

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 837**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50

(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2004 PCT/US2004/033271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2005 WO05035727**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2004 E 04794581 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 1675620**

54 Título: **Derivados poliméricos**

30 Prioridad:

09.10.2003 US 510169 P

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

16.01.2020

73 Titular/es:

**AMBRX, INC. (100.0%)
10975 North Torrey Pines Road, Suite 100
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

WILSON, TROY E.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 737 837 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 poliméricos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 **[0001]** La presente invención está relacionada con los derivados de polímeros y compuestos hidrófilos que contienen fracciones de acetileno, con los métodos para su síntesis y con los métodos que los usan para modificar de forma selectiva las propiedades y características de moléculas proteicas.

Antecedentes

15 **[0002]** La unión covalente del polímero hidrófilo polietilenglicol, abreviado como 'PEG', es un método para aumentar la solubilidad en agua y la biodisponibilidad y para prolongar el tiempo de circulación de muchas moléculas biológicamente activas, incluyendo proteínas, péptidos y, particularmente, moléculas hidrófobas. El PEG se ha usado ampliamente en la industria farmacéutica, en implantes artificiales y en otras aplicaciones en las que son importantes la biocompatibilidad, la falta de toxicidad y la falta de inmunogenicidad. Para maximizar las propiedades deseadas del PEG, el peso molecular total y el estado de hidratación del polímero o polímeros de PEG unidos a la molécula biológicamente activa deben ser lo suficientemente altos como para proporcionar las características ventajosas que se asocian normalmente con la unión de polímeros de PEG, como una mayor solubilidad en agua y una mayor vida media de circulación, sin afectar negativamente a la bioactividad de la molécula madre.

25 **[0003]** Los derivados de PEG se unen frecuentemente con moléculas biológicamente activas mediante funcionalidades químicas reactivas, como los residuos de histidina, lisina y cisteína, los extremos N-terminales y las fracciones de carbohidratos. Las proteínas y otras moléculas tienen a menudo un número limitado de sitios reactivos disponibles para la unión polimérica. A menudo, los sitios más adecuados para la modificación mediante unión polimérica desempeñan un papel significativo en la unión de receptores y son necesarios para el mantenimiento de la actividad biológica de la molécula. Por ello, la unión indiscriminada de cadenas poliméricas con estos sitios reactivos en una molécula biológicamente activa provoca a menudo una reducción significativa o incluso la pérdida total de la actividad biológica de la molécula modificada con polímeros (R. Clark et al., (1996), 'J. Biol. Chem.', 271:21969-21977). Para formar conjugados que tengan el peso molecular polimérico suficiente como para proporcionar las ventajas deseadas a una molécula diana, los métodos o estrategias de la técnica anterior normalmente requerían la unión aleatoria de numerosos brazos poliméricos a la molécula, aumentando así el riesgo de una reducción o incluso la pérdida total de la bioactividad de la molécula madre.

40 **[0004]** Los sitios reactivos que forman los loci para la unión de los derivados de PEG con las proteínas están determinados por la estructura de la proteína. Las proteínas, incluidas las enzimas, están compuestas por diversas secuencias de alfa-aminoácidos, cuya estructura general es $H_2N-CHR-COOH$. La fracción alfa amino (H_2N-) de un aminoácido se une con la fracción carboxilo ($-COOH$) de un aminoácido adyacente para formar enlaces amida, que pueden representarse como $-(NH-CHR-CO)_n-$, donde el subíndice 'n' puede ser igual a cientos o miles de unidades. El fragmento representado por R puede contener sitios reactivos para la actividad biológica de las proteínas y para la unión de derivados de PEG.

45 **[0005]** Por ejemplo, en el caso del aminoácido lisina, hay una fracción $-NH_2$ en la posición épsilon y también en la posición alfa. El $-NH_2$ de épsilon está libre para las reacciones en condiciones con un pH básico. Gran parte de la técnica en el campo de la derivatización de proteínas con PEG se ha orientado a desarrollar derivados de PEG para su unión con la fracción épsilon- NH_2 de los residuos de lisina presentes en las proteínas. ("Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", 'Nektar Molecular Engineering Catalog', 2003, págs. 1-17). Sin embargo, todos estos derivados de PEG comparten la limitación de no poder establecerse de forma selectiva entre los -a menudo- numerosos residuos de lisina presentes en la superficie de las proteínas. Esta puede ser una limitación importante en los casos en los que un residuo de lisina es importante para la actividad proteica -que se da en un sitio enzimático activo, por ejemplo- o en los casos en los que un residuo de lisina desempeña un papel importante a la hora de mediar en la interacción de la proteína con otras moléculas biológicas, tal y como sucede con los sitios de unión al receptor.

60 **[0006]** Una segunda -e igualmente importante- complicación de los métodos existentes actualmente para la pegilación (o PEGilación) de proteínas es que los derivados de PEG pueden sufrir reacciones secundarias no deseadas con otros residuos que no son los deseados. La histidina contiene una fracción imino reactiva, que se representa estructuralmente como $-N(H)-$, pero muchos derivados que reaccionan con el NH_2 épsilon también pueden reaccionar con $-N(H)-$. De manera similar, la cadena lateral del aminoácido cisteína tiene un grupo sulfhidrido libre, representado estructuralmente como $-SH$. En algunos casos, los derivados de PEG dirigidos al grupo $-NH_2$ de épsilon de la lisina también reaccionan con la cisteína, la histidina u otros residuos. Esto puede producir complejas mezclas de moléculas bioactivas derivatizadas con PEG y conlleva el riesgo de eliminar la actividad de la molécula bioactiva seleccionada. Sería conveniente desarrollar derivados de PEG que permitan introducir un grupo

químico funcional en un único sitio de la proteína que después permita el acoplamiento selectivo de uno o más polímeros de PEG a la molécula bioactiva en sitios específicos de la superficie de la proteína que están bien definidos y son predecibles.

[0007] Además de los residuos de lisina, la técnica relacionada en este campo ha dedicado esfuerzos considerables al desarrollo de reactivos de PEG activados que están dirigidos o apuntan a otras cadenas laterales de aminoácidos, incluyendo la cisteína, la histidina y el extremo N-terminal. (Patente de EE. UU. N° 6,610,281. 'Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation', Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, págs. 1-17). El residuo de cisteína puede introducirse selectivamente en sitios de la estructura de las proteínas utilizando mutagénesis de sitio dirigido y otras técnicas conocidas en este campo, y la fracción sulfhidrilo libre resultante se puede hacer reaccionar con derivados de PEG que contienen grupos funcionales reactivos al tiol. Sin embargo, este enfoque tiene sus complicaciones, pues la introducción de un grupo sulfhidrilo libre puede dificultar la expresión, el plegamiento y la estabilidad de la proteína resultante. Por lo tanto, sería conveniente contar con un medio para introducir un grupo químico funcional en moléculas bioactivas que permita la unión o el acoplamiento selectivo de uno o más polímeros de PEG a la proteína y que, al mismo tiempo, sea compatible (es decir, no entre en reacciones secundarias no deseadas) con los sulfhidrilos y otros grupos químicos funcionales que se hallan habitualmente en las proteínas.

[0008] Tal y como puede verse a partir de un muestreo de la técnica relacionada, muchos de estos derivados que se han desarrollado para unirse a las cadenas laterales de las proteínas -en particular, la fracción $-NH_2$ de la cadena lateral del aminoácido lisina y la fracción $-SH$ de la cadena lateral de cisteína- han resultado ser problemáticos en cuanto a su síntesis y su utilización. Algunos forman con la proteína enlaces inestables que están sujetos a hidrólisis y, por lo tanto, no duran demasiado en entornos acuosos, por ejemplo en el torrente sanguíneo. Otros forman enlaces más estables, pero experimentan una hidrólisis antes de que se forme el enlace, lo cual significa que el grupo reactivo del derivado de PEG puede quedar inactivo antes de que la proteína pueda unirse. Algunos son algo tóxicos y, por lo tanto, son menos adecuados para usarse 'in vivo'. Algunos reaccionan con demasiada lentitud como para ser útiles en la práctica. Algunos provocan una pérdida de la actividad proteica al unirse a sitios que son responsables de la actividad de la proteína. Algunos no son específicos para los sitios a los que se van a unir, lo cual también puede provocar una pérdida de la actividad necesaria y dificultar la reproducibilidad de los resultados. A fin de dar respuesta a los retos relacionados con la modificación de proteínas con fracciones de polietilenglicol, se han desarrollado derivados de PEG que son más estables (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6,602,498) o que reaccionan de forma selectiva con las fracciones de tiol de moléculas y superficies (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6,610,281). Es evidente que en este campo existe una necesidad de contar con derivados de PEG que sean químicamente inertes en entornos fisiológicos hasta que se hacen reaccionar de forma selectiva para formar enlaces químicos estables.

