

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 216**

51 Int. Cl.:

A61K 31/74 (2006.01)

C08F 230/02 (2006.01)

A61K 47/58 (2007.01)

A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2011 PCT/US2011/032768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130694**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11769715 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2558538**

54 Título: **Polímeros que contienen zwitteriones de alto peso molecular**

30 Prioridad:

15.04.2010 US 324413 P

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**KODIAK SCIENCES INC. (100.0%)
2631 Hanover Street
Palo Alto CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**CHARLES, STEPHEN A.;
PERLROTH, VICTOR D.;
BENOIT, DIDIER G.;
CLIZBE, LANE A.;
TO, WAYNE;
ZADIK, LINDA J. y
PRATT, JEANNE M.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 742 216 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

Polímeros que contienen zwitteriones de alto peso molecular

- 5 La presente invención se refiere a un conjugado que comprende (a) al menos un polímero que comprende al menos dos brazos de polímero que comprenden cada uno una pluralidad de monómeros como se define en la reivindicación 1, en donde cada monómero comprende un resto de fosforilcolina (PC), un fragmento iniciador adecuado para la polimerización de radicales, unido a un extremo proximal de cada brazo de polímero y un grupo terminal unido a un extremo distal de cada brazo de polímero, en donde el polímero tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.500 kDa y un índice de polidispersidad de menos de 2; y (b) al menos un agente funcional que comprende un agente bioactivo o un agente de diagnóstico, ambos como se definen en la reivindicación 1, unidos al fragmento iniciador o el grupo terminal.

Antecedentes de la invención

- 15 En la actualidad se está produciendo una intensa competición entre las grandes compañías farmacéuticas en un intento de brindar "productos médicamente diferenciados". Los agentes biofarmacéuticos se consideran un vehículo clave. Se considera que la diferenciación no provendrá necesariamente de la novedad de las dianas, sino de nuevos formatos farmacológicos. Estos formatos serán flexibles, de tal forma que los fármacos resultantes pueden centrarse en la *biología* en lugar de centrarse en el *formato*. Esta próxima ola de productos biofarmacéuticos será modular, multifuncional y dirigida. Estos medicamentos se diseñarán con vistas a comprender ampliamente la biología de la enfermedad a la que se dirige y a la aplicación de ese conocimiento en un medicamento multifacético. Los anticuerpos son fármacos fantásticos, pero a pesar de la gran cantidad de ingeniería de las proteínas de anticuerpo, son y seguirán siendo un formato rígido e inflexible.

- 25 Los ingenieros de proteínas farmacéuticas están buscando formatos de proteínas más pequeños. Se produjo un gran progreso en el año 2006 con productos como las adnectinas (desarrolladas por Adnexus y adquiridas por BMS), avimeros (desarrollados por Avidia y adquiridos por Amgen), diabodies (desarrollados por Domantis y adquiridos por GSK), Haptogen (adquirido por Wyeth), BiTES (desarrollado por Micromet), camélidos (desarrollados por Ablynx), péptidos (desarrollados por compañías como Gryphon Therapeutics y Compugen y muchos otros). Sin embargo, la conversión de estas plataformas tecnológicas en múltiples productos en la cadena farmacéutica ha tardado en materializarse. Durante las dos últimas décadas, los problemas que afectan a estos formatos de anticuerpo no completos están relacionados con una afinidad subóptima, mala estabilidad, bajo rendimiento de fabricación, así como con el desarrollo de herramientas. En gran medida, estos problemas se han resuelto o se están resolviendo. Sin embargo, el talón de Aquiles de estos formatos sigue siendo su inadecuado tiempo de residencia *in vivo*, un problema que frena una nueva ola de oportunidades de productos farmacéuticos.

- Los anticuerpos enteros tienen una semivida de eliminación *in vivo* superior a 250 horas, correspondiente a más de un mes de residencia física en el organismo. Esto los convierte en un excelente formato de producto desde el punto de vista de la dosificación. Normalmente se pueden lograr inyecciones mensuales o menos frecuentes. La tendencia también es hacia inyecciones subcutáneas en volúmenes más pequeños (1 ml, 0,8 ml, 0,4 ml), formulaciones líquidas más estables (frente a formulaciones liofilizadas que requieren reconstitución física), almacenamiento a mayores concentraciones (50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml) y a temperaturas más altas (-80 grados, -20 grados, 2 - 8 grados, temperatura ambiente).

