
### Sección experimental

La práctica de la invención emplearán, a menos que se indique lo contrario, mecanismos convencionales de síntesis orgánica y similares, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales mecanismos están completamente explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4ª ed. (Nueva York: Wiley-Interscience, 1992), más arriba.

En los siguientes ejemplos, se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, la temperatura está en grados C y la presión está en o cerca de la presión atmosférica al nivel del mar. Todos los reactivos se obtuvieron comercialmente a menos que se indique lo contrario. Las siguientes abreviaturas se utilizan en la presente memoria y en otras partes de la memoria descriptiva.

#### Ejemplo 1

Preparación de una molécula precursora basada en glicerol



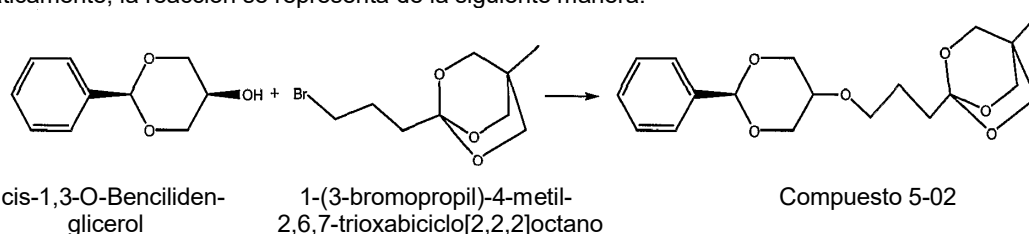
un molécula precursora basada en glicerol (Compuesto 8-02)

Una solución de cis-1,3-O-bencilidenglicerol (7,2 g, 0,040 moles) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) en tolueno (100 ml) se secó azetrópicamente mediante destilación del tolueno. El compuesto seco se disolvió en tolueno anhidro (100 ml) y se añadieron una solución 1,0 M de terc-butóxido de potasio en terc-butanol (60 ml, 0,060 moles) y 1-(3-bromopropil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2]octano (14,0 g, 0,0558 moles) y la mezcla se agitó

durante la noche a 100°C en atmósfera de argón. La mezcla se filtró y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida proporcionando 15,7 g de producto sólido (Compuesto 5-02). RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,74 ppm (s, 3H), 1,61 ppm (m, 4H), 1,88 ppm (m, 2H), 3,44 ppm (t, 2H), 3,81 ppm (s, 6H), 4,05 ppm (m, 4H), 5,55 ppm (s, 1H), 7,37 ppm (m, 5H).

5

Esquemáticamente, la reacción se representa de la siguiente manera:

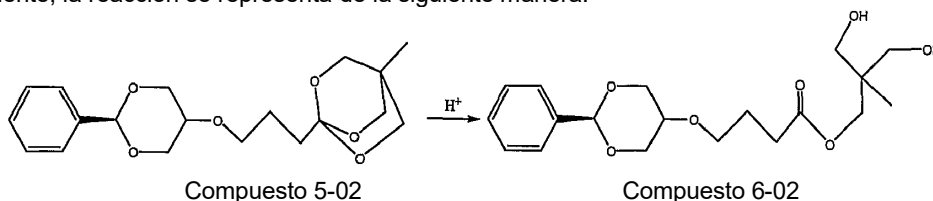


10

Hidrólisis de 5-02. El compuesto 5-02 (15,0 g) se disolvió en una mezcla de acetonitrilo (150 ml) y agua destilada (35 ml). A continuación, se añadió una solución al 10% de  $H_3PO_4$  para ajustar el pH a 4,5. La mezcla se agitó durante 1 hora a pH = 4,5. Se añadió NaCl (2 g) y el pH se ajustó a 7,5. El producto se extrajo con  $CH_2Cl_2$  (600 y 150 ml).

15 El extracto se secó ( $MgSO_4$ ) y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para proporcionar un producto sólido (Compuesto 6-02). Se determinó que el rendimiento era de 14,2 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 0,78 ppm (s, 3H), 1,79 ppm (m, 2H), 2,41 ppm (t, 2H), 3,25 ppm (m, 6H), 3,49 ppm (t, 2H), 4,05 ppm (m, 4H), 4,48 ppm (t, 3H), 5,56 ppm (s, 1H), 7,37 ppm (m, 5H).

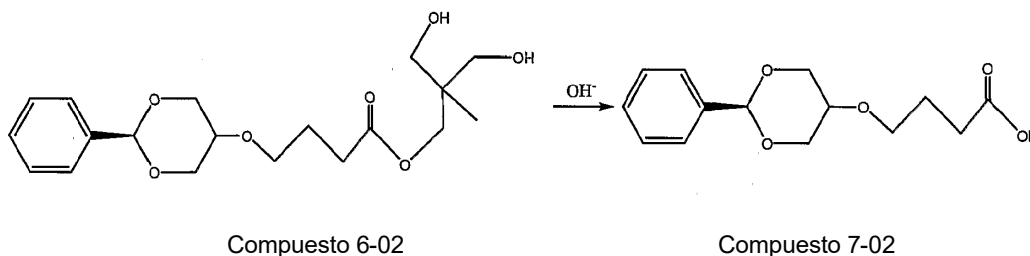
20 Esquemáticamente, la reacción se representa de la siguiente manera:



25 El compuesto 6-02 (14,2 g) se disolvió en una mezcla de acetonitrilo (80 ml) y agua destilada (80 ml). A continuación, se añadió una solución al 6% de NaOH para ajustar el pH a 12,5. La solución se agitó durante 5,5 horas a un pH comprendido entre 12,3 y 12,8, que se mantuvo mediante adiciones periódicas de una solución al 6% de NaOH. Se añadió NaCl (5 g) y el pH se ajustó a 7,5 con  $H_3PO_4$  al 5%. Las impurezas no ácidas se extrajeron con  $CH_2Cl_2$  (dos tratamientos, un primero con 300 ml y un segundo con 200 ml). El pH de la solución se ajustó a 3 con  $H_3PO_4$  y el producto se extrajo con  $CH_2Cl_2$  (dos tratamientos, un primero con 200 ml y un segundo con 100 ml).

30 El extracto se secó ( $MgSO_4$ ) y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El producto resultante (Compuesto 7-02) tuvo un rendimiento de 8,7 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,76 ppm (m, 2H), 2,31 ppm (t, 2H), 3,46 ppm (t, 2H), 4,05 ppm (m, 4H), 5,56 ppm (s, 1H), 7,37 ppm (m, 5H).

35 Esquemáticamente, la reacción se representa de la siguiente manera:

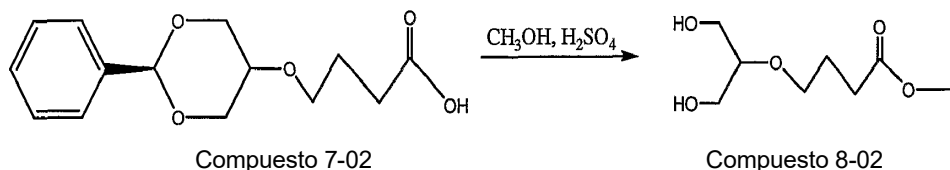


40 El compuesto 7-02 (8,0 g) se disolvió en metanol anhidro (120 ml) y, después de la disolución, se añadió  $H_2SO_4$  (1,6 ml). La solución se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadió  $NaHCO_3$  (solución al 8%) para ajustar el pH de la mezcla a 7,5. El producto se extrajo con  $CH_2Cl_2$  (Dos tratamientos, cada uno utilizando 100 ml).

45 El extracto se secó ( $MgSO_4$ ) y los compuestos volátiles se eliminaron por destilación a presión reducida (0,05 mm Hg) a 60°C. El producto resultante (Compuesto 8-02) tuvo un rendimiento de 4,8 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (m, 2H), 2,37 ppm (t, 2H), 3,20 ppm (m, 1H), 3,42 ppm (bm, 4H), 3,49 ppm (t, 2H), 3,59 ppm (s, 3H), 4,46 ppm (t, 2H).

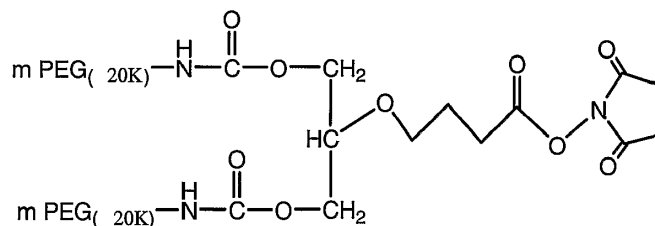


Esquemáticamente, la reacción se representa de la siguiente manera:



5 Ejemplo 2

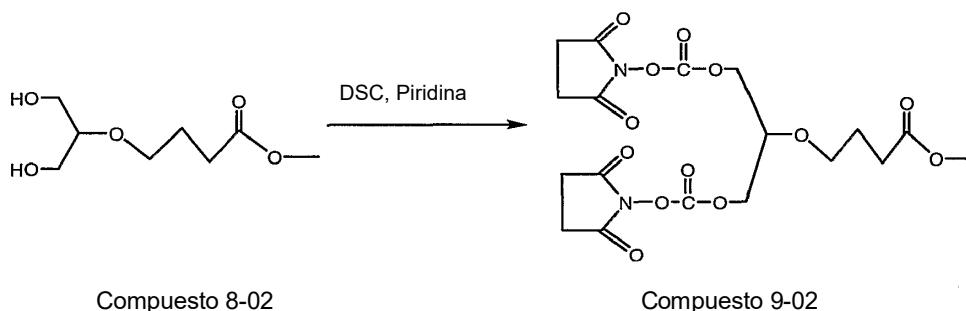
Preparación de "mPEG<sub>2(40K)</sub>-Ácido Butanoico, Éster de N-Hidroxisuccinimida"



10 (en donde mPEG<sub>20K</sub> designa un PEG que tiene un peso molecular de 20.000 Daltons)  
"mPEG<sub>2(40K)</sub>-Ácido Butanoico, Éster de N-Hidroxisuccinimida"

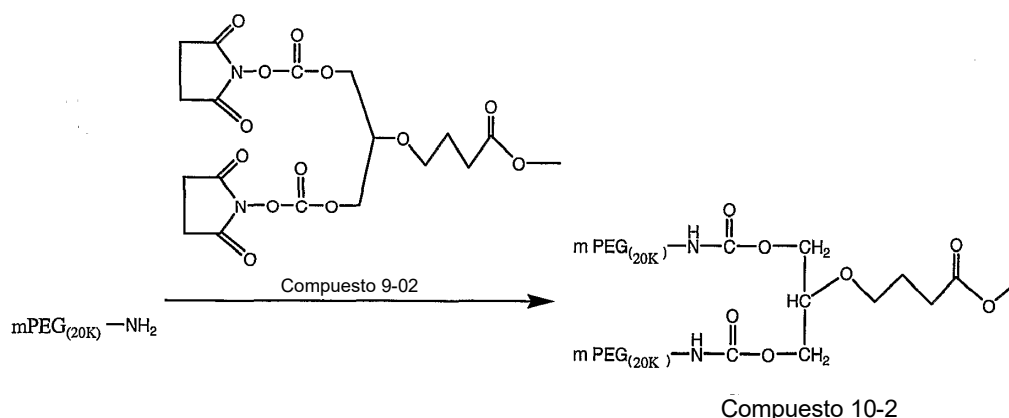
15 Activación de los grupos hidroxilo en la molécula precursora. El Compuesto 8-02 (2,0 g, 0,0208 equivalentes) se disolvió en acetonitrilo anhidro (50 ml) y se añadió piridina anhidra (2,2 ml, 0,272 moles) y carbonato de N,N-disuccinimidilo (5,86 g, 0,0229 mol, DSC). La solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, la mezcla se filtró y el disolvente se eliminó por destilación. El producto crudo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) y se lavó con una solución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 5%. A continuación la solución se secó (MgSO<sub>4</sub>), y el disolvente se eliminó por destilación. El producto resultante (Compuesto 9-02) tuvo un rendimiento de 2,8 g. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,76 ppm (m, 2H), 2,35 ppm (t, 2H), 2,82 ppm (s, 8H), 3,56 ppm (t, 2H), 3,58 ppm (s, 3H), 3,96 ppm (m, 1H), 4,37 ppm (m, 2H), 4,52 ppm (m, 2H).