[0009] Recientemente, se ha informado sobre una tecnología completamente nueva relacionada con las ciencias de las proteínas que promete dar solución a muchas de las limitaciones relacionadas con las modificaciones de sitio específico de las proteínas. Más específicamente, se han añadido nuevos componentes a la maquinaria biosintética proteica de la procariota *Escherichia coli* (*E. coli*) (por ejemplo, L. Wang, et al., (2001), *Science*, 292:498-500) y la eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (por ejemplo, J. Chin et al., *Science*, 301:964-7 (2003)), lo cual ha permitido incorporar 'in vivo' aminoácidos no codificados genéticamente a proteínas. Diversos aminoácidos nuevos con propiedades químicas, físicas y biológicas novedosas -incluyendo marcadores de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, ceto aminoácidos y aminoácidos glicosilados- se han incorporado eficazmente y con gran fidelidad a proteínas de *E. coli* y levadura en respuesta al codón ámbar, TAG, usando esta metodología. Ver, por ejemplo, J. W. Chin et al., (2002), 'Journal of the American Chemical Society', 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), 'ChemBioChem', 11:1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), 'PNAS United States of America', 99:11020-11024; y L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), 'Chem. Comm.', 1-10. Estos estudios han demostrado que es posible introducir de forma selectiva y rutinaria grupos químicos funcionales, como grupos alquino y fracciones azida, que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes a todos los grupos funcionales que se hallan entre los 20 aminoácidos más comunes codificados genéticamente, y que reaccionan de forma eficaz y selectiva para formar enlaces covalentes estables.

[0010] La capacidad de incorporar a las proteínas aminoácidos no codificados genéticamente permite introducir grupos químicos funcionales que podrían proporcionar valiosas alternativas a los grupos funcionales que existen de forma natural, como el épsilon- NH_2 de la lisina, el sulfhidrilo $-SH$ de la cisteína, el grupo imino de la histidina, etc. Se sabe que algunos grupos químicos funcionales son inertes a los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos más comunes codificados genéticamente, pero reaccionan de forma limpia y eficiente para formar enlaces estables. En este campo se sabe que los grupos azida y acetileno, por ejemplo, experimentan una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen en condiciones acuosas y en presencia de una cantidad catalizadora de cobre. Ver, por ejemplo, Tornøe, et al., (2002) 'Org. Chem.', 67:3057-3064; y Rostovtsev, et al., (2002) 'Angew. Chem. Int. Ed.', 41:2596-2599. Si se introduce una fracción azida en una estructura proteica, por ejemplo, es posible incorporar un grupo funcional que es químicamente inerte a las aminas, los sulfhidrilos, los ácidos carboxílicos y los grupos hidroxilos que se encuentran en las proteínas, pero que también reacciona de forma fluida y eficiente con una fracción de acetileno para formar un producto de cicloadición. Es importante señalar que, en ausencia de la fracción de acetileno, la azida sigue siendo químicamente inerte y no reactiva en presencia de otras cadenas laterales de proteínas y en condiciones fisiológicas.

En las técnicas anteriores se conocen algunos derivados de polietilenglicol con un peso molecular bajo que contienen grupos acetilénicos (por ejemplo, FRA-2753975), pero no sucede lo mismo en el campo de la modificación de proteínas.

[0011] Si bien en este campo se han desvelado métodos y composiciones para introducir en estructuras proteicas aminoácidos no codificados genéticamente, no se han hecho esfuerzos para desarrollar derivados de PEG que puedan reaccionar de forma eficiente y específica con las nuevas funcionalidades químicas. Por consiguiente, en este campo existe una necesidad de contar con nuevos derivados de PEG que proporcionen los beneficios relacionados con los polímeros de PEG (es decir, una mayor solubilidad, estabilidad y vida media y una menor inmunogenicidad), pero que proporcionen una mayor versatilidad y selectividad en cuanto a su uso para modificar proteínas con derivados de polietilenglicol. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCION Y DIVULGACION

[0012] Los compuestos solubles en agua de la presente divulgación pueden ser estables en entornos acuosos con un pH de alrededor de 11 o menos.

[0013] Las fracciones enlazadoras o conectoras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, $--NH--CO--CH_2--CH_2--$, $--CO--NH--CH_2--CH_2--$, $--S--CH_2--CH_2--$, y $--O--CH_2--CH_2--$.

[0014] La presente invención proporciona el uso de un compuesto que comprende un polímero y al menos una fracción de acetileno, tal y como se reivindica en la reivindicación 1.

[0015] La invención también proporciona un compuesto soluble en agua de acuerdo con la reivindicación 2 que incluye un polímero y al menos una fracción de acetileno, de manera que el polímero se selecciona de un grupo que incluye óxidos de polialquileño, polioles polioxiethylados y alcoholes poliolefinicos.

[0016] En algunas realizaciones, el polímero se selecciona de un grupo que incluye polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol polioxiethylado, sorbitol polioxiethylado, glucosa polioxiethylada y alcohol de polivinilo. Por ejemplo, el compuesto puede ser polietilenglicol acetileno, de manera que la fracción de acetileno está ligada covalentemente a una estructura central o esqueleto polimérico mediante un enlace de éter. En algunas realizaciones, el compuesto es polietilenglicol acetileno y la fracción de acetileno está unida covalentemente de forma directa a un esqueleto polimérico. De manera alternativa, la fracción de acetileno puede unirse covalentemente al esqueleto polimérico mediante un enlazador o conector. En algunas realizaciones, el polímero es una cadena polimérica recta o lineal y el compuesto no está sustituido más allá de la fracción de acetileno. En otras realizaciones, el polímero es un terpolímero o un copolímero en bloque o un copolímero aleatorio.

[0017] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos solubles en agua que tienen una estructura de mancuerna que incluye: a) una fracción de acetileno en al menos un primer extremo del esqueleto polimérico; y b) al menos un segundo grupo funcional en un segundo extremo del esqueleto polimérico. El segundo grupo funcional puede ser otra fracción de acetileno o un grupo reactivo diferente. En algunas realizaciones, el segundo grupo funcional no reacciona con las fracciones de acetileno. En algunas realizaciones, la invención proporciona compuestos solubles en agua que comprenden al menos un brazo de una estructura molecular ramificada. Por ejemplo, la estructura molecular ramificada puede ser dendrítica.

[0018] En algunas realizaciones, la fracción de acetileno forma un enlace con una fracción reactiva en una superficie o en una molécula. Por ejemplo, la fracción reactiva puede ser una fracción de acetileno. La fracción de acetileno puede unirse al mencionado polímero mediante un enlace que incluye una fracción enlazadora. En estas realizaciones, el polímero puede incluir al menos un segundo grupo funcional además de la fracción de acetileno para unirse a la mencionada fracción enlazadora. Por ejemplo, el segundo grupo funcional puede ser específico para el desplazamiento nucleofílico y la fracción enlazadora puede incluir una fracción nucleofílica capaz de reaccionar con el mencionado grupo funcional. En otras realizaciones, el segundo grupo funcional es específico para aminas y la mencionada fracción enlazadora incluye una fracción amina activa. En otro ejemplo, el segundo grupo funcional puede ser específico para reaccionar con un carbonilo electrofílico y la mencionada fracción enlazadora puede incluir una fracción carbonilo electrofílica. Por ejemplo, el segundo grupo funcional puede ser específico para reaccionar con un éster activado y la fracción enlazadora puede incluir un éster activado. En otro ejemplo, el segundo grupo funcional puede ser específico para reaccionar con una cetona y la mencionada fracción enlazadora incluye una cetona. En otra realización, el segundo grupo funcional es específico para reaccionar con un tiol nucleófilo y la fracción enlazadora incluye un tiol nucleófilo. En algunas realizaciones, el segundo grupo funcional es específico para reaccionar con un hidroxilo nucleófilo y la fracción enlazadora incluye un hidroxilo nucleófilo.