- 45 Es difícil seguir los avances en materia de anticuerpos, especialmente con toda la actividad en el amplio ecosistema de descubrimiento y desarrollo de anticuerpos. Sin embargo, los anticuerpos distan de ser deseables. Son complicados de manejar, inflexibles, grandes, están limitados a una sola diana, se producen en sistemas de mamífero, en general están poco caracterizados y son cruciales para diversas actividades biológicas *in vivo*, entre las que destacan la unión a la diana, el reciclaje por el receptor FcRn epitelial, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), avidez, arquitecturas de mayor orden, solo por nombrar algunas.

- Los formatos modulares más pequeños pueden hacer una contribución mayor hacia el desarrollo de agentes terapéuticos más seguros, dirigidos, multifuncionales, con mayor eficacia, bien caracterizados y más baratos. Además, existe una necesidad similar de mejorar el tiempo de residencia en suero y las propiedades físicas asociadas de otros agentes farmacológicos, tales como proteínas y péptidos recombinantes (ya sean naturales o muteínas) y oligonucleótidos. El reto es diseñar una solución técnica que aumente drásticamente el tiempo de residencia *in vivo* para estos agentes biofarmacéuticos solubles (el problema de rendimiento), haciéndolo sin comprometer otros parámetros clave, tales como la solubilidad del fármaco, la estabilidad, la viscosidad, la capacidad de caracterización (los problemas con las propiedades físicas relacionadas) y emplear una estrategia que facilite la capacidad de predicción entre las clases de dianas y entre las vías de desarrollo de fármacos, desde los estudios tempranos en animales hasta el aumento de escala de fabricación y los ensayos clínicos en humanos finales (el problema de planificación de la cartera).

- 65 La primera clase de soluciones prevista está basada en la biología y depende de la fusión de agentes proteínicos a transferrina, albúmina, inmunoglobulina gamma (IgG), región constante de IgG (IgG-Fc) y/u otras proteínas séricas.

Sin embargo, la fusión de un resto de extensión en suero basado en agentes biológicos a un resto biológico funcional aumenta el número y la complejidad de las interacciones biológicas concurrentes. Estas interacciones no mediadas por la diana raramente promueven la acción terapéutica deseada del fármaco, sino que con frecuencia afectan negativamente a la acción terapéutica del fármaco de maneras complejas y escasamente comprendidas. El resultado neto es que se socava la capacidad de predicción, el rendimiento y la seguridad.

La segunda clase de soluciones probada se basa en gran medida en un conjunto de estrategias que utilizan polímeros de diferentes tipos que se acoplan al medicamento. Estos polímeros funcionan en gran medida basándose en su capacidad para unirse a y estructurar el agua. El agua unida reduce la eliminación por los cientos mecanismos de eliminación *in vivo*, tanto pasivos como activos, a la vez que también mejoran las propiedades físicas del conjugado de polímero-fármaco, tales como la solubilidad, la estabilidad, la viscosidad. Esta segunda clase de soluciones se subcategoriza adicionalmente de dos maneras: (1) por la entidad de unión a agua en del polímero y (2) por cómo se une el polímero al agente farmacológico. En relación con (1), hay diversos restos de unión a agua poliméricos en uso, tales como azúcares (carbohidratos), aminoácidos (dominios de proteína hidrófilos), óxido de polietileno, polioxazolina, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, etc. En relación con (2), la distinción es en gran medida si el polímero se agrega al agente farmacológico por la maquinaria celular o si se agrega en una etapa de conjugación semisintética.

En relación con los polímeros añadidos al agente farmacológico por la maquinaria celular (es decir, no a través de una etapa semisintética), un ejemplo es la adición de polímeros de carbohidratos hidrófilos a la superficie de una proteína traducida mediante un proceso de glucosilación mediado por células mediante la adición o modificación de un sitio de glucosilación a nivel de la secuencia de nucleótidos codificante (por ejemplo, Aranesp). Otro ejemplo es la adición de una cadena de aminoácidos hidrófilos durante la traducción de proteínas añadiendo una serie de unidades de nucleótidos repetidas a nivel de los codones del marco abierto de lectura (es decir, la plataforma XTEN de Amunix).