25 Esquemáticamente, la reacción se representa de la siguiente manera:



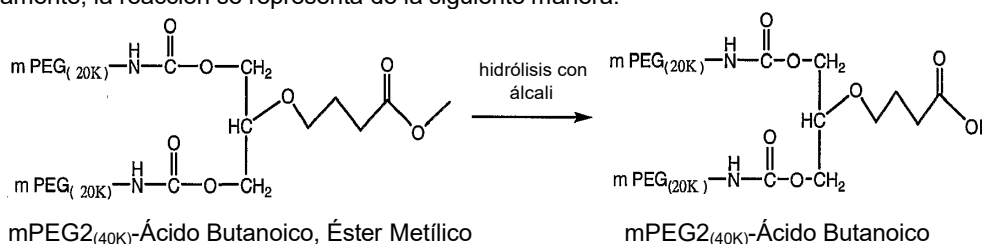
30 Acoplamiento del precursor activado con un polímero soluble en agua que contiene amina. A una mezcla de mPEG<sub>(20K)</sub>-amina (11g, 0,00055 moles) (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL), acetonitrilo (70 ml) y trietilamina (0,15 ml), se le añadió el compuesto 9-02 (0,119 g, 0,00050 equivalentes). La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida.

35 Esquemáticamente, la reacción se representa de la siguiente manera:



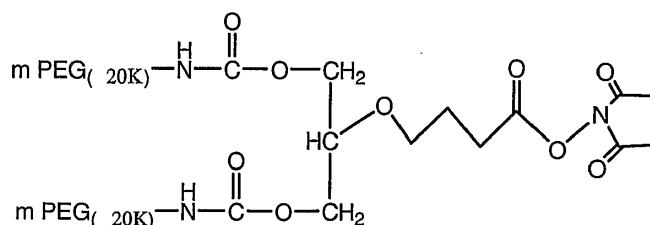
5 Etapa de desprotección y purificación cromatográfica de PEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico. El Compuesto 10-2 (denominado aquí PEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico, éster metílico) obtenido se disolvió en 150 ml de agua destilada y el pH de la solución se ajustó a 12,2 con una solución de NaOH al 5%. La solución se agitó durante 1,5 horas a un pH en un intervalo de 12,0-12,2. A continuación, se añadió NaCl (10 g) y el pH se ajustó a 2,5 con una solución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 5%. El producto fue extraído mediante un tratamiento con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El extracto se secó (MgSO<sub>4</sub>), y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida proporcionando 9 g de producto sólido. Cromatografía de intercambio iónico: PEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico 85%, mPEG<sub>(20K)</sub>amina 10%. El producto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.932.462 proporcionando producto 100% puro. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,72 ppm (q, 2H), 2,24 ppm (t, 2H), 3,24 ppm (s, 6H), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 3,99 ppm (m, 4H), 7,19 ppm (t, 2H).

15 Esquemáticamente, la reacción se representa de la siguiente manera:



20 El mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico se puede utilizar como un reactivo polimérico para reacciones que forman productos conjugados de polímero-agente activo. Además, el mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico puede hacerse reaccionar adicionalmente para proporcionar reactivos poliméricos que tienen grupos funcionales distintos de un ácido carboxílico. Por ejemplo, la preparación del correspondiente éster N-hidroxisuccinimida de mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico, así como los derivados aldehído, maleimida y tiol se describen a continuación.

25 Preparación de mPEG<sub>2(40K)</sub>-Ácido butanoico. Éster N-Hidroxisuccinimida

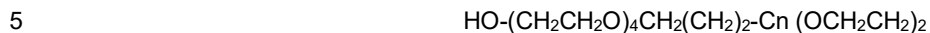


30 Se disolvió mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico (9,0 g, 0,000225 moles) (preparado como se ha descrito anteriormente) en diclorometano anhidro (70 ml) y se añadieron N-hidroxisuccinimida (0,0285 g, 0,000248 moles) y 1,3-diciclocarbodiimida (0,0510 g, 0,000247 moles). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, parte del disolvente se eliminó por destilación a presión reducida y el producto se precipitó con alcohol isopropílico a temperatura ambiente y se secó a vacío proporcionando 8,6 g de polvo blanco. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,81 ppm (q, 2H) 2,70 ppm (t, 2H), 2,81 ppm (s, 4H), 3,24 ppm (s, 6H), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 3,99 ppm (m, 4H), 7,22 ppm (t, 2H).

Ejemplo 3

Preparación de un "mPEG<sub>2(40K)</sub>-Butiraldehído

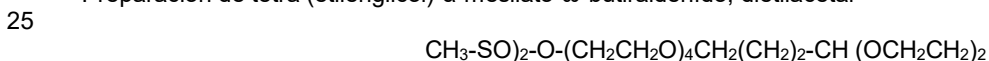
## Preparación de mono-butiraldehído de tetra(etilenglicol), dietilacetal



Una mezcla de tetra(etilenglicol) (97.1 g, 0.500 moles) y tolueno (200 ml) se secó azeotrópicamente mediante destilación del tolueno a presión reducida (evaporador rotativo). El tetra(etilenglicol) seco se disolvió en tolueno anhidro (180 ml) y se añadieron una solución 1,0 M de terc-butóxido de potasio en terc-butanol (120,0 ml, 0,120 moles) y dietil acetal de 4-clorobutiraldehído (18,1 g, 0,100 moles) (Alfa Aesar, Ward Hill, MA). La mezcla se agitó a 95-100°C durante la noche bajo una atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtró y los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en 1000 ml de agua desionizada y la solución resultante se filtró a través de carbón activo. Se añadió cloruro de sodio (100 g) y el producto se extrajo con diclorometano (250, 200 y 150 ml). El extracto se secó (sobre MgSO<sub>4</sub>) y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida (por evaporación rotativa).

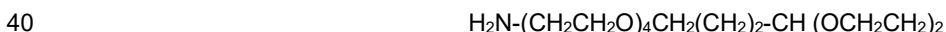
El producto bruto se disolvió en 300 ml de tampón fosfato al 10% (pH = 7,5) y las impurezas se extrajeron con acetato de etilo (2 x 50 ml). El producto resultante se extrajo con diclorometano (200, 150 y 100 ml). El extracto se secó (sobre MgSO<sub>4</sub>) y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida (por evaporación rotativa). Rendimiento: 20,3 g. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,10 ppm (t, CH<sub>3</sub>-C-) 1,51 ppm (m, C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3,49 ppm (bm, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 4,46 ppm (t, -CH, acetal), 4,58 ppm (t, -OH). Pureza: ~100% (no hay signos de sustancias de partida sin reaccionar).

## Preparación de tetra (etilenglicol)-α-mesilato-ω-butiraldehído, dietilacetal



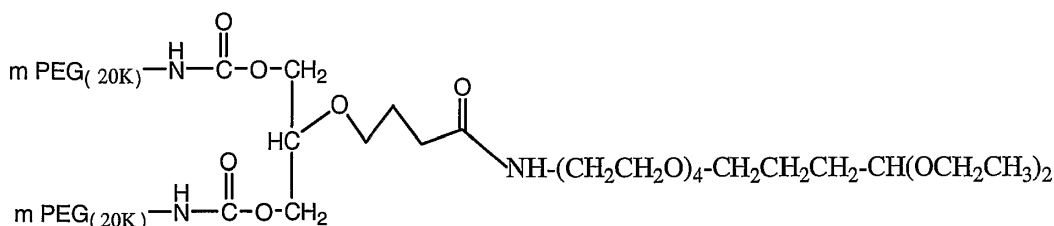
Una mezcla de mono-butiraldehído de tetra(etilenglicol), dietilacetal (12,5 g, 0,037 moles) y tolueno (120 ml) se secó azeotrópicamente mediante destilación del tolueno a presión reducida (evaporador rotatorio). El monobutiraldehído de tetra(etilenglicol), dietilacetal, seco se disolvió en tolueno anhidro (100 ml). A la solución se le añadieron 20 ml de diclorometano anhidro y 5,7 ml de trietilamina (0,041 moles). A continuación se añadieron gota a gota 4,5 g de cloruro de metanosulfonilo (0,039 moles). La solución se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante la noche. A continuación se añadió carbonato de sodio (5 g), la mezcla se agitó durante una hora. La solución se filtró y los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida (evaporador rotativo). RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,10 ppm (t, CH<sub>3</sub>-C-) 1,51 ppm (m, C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3,17 ppm (s, CH<sub>3</sub>- metanosulfonato), 3,49 ppm (bm, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 4,30 ppm (m, -CH<sub>2</sub>- metanosulfonato), 4,46 ppm (t, -CH, acetal). Pureza: ~100%.

## Tetra(etilenglicol)-α-amino-ω-butiraldehído, dietilacetal



Una mezcla de tetra(etilenglicol)-α-mesilato-but-butiraldehído, dietilacetal (14,0 g), hidróxido de amonio concentrado (650 ml) y alcohol etílico (60 ml) se agitó durante 42 horas a temperatura ambiente. A continuación, todas las sustancias volátiles se eliminaron por destilación a presión reducida. El producto bruto se disolvió en 150 ml de agua desionizada y el pH de la solución se ajustó a 12 con NaOH 1,0 M. El producto se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml). El extracto se secó (MgSO<sub>4</sub>) y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida (evaporador rotativo). Rendimiento 10,6 g. RMN (D<sub>2</sub>O): 1,09 ppm (t, CH<sub>3</sub>-C-) 1,56 ppm (m, C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2,69 ppm (t, CH<sub>2</sub>-N), 3,56 ppm (bm, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), 4,56 ppm (t, -CH, acetal). Pureza: ~100%.

## MPEG2 ramificado (40,3 KDa)-butiraldehído, dietilacetal

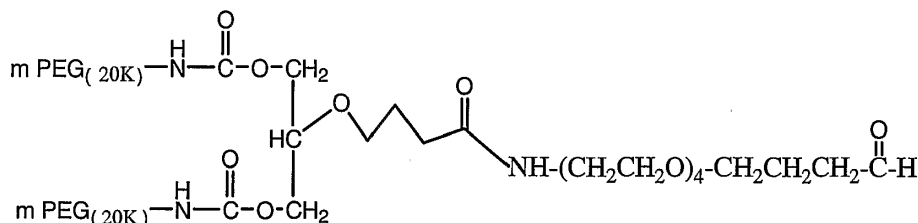


55 A una solución de mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (Ejemplo 2) (5,0 g, 0,000125 moles) en cloruro de metileno (100 ml), se le añadieron tetra(etilenglicol)-α-amino-ω-butiraldehído, dietilacetal (0,050 g, 0,000148 moles) trietilamina (0,035 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. El disolvente se evaporó hasta sequedad utilizando un evaporador rotativo. El

producto bruto se disolvió en cloruro de metileno y se precipitó con alcohol isopropílico. El producto húmedo se secó a presión reducida. Rendimiento de 4,8 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,10 ppm (t, 6H), 1,51 ppm (m, 4H), 1,67 ppm (m, 2H), 2,12 ppm (t, 2H), 3,12 ppm (q, 4H), 3,24 ppm (s, 3H), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 3,99 ppm (m, 4H), 4,46 ppm (t, 1H, acetal), 7,22 ppm (t, 2H), 7,82 ppm (t, 1H). Sustitución: ~100%.

5

MPEG2 ramificado(40,3 KDa)-butiraldehído



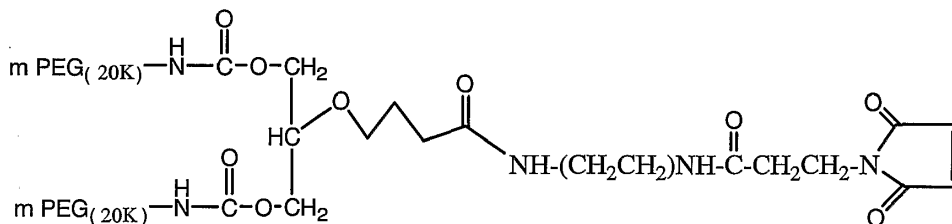
10 El PEG2 ramificado (40,3 KDa)-butiraldehído, dietilacetil (4,8 g) se disolvió en 100 ml de agua y el pH de la solución se ajustó a 3 con ácido fosfórico diluido. La solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de hidróxido de sodio 0,5 M suficiente para ajustar el pH de la solución a aproximadamente 7. El producto (mPEG2 ramificado (40,3 KDa)-butiraldehído) se extrajo con cloruro de metileno, y el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. Rendimiento 4,2 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,67 ppm (m, 2H), 1,76 ppm (p,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}-$ , 2H), 2,11 ppm (t, 2H), 2,44 ppm (dt,  $-\text{CH}_2-\text{CHO}$ ), 3,24 ppm (s,  $-\text{OCH}_3$ , 6H), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 3,99 ppm (m, 4H), 7,24 ppm (t, 2H), 7,83 ppm (t, 1H), 9,66 ppm (t,  $-\text{CHO}$ ). Sustitución: ~100%.