DESCRIPCION DETALLADA

[0019] La presente invención proporciona un método altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas con polímeros o derivados de compuestos solubles en agua, incluyendo -pero sin limitarse a- derivados de PEG. Los polímeros o derivados de compuestos solubles en agua de la presente invención pueden añadirse a cualquier proteína que contenga un grupo funcional adecuado. El grupo funcional adecuado puede añadirse a un polipéptido

modificando una o más cadenas laterales de uno o más aminoácidos que existen de forma natural. De manera alternativa, los grupos funcionales adecuados pueden incorporarse a un polipéptido usando una síntesis química estándar de polipéptidos con aminoácidos que tienen el grupo funcional, o mediante la incorporación selectiva de aminoácidos no codificados genéticamente -por ejemplo aquellos aminoácidos que contienen una fracción azida o acetileno- a las proteínas en respuesta a un codón selector. Después de incorporarse, las cadenas laterales de los aminoácidos pueden modificarse por medio de cualquier polímero o compuesto soluble en agua adecuados. Los polímeros o compuestos reactivos adecuados incluyen -pero no se limitan a- los derivados de PEG. Las reacciones adecuadas que pueden usarse para unir los derivados o compuestos solubles en agua con los grupos funcionales adecuados del polipéptido incluyen, por ejemplo -pero no se limitan a-, la reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen (ver, por ejemplo, Padwa, A. en 'Comprehensive Organic Synthesis', Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, págs. 1069-1109; y Huisgen, R. en '1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry', (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, Nueva York, págs. 1-176), por ejemplo con derivados de azida o acetileno, respectivamente.

[0020] Puesto que el método incluye una cicloadición en vez de una reacción de sustitución nucleofílica, las proteínas pueden modificarse con una selectividad extremadamente alta. La reacción puede realizarse a temperatura ambiente en condiciones acuosas con una excelente regioselectividad ($1,4 > 1,5$) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu(I) a la mezcla de reacción. Ver, por ejemplo, Tornøe, et al., (2002) 'Org. Chem.', 67:3057-3064; y Rostovtsev, et al., (2002) 'Angew. Chem. Int. Ed.', 41:2596-2599. Las moléculas que pueden añadirse a una proteína de la invención mediante una cicloadición [3+2] incluyen prácticamente cualquier molécula con un derivado de azido o acetileno. Estas moléculas pueden añadirse al grupo funcional apropiado de un aminoácido modificado que existe de forma natural o un aminoácido no natural con un grupo acetileno, por ejemplo p-propargiloxifenilalanina, o un grupo azido, por ejemplo p-azido-fenilalanina, respectivamente.

[0021] Generalmente, el anillo resultante de cinco miembros que surge de la cicloadición [3+2] de Huisgen no es reversible en medios o entornos reductores y permanece estable frente a la hidrólisis durante largos períodos de tiempo en medios acuosos. Por consiguiente, las características físicas y químicas de una gran variedad de sustancias pueden modificarse en condiciones acuosas exigentes con los derivados activos de PEG de la presente invención. Y lo que es aún más importante, puesto que las fracciones de azida y acetileno son específicas entre sí (y no reaccionan, por ejemplo, con los grupos funcionales de las cadenas laterales de cualquiera de los 20 aminoácidos más comunes codificados genéticamente), las proteínas pueden modificarse en uno o más sitios específicos con una selectividad extremadamente alta.

[0022] La invención también proporciona derivados hidrolíticamente estables y solubles en agua de compuestos y polímeros, incluyendo -pero sin limitarse a- derivados de PEG y polímeros hidrófilos relacionados que tienen una o más fracciones de acetileno. Los derivados de polímeros de PEG de la presente invención que contienen fracciones de acetileno son muy selectivos a la hora de unirse con fracciones de azida que se han introducido de forma selectiva en las proteínas en respuesta a un codón selector.

[0023] Más específicamente, las fracciones de azida comprenden azidas de alquilo, azidas de arilo y derivados de estas azidas. Los derivados de las azidas de alquilo y arilo pueden incluir otros sustituyentes siempre y cuando se mantenga la reactividad específica de acetileno. Las fracciones de acetileno comprenden acetilenos de alquilo y arilo y derivados de estos. Los derivados de los acetilenos de alquilo y arilo pueden incluir otros sustituyentes siempre y cuando se mantenga la reactividad específica de azida.

[0024] La invención incluye conjugados o sustancias que tienen fracciones de acetileno con polímeros o compuestos solubles en agua, como, por ejemplo -pero sin limitarse a- derivados de polímeros de PEG que tengan las correspondientes fracciones de acetileno. El enlace mediante el que se unen el PEG y la molécula biológicamente activa incluye el producto de cicloadición [3+2] de Huisgen.

[0025] En este campo se ha comprobado de forma fehaciente que puede usarse PEG para modificar las superficies de biomateriales (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6,610,281). La invención también incluye biomateriales que contienen una superficie que tiene uno o más sitios reactivos de azida o acetileno y uno o más de los polímeros con acetileno pertenecientes a la invención unidos a la superficie mediante un enlace de cicloadición [3+2] de Huisgen. Los biomateriales y otras sustancias también pueden unirse a los derivados poliméricos activados con azida o acetileno mediante un enlace diferente al enlace de azida o acetileno, por ejemplo mediante un enlace que comprende una fracción de tiol, ácido carboxílico, amina o alcohol, para dejar la fracción de azida o acetileno disponible para posteriores reacciones.

[0026] La invención incluye un método para sintetizar los polímeros o compuestos de la invención que contienen acetileno. En el caso de los derivados de polímeros o compuestos que contienen acetileno, el acetileno puede ligarse o unirse directamente a un átomo de carbono del polímero. De manera alternativa, el derivado polimérico o compuesto que contiene acetileno puede prepararse uniendo un agente de enlace -o agente enlazante- que tiene una fracción de acetileno en un extremo a un polímero convencional activado, de manera que el polímero resultante tiene la fracción de acetileno en la propia molécula o en su extremo.

[0027] Más específicamente, en el caso de los derivados poliméricos o compuestos que contienen acetileno, un

polímero soluble en agua que tiene al menos una fracción de hidroxilo activa experimenta una reacción en la que se desplaza un halógeno u otro grupo saliente activado de un precursor que contiene una fracción de acetileno. De manera alternativa, un polímero soluble en agua que tiene al menos una fracción electrofílica o nucleofílica activa experimenta una reacción con un agente de enlace que tiene un acetileno en un extremo, de manera que se forma un enlace covalente entre el polímero y el agente de enlace, y la fracción de acetileno se sitúa en el extremo del polímero. El uso de fracciones halógenas, grupos salientes activados y fracciones electrofílicas y nucleofílicas en el contexto de la síntesis orgánica y la preparación y uso de derivados de PEG está muy asentado entre los profesionales en este campo.

[0028] De este modo, la presente invención proporciona un método para la modificación selectiva de proteínas con derivados de polímeros o compuestos solubles en agua, como PEG, que contienen una fracción de acetileno. Los derivados de PEG que contienen acetileno pueden usarse para modificar las propiedades de superficies y moléculas en las que la biocompatibilidad, la estabilidad, la solubilidad y la falta de inmunogenicidad son importantes, mientras que, al mismo tiempo, se proporcionan medios más selectivos que los que se conocen en este campo para unir los derivados de PEG a proteínas.