En relación con los semisintéticos: El campo que atesora más experiencia es la PEGilación, en el que se funcionalizan polímeros de óxido de polietileno y después se conjuntan al agente farmacológico. Asimismo, Fresenius emplea un enfoque de HESilación en el que se funcionalizan almidones de maíz de cadena larga y después se conjuntan al agente farmacológico. Asimismo, Serina Therapeutics emplea una cadena principal de polioxazolina hidrófila (en contraposición a la cadena principal de polietileno del PEG). Otro método denominado poliPEG, como se describe en Haddleton et al. emplea una cadena principal polimérica capaz de polimerizar por radicales y una entidad de unión a agua que es o bien una cadena corta de PEG o un azúcar.

¿Cómo de bien funcionan en la práctica estas estrategias tecnológicas diferentes? En general, a pesar del tiempo y los recursos empleados por las compañías farmacéuticas y biofarmacéuticas, la conclusión general es que estas tecnologías no proporcionan el nivel de beneficio de rendimiento necesario (especialmente el tiempo de residencia *in vivo*) y, además, se encuentran en la parte más baja de la curva en términos de su capacidad para ofrecer un mayor progreso a través de ingeniería adicional. El nivel de mejora necesario depende del fármaco y su biología y del perfil de producto necesario, pero en muchos casos llega a ser del triple al cuádruple. Muchas compañías están trabajando para lograr este nivel de mejora, pero en la práctica, las tecnologías empleadas no logran proporcionar mejoras incrementales que en general son un nicho para su aplicabilidad.

Por ejemplo:

la PEGilación de un fragmento de anticuerpo scFv (con un tamaño de aproximadamente 22 kDa) inhibidor de GM-CSF (datos de Micromet) con un PEG ramificado de 40 kDa dio como resultado una semivida de eliminación murina tras la inyección intravenosa de 59 horas que es inadecuada. Para que sea útil, la semivida murina debe ser de más de 150 horas (una mejora de 3x) y preferentemente, de más de 250 horas (una mejora de 4x).

La PEGilación de un interferón alfa de aproximadamente 19,5 kDa con un PEG ramificado de 40 kDa (datos de Pegasys) da como resultado una semivida de eliminación murina tras la inyección subcutánea de aproximadamente 50 horas y una semivida en humanos en el intervalo de 80 horas. Pegasys se dosifica semanalmente en humanos.

La PEGilación de un fragmento de anticuerpo Fab' de aproximadamente 50 kDa contra IL-8 (datos de Genentech, Leong et al, 2001) con una serie de polímeros de PEG de tamaño y arquitectura creciente. Las semividas en conejos después de la interacción intravenosa varió de 44 horas con un PEG lineal de 20 kDa a 105 horas con un PEG ramificado de 40 kDa. Esto puede correlacionarse frente a la semivida del producto aprobado Cimzia, que tiene un Fab' contra TNF α conjugado con un polímero ramificado de 40 kDa. La semivida en humanos después de una inyección subcutánea es de 311 horas y es suficiente (según se ha aprobado por la FDA para la artritis reumatoide) para la administración subcutánea mensual. Sin embargo, las propiedades conferidas por el resto de PEG (solubilidad, estabilidad, viscosidad) no son suficientes para posibilitar la formulación de una cantidad de dosis completa (400 mg) en un solo vial para inyección subcutánea (límite de 1 ml, preferentemente 0,8 ml o menos). En cambio, Cimzia se formula preferentemente como un sólido y en dos viales para dos inyecciones separadas, administrando cada una 200 mg de producto. Además, el reactivo PEG es muy costoso y supone hasta un veinte por ciento del precio mayorista promedio del medicamento. Por lo tanto, el producto Cimzia no es muy competitivo en el mercado frente a Humira (anticuerpo anti-TNF α , en una formulación líquida, en una jeringa de un solo uso, administrado por inyección subcutánea única, dos veces al mes) e incluso menos en comparación con Simponi (anticuerpo anti-TNF α , en una

formulación líquida, en una jeringa de un solo uso, administrado por inyección subcutánea única, una vez al mes).