15

Ejemplo 4

20

Preparación de "mPEG2<sub>(40K)</sub>-Maleimida "

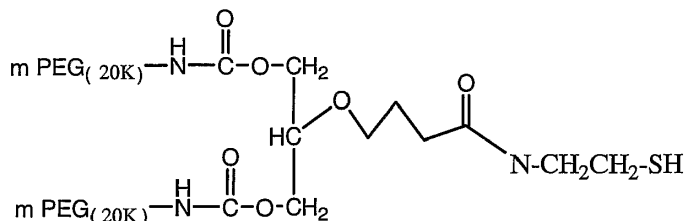


25 A una solución de mPEG2<sub>(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (Ejemplo 2) (5,0 g, 0,000125 moles) en acetonitrilo anhidro (100 ml), se le añadieron N-(3-maleimidopropionamido)etilendiamida en forma de sal de ácido trifluoroacético (0,042 g, 0,000129 moles) y trietilamina (0,050 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. El disolvente se evaporó hasta sequedad utilizando un evaporador rotativo. El producto bruto se disolvió en una pequeña cantidad de cloruro de metileno y se precipitó con alcohol isopropílico. El producto húmedo se secó a presión reducida. Rendimiento de 4,7 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,69 ppm (m, 2H), 2,09 ppm (t, 2H), 2,31 ppm (t, 2H), 3,03 ppm (q, 4H), 3,12 ppm (q, 4H), 3,24 ppm (s, 6H), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 3,99 ppm (m, 4H), 7,00 ppm (s, 2H, maleimida), 7,21 ppm (t, 2H), 7,75 ppm (t, 1H), 7,96 ppm (t, 1H).

30

Ejemplo 5

Preparación de un "mPEG2<sub>(40K)</sub>-Tiol



40

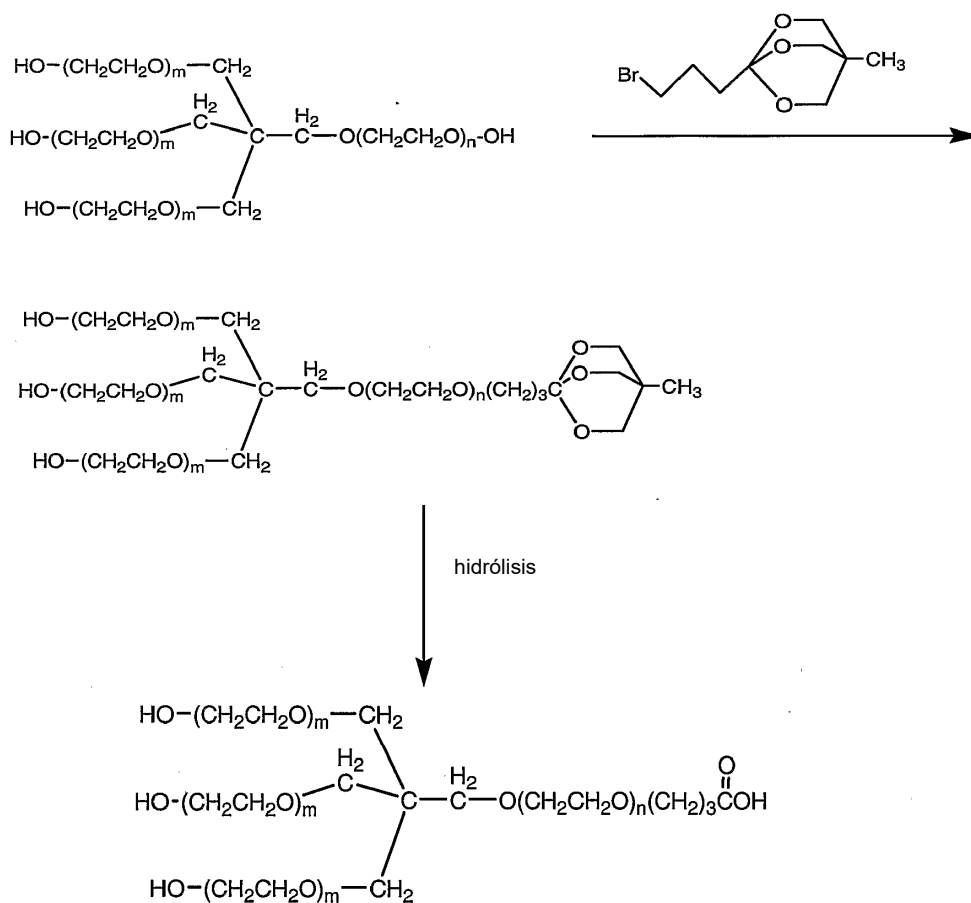
A una solución de mPEG2<sub>(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (Ejemplo 2) (5,0 g, 0,000125 moles) en cloruro de metileno (50 ml), se le añadieron dihidrocloruro de cistamina (0,0142 g, 0,000126 equivalentes) y trietilamina (0,040 ml) y la mezcla de reacción se agitó. Durante la noche a temperatura ambiente bajo una

- atmósfera de argón. A continuación se añadieron ditiotreitól (0.054 g, 0.000350 moles) y trietilamina (0.25 ml) y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. El disolvente se evaporó hasta sequedad utilizando un evaporador rotativo. El producto bruto se disolvió en una pequeña cantidad de cloruro de metileno y se precipitó con alcohol isopropílico. El producto húmedo se secó a presión reducida. Rendimiento de 4,8 g. RMN (CDCl<sub>3</sub>): 1,68 ppm (m, -SH, 1H), 1,35 ppm (t, 2H), 2,65 ppm (q, -CH<sub>2</sub>SH, 2H), 3,15 ppm (q, 6H), 3,36 ppm (s, 6H), 3,65 ppm (s, cadena principal de PEG), 4,15 ppm (m, 4H). Sustitución: -100%.

## Ejemplo 6

- 10 Preparación de un "mPEG3<sub>(60K)</sub>-Ácido Butanoico, Éster de N-Hidroxisuccinimida" con adaptador de Pentaeritritol

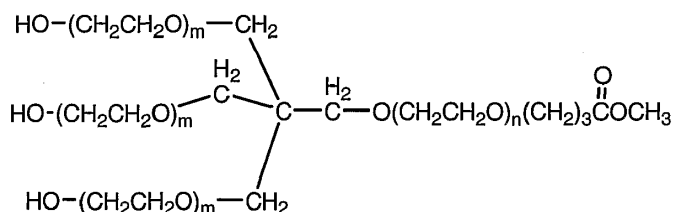
## Preparación del Compuesto 1.04



Compuesto 1-04

- 15 Una mezcla de etoxilato de pentaeritritol (15/4 OE/OH, Mn = 797, Sigma-Aldrich) (100 g, 0,125 moles) y tolueno (200 ml) se secó azeotrópicamente mediante destilación del tolueno a presión reducida. El etoxilato de pentaeritritol seco se disolvió en tolueno anhidro (150 ml) y se añadieron una solución 1,0 M de terc-butóxido de potasio en terc-butanol (30 ml, 0,03 moles) y 1-(3-bromopropil)-4-metil-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2]octano (6,3 g, 0,025 moles).
- 20 A continuación, la mezcla se agitó a 80 - 85°C durante la noche bajo una atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtró y los disolventes se eliminaron mediante destilación a presión reducida. El producto crudo se disolvió en 800 ml de agua desionizada. El pH de la solución se ajustó a 2 con ácido fosfórico al 5% y la solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el pH se reajustó a 12 con hidróxido de sodio 1 M y la solución se agitó durante 2 horas manteniendo el pH a 12 mediante la adición periódica de hidróxido de sodio 1M. Se añadió cloruro de sodio (40 g) y el etoxilato de pentaeritritol que no había reaccionado se extrajo con diclorometano. A continuación, el pH se ajustó a 3 con ácido fosfórico al 5% y el producto se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. Rendimiento 15 g. RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 1,72 ppm (q, 2H) 2,24 ppm (t, 2H), 3,51 ppm (s, 60H), 4,57 ppm (t, 3H).

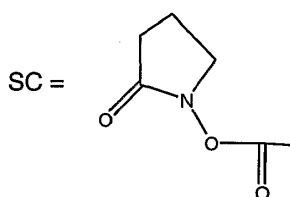
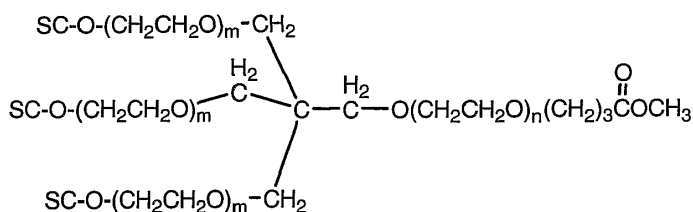
Preparación del compuesto 2-04



Compuesto 2-04

5 El compuesto 1-04 (15 g, 0,017 moles) se disolvió en metanol anhidro (300 ml) y se añadió ácido sulfúrico concentrado (4 ml). La solución se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadió  $\text{NaHCO}_3$  (solución al 8%) para ajustar el pH de la mezcla a 7,5. El producto se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El extracto se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y los compuestos volátiles se eliminaron por destilación a presión reducida. Rendimiento de 13,5 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (q, 2H) 2,37 ppm (t, 2H), 3,51 ppm (s, 60H), 4,57 ppm (t, 3H).

Preparación del compuesto 3-04



Compuesto 3-04

15 El Compuesto 2-04 (13,5 g, 0,0444 equivalentes) se disolvió en acetonitrilo anhidro (100 ml) y se añadieron piridina anhidra (4,4 ml, 0,544 moles) y carbonato de N,N-disuccinimido (12,40 g, 0,0484 moles). La solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. A continuación, la mezcla se filtró y el disolvente se eliminó por destilación. El producto bruto se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) y se lavó con una solución de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 5%. La solución se secó a continuación ( $\text{MgSO}_4$ ), y el disolvente se eliminó por destilación. Rendimiento 16,5 g. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (m, 2H), 2,37 ppm (t, 2H), 2,82 ppm (s, 12H), 3,50 ppm (s, 48H), 3,70 ppm (m, 6H), 4,45 (m, 6H).

20 Preparación del compuesto 4-04, (PEG<sub>3(60K)</sub>-ácido butanoico, éster metílico). A una mezcla de mPEG<sub>(20K)</sub>-amina (15 g, 0,00075 moles) (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL), acetonitrilo (70 ml) y trietilamina (0,15 ml), se le añadió el compuesto 3-04 (0,259 g, 0,00060 equivalentes). La mezcla se agitó durante tres horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A continuación, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida.

30 Etapa de desprotección y purificación cromatográfica de un PEG<sub>3(60K)</sub>-ácido butanoico. El Compuesto 4-04 (referido en la presente memoria como "PEG<sub>3(60K)</sub>-ácido butanoico, éster metílico se disolvió en 150 ml de agua destilada y el pH de la solución se ajustó a 12,2 con una solución de NaOH al 5%. La solución se agitó durante 1,5 horas a un pH en un intervalo de 12,0-12,2. A continuación, se añadió NaCl (10 g) y el pH se ajustó a 2,5 con una solución de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 5%. El producto se extrajo mediante un tratamiento con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El extracto se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, proporcionando 13,8 g de producto sólido. Cromatografía de intercambio iónico: PEG<sub>3(60K)</sub>-ácido butanoico 82%, M-PEG<sub>(20K)</sub>-amida 18%. El producto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.932.462 proporcionando un producto 100% puro. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,72 ppm (q, 2H) 2,24 ppm (t, 2H), 3,24 ppm (s, 6H), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 3,99 ppm (m, 6H), 7,19 ppm (t, 3H).

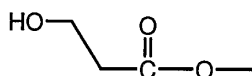
40 Preparación de mPEG<sub>3(60K)</sub>-Ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida. El mPEG<sub>3(60K)</sub>-ácido butanoico (etapa

anterior) (9,0 g, 0,000225 moles) obtenido se disolvió en diclorometano anhidro (70 ml) y se añadió N-hidroxisuccinimida (0,0285 g, 0,000248 moles) y se añadió 1,3-diciclohexilcarbodiimida (0,0510g, 0,000247 moles). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. A continuación, parte del disolvente se eliminó por destilación a presión reducida y el producto se precipitó con alcohol isopropílico a temperatura ambiente y se secó a vacío proporcionando 8,6 g de polvo blanco. RMN ( $d_6$ -DMSO): 1,81 ppm (q, 2H) 2,70 ppm (t, 2H), 2,81 ppm (s, 4H), 3,24 ppm (s, 6H), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 3,99 ppm (m, 4H), 7,22 ppm (t, 2H).