Definiciones

[0029] Los términos 'grupo funcional', 'fracción activa' -o 'fragmento activo'-, 'grupo activador', 'grupo saliente', 'sitio reactivo', 'grupo químicamente reactivo' y 'fracción químicamente reactiva' se usan en este campo y en el presente documento para referirse a las porciones o unidades diferenciadas y definibles de una molécula. Los términos se utilizan en el presente documento para señalar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y reaccionan con otras moléculas.

[0030] Los términos 'enlace' -o 'unión'- y 'enlazante' -o 'enlazador'- se usan en el presente documento para referirse a grupos o enlaces que normalmente se forman como resultado de una reacción química y, normalmente, son enlaces covalentes. 'Enlaces hidrolíticamente estables' quiere decir que los enlaces son básicamente estables en agua y no reaccionan con agua en pHs adecuados -por ejemplo en condiciones fisiológicas- durante largos períodos de tiempo o, quizás, incluso indefinidamente. 'Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables' quiere decir que los enlaces se pueden degradar en agua o en soluciones acuosas, incluyendo, por ejemplo, la sangre. 'Enlaces enzimáticamente inestables o degradables' quiere decir que el enlace puede degradarse mediante una o más enzimas. Tal y como se conoce en este campo, el PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la estructura central o esqueleto polimérico o en el grupo de enlace -o grupo enlazador- situado entre el esqueleto polimérico y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula polimérica. Por ejemplo, los enlaces de éster que se forman mediante la reacción de ácidos carboxílicos de PEG, o ácidos carboxílicos de PEG activado, con grupos de alcoholes en un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen los enlaces de carbonato; los enlaces de imina que resultan de la reacción de una amina y un aldehído; los enlaces de éster de fosfato que se forman haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; los enlaces de hidrazona que son el producto de reacción de una hidrazida y un aldehído; los enlaces acetales -o acetálicos- que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; los enlaces de ortoésteres que son el producto de reacción de un formiato y un alcohol; los enlaces peptídicos formados por un grupo amina -por ejemplo, en un extremo de un polímero como PEG- y un grupo carboxilo de un péptido; y los enlaces de oligonucleótidos formados por un grupo de fosforamidita -por ejemplo, en un extremo de un polímero- y un grupo 5' hidroxilo de un oligonucleótido.

[0031] Cuando se utilizan en el presente documento, los términos 'molécula biológicamente activa', 'fracción biológicamente activa' o 'agente biológicamente activo' hacen referencia a cualquier sustancia que pueda afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un organismo biológico, incluyendo -pero sin limitarse a- virus, bacterias, hongos, plantas, animales y humanos. Más particularmente, tal y como se utilizan en el presente documento, las moléculas biológicamente activas incluyen cualquier sustancia dirigida al diagnóstico, la atenuación, el tratamiento o la prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o que pretenda mejorar de cualquier otro modo el bienestar físico o mental de humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen -pero no se limitan a- péptidos, proteínas, enzimas, fármacos o medicamentos de moléculas pequeñas, tintes, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Los tipos de agentes biológicamente activos que son adecuados para usarse con la presente invención incluyen -pero no se limitan a- antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes contra la ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos y similares.

[0032] Los términos 'alquilo', 'alqueno' y 'alcoxi' incluyen alquilos, alquenos y alcoxis ramificados y de cadena recta, respectivamente. El término 'alquilo inferior' hace referencia a un alquilo C₁-C₆. El término 'alcoxi' hace referencia a un alquilo sustituido con oxígeno, por ejemplo con las fórmulas -OR o -ROR₁, de manera que R y R₁ son, cada uno, alquilos seleccionados de forma independiente. Los términos 'alquilo sustituido' y 'alqueno sustituido' hacen referencia, respectivamente, a un alquilo y un alqueno sustituidos con uno o más sustituyentes no interferentes, como por ejemplo -pero sin limitarse a- cicloalquilo C₃-C₆, por ejemplo ciclopropilo, ciclobutilo y similares; acetileno; ciano; alcoxi, por ejemplo metoxi, etoxi y similares; alcanoloxi inferior, por ejemplo acetoxi; hidroxilo; carboxilo; amino; alquilamino inferior, por ejemplo metilamino; cetona; halo, por ejemplo cloro o bromo; fenilo; fenilo sustituido, y

similares. El término 'halógeno' incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

[0033] 'Arilo' hace referencia a uno o más anillos aromáticos, de manera que cada uno tiene 5 o 6 átomos de carbono. Los múltiples anillos de arilo pueden estar fusionados, como en el naftilo, o no fusionados, como en el caso del bifenilo. Los anillos de arilo también pueden estar fusionados o no con uno o más anillos heterocíclicos, heteroarilos o hidrocarburos cíclicos.

[0034] Un 'arilo sustituido' es un arilo que tiene uno o más grupos no interferentes como sustituyentes.

[0035] El término 'sustituyentes' incluye -pero no se limita a- los sustituyentes no interferentes. Los 'sustituyentes no interferentes' son aquellos grupos que proporcionan compuestos estables. Los radicales o sustituyentes no interferentes adecuados incluyen -pero no se limitan a- halo, C.sub.1 -C.sub.10 alquilo, C₂-C₁₀ alquenilo, C₂-C₁₀ alquinilo, C₁-C₁₀ alcoxi, C₁-C₁₂ aralquilo, C₁-C₁₂ alcarilo, C₃-C₁₂ cicloalquilo, C₃-C₁₂ cicloalquenilo, fenilo, fenilo sustituido, toluoilo, xilenilo, bifenilo, C₂-C₁₂ alcoxialquilo, C₂-C₁₂ alcoxiarilo, C₇-C₁₂ ariloxialquilo, C₇-C₁₂ oxiarilo, C₁-C₆ alquilsulfinilo, C₁-C₁₀ alquilsulfonilo, --(CH₂)_m --O--(C₁-C₁₀ alquilo), de manera que 'm' es entre 1 y 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radicales heterocíclicos, radicales heterocíclicos sustituidos, nitroalquilo, --NO₂, --CN, --NRC(O)--(C₁-C₁₀ alquilo), --C(O)--(C₁-C₁₀ alquilo), C₂-C₁₀ alquil tioalquilo, --C(O)O--(C₁-C₁₀ alquilo), --OH, --SO₂, .dbd.S, --COOH, --NR₂, carbonilo, --C(O)--(C₁-C₁₀ alquilo)-CF₃, --C(O)-CF₃, --C(O)NR₂, --(C₁-C₁₀ arilo)-S--(C₆-C₁₀ arilo), --C(O)-(C₁-C₁₀ arilo), --(CH₂)_m --O--(--(CH₂)_m --O--(C₁-C₁₀ alquilo), de manera que 'm' es entre 1 y 8, --C(O)NR.sub.2, --C(S)NR₂, --SO₂NR₂, --NRC(O) NR₂, --NRC(S) NR₂, sales de estos compuestos y similares. Tal y como se utiliza en el presente documento, cada R es H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, aralquilo o alcarilo.

[0036] La presente invención proporciona el uso -de acuerdo con la reivindicación 1- de derivados poliméricos que contienen acetileno y que comprenden un esqueleto polimérico soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de entre alrededor de 800 Da y alrededor de 100 000 Da. Las moléculas relacionadas con el PEG, como el polidextrano y el polipropilenglicol, son adecuadas para su uso en la puesta en práctica de esta invención y se pretende que el uso del término PEG o polietilenglicol sea incluyente y no excluyente a este respecto. El término PEG incluye el polietilenglicol en cualquiera de sus formas, incluyendo el PEG bifuncional, el PEG de múltiples brazos, el PEG bifurcado, el PEG ramificado, el PEG pendiente o colgante (es decir, el PEG o los polímeros relacionados con él que tienen uno o más grupos funcionales que 'penden' o 'cuelgan' del esqueleto polimérico) o el PEG con enlaces degradables.