### Ejemplo 7

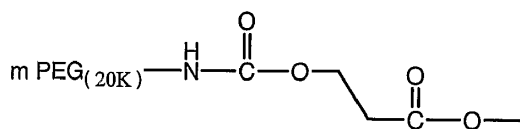
#### Preparación de un mPEG monofuncional

Se prepara un polímero de la invención que comprende un único polímero soluble en agua. Se sigue el procedimiento del Ejemplo 2, excepto que el ácido 3-hidroxi-propiónico, éster metílico se reemplaza por el compuesto 8-02.



ácido 3-hidroxi-propiónico, éster metílico

El compuesto resultante ("mPEG-ácido propiónico, éster metílico") tiene la siguiente estructura:



mPEG<sub>(20K)</sub>-Ácido Propiónico, Éster Metílico

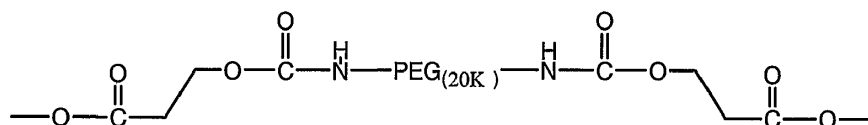
El mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido propiónico, éster metílico puede proporcionar el correspondiente ácido carboxílico. Por ejemplo, el éster metílico se puede disolver en agua destilada y el pH se puede ajustar a aproximadamente 12 utilizando una solución de NaOH. Posteriormente, se puede añadir una sal tal como cloruro de sodio y a continuación se ajusta el pH a aproximadamente 3 utilizando un ácido adecuado. El correspondiente ácido carboxílico (mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido propiónico) se puede extraer utilizando un tratamiento con cloruro de metileno, secando y destilando el disolvente restante.

El mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido propiónico se puede utilizar como un reactivo polimérico para reacciones que forman productos conjugados de polímero-agente activo. Además, el mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido propiónico se puede hacer reaccionar adicionalmente para proporcionar reactivos poliméricos que tienen grupos funcionales distintos de un ácido carboxílico. Por ejemplo, utilizando técnicas descritas anteriormente, se pueden preparar los correspondientes derivados éster de N-hidroxisuccinimida (véase el Ejemplo 2), aldehído (véase el Ejemplo 3), maleimida (véase el Ejemplo 4) y tiol (véase el Ejemplo 5) de mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido propiónico.

### Ejemplo 8

#### Preparación de un PEG homobifuncional

Se prepara un polímero homobifuncional de la invención que comprende una única porción de polímero soluble en agua. Se sigue el procedimiento del Ejemplo 7, excepto la amina-PEG<sub>(20K)</sub>-amina se sustituye por mPEG<sub>(20K)</sub>-amina. Se encuentra que el compuesto resultante tiene la siguiente estructura:



mPEG<sub>(20K)</sub>-Ácido Propiónico, Éster Metílico (un polímero difuncional)

El mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido dipropiónico, éster metílico puede proporcionar el correspondiente ácido dicarboxílico. Por ejemplo, el mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido dipropiónico, éster metílico se puede disolver en agua destilada y el pH se puede ajustar

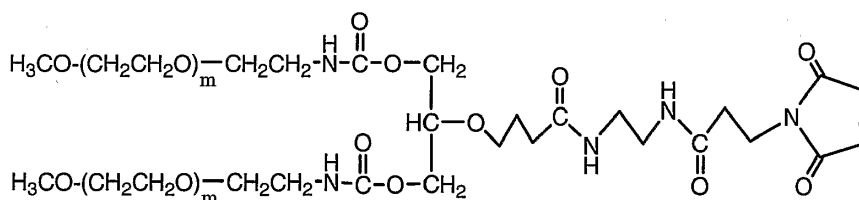
a aproximadamente 12 utilizando una solución de NaOH. Después de eso, se puede añadir una sal tal como cloruro de sodio y a continuación ajustar el pH a aproximadamente 3 utilizando un ácido adecuado. El correspondiente ácido dicarboxílico (mPEG)<sub>(20K)</sub>-ácido dipropiónico se puede extraer utilizando un tratamiento con cloruro de metileno, secando y destilando el disolvente restante.

5 El mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido dipropiónico se puede utilizar como un reactivo polimérico para reacciones que forman productos conjugados de polímero-agente activo (que comprenden dos agentes activos). Además, el mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido dipropiónico se puede hacer reaccionar adicionalmente para proporcionar reactivos poliméricos que tienen grupos funcionales distintos de un ácido carboxílico. Por ejemplo, utilizando técnicas las descritas anteriormente, se pueden preparar los correspondientes derivados éster de diN-hidroxisuccinimida (véase el Ejemplo 2), dialdehído (véase el Ejemplo 3), dimaleimida (véase el Ejemplo 4) y ditiol (véase el Ejemplo 5) de mPEG<sub>(20K)</sub>-ácido propiónico.

Ejemplo 9

15 Conjugación

Se hace reaccionar mPEG<sub>2(40K)</sub>-maleimida (Ejemplo 4) que tiene un grupo reactivo selectivo de sulfhidrilo, con cada una de las secuencias polipeptídicas que se proporciona en SEC. ID. NO. 1-349.



20 en donde (m), en la estructura anterior, es aproximadamente 454 y/o el peso molecular de cada polímero soluble en agua es aproximadamente 20.000 Daltons, proporcionando así un reactivo que tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000 Daltons.

25 En la medida en que cualquier polipéptido concreto carezca de un grupo sulfhidrilo (p. ej., el polipéptido carece tanto de metionina como de un residuo de cisteína), se puede añadir una metionina o un residuo de cisteína al polipéptido utilizando técnicas de síntesis convencionales. Véase, por ejemplo, el documento WO 90/12874.

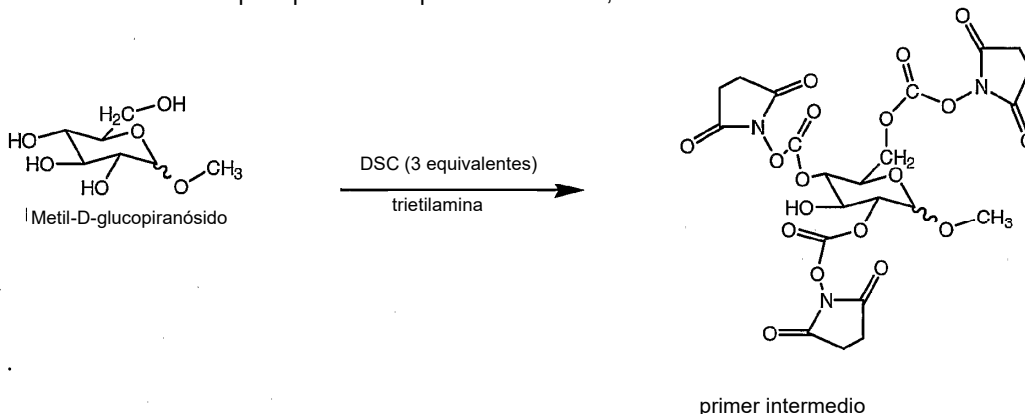
30 Para cada polipéptido, se añade un exceso de polímero a un recipiente de reacción que contiene el polipéptido. Las condiciones de reacción incluyen un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8 a temperatura ambiente. Después de aproximadamente cinco horas, se produce un producto conjugado del polipéptido y el polímero.

Ejemplo 10

35 Polímero Multibrazo

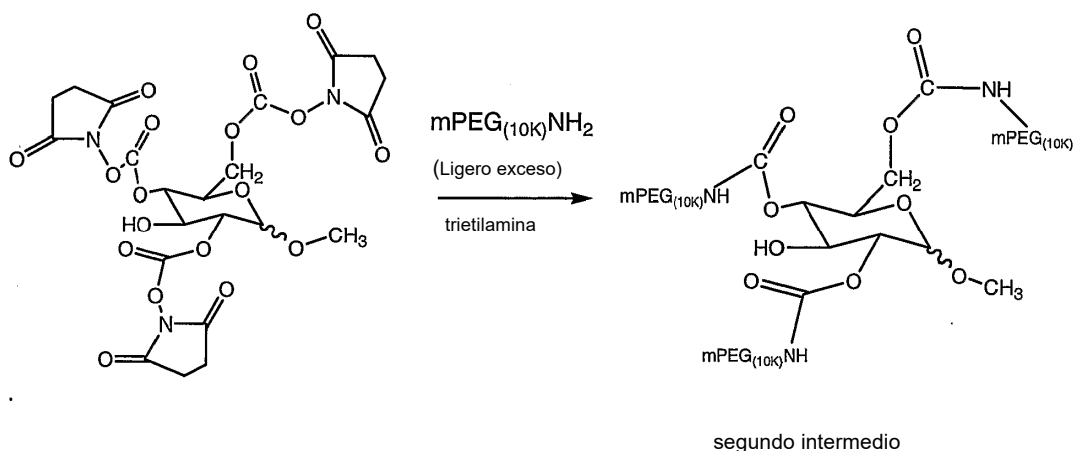
Un polímero multibrazo que comprende al menos un grupo reactivo se prepara de la siguiente manera.

40 Se combinan tres equivalentes de éster bis-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ílico) de ácido carbónico con metil-D-glucopiranosido en trietilamina para producir un primer intermedio, como se muestra a continuación:

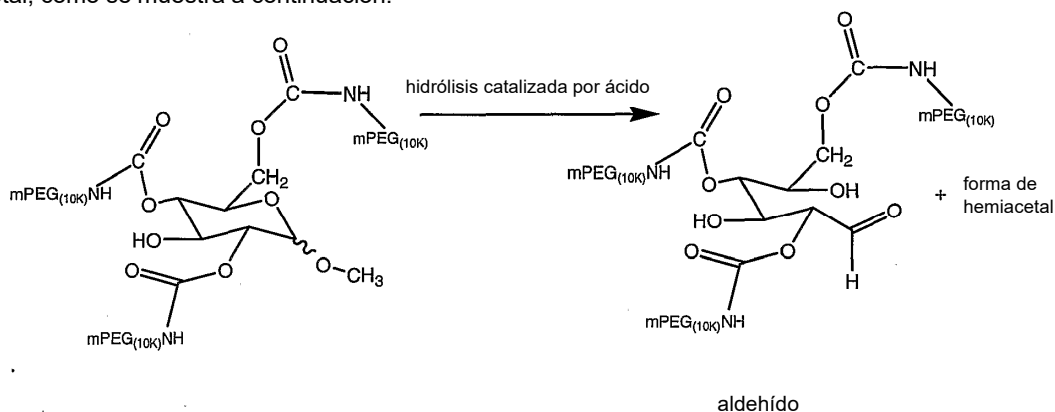




El primer intermedio se expone a un ligero exceso de mPEG<sub>(10K)</sub>-amina en presencia de trietilamina para producir un segundo intermedio, como se muestra a continuación:



5 El segundo intermedio se somete luego a hidrólisis catalizada por ácido para producir las formas aldehído y hemiacetal, como se muestra a continuación:



10 El aldehído está compuesto por tres PEG de 10K, lo que proporciona una estructura global ramificada de 30K. El aldehído, a su vez, se convierte opcionalmente en otros derivados a través del ácido (p. ej., el ácido carboxílico formado cuando el aldehído se expone a condiciones oxidativas suaves).

15 El enfoque se puede utilizar para proporcionar dos brazos y cuatro brazos.

Durante cualquier procedimiento dado, se pueden producir mezclas de las sustancias (p. ej., doblemente sustituidas y algunas cuádruplemente sustituidas). Además, son posibles los isómeros posicionales de cualquiera de los polímeros.

Ejemplo 11

20 Preparación de PEGilación aleatoria de EPO de Producto Conjugado de Polímero-EPO

25 La eritropoyetina recombinante, "EPO" (producida en *E. coli*, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente) se acopla a un mPEG<sub>2</sub>(40 KDa)ramificado-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

30 La EPO (~2 mg) se disuelve en 1 ml de tampón de fosfato 50 mM (pH 7,6) y se añaden PEG<sub>2</sub>(40 KDa)-butiraldehído ramificado a 5X la concentración molar de EPO. Se añade un agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub> y la solución se agita durante 24 horas a temperatura ambiente para acoplar el reactivo de PEG<sub>2</sub> ramificado (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

35 La mezcla de reacción se analiza mediante SDS-PAGE para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se realiza mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene una mezcla de proteínas

nativas y monoconjugadas. El aumento de la proporción de reactivo de PEG con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación.

5 Lo anterior demuestra la PEGilación aleatoria de una proteína ilustrativa de la invención para producir una distribución de productos de EPO PEGilados. Si se desea, la mezcla de reacción se puede separar adicionalmente para aislar los isómeros individuales como se describe a continuación.

10 Los productos conjugados de PEG que tienen diferentes pesos moleculares se separan mediante cromatografía de filtración en gel. Los diferentes productos conjugados de PEG se fraccionan en función de sus diferentes pesos moleculares (en este caso, variando en aproximadamente 40,000 Daltons). Específicamente, la separación se realiza utilizando un sistema de columnas en serie adecuado para la separación eficaz de productos en el intervalo de peso molecular observado, por ejemplo, una columna Superdex™ 200 (Amersham Biosciences). Los productos se eluyen con 10 ml de tampón de acetato a un caudal de 1,5 ml/min. Las fracciones recogidas (1 ml) se analizan mediante DO a 280 nm para determinar el contenido de proteínas y también utilizando una prueba con yodo para determinar el contenido de PEG (Sims et al. (1980) Anal. Biochem. 107:60-63). Además, los resultados se pueden visualizar ejecutando un gel de SDS PAGE, seguido de tinción con yoduro de bario. Las fracciones correspondientes a los picos eluidos se recogen, se concentran por ultrafiltración utilizando una membrana y se liofilizan. Este método da como resultado la separación/purificación de productos conjugados que tienen los mismos pesos moleculares pero no proporciona la separación de productos conjugados que tienen el mismo peso molecular pero diferentes sitios de PEGilación (es decir, isómeros posicionales).

20 La separación de los isómeros posicionales se realiza mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna RP-HPLC C18 (Amersham Biosciences o Vydac). Este procedimiento es eficaz para separar isómeros de biomoléculas de PEG que tienen el mismo peso molecular (isómeros posicionales). La cromatografía de fase inversa se lleva a cabo utilizando una columna preparativa RP-HPLC C18 y eluyendo con un gradiente de agua/TFA al 0,05% (Eluyente A) y acetonitrilo/TFA al 0,05% (Eluyente B).

25 Las fracciones correspondientes a los picos eluidos se recogen, se evaporan para eliminar el acetonitrilo y el TFA, seguido de la eliminación del disolvente para aislar los isómeros de PEG posicionales individuales.

30 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de EPO.

35 Ejemplo 12

Preparación de PEGilación de EPO N-terminal de Producto Conjugado de Polímero-EPO

40 La eritropoyetina recombinante, "EPO" (producida en *E. coli*, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente) se acopla a mPEG2 (40 Kda) ramificado-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

45 La EPO (~2 mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de EPO. Se añade un agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG2(40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

50 La mezcla de reacción se analiza mediante SDS-PAGE para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de proteínas nativas y monoconjugadas. Las especies monoconjugadas se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar la EPO libre y las especies de mayor peso molecular.

55 La confirmación de la PEGilación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de PEG con respecto a la proteína aumenta el grado de PEGilación, produciendo proteína policonjugada.

Lo anterior demuestra la PEGilación de una proteína ilustrativa de la invención para producir una proteína PEGilada única predominantemente N-terminal.

60 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de EPO.

Ejemplo 13

PEGilación N-terminal de GCSF

El factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante, "GCSF" (producido en *E. coli*, células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acopla a mPEG2(40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

5 El GCSF (~2 Mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de GCSF. Se añade el agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

10 La mezcla de reacción resultante se analiza mediante SDS-PAGE para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de GCSF nativo y monoconjugado. Los productos monoconjugados se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar el GCSF libre y las especies de mayor peso molecular. La confirmación de la PEGilación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de PEG con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación que produce la proteína policonjugada.

Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de GCSF.

20 Ejemplo 14

PEGilación N-terminal de Interferón- $\alpha$

25 El interferón alfa recombinante, "IFN- $\alpha$ " (producido en *E. coli*, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acopla a mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

30 El IFN- $\alpha$  (~2 Mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de IFN- $\alpha$ . Se añade un agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

35 La mezcla de reacción se analiza mediante SDS-PAGE para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de proteínas nativas y monoconjugadas. Las especies monoconjugadas se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar el interferón- $\alpha$  libre y las especies de mayor peso molecular. La confirmación de la PEGilación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de PEG con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación que produce IFN- $\alpha$  policonjugado.

Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de IFN- $\alpha$ .

45 Ejemplo 15

PEGilación N-terminal de la Hormona de Crecimiento Humana

50 La hormona del crecimiento humana recombinante, "hGH" (producida en *E. coli*, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acopla a mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

55 Se disuelve hGH (~2 mg) en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de hGH. Se añade un exceso molar de 5 a 20 veces del agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

60 El progreso de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas y otras difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de proteínas nativas y monoconjugadas. Las especies monoconjugadas se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar la hGH libre y las especies de mayor peso molecular. La confirmación de la conjugación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación que

produce una población de hGH policonjugada.

Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de hGH.

5 Ejemplo 16  
 PEGilación N-terminal De Interferón- $\beta$   
 10 El interferón  $\beta$  recombinante, "IFN- $\beta$ " (producido en *E. coli*, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acopla a mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

15 El IFN- $\beta$  (~2 mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de IFN- $\beta$ . Se añade un exceso molar de 5 a 20 veces del agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

20 El progreso de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de proteínas nativas y monoconjugadas. Las especies monoconjugadas se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar el IFN- $\beta$  libre y las especies de mayor peso molecular. La confirmación de la PEGilación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación que produce una población de IFN- $\beta$  policonjugado.

30 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de IFN- $\beta$ .

Ejemplo 17

35 PEGvilación N-terminal de FSH  
 La Hormona estimulante del folículo recombinante, "FSH" (producida en *E. coli*, células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acopla a mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

40 La FSH (~2 mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de FSH. Se añade un exceso molar de 5 a 20 veces del agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

45 El progreso de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas y otras difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de proteínas nativas y monoconjugadas. Las especies monoconjugadas se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar la FSH libre y las especies de mayor peso molecular. La confirmación de la PEGilación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación que produce una población de FSH policonjugada.

55 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de FSH.

Ejemplo 18

60 PEGilación N-terminal de Factor VIII  
 El Factor VIII recombinante, "F8" (producido en *E. coli*, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acopla a mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

El F8 (~2 mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de F8. Se añade un exceso molar de 5 a 20 veces del agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

5 El progreso de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas y otras difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de proteínas nativas y monoconjugadas. Las especies monoconjugadas se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar el F8 libre y las especies de mayor peso molecular. La confirmación de la PEGilación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación que produce una población de F8 policonjugado.

15 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de F8.

#### 20 Ejemplo 19

##### PEGilación N-terminal del Factor VIII con Dominio B Suprimido

El Factor VIII con dominio B suprimido recombinante, "BDD F8" (producido en *E. coli*, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acopla a mPEG2(40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

25 El BDD F8 (~2 mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de BDD F8. Se añade un exceso molar de 5 a 20 veces del agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

30 El progreso de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas y otras difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de proteínas nativas y monoconjugadas. Las especies monoconjugadas se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar el BDD F8 libre y las especies de mayor peso molecular. La confirmación de la PEGilación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de mPEG2 (40 KDa)-butiraldehído con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación que produce una población de BDD F8 policonjugado.

35 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de BDD F8.

#### 40 Ejemplo 20

##### PEGilación de Factor VIII Utilizando mPEG2<sub>(40K)</sub>-Ácido Butanoico, Éster de N-Hidroxisuccinimida

45 El Factor VIII recombinante, "F8" (producido en *E. coli*, Las células de mamíferos, como las células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acopla a mPEG2<sub>(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (preparado como se describe en el Ejemplo 2).

50 El F8 se disuelve en un líquido acuoso y se añade mPEG2<sub>(40K)</sub>-Ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida de una a diez veces la concentración molar de F8 para formar una solución de reacción. El pH de la solución de reacción se ajusta a aproximadamente 8-9,5 y la temperatura se mantiene a temperatura ambiente. La solución de reacción se agita durante varias horas para permitir el acoplamiento del reactivo polimérico a F8 a través de un enlace amida. Tras someter a ensayo la solución de reacción, se determina que la conjugación se ha producido en los sitios N-terminales y de lisina.

55 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de F8.

#### 60 Ejemplo 21

PEGilación del Factor VIII con Dominio B Suprimido Utilizando mPEG<sub>2(40K)</sub>-Ácido Butanoico, Éster de N-Hidroxisuccinimida

5 El Factor VIII con el dominio B suprimido recombinante, "BDD F8" (producido en *E. coli*, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino u otra fuente, se acoplan a mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (preparado como se describe en el Ejemplo 2).

10 El BDD F8 se disuelve en un líquido acuoso y se añade mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida de una a diez veces la concentración molar de F8 para formar una solución de reacción. El pH de la solución de reacción se ajusta a aproximadamente 8-9,5 y la temperatura se mantiene a temperatura ambiente. La solución de reacción se agita durante varias horas para permitir el acoplamiento del reactivo polimérico a BDD F8 a través de un enlace amida. Tras probar la solución de reacción, se determina que la conjugación se ha producido en los sitios N-terminales y de lisina.

15 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de BDD F8.

Ejemplo 22

20 PEGilación N-terminal de Desmopresina

La desmopresina se acopla a mPEG<sub>2</sub> (40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

25 La desmopresina (~2 mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG<sub>2</sub> (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de BDD F8. Se añade un exceso molar de 5 a 20 veces del agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG<sub>2</sub> (40 KDa)-butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

30 El progreso de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar el grado de conjugación. La confirmación del grado de conjugación se lleva a cabo mediante espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF). Los picos mostrados para las especies nativas y monoconjugadas y otras difieren en aproximadamente 40.000 Daltons. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de proteínas nativas y monoconjugadas. Las especies monoconjugadas se purifican mediante cromatografía en columna para eliminar la desmopresina libre y las especies de mayor peso molecular. La confirmación de la PEGilación N-terminal se realiza mediante mapeo de péptidos. El aumento de la proporción de mPEG<sub>2</sub> (40 KDa)-butiraldehído con respecto a la proteína aumenta el grado de conjugación que produce una población de desmopresina policonjugada.

40 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de desmopresina.

Ejemplo 23

45 PEGilación de Desmopresina Utilizando mPEG<sub>2(40K)</sub>-Ácido Butanoico, Éster de N-Hidroxisuccinimida

La desmopresina se acopla a mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (preparado como se describe en el Ejemplo 2).

50 La desmopresina se disuelve en un líquido acuoso y se añade mPEG<sub>2(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida de una a diez veces la concentración molar de desmopresina para formar una solución de reacción. El pH de la solución de reacción se ajusta a aproximadamente 8-9,5 y la temperatura se mantiene a temperatura ambiente. La solución de reacción se agita durante varias horas para permitir el acoplamiento del reactivo polimérico a la desmopresina a través de un enlace amida. Tras someter a ensayo la solución de reacción, se determina que se ha producido la conjugación.

55 Ejemplo 24

PEGilación de Amdoxivir (DAPD)

60 El amdoxivir (DAPD) se acopla a mPEG<sub>2</sub>(40 KDa)-butiraldehído (preparado como se describe en el Ejemplo 3).

El amdoxivir (~2 mg) se disuelve en 1 ml de acetato de sodio 0,1 mM (pH 5) y se añade mPEG<sub>2</sub> (40 KDa)-butiraldehído a 5X la concentración molar de amdoxivir. Se añade un exceso molar de 5 a 20 veces del agente reductor, NaCNBH<sub>3</sub>, y la solución se agita durante 24 horas a 4°C para acoplar el reactivo de mPEG<sub>2</sub> (40 KDa)-

butiraldehído a la proteína a través de un enlace amina.

El progreso de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF.

- 5 Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de amdoxivir.

Ejemplo 23

- 10 PEGilación de Amdoxivir (DAPD) Utilizando mPEG2<sub>(40K)</sub>-Ácido Butanoico, Éster N-Hidroxisuccinimida

El amdoxivir (DAPD) se acopla a mPEG2<sub>(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida (preparado como se describe en el Ejemplo 2).