[0037] Tal y como se utiliza en el presente documento, el término 'polímero soluble en agua' hace referencia a cualquier polímero que sea soluble en solventes acuosos. La unión de polímeros solubles en agua con un polipéptido terapéutico puede provocar cambios, incluyendo -pero sin limitarse a- una vida media sérica aumentada o modulada, o una vida media terapéutica aumentada o modulada respecto a la forma no modificada, una inmunogenicidad modulada, unas características de asociación física moduladas, como la agregación y la formación de multímeros, la unión alterada de receptores y la multimerización o dimerización alterada de receptores. El polímero soluble en agua puede tener -o no- su propia actividad biológica. Los polímeros adecuados incluyen -pero no se limitan a- polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, mono C₁-C₁₀ alcoxi o derivados ariloxi (que se describen en la Patente de EE. UU. nº 5,252,714, la cual se incorpora al presente documento mediante referencia), monometoxipolietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol de polivinilo, poliaminoácidos, anhídrido maleico de éter divinílico, N-(2-Hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, incluyendo sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, poliol polioxietylado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo -pero sin limitarse a- metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados de este, copolímeros de polialquilenglicol y derivados de estos, polivinil etil éteres, y alfa-beta-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de estos compuestos. Los ejemplos de estos polímeros solubles en agua incluyen -pero no se limitan a- polietilenglicol y seroalbúmina.

[0038] Tal y como se utiliza en el presente documento, el término 'polialquilenglicol' hace referencia al polietilenglicol, el polipropilenglicol, el polibutilenglicol y derivados de estos. El término 'polialquilenglicol' abarca polímeros lineales y ramificados y unos pesos moleculares promedio de entre 1 kDa y 100 kDa. Otras realizaciones ejemplares se detallan, por ejemplo, en los catálogos de distribuidores comerciales, como el catálogo 'Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications' ('Polietilenglicol y derivados para aplicaciones biomédicas') (2001) de Shearwater Corporation.

[0039] Normalmente, el PEG es claro, incoloro, inodoro, soluble en agua, estable frente al calor, inerte a muchos agentes químicos, no se hidroliza o deteriora y, generalmente, no es tóxico. Se considera que el polietilenglicol es biocompatible, es decir, el PEG puede coexistir con organismos o tejidos vivos sin provocar daños. Más específicamente, el PEG es básicamente no inmunogénico, es decir, el PEG no suele provocar una respuesta inmune por parte del cuerpo. Cuando se une a una molécula que tiene una función necesaria dentro del cuerpo, como un agente biológicamente activo, el PEG suele ocultar o enmascarar el agente y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmune de manera que el organismo pueda tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG no suelen provocar una respuesta inmune significativa y no suelen causar coagulaciones u otros efectos no

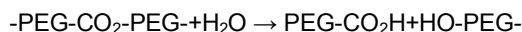
deseados. El PEG con la fórmula $--CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n--CH_2CH_2--$, de manera que 'n' es entre alrededor de 3 y alrededor de 4000, normalmente entre alrededor de 20 y alrededor de 2000, es un polímero útil para poner en práctica la presente invención. Los PEG que tienen un peso molecular de entre alrededor de 800 Da y alrededor de 100 000 Da son particularmente útiles como esqueleto polimérico.

[0040] El esqueleto polimérico -también llamado 'estructura central polimérica' o 'polymer backbone', en inglés- puede ser lineal o ramificado. Los esqueletos poliméricos ramificados se conocen de forma general en este campo. Normalmente, un polímero ramificado tiene una fracción o núcleo ramificado central y diversas cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo central. Normalmente, el PEG se utiliza en formas ramificadas que pueden prepararse mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La fracción de la rama central también puede derivarse de diversos aminoácidos, como la lisina. El polietilenglicol ramificado puede representarse mediante su forma general $R(-PEG-OH)_m$, en la que 'R' se deriva u obtiene de una fracción central, como glicerol, oligómeros de glicerol o pentaeritritol, y 'm' representa el número de brazos. Las moléculas de PEG con múltiples brazos, como las que se describen en las Patentes de EE. UU. n^{os} 5,932,462; 5,643,575; 5,229,490; 4,289,872; y en las Solicitudes de Patente de EE. UU. 2003/0143596; WO 96/21469 y WO 93/21259, también pueden usarse como esqueleto polimérico.

[0041] El PEG ramificado también puede tener la forma de un PEG bifurcado, representada mediante $PEG(-YCH_2)_n$, de manera que 'Y' es un grupo de enlace y 'Z' es un grupo terminal activado que está unido a un CH mediante una cadena de átomos con una longitud definida.

[0042] Otra forma ramificada, el PEG colgante, tiene grupos reactivos -como carboxilo- a lo largo del esqueleto de PEG en vez de en los extremos de las cadenas de PEG.

[0043] Además de estas formas de PEG, el polímero también puede prepararse con enlaces débiles o degradables en el esqueleto. Por ejemplo, el PEG puede prepararse con enlaces de éster en el esqueleto polimérico que están expuestos a hidrólisis. Tal y como se muestra más abajo, la hidrólisis da como resultado la escisión o descomposición del polímero en fragmentos con un menor peso molecular:



[0044] Aquellas personas versadas en la materia comprenderán que el término polietilenglicol o PEG representa o incluye todas las formas previamente mencionadas.

[0045] Los esqueletos poliméricos que son solubles en agua, con entre alrededor de 2 y alrededor de 300 extremos o terminales, son particularmente útiles para la presente invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen -pero no se limitan a- otros polialquilenglicoles, como polipropilenglicol (o PPG), copolímeros de estos (por ejemplo, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol), terpolímeros de estos, mezclas de estos compuestos y similares. Si bien el peso molecular de cada cadena del esqueleto polimérico puede variar, normalmente se encuentra en un rango o intervalo de entre alrededor de 800 Da y alrededor de 100 000 Da, a menudo entre alrededor de 6000 Da y alrededor de 80 000 Da.

[0046] Las personas con conocimientos y habilidades comunes en este campo comprenderán que la lista precedente de esqueletos básicamente solubles en agua no es en modo alguno exhaustiva y es meramente ilustrativa y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tengan las propiedades previamente descritas.

[0047] Los derivados poliméricos de la invención son 'multifuncionales', lo cual significa que el esqueleto polimérico tiene al menos dos extremos o terminales y, posiblemente, hasta alrededor de 300 terminales, que se funcionalizan o activan con un grupo funcional. Los derivados poliméricos multifuncionales incluyen polímeros lineales que tienen dos terminales, de manera que cada terminal está unido a un grupo funcional que puede ser igual o diferente.

[0048] Tal y como comprenderán aquellas personas versadas en este campo, el término 'protegido' hace referencia a la presencia de un grupo protector -o fracción de protección- que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en determinadas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse de un grupo que incluye tert-butiloxycarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, como ácido butanoico o ácido propinoico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser un grupo bencilo o alquilo como metilo, etilo o tert-butilo. También pueden usarse otros grupos protectores conocidos en este campo.

[0049] Los ejemplos específicos de grupos funcionales terminales presentes en la literatura incluyen N-succinimidil carbonato (ver, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. n^{os} 5,281,698, 5,468,478), amina (ver, por ejemplo, Buckmann et al., 'Makromol. Chem.', 182:1379 (1981), Zaplisky et al., 'Eur. Polym. J.', 19:1177 (1983)), hidrazida (ver, por ejemplo, Andresz et al., 'Makromol. Chem.', 179:301 (1978)), succinimidil propionato y succinimidil butanoato (ver,

por ejemplo, Olson et al. en 'Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications', págs. 170-181, Harris & Zaplinsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; ver también la Patente de EE. UU. n° 5,672,662), succinimidil succinato (ver, por ejemplo, Abuchowski et al., 'Cancer Biochem. Biophys.', 7:175 (1984) y Joppich et al., 'Macrolol. Chem.', 180:1381 (1979)), succinimidil éster (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n° 4,670,417), benzotriazol carbonato (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n° 5,650,234), glicidil éter (ver, por ejemplo, Pitha et al., 'Eur. J Biochem.', 94:11 (1979), Elling et al., 'Biotech. Appl. Biochem.', 13:354 (1991)), oxicarbonilimidazola (ver, por ejemplo, Beauchamp, et al., 'Anal. Biochem.', 131:25 (1983), Tondelli et al., 'J. Controlled Release', 1:251 (1985)), p-nitrofenil carbonato (ver, por ejemplo, Veronese, et al., 'Appl. Biochem. Biotech.', 11: 141 (1985); y Sartore et al., 'Appl. Biochem. Biotech.', 27:45 (1991)), aldehído (ver, por ejemplo, Harris et al., 'J. Polym. Sci. Chem.', Ed. 22:341 (1984), y las Patentes de EE. UU. n°s 5,824,784, y 5,252,714)), maleimida (ver, por ejemplo, Goodson et al., 'Bio/Technology', 8:343 (1990), Romani et al., en 'Chemistry of Peptides and Proteins', 2:29 (1984), y Kogan, 'Synthetic Comm.', 22:2417 (1992)), ortopiridildisulfuro (ver, por ejemplo, Woghiren, et al., 'Bioconj. Chem.', 4:314(1993)), acrilol (ver, por ejemplo, Sawhney et al., 'Macromolecules', 26:581 (1993)), y vinilsulfona (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n° 5,900,461).