- 15 El amdoxivir se disuelve en un líquido acuoso y se añade mPEG2<sub>(40K)</sub>-ácido butanoico, éster de N-hidroxisuccinimida de una a diez veces la concentración molar de amdoxivir para formar una solución de reacción. El pH de la solución de reacción se ajusta a aproximadamente 8-9,5 y la temperatura se mantiene a temperatura ambiente. La solución de reacción se agita durante varias horas para permitir el acoplamiento del reactivo polimérico a amdoxivir a través de un enlace amida. Tras probar la solución de reacción, se determina que se ha producido la conjugación.
- 20

Este ejemplo demuestra la capacidad de los reactivos poliméricos de la invención para utilizarse en la formación de productos conjugados de amdoxivir.

- 25 **LISTA DE SECUENCIAS**

<110> TERAPEUTICA NEKTAR

<120> DERIVADOS DE POLÍMEROS QUE TIENEN ORDENAMIENTOS ATÓMICOS CONCRETOS

- 30 <130> P79826EP01

<140> EP1316237.4

<141> 21-05-2004

- 35 <150> US 60/493,213  
<151> 23-05-2003

<160> 349

- 40 <170> PatentIn versión 3.2  
<210> 1

<211> 39

<212> PRT

- 45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

- 50 <220>  
<221> MOD\_RES

<222> (1)

<223> His, Arg o Tyr

- 55 <220>  
<221> MOD\_RES

<222> (2)

<223> Ser, Gly, Ala o Thr

- 60 <220>  
<221> MOD\_RES

<222> (3)

<223> Asp o Glu

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)  
 <223> Phe, Tyr o naftilalanina  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Thr o Ser  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)  
 <223> Ser o Thr  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)  
 <223> Asp o Glu  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)  
 <223> Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (22)  
 <223> Phe, Tyr o naftilalanina  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (23)  
 <223> Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (24)  
 <223> Glu o Asp  
 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (25)  
 <223> Trp, Phe, Tyr o naftilalanina  
 50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (31)  
 <223> Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina  
 55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (36)..(38)  
 <223> Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina  
 60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (39)  
 <223> Ser, Thr o Tyr



ES 2 725 808 T3

<220>

<223> puede ser c-term amidado

<400> 1

5

```

Xaa Xaa Xaa Gly Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Lys Gln Xaa Glu Glu
 1           5           10
Glu Ala Val Arg Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Lys Asn Gly Gly Xaa Ser
          20           25           30
Ser Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa
          35
    
```

<210> 2

<211> 31

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

15

<400> 2

```

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1           5           10
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
          20           25           30
    
```

20

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

<223> c-term amidado

30

<400> 3

```

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1           5           10
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
          20           25           30
    
```

35

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 4

```

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1           5           10
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
          20           25           30
    
```

45

<210> 5

ES 2 725 808 T3

<211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

10 <400> 5

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Asn Ile Glu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Leu Lys Lys Gly Gly
          20          25          30
Thr
  
```

15 <210> 6  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

25 <400> 6

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Leu Lys Lys Gly Gly Thr
          20          25          30
  
```

30 <210> 7  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 7

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Leu Lys Lys Gly Gly Thr
          20          25          30
  
```

40 <210> 8  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

50 <400> 8

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Leu Lys Lys Gly Gly Thr  
20 25 30

<210> 9  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)  
<223> CH30-Tyr

<220>  
<223> c-term amidado

<400> 9

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Asn Ile Glu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Leu Lys Lys  
20 25 30

<210> 10  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 10

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Leu Lys Lys  
20 25

<210> 11  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
<223> c-term amidado

<400> 11

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys  
20 25

<210> 12  
<211> 31

ES 2 725 808 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 12

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Lys	Lys	Gly	Gly	Thr	
			20					25					30		

10  
 <210> 13  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 13

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Lys	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Leu	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	
			20					25					30		

15  
 <210> 14  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 14

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Lys	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	
			20					25					30		

25  
 <210> 15  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 15

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Lys	Lys	Gly	Gly	Thr	
			20					25					30		

35  
 <210> 16  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 16

40  
 <210> 16  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 725 808 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

5 <223> c-term amidado

<400> 16

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Lys	Lys				
			20					25							

10

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 17

20

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Leu	Lys	Lys	Gly	Gly	Thr	
			20					25					30		

25

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

30

<400> 18

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Lys	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Leu	Lys	Lys	Gly	Gly	Thr	Ser
			20					25					30		
Trp	Cys	Glu	Pro	Gly	Trp	Cys	Arg								
		35					40								

35

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 19

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Lys	Lys	Gly	Gly	Thr	
			20					25					30		

45

<210> 20

ES 2 725 808 T3

<211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 20

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

10 Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Lys Gly Gly Thr  
 20 25 30

<210> 21  
 <211> 31  
 <212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

20 <400> 21

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Gly Gly Thr  
 20 25 30

<210> 22  
 <211> 31  
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

30 <400> 22

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

35 <210> 23  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

40 <400> 23

45 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Gly Gly Thr  
 20 25 30

50 <210> 24  
 <211> 31  
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

5

<400> 24

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Gly Gly Thr  
20 25 30

10 <210> 25

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 25

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

20

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

30 <400> 26

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

35

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

40

<400> 27

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Lys Gly Gly  
20 25 30

45

<210> 28

<211> 29

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 725 808 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 28

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Lys Gly
          20          25
    
```

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

15 <400> 29

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Lys
          20          25
    
```

<210> 30

20 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 30

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Lys Gln
          20          25
    
```

30 <210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 31

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Lys Asn Gln
          20          25          30
    
```

<210> 32

45 <211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético



ES 2 725 808 T3

<400> 32

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Lys Lys Lys Arg Tyr  
20 25 30

5 <210> 33  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 33

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys  
20 25

15 <210> 34  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

25 <400> 34

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn  
20 25

30 <210> 35  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 35

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Lys  
20 25

40 <210> 36  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 36

50

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Glu Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn  
20 25

5 <210> 37  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 37

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Glu Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn  
20 25

15 <210> 38  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 38

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn  
20 25

25 <210> 39  
<211> 28  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
35 <400> 39

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn  
20 25

40 <210> 40  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 40

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Leu Asn  
20 25

5 <210> 41  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 41

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn  
20 25

15 <210> 42  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 42

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Lys  
20 25

25 <210> 43  
<211> 28  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35 <400> 43

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys  
20 25

40 <210> 44  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 44

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Lys Arg Tyr  
20 25 30

5 <210> 45  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 45

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 46  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 46

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Lys  
20 25

25 <210> 47  
<211> 31  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
35 <400> 47

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

40 <210> 48  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 48

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Lys Arg Tyr  
20 25 30

5 <210> 49  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 49

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 50  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 50

Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln Met Ala  
1 5 10 15

Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Lys  
20 25

25 <210> 51  
<211> 31  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
35 <400> 51

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

40 <210> 52  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 52

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Lys  
20 25

5 <210> 53  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 53

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Ile Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Lys  
20 25

15 <210> 54  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 54  
000

25 <210> 55  
<211>  
<212>  
<213>

30 <400> 55  
000

35 <210> 56  
<211>  
<212>  
<213>

40 <400> 56  
000

45 <210> 57  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 57

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Glu Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Leu Lys Lys Lys Arg Tyr Lys  
20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys  
35

50 <210> 58

ES 2 725 808 T3

<211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

10 <400> 58

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Leu	Lys	Lys				
			20					25							

15 <210> 59  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

25 <400> 59

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ser	Ala	Val	Arg	His	Gly	Gln	Thr	
			20					25					30		

30 <210> 60  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

40 <400> 60

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Gly	Thr	
			20					25					30		

45 <210> 61  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

ES 2 725 808 T3

<223> c-term amidado

<400> 61

```

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1          5          10          15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala
          20          25          30
Val Arg His Gly
          35

```

5

<210> 62

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

15 <400> 62

```

Ser Trp Cys Glu Pro Gly Trp Cys Arg His Ser Asp Ala Val Phe Thr
1          5          10          15
Glu Asn Tyr Thr Lys Leu Arg Lys Gln Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu
          20          25          30
Asn Asp Leu Lys Lys Gly Gly Thr
          35          40

```

20

<210> 63

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 63

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Leu Lys Gly Gly Thr
          20          25          30

```

30

<210> 64

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 64

40

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1          5          10          15
Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Leu Asn Gly Gly Thr
          20          25          30

```

<210> 65



ES 2 725 808 T3

<211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 65

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

10 Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Asp Ile Leu Lys Gly Gly Thr  
 20 25 30

<210> 66  
 <211> 31  
 <212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

20 <400> 66

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Ala Asp Val Lys Lys Gly Gly Thr  
 20 25 30

<210> 67  
 <211> 28  
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

30 <400> 67

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Ala Asp Val Lys Lys  
 20 25

35 <210> 68  
 <211> 28  
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

40 <400> 68

45 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Lys Lys  
 20 25

<210> 69  
 <211> 28  
 <212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

ES 2 725 808 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

5

<400> 69

```

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 1           5           10           15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Lys Lys
           20           25
    
```

10 <210> 70

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 70

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1           5           10           15
Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys
           20           25
    
```

20

<210> 71

<211> 30

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

30 <400> 71

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1           5           10           15
Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg
           20           25           30
    
```

35

<210> 72

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 72

```

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1           5           10           15
Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
           20           25           30
    
```

45

<210> 73

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

ES 2 725 808 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 73

5

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

<210> 74

<211> 31

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

15

<400> 74

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

20

<210> 75

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 75

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

30

<210> 76

<211> 31

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

40

<400> 76

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

45

<210> 77

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

ES 2 725 808 T3

<400> 77

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

5

<210> 78

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 78

15

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

20

<210> 79

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 79

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

30

<210> 80

<211> 31

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

40

<400> 80

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

45

<210> 81

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

ES 2 725 808 T3

<400> 81

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala His Lys Tyr Leu Asn Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

5 <210> 82  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 82

15 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys His Tyr Leu Asn Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

20 <210> 83  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 83

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Lys Lys Arg  
20 25 30

30 <210> 84  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 84

40 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Lys Lys Arg  
20 25 30

45 <210> 85  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 85

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
 20 25 30

5 <210> 86  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 86

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Val Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Lys Lys Arg  
 20 25 30

15 <210> 87  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

25 <400> 87

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Val Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Lys Lys  
 20 25

30 <210> 88  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 88

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Val Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
 20 25 30

40 <210> 89  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

50 <400> 89

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Lys Lys Arg Tyr  
20 25 30

5 <210> 90  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 90

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Lys Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 91  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 91

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Lys Lys  
20 25

25 <210> 92  
<211> 29  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 92

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys  
20 25

40 <210> 93  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 93

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Lys Lys Arg Tyr  
20 25 30

5 <210> 94  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 94

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Lys Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 95  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 95

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Lys Lys  
20 25

25 <210> 96  
<211>  
<212>  
30 <213>

<400> 96  
000

35 <210> 97  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 97

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Asn Lys Arg Tyr  
20 25 30

45 <210> 98  
<211> 30  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia Artificial



<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

5 <400> 98

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Asn Lys Arg  
20 25 30

<210> 99

10 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 99

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Leu Asn Lys  
20 25

20

<210> 100

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 100

30

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Cys Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
20 25 30

<210> 101

<211> 30

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

40

<400> 101

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Asp Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
20 25 30

45 <210> 102

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

ES 2 725 808 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 102

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

5 Met Ala Glu Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
20 25 30

<210> 103

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 103

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

20 Met Ala Phe Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
20 25 30

<210> 104

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 104

30 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
20 25 30

<210> 105

<211> 30

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 105

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala His Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
20 25 30

45 <210> 106

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

ES 2 725 808 T3

<400> 106

5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Ile Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
 20 25 30

<210> 107

<211> 30

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

15

<400> 107

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
 20 25 30

20 <210> 108

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 108

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Leu Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
 20 25 30

30

<210> 109

<211> 30

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

40 <400> 109

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Met Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
 20 25 30

45

<210> 110

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 110

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Asn Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
 20 25 30  
 5  
 <210> 111  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <400> 111  
 15  
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Pro Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
 20 25 30  
 <210> 112  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 25  
 <400> 112  
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Gln Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
 20 25 30  
 30  
 <210> 113  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <400> 113  
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
 20 25 30  
 40  
 <210> 114  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 50  
 <400> 114  
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

ES 2 725 808 T3

	1		5		10		15									
	Met	Ala	Ser	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Lys	Asn	Lys	Arg		
				20					25					30		
5	<210> 115 <211> 30 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
10	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético <400> 115															
	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
	1				5					10					15	
	Met	Ala	Thr	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Lys	Asn	Lys	Arg		
				20					25					30		
15	<210> 116 <211> 30 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
20	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético <400> 116															
	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
	1				5					10					15	
	Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Lys	Asn	Lys	Arg		
				20					25					30		
25	<210> 117 <211> 30 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
30	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético <400> 117															
	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
	1				5					10					15	
	Met	Ala	Trp	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Lys	Asn	Lys	Arg		
				20					25					30		
40	<210> 118 <211> 30 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
45	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético <400> 118															

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Tyr Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Arg  
20 25 30

5 <210> 119  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 119

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Ala Asn Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 120  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 120

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Cys Asn Lys Arg  
20 25 30

25 <210> 121  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35 <400> 121

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Asp Asn Lys Arg  
20 25 30

40 <210> 122  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 122

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Glu Asn Lys Arg  
20 25 30

5 <210> 123  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 123

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Phe Asn Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 124  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 124

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Gly Asn Lys Arg  
20 25 30

25 <210> 125  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 125

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile His Asn Lys Arg  
20 25 30

40 <210> 126  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 126

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Ile Asn Lys Arg  
20 25 30

5 <210> 127  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 127

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Met Asn Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 128  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 128

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Asn Asn Lys Arg  
20 25 30

25 <210> 129  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
35 <400> 129

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Pro Asn Lys Arg  
20 25 30

40 <210> 130  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 130



ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Gln Asn Lys Arg  
20 25 30

5 <210> 131  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 131

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Arg Asn Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 132  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 132

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Ser Asn Lys Arg  
20 25 30

25 <210> 133  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35 <400> 133

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Thr Asn Lys Arg  
20 25 30

40 <210> 134  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 134

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Val Asn Lys Arg  
20 25 30

5 <210> 135  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 135

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Trp Asn Lys Arg  
20 25 30

15 <210> 136  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 136

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Tyr Asn Lys Arg  
20 25 30

25 <210> 137  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35 <400> 137

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Ala Arg  
20 25 30

40 <210> 138  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 138

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Cys Arg  
20 25 30

5 <210> 139  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 139

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Asp Arg  
20 25 30

15 <210> 140  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 140

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Glu Arg  
20 25 30

25 <210> 141  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 141

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Phe Arg  
20 25 30

40 <210> 142  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 142

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Gly Arg  
20 25 30

5 <210> 143  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 143

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn His Arg  
20 25 30

15 <210> 144  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 144

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Ile Arg  
20 25 30

25 <210> 145  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 145

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Leu Arg  
20 25 30

40 <210> 146  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 146

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Met Arg  
20 25 30

5 <210> 147  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 147

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Asn Arg  
20 25 30

15 <210> 148  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 148

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Pro Arg  
20 25 30

25 <210> 149  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 149

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Gln Arg  
20 25 30

40 <210> 150  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 150

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Arg Arg  
20 25 30

5 <210> 151  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 151

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Ser Arg  
20 25 30

15 <210> 152  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 152

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Thr Arg  
20 25 30

25 <210> 153  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 153

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Val Arg  
20 25 30

40 <210> 154  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 154

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Trp Arg  
 20 25 30

5 <210> 155  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 155

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Tyr Arg  
 20 25 30

15 <210> 156  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 156

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Ala  
 20 25 30

25 <210> 157  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 157

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Asp  
 20 25 30

35 <210> 158  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 158

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Glu  
20 25 30

5 <210> 159  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 159

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Phe  
20 25 30

15 <210> 160  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 160

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Gly  
20 25 30

25 <210> 161  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35 <400> 161

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys His  
20 25 30

40 <210> 162  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 162



ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Ile  
20 25 30

5 <210> 163  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 163

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Lys  
20 25 30

15 <210> 164  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 164

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Leu  
20 25 30

25 <210> 165  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35 <400> 165

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Met  
20 25 30

40 <210> 166  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 166

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Asn  
20 25 30

5 <210> 167  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 167

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Pro  
20 25 30

15 <210> 168  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 168

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Gln  
20 25 30

25 <210> 169  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 169

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Ser

40 20 25 30

<210> 170  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 170

50

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Thr  
20 25 30

5 <210> 171  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 171

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Val  
20 25 30

15 <210> 172  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 172

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Trp  
20 25 30

25 <210> 173  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35 <400> 173

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Lys Tyr  
20 25 30

40 <210> 174  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

50 <400> 174

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr Ser  
 20 25 30  
 Trp Cys Glu Pro Gly Trp Cys Arg  
 35 40

5 <210> 175  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 10 <400> 175

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asp Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Glu Ser Ile Lys Asp Lys Arg Tyr  
 20 25 30

15 <210> 176  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <220>  
 <223> c-term amidado  
 25 <400> 176

Glu Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
 20 25

30 <210> 177  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <220>  
 <223> c-term amidado  
 40 <400> 177

His Lys Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
 20 25

45 <210> 178  
 <211> 27  
 <212> PRT

ES 2 725 808 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

5

<220>  
<223> c-term amidado

<400> 178

10

His	Ser	Lys	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

<210> 179  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

15

<220>  
<223> c-term amidado

<400> 179

20

His	Ser	Asp	Lys	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

<210> 180  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

25

<220>  
<223> c-term amidado

<400> 180

30

His	Ser	Asp	Gly	Lys	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

<210> 181  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35

<220>  
<223> c-term amidado

<400> 180

40

His	Ser	Asp	Gly	Lys	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

<210> 181  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

45

<220>  
<223> c-term amidado

<400> 180

50

His	Ser	Asp	Gly	Lys	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

<210> 181  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

50

<220>  
<223> c-term amidado

ES 2 725 808 T3

<400> 181

His Ser Asp Gly Ile Lys Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

5 <210> 182  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
<223> c-term amidado

15 <400> 182

His Ser Asp Gly Ile Phe Lys Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

20 <210> 183  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
<223> c-term amidado

30 <400> 183

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Lys Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

35 <210> 184  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
<223> c-term amidado

45 <400> 184

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Lys Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

50 <210> 185

<211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

10 <400> 185

```

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Lys Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 1           5           10           15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
           20           25
    
```

15 <210> 186  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

25 <400> 186

```

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Lys Arg Tyr Arg Lys Gln
 1           5           10           15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
           20           25
    
```

30 <210> 187  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

40 <400> 187

```

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Glu Tyr Arg Lys Gln
 1           5           10           15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
           20           25
    