[0050] En una realización de la invención, el derivado polimérico tiene la siguiente estructura:



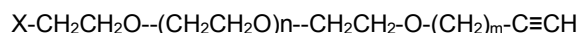
de manera que:

R puede ser H o un alquilo, alqueno, alquioxo o arilo o un grupo arilo sustituido;
B es una fracción de enlace -o fracción enlazadora- que puede estar presente o ausente;
POLI es un polímero no antigénico soluble en agua;
A es una fracción de enlace que puede estar presente o ausente y que puede ser la misma que B o diferente;
y
X es un segundo grupo funcional.

[0051] Los ejemplos de fracciones de enlace para A y B incluyen un grupo alquilo con múltiples funciones que contiene hasta 18 átomos de carbono y, preferiblemente, 1-10 átomos de carbono. Puede incluirse un heteroátomo como nitrógeno, oxígeno o azufre en la cadena alquilo. La cadena alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de fracciones de enlace para A y B incluyen un grupo arilo con múltiples funciones que contiene hasta 10 átomos de carbono y, preferiblemente, 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de enlace adecuados incluyen aquellos grupos de enlace que se describen en las Patentes de EE. UU. n°s 5,932,462 y 5,643,575 y en la Solicitud de Patente de EE. UU. 2003/0143596. Las personas con conocimientos y habilidades comunes en este campo comprenderán que la lista precedente de fracciones de enlace no es en modo alguno exhaustiva y es meramente ilustrativa y que se contemplan todas las fracciones de enlace que tengan las propiedades previamente descritas.

[0052] Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para usarse como X incluyen hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo, como ésteres de N-hidroxisuccinimidil y ésteres de 1-benzotriazolil, carbonato activo, como carbonatos de N-hidroxisuccinimidil y carbonatos de 1-benzotriazolil, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, iodoacetamida, epoxida, glioxales, diones, mesilatos, tosilatos, y tresilato, alqueno, cetona y acetileno. Debe entenderse que la fracción de X seleccionada debería ser compatible con el grupo de acetileno, de manera que no se produzca una reacción con el grupo de acetileno. Los derivados poliméricos que contienen acetileno pueden ser homobifuncionales, lo cual significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una fracción de acetileno, o heterobifuncionales, lo cual significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

[0053] En otra realización preferida, los derivados poliméricos de la invención comprenden un esqueleto polimérico que tiene la siguiente estructura:

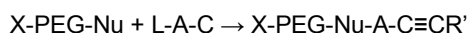


de manera que:

X es un grupo funcional como el que se ha descrito previamente;
n es entre alrededor de 20 y alrededor de 4000; y
m es entre alrededor de 1 y alrededor de 10.

[0054] Los ejemplos específicos de cada uno de los polímeros de PEG heterobifuncionales se muestran más abajo.

[0055] Los derivados de PEG de la presente invención que contienen acetileno pueden prepararse al menos mediante dos métodos. En un primer método, un esqueleto polimérico soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de entre alrededor de 800 Da y alrededor de 100 000 Da, de manera que el esqueleto polimérico tiene un primer terminal unido a un primer grupo funcional y un segundo terminal unido a un grupo nucleofílico adecuado, se hace reaccionar con un compuesto que contiene una funcionalidad de acetileno y un grupo saliente que es adecuado para reaccionar con el grupo nucleofílico del PEG. Cuando se combinan el polímero de PEG que tiene la fracción nucleofílica y la molécula que contiene el grupo saliente, el grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleofílico y es sustituido por la fracción nucleofílica, obteniendo así el polímero deseado que contiene acetileno.



[0056] Tal y como se muestra, un esqueleto polimérico que se prefiere para usarse en la reacción tiene la fórmula X-PEG-Nu, de manera que PEG es polietilenglicol, Nu es una fracción nucleofílica y X es un grupo funcional que no reacciona con Nu, L o la funcionalidad de acetileno.

[0057] Los ejemplos de Nu incluyen grupos amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidrido, imino, carboxilato, hidrazida y aminoxi, que reaccionarían principalmente mediante un mecanismo de tipo SN₂. Los ejemplos adicionales de grupos de Nu incluyen aquellos grupos funcionales que reaccionarían principalmente mediante una reacción de adición nucleofílica. Los ejemplos de grupos de L incluyen cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato, tosilato y otros grupos que se espera experimenten un desplazamiento nucleofílico, y también cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrofílicos que se espera experimenten una adición mediante nucleófilos.

[0058] En una realización preferida, A es un conector o enlazador alifático de entre 1 y 10 átomos de carbono o un anillo de arilo sustituido de entre 6 y 14 átomos de carbono. X es un grupo funcional que no reacciona con grupos azida y L es un grupo saliente adecuado.

[0059] En un segundo método para preparar los derivados poliméricos de la presente invención que contienen acetileno, un polímero de PEG que tiene un peso molecular promedio de entre alrededor de 800 Da y alrededor de 100 000 Da, que contiene un grupo funcional protegido o un agente de terminación de cadena en un extremo o terminal y un grupo saliente adecuado en el otro terminal, entra en contacto con un anión de acetileno.

[0060] Más abajo se muestra un esquema de reacción ejemplar:



de manera que:

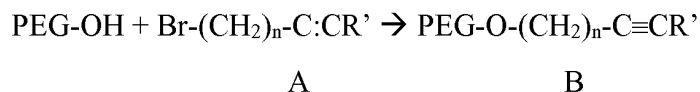
PEG es polietilenglicol y X es un grupo de terminación de cadena como alcoxi o un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y R' es H, o un grupo alquilo, alcoxi, arilo o ariloxi o un grupo alquilo, alcoxi, arilo o ariloxi sustituido.

[0061] En el ejemplo anterior, el grupo saliente L debería ser lo suficientemente reactivo como para experimentar un desplazamiento de tipo SN₂ cuando entra en contacto con una concentración suficiente de anión de acetileno. Las condiciones de reacción que se requieren para lograr un desplazamiento SN₂ de los grupos salientes por parte de los aniones de acetileno son muy conocidas en este campo.

[0062] Normalmente, la purificación del producto en bruto puede lograrse mediante la precipitación del producto seguida de una cromatografía, si fuera necesario.

EJEMPLOS

[0063] Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar -pero no para limitar- la presente invención, que queda definida y delimitada en las reivindicaciones.

Ejemplo 1**[0064]**

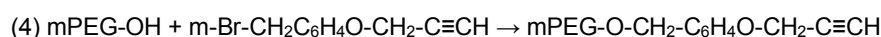
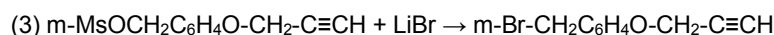
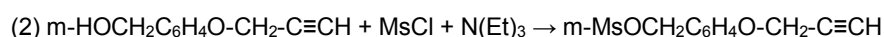
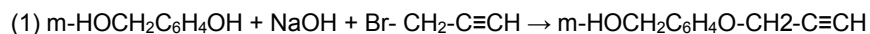
[0065] El polialquilenglicol (P-OH) se hace reaccionar con el haluro de alquilo (A) para formar el éter (B). En estos compuestos, 'n' es un número entero de uno a nueve y R' puede ser una cadena recta o ramificada, saturada o no saturada, de un grupo alquilo o heteroalquilo C1 a C20. R' también puede ser un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico C3 a C7 saturado o no saturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un grupo alcarilo sustituido o no sustituido (el alquilo es un alquilo C1 a C20 saturado o no saturado) o un grupo heteroalquilo. Normalmente, P-OH es un polietilenglicol (PEG) o monometoxi polietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de entre 800 y 40 000 Daltons (Da).