```

45 <210> 188  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

ES 2 725 808 T3

<400> 188

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Lys Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

5

<210> 189

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

15 <223> c-term amidado

<400> 189

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Glu Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

20

<210> 190

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

30 <223> c-term amidado

<400> 190

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Glu Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

35

<210> 191

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

45 <223> c-term amidado

<400> 191

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Lys  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

50



<210> 192  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 10  
 <220>  
 <223> c-term amidado  
 <400> 192

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Lys	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

15  
 <210> 193  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 25  
 <220>  
 <223> c-term amidado  
 <400> 193

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Lys	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

30  
 <210> 194  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 40  
 <220>  
 <223> c-term amidado  
 <400> 194  
 45

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Lys	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

50  
 <210> 195  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

<223> c-term amidado

5 <400> 195

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Glu Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

<210> 196

10 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

<223> c-term amidado

20 <400> 196

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Glu Tyr Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

<210> 197

25 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

<223> c-term amidado

35 <400> 197

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Lys Leu Ala Ala Val Leu  
20 25

<210> 198

40 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>

<223> c-term amidado

50 <400> 198

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Lys Ala Ala Val Leu  
20 25

5 <210> 199  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
<223> c-term amidado

15 <400> 199

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Lys Ala Val Leu  
20 25

20 <210> 200  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
<223> c-term amidado

30 <400> 200

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Lys Val Leu  
20 25

35 <210> 201  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
<223> c-term amidado

45 <400> 201

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Lys Leu  
20 25

50 <210> 202  
<211> 27  
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

5

<220>

<223> c-term amidado

<400> 202

10

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Lys					
			20					25							

<210> 203

<211>

15 <212>

<213>

<400> 203

000

20

<210> 204

<211>

<212>

<213>

25

<400> 204

000

30

<210> 205

<211>

<212>

<213>

35

<400> 205

000

<210> 206

<211>

<212>

40 <213>

<400> 206

000

45

<210> 207

<211>

<212>

<213>

50

<400> 207

000

<210> 208

<211>

55 <212>

<213>

<400> 208

000

60

ES 2 725 808 T3

<210> 209  
<211>  
<212>  
<213>  
5  
<400> 209  
000  
10  
<210> 210  
<211>  
<212>  
<213>  
15  
<400> 210  
000  
20  
<210> 211  
<211>  
<212>  
<213>  
25  
<400> 211  
000  
<210> 212  
<211>  
<212>  
<213>  
30  
<400> 212  
000  
35  
<210> 213  
<211>  
<212>  
<213>  
40  
<400> 213  
000  
45  
<210> 214  
<211>  
<212>  
<213>  
50  
<400> 214  
000  
55  
<210> 215  
<211>  
<212>  
<213>  
60  
<400> 215  
000  
<210> 216  
<211>  
<212>  
<213>  
65  
<400> 216  
000  
<210> 217

ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 217  
000

<210> 218  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 218  
000

15 <210> 219  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 219  
000

<210> 220  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 220  
000

30 <210> 221  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 221  
000

40 <210> 222  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 222  
000

<210> 223  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 223  
000

55 <210> 224  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 224  
000

<210> 225

ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 225  
000

<210> 226  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 226  
000

15 <210> 227  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 227  
000

<210> 228  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 228  
30 000

<210> 229  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 229  
000

40 <210> 230  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 230  
000

<210> 231  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 231  
000

55 <210> 232  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 232  
000

<210> 233

# ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 233  
000

<210> 234  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 234  
000

15 <210> 235  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 235  
000

<210> 236  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 236  
000

30 <210> 237  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 237  
000

40 <210> 238  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 238  
000

<210> 239  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 239  
000

55 <210> 240  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 240  
000

<210> 241



ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 241  
000

<210> 242  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 242  
000

15 <210> 243  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 243  
000

<210> 244  
<211>  
25 <212>  
<213>

<400> 244  
000

30

<210> 245  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 245  
000

40 <210> 246  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 246  
000

<210> 247  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 247  
000

55

<210> 248  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 248  
000

<210> 249

# ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 249  
000

<210> 250  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 250  
000

15 <210> 251  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 251  
000

<210> 252  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 252  
000

30

<210> 253  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 253  
000

40 <210> 254  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 254  
000

<210> 255  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 255  
000

55

<210> 256  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 256  
000

<210> 257

ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 257  
000

<210> 258  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 258  
000

15 <210> 259  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 259  
000

<210> 260  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 260  
30 000

<210> 261  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 261  
000

40 <210> 262  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 262  
000

<210> 263  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 263  
000

55 <210> 264  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 264  
000

<210> 265

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 265  
000

<210> 266  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 266  
000

15 <210> 267  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 267  
000

<210> 268  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 268  
000

30

<210> 269  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 269  
000

40 <210> 270  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 270  
000

<210> 271  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 271  
000

55

<210> 272  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 272  
000

<210> 273

ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 273  
000

<210> 274  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 274  
000

15 <210> 275  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 275  
000

<210> 276  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 276  
30 000

<210> 277  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 277  
000

40 <210> 278  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 278  
000

<210> 279  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 279  
000

55 <210> 280  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 280  
000

<210> 281

ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 281  
000

<210> 282  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 282  
000

15 <210> 283  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 283  
000

<210> 284  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 284  
30 000

<210> 285  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 285  
000

40 <210> 286  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 286  
000

<210> 287  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 287  
000

55 <210> 288  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 288  
000

<210> 289

ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 289  
000

<210> 290  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 290  
000

15 <210> 291  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 291  
000

<210> 292  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 292  
30 000

<210> 293  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 293  
000

40 <210> 294  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 294  
000

<210> 295  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 295  
000

55 <210> 296  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 296  
000

<210> 297

ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 297  
000

<210> 298  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 298  
000

15 <210> 299  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 299  
000

<210> 300  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 300  
000

30 <210> 301  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 301  
000

40 <210> 302  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 302  
000

<210> 303  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 303  
000

55 <210> 304  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 304  
000

<210> 305



ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 305  
000

<210> 306  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 306  
000

15 <210> 307  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 307  
000

<210> 308  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 308  
000

30

<210> 309  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 309  
000

40 <210> 310  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 310  
000

<210> 311  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 311  
000

55

<210> 312  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 312  
000

<210> 313

ES 2 725 808 T3

<211>  
<212>  
<213>

5 <400> 313  
000

<210> 314  
<211>  
10 <212>  
<213>

<400> 314  
000

15 <210> 315  
<211>  
<212>  
<213>

20 <400> 315  
000

<210> 316  
25 <211>  
<212>  
<213>

<400> 316  
000

30 <210> 317  
<211>  
<212>  
35 <213>

<400> 317  
000

40 <210> 318  
<211>  
<212>  
<213>

45 <400> 318  
000

<210> 319  
<211>  
50 <212>  
<213>

<400> 319  
000

55 <210> 320  
<211>  
<212>  
<213>

60 <400> 320  
000

<210> 321

<211>  
 <212>  
 <213>

5 <400> 321  
 000

<210> 322  
 <211> 30  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

15 <400> 322

	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
	1				5					10					15	
	Met	Ala	Ala	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Lys	Asn	Arg	Ile		
				20					25					30		

20 <210> 323  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 323

	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
	1				5					10					15	
	Met	Ala	Gly	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Lys	Asn	Arg	Ile		
				20					25					30		

30 <210> 324  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

40 <400> 324

	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
	1				5					10					15	
	Met	Ala	Lys	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Lys	Asn	Arg	Ile		
			20						25					30		

45 <210> 325  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 325

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Arg Ile  
20 25 30

5 <210> 326  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 326

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Lys Asn Arg Ile  
20 25 30

15 <210> 327  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 327

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Pro Asn Arg Ile  
20 25 30

25 <210> 328  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

35 <400> 328

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Pro Asn Arg Ile  
20 25 30

40 <210> 329  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 329

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Pro Asn Arg Ile  
20 25 30

5 <210> 330  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 330

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Pro Asn Arg Ile  
20 25 30

15 <210> 331  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 331

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Pro Asn Arg Ile  
20 25 30

25 <210> 332  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 332

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Gln Asn Arg Ile  
20 25 30

40 <210> 333  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 333

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Gln Asn Arg Ile  
20 25 30

5 <210> 334  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 334

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Gln Asn Arg Ile  
20 25 30

15

<210> 335  
<211> 30  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

25 <400> 335

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Gln Asn Arg Ile  
20 25 30

30 <210> 336  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 336

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Gln Asn Arg Ile  
20 25 30

40 <210> 337  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<400> 337

50

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Arg Asn Arg Ile  
20 25 30

5 <210> 338  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 338

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Arg Asn Arg Ile  
20 25 30

15 <210> 339  
<211> 30  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
25 <400> 339

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Arg Asn Arg Ile  
20 25 30

30 <210> 340  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
<400> 340

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Arg Asn Arg Ile  
20 25 30

40 <210> 341  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
50 <400> 341

ES 2 725 808 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Arg Asn Arg Ile  
 20 25 30

5 <210> 342  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

15 <400> 342

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
 35 40

20 <210> 343  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

30 <400> 343

Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu  
 1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu  
 20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys  
 35 40 45

Lys Lys

35 <210> 344  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético

<220>  
 <223> c-term amidado

45 <400> 344



ES 2 725 808 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Trp Leu Lys Asn Gly Gly  
 20 25 30  
 Pro Ser Ser Gly Ala Ser  
 35

5 <210> 345  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <220>  
 <223> c-term amidado

15 <400> 345  
 Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu  
 20 25 30  
 Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser  
 35 40

20 <210> 346  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <220>  
 <223> c-term amidado

30 <400> 346  
 Asn Glu Glu Glu Glu Glu His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu  
 20 25 30  
 Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser  
 35 40

35 <210> 347  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <220>  
 <223> c-term amidado

45 <400> 347

ES 2 725 808 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
 35 40

5 <210> 348  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <220>  
 <223> c-term amidado

15 <400> 348

Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu  
 20 25 30  
 Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
 35 40 45

20 <210> 349  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

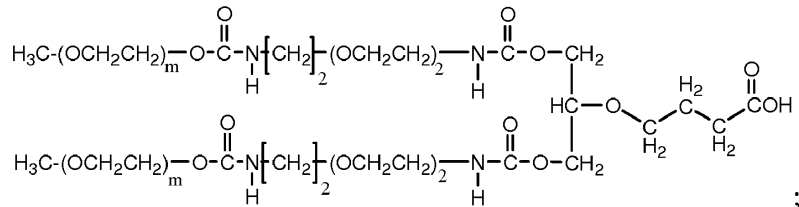
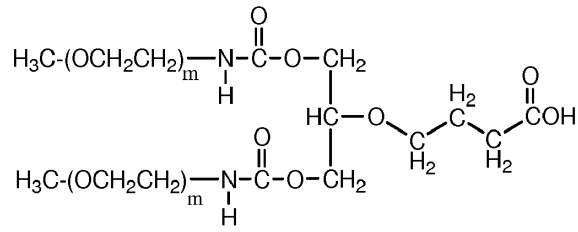
25 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético  
 <220>  
 <223> c-term amidado

30 <400> 349

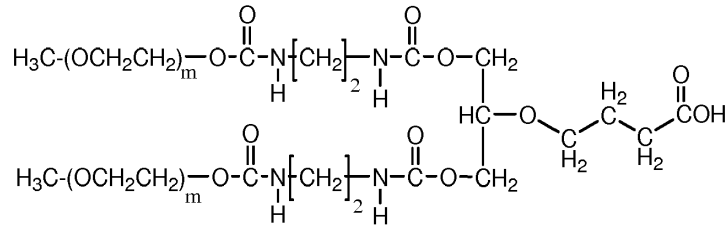
Asp Glu Glu Glu Glu Glu His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu  
 20 25 30  
 Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
 35 40 45

35





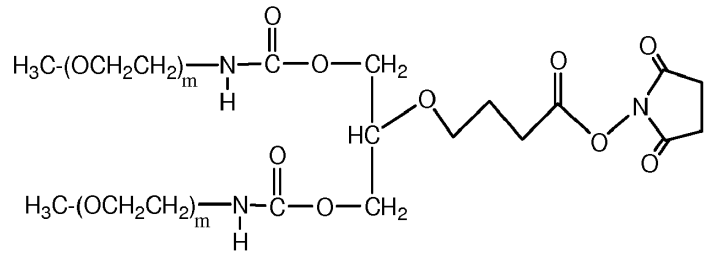
y



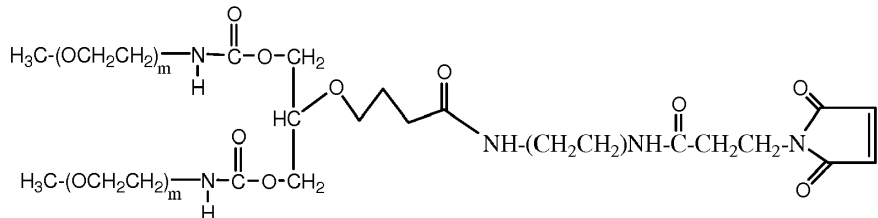
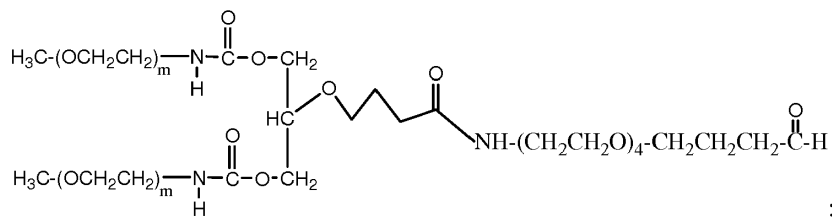
5

en donde cada (m) es 2 a 4000.

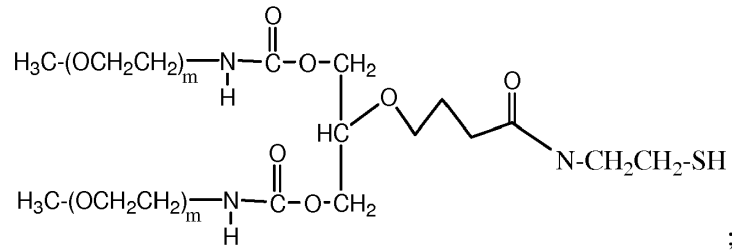
6. El reactivo polimérico de la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en



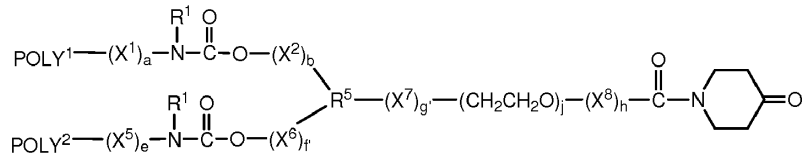
10



15

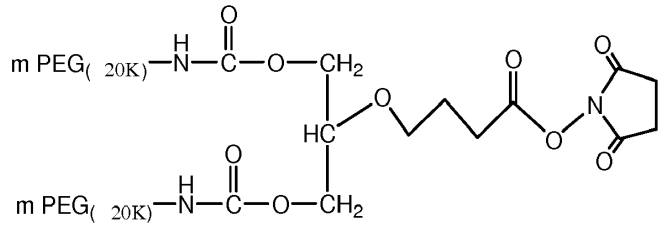


;



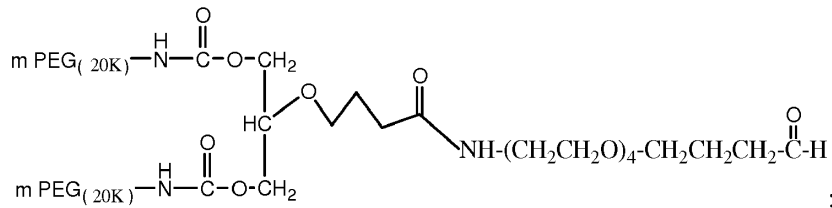
5 en donde cada (m) es 2 a 4000.

7. El reactivo polimérico de la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en

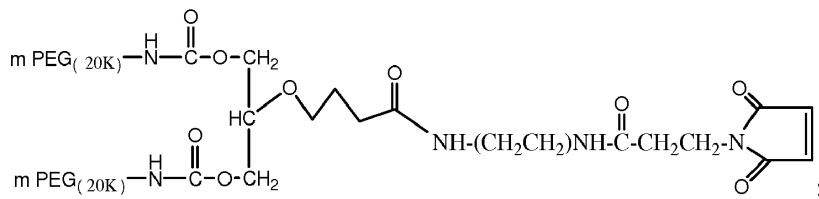


;

10

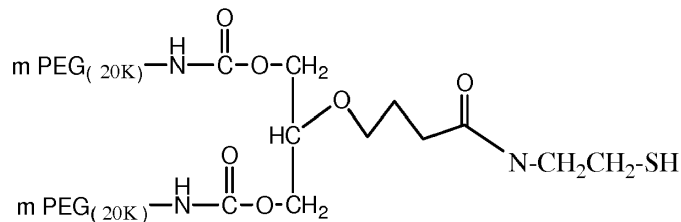


;



;

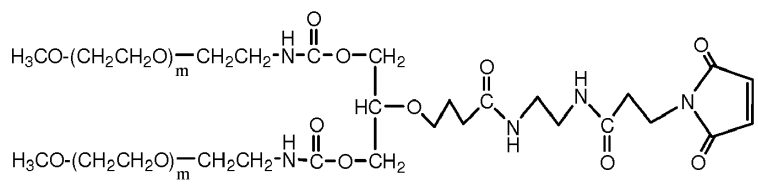
y



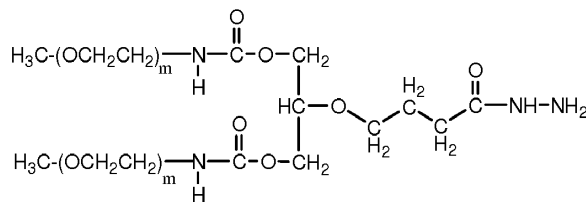
.

15

8. El reactivo polimérico de la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en



y



5 en donde cada (m) es de 2 a 4000 y cada (n) 0 a 20.

9. Un método para preparar un producto conjugado que comprende la etapa de poner en contacto un reactivo polimérico de acuerdo con la reivindicación 1 con un agente activo para proporcionar así el producto conjugado de fármaco.
- 10 Una preparación farmacéutica que comprende el producto conjugado preparado según la reivindicación 9 combinado con un excipiente farmacéutico.
11. La preparación farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el excipiente es un azúcar.
12. La preparación farmacéutica de la reivindicación 10, en forma liofilizada.
13. La preparación farmacéutica de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente un diluyente líquido.
14. La preparación farmacéutica de la reivindicación 13, en donde el diluyente líquido se selecciona del grupo que consiste en agua bacteriostática para inyectables, dextrosa al 5% en agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada y combinaciones de las mismas.
15. La preparación farmacéutica de la reivindicación 10, en forma de dosis unitaria o alojada en un vial de vidrio.