Ejemplo 2**[0066]**

El mPEG-OH con un peso molecular de 20 000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) se trató con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 mL). Después se añadió a la solución una solución de bromuro de propargilo, disuelto como una solución de un 80% de peso en xileno (0,56 mL, 5 mmol, 50 equiv., Aldrich), y una cantidad catalítica de KI, y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 h. Después se añadió agua (1 mL) y el solvente se extrajo al vacío. Al residuo se le añadió CH₂Cl₂ (25 mL) y se separó la capa orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 mL. Esta solución de CH₂Cl₂ se añadió a dietiléter (150 mL) gota a gota. El precipitado resultante se recogió, se lavó con varias porciones de dietiléter frío y se secó para obtener propargil-O-PEG.

Ejemplo 3**[0067]**

El mPEG-OH con un peso molecular de 20 000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) se trató con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 mL). Después se añadieron a la mezcla cincuenta equivalentes de 5-cloro-1-pentino (0,53 mL, 5 mmol, Aldrich) y una cantidad catalítica de KI. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 16 h. Después se añadió agua (1 mL) y el solvente se extrajo al vacío. Al residuo se le añadió CH₂Cl₂ (25 mL) y se separó la capa orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 mL. Esta solución de CH₂Cl₂ se añadió a dietiléter (150 mL) gota a gota. El precipitado resultante se recogió, se lavó con varias porciones de dietiléter frío y se secó para obtener el correspondiente alquino.

Ejemplo 4**[0068]**

[0069] A una solución de 3-hidroxibencilalcohol (2,4 g, 20 mmol) en THF (50 mL) y agua (2,5 mL) se añadió primero hidróxido de sodio (1,5 g, 37,5 mmol) y, después, una solución de bromuro de propargilo, disuelto como una solución

de un 80% de peso en xileno (3,36 mL, 30 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 6 h. A la mezcla se le añadió un 10% de ácido cítrico (2,5 mL) y el solvente se extrajo al vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron con MgSO₄ y se concentraron para obtener 3-propargiloxibencil alcohol.

[0070] Se añadió cloruro de metansulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 mL, 20 mmol) a una solución del compuesto 3 (2,0 g, 11,0 mmol) en CH₂Cl₂ a 0 °C y la reacción se depositó en el frigorífico durante 16 h. Con un tratamiento habitual se obtuvo el mesilato en forma de aceite amarillo pálido. Este aceite (2,4 g, 9,2 mmol) se disolvió en THF (20 mL) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h y, después, se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (2,5 mL) y se extrajo el solvente al vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para obtener el bromuro deseado.

[0071] El mPEG-OH de 20 kDa (1,0 g, 0,05 mmol, Sunbio) se disolvió en THF (20 mL) y la solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió NaH (6 mg, 0,25 mmol) agitando de forma vigorosa durante varios minutos y, después, se añadió el bromuro obtenido previamente (2,55 g, 11,4 mmol) y una cantidad catalítica de KI. Se extrajo el baño de enfriamiento y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 12 h. A la mezcla se le añadió agua (1,0) y se extrajo el solvente al vacío. Al residuo se le añadió CH₂Cl₂ (25 mL) y se separó la capa orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 mL. Mediante la adición gota a gota a una solución de éter (150 mL) se obtuvo un precipitado blanco, que se recogió para obtener el derivado de PEG.

Ejemplo 5

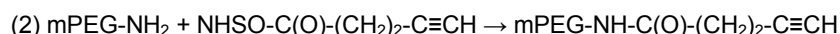
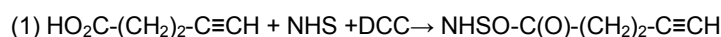
[0072]



[0073] Los polímeros de polietilenglicol que contienen alquinos terminales también pueden obtenerse uniendo un polímero de polietilenglicol que contiene un grupo funcional terminal a una molécula reactiva que contiene la funcionalidad alquino, tal y como se ha mostrado previamente.

Ejemplo 6

[0074]

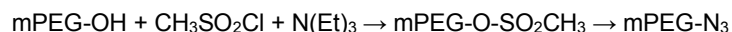


[0075] Se disolvió ácido 4-pentinoico (2,943 g, 3,0 mmol) en CH₂Cl₂ (25 mL). Se añadió N-hidroxisuccinimida (3,80 g, 3,3 mmol) y DCC (4,66 g, 3,0 mmol) y la solución se removió durante la noche a temperatura ambiente. El éster 7 de NHS bruto resultante se usó en la siguiente reacción sin purificarlo más.

[0076] El mPEG-NH₂ con un peso molecular de 5000 Da (mPEG-NH₂, 1 g, Sunbio) se disolvió en THF (50 mL) y la mezcla se enfrió hasta 4° C. Se añadió éster 7 de NHS (400 mg, 0,4 mmol) en porciones removiendo vigorosamente. Se dejó que la mezcla se mezclara durante 3 h mientras se calentaba a temperatura ambiente. Después se añadió agua (2 mL) y se extrajo el solvente al vacío. Al residuo se le añadió CH₂Cl₂ (50 mL) y se separó la capa orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 mL. Esta solución de CH₂Cl₂ se añadió al éter (150 ml) gota a gota. El precipitado resultante se recogió y se secó 'in vacuo'.

Ejemplo de referencia 1

[0077] Este ejemplo representa la preparación del éster de metansulfonilo de polietilenglicol, que también puede denominarse metansulfonato o mesilato de polietilenglicol. Los haluros y el tosilato correspondientes pueden prepararse mediante procedimientos similares.



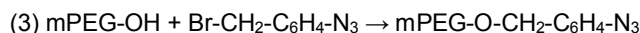
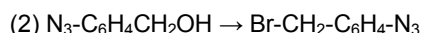
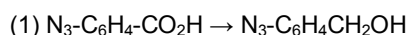
El mPEG-OH (MW = 3400, 25 g, 10 mmol) en 150 mL de tolueno se destiló azeotrópicamente durante 2 horas bajo nitrógeno y la solución se enfrió a temperatura ambiente. A la solución se le añadieron 40 mL de CH₂Cl₂ seco y 2,1 mL de trietilamina seca (15 mmol). La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadieron gota a gota 1,2 mL de cloruro de metansulfonilo destilado (15 mmol). La solución se removió a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche y la reacción se enfrió añadiendo 2 mL de etanol absoluto. La mezcla se evaporó al vacío para

eliminar los solventes -especialmente aquellos que no eran tolueno-, se filtró, se volvió a concentrar al vacío y después se precipitó en 100 mL de dietiléter. El filtrado se lavó con varias porciones de dietiléter frío y se secó 'in vacuo' para obtener el mesilato.

[0078] El mesilato (20 g, 8 mmol) se disolvió en 75 ml de THF y la solución se enfrió hasta 4° C. A la solución fría se le añadió azida de sodio (1,56 g, 24 mmol). La reacción se calentó a reflujo bajo nitrógeno durante 2 h. Después, se evaporaron los solventes y el residuo se diluyó con CH₂Cl₂ (50 mL). La fracción orgánica se lavó con una solución de NaCl y se secó con MgSO₄ anhidro. El volumen se redujo a 20 mL y el producto se precipitó añadiendo 150 ml de éter seco y frío.

Ejemplo de referencia 2

[0079]



[0080] El alcohol 4-azidobencilo puede producirse usando el método que se describe en la Patente de EE. UU. 5,998,595. Se añadió cloruro de metansulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 mL, 20 mmol) a una solución de alcohol 4-azidobencilo (1,75 g, 11,0 mmol) en CH₂Cl₂ a 0 °C y la reacción se depositó en el frigorífico durante 16 h. Con un tratamiento habitual se obtuvo el mesilato en forma de aceite amarillo pálido. Este aceite (9,2 mmol) se disolvió en THF (20 mL) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h y, después, se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (2,5 mL) y se extrajo el solvente al vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para obtener el bromuro deseado.

[0081] El mPEG-OH de 20 kDa (2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) se trató con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 mL) y el bromuro (3,32 g, 15 mmol) se añadió a la mezcla junto con una cantidad catalítica de KI. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 12 h. A la mezcla se le añadió agua (1,0) y se extrajo el solvente al vacío. Al residuo se le añadió CH₂Cl₂ (25 mL) y se separó la capa orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 mL. Mediante la adición gota a gota a una solución de éter (150 mL) se obtuvo un precipitado, que se recogió para obtener mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃.

Ejemplo de referencia 3

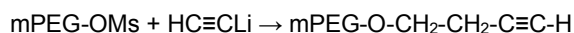
[0082]



El NH₂-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H (MW 3 400 Da, 2,0 g) se disolvió en una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 mL) y la solución se enfrió hasta 0° C. Se añadió 3-azido-1-N-hidroxisuccinimido propionato (5 equiv.) removiendo vigorosamente. Después de 3 horas, se añadieron 20 mL de H₂O y la mezcla se removió durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 3 con 0,5 N de H₂SO₄ y se añadió NaCl hasta una concentración de aproximadamente un 15% en peso. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (100 mL x 3), se secó con Na₂SO₄ y se concentró. Tras la precipitación con dietiléter frío, el producto se recogió mediante filtrado y se secó al vacío para obtener el derivado de PEG de omega-carboxiazida.

Ejemplo 7

[0083]



[0084] A una solución de acetiluro de litio (4 equiv.), preparada tal y como se conoce en este campo y enfriada hasta -78° C en THF, se añadió gota a gota una solución de mPEG-OMs disuelta en THF removiendo vigorosamente. 3 horas después, se dejó que la reacción se calentara a temperatura ambiente y se enfrió añadiendo 1 mL de butanol. Después se añadieron 20 mL de H₂O y la mezcla se removió durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 3 con 0,5 N de H₂SO₄ y se añadió NaCl hasta una concentración de aproximadamente un 15% en peso. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (100 mL x 3), se secó con Na₂SO₄ y se concentró. Tras la precipitación con dietiléter frío, el producto se recogió mediante filtrado y se secó al vacío para obtener el

derivado de PEG de omega-carboxi-azida.

Ejemplo 8

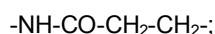
[0085] Los aminoácidos que contenían azida y acetileno se incorporaron a las proteínas en sitios selectivos utilizando los métodos que se describen en L. Wang, et al., (2001), 'Science', 292:498-500, J.W. Chin et al., 'Science', 301:964-7 (2003)), J. W. Chin et al., (2002), 'Journal of the American Chemical Society', 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), 'ChemBioChem', 11:1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), 'PNAS United States of America', 99:11020-11024; y L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), 'Chem. Comm.', 1-10. Después de incorporar los aminoácidos, se llevó a cabo la reacción de cicloadición con 0,01 mM de proteína en un 'buffer' o tampón de fosfato (o 'PB', por sus siglas en inglés), pH 8, en presencia de 2 mM de derivado de PEG, 1 mM de CuSO₄ y ~1 mg de alambre de Cu durante 4 horas a 37° C.

REIVINDICACIONES

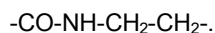
- 5 **1.** El uso o utilización de un compuesto soluble en agua que comprende un polímero y al menos una fracción de acetileno para la modificación selectiva de proteínas, de manera que el mencionado polímero es un óxido de polialquileño, un poliol polioxietilado o un alcohol poliolefínico.
- 10 **2.** Un compuesto soluble en agua como el de la reivindicación 1 que comprende un polímero y al menos una fracción de acetileno, de manera que el mencionado polímero es un óxido de polialquileño, un poliol polioxietilado o un alcohol poliolefínico, y de manera que el mencionado polímero tiene un peso molecular de entre 6000 Da y 100 000 Da.
- 15 **3.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que la mencionada fracción de acetileno es un grupo de acetileno terminal.
- 20 **4.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que el mencionado polímero es polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol polioxietilado, sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada o alcohol de polivinilo.
- 25 **5.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 4 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 4, de manera que el mencionado polímero es polietilenglicol.
- 30 **6.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que el mencionado compuesto es polietilenglicol acetileno y la mencionada fracción de acetileno está unida covalentemente y de forma directa a una estructura central o esqueleto polimérico.
- 35 **7.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que el mencionado compuesto es polietilenglicol acetileno y la mencionada fracción de acetileno está unida covalentemente a un esqueleto polimérico mediante una fracción de enlace.
- 40 **8.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 7 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 7, de manera que la mencionada fracción de acetileno está unida covalentemente a un esqueleto polimérico mediante un enlace de éter.
- 45 **9.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que el mencionado polímero es un polímero de cadena recta o lineal que no está sustituido más allá de la fracción de acetileno.
- 50 **10.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que el mencionado polímero es un terpolímero o un copolímero en bloque o aleatorio.
- 55 **11.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que el mencionado compuesto tiene una estructura de mancuerna que incluye: a) la mencionada fracción de acetileno en al menos un primer extremo del esqueleto polimérico; y b) al menos un segundo grupo funcional en al menos un segundo extremo del esqueleto polimérico; de manera que el segundo grupo funcional puede ser igual a la mencionada fracción de acetileno o diferente.
- 60 **12.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 11 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 11, de manera que el mencionado segundo grupo funcional no reacciona con la fracción de acetileno.
- 65 **13.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que el mencionado polímero comprende al menos un brazo de una estructura molecular ramificada.
- 14.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 13 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 13, de manera que la mencionada estructura molecular ramificada es dendrítica.
- 15.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que la mencionada fracción de acetileno forma un enlace con una fracción reactiva en una superficie o en una molécula.
- 16.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 2 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 1, de manera que la mencionada fracción de acetileno está unida al mencionado polímero mediante un enlace que comprende una fracción conectora o fracción de enlace y de manera que el mencionado polímero comprende al menos un segundo grupo funcional diferente a la mencionada fracción de acetileno para unirse a la mencionada fracción de enlace.
- 17.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 16 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 16, de

manera que el mencionado segundo grupo funcional es específico para el desplazamiento nucleofílico y la mencionada fracción de enlace comprende una fracción nucleofílica capaz de reaccionar con el mencionado segundo grupo funcional.

- 5 **18.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 16 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 16, de manera que el mencionado segundo grupo funcional es específico para aminas y la mencionada fracción de enlace incluye una fracción amina activa.
- 10 **19.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 16 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 16, de manera que el mencionado segundo grupo funcional es específico para reaccionar con un carbonilo electrofílico y la mencionada fracción de enlace incluye una fracción carbonilo electrofílica.
- 15 **20.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 16 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 16, de manera que el mencionado segundo grupo funcional es específico para reaccionar con un éster activado y la mencionada fracción de enlace incluye un éster activado.
- 20 **21.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 16 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 16, de manera que el mencionado segundo grupo funcional es específico para reaccionar con una cetona y la mencionada fracción de enlace incluye una cetona.
- 25 **22.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 16 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 16, de manera que el mencionado segundo grupo funcional es específico para reaccionar con un tiol nucleófilo y la mencionada fracción de enlace incluye un tiol nucleófilo.
- 30 **23.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 16 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 16, de manera que el mencionado segundo grupo funcional es específico para reaccionar con un hidroxilo nucleófilo y la mencionada fracción de enlace incluye un hidroxilo nucleófilo.
- 30 **24.** El compuesto soluble en agua de la reivindicación 16 o su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 16, de manera que el mencionado compuesto es conforme a la reivindicación 1 y la mencionada fracción de enlace es:



o



25. El compuesto soluble en agua de la reivindicación 1, de manera que el mencionado compuesto es estable en entornos acuosos con un pH de alrededor de 11 o menos.