La PEGilación de un péptido mimético (aproximadamente 4 kDa) del receptor de eritropoyetina (datos de Hematide) con un polímero de PEG ramificado de 40 kDa después de la inyección subcutánea mostró una semivida de entre 23 y 31 horas en ratas (dependiendo de la dosis). En monos, la semivida osciló entre 15 horas y 60 horas (Fan et al. Experimental Hematology, 34, 2006). La frecuencia de dosis proyectada para la molécula es mensual. En este caso, se hace posible dosificar esta molécula mensualmente por un efecto farmacodinámico cuya duración supera con creces la semivida física y el tiempo de residencia del fármaco en sí. Esta propiedad se mantiene para ciertos fármacos agonistas potentes pero generalmente no se mantiene para inhibidores que necesitan mantener una concentración inhibidora mínima ni tampoco para enzimas ni para proteínas agonistas a altas dosis.

El interferón beta (aproximadamente 20 kDa) se PEGiló con un polímero de PEG lineal de 40 kDa. Avonex, una forma no PEGilada, muestra una semivida terminal media en monos después de inyección intravenosa de 5.5 horas y una semivida de 10 horas después de la inyección intramuscular. La conjugación de un polímero de PEG lineal de 40 kDa puede demostrar una semivida de aproximadamente quince horas después de su administración intravenosa y de treinta horas después de su administración subcutánea. La conjugación de un polímero de PEG ramificado de 40 kDa puede demostrar una semivida de treinta horas después de su administración intravenosa y de sesenta horas después de su administración subcutánea. La frecuencia de dosis proyectada es dos veces al mes, por lo que se hace posible dosificar esta molécula mensualmente por un efecto biológico o farmacodinámico cuya duración supera la semivida física y el tiempo de residencia del fármaco en sí. Para un perfil de producto diana atractivo para competir con los productos de interferón beta existentes, se requiere una frecuencia de dosificación de una vez al mes. Como alternativa, sería ideal un conjugado de polímero que se administre dos veces al mes pero con una cinética muy plana, de orden potencialmente cero. Esto puede obtenerse con un conjugado altamente biocompatible y dosificado a una dosis general menor. Además, el interferón beta es una proteína inestable y "difícil" de trabajar en general y se desea una mejora adicional de su solubilidad y estabilidad.

Se ha realizado la PEGilación del factor VIII humano recombinante (de más de 300 kDa) con un polímero de PEG ramificado de 60 kDa. El FVIII no PEGilado demuestra una semivida en circulación de doce a catorce horas en seres humanos. Se usa de forma aguda en respuesta a una crisis hemorrágica. También se está utilizando para la profilaxis mediante infusiones intravenosas tres veces por semana. La semivida terminal media murina es de seis horas en forma no PEGilada y de once horas con una forma PEGilada dirigida al sitio. En conejos, con una proteína FVIII de longitud completa, una forma no PEGilada mostró una semivida terminal media de 6,7 horas. Con una forma PEGilada con un PEG ramificado de 60 kDa, la semivida aumentó hasta doce horas. La magnitud del aumento en la semivida de PEG-FVIII se correlaciona con el aumento en la masa de PEG. Un objetivo clave, sin embargo, es posibilitar la profilaxis con una infusión intravenosa una vez a la semana. No se cree o no es probable que el beneficio proporcionado por grandísimo (y costoso) reactivo de PEG de 60 kDa permita una frecuencia de dosis de una vez a la semana. Se necesita > 2x preferentemente un 4x adicional frente a PEG para cambiar el juego. Otra métrica de rendimiento *in vivo* a mejorar sería reducir significativamente la incidencia de anticuerpos neutralizantes generados contra el fármaco de FVIII administrado. Este objetivo se cumple de forma inadecuada a través de conjugados de FVIII-PEG. Otra métrica de rendimiento *in vitro* a mejorar podría ser conseguir una formulación estable de alta concentración suficiente para posibilitar una dosificación subcutánea en lugar de una dosificación intravenosa - esto también requeriría la mejora de las propiedades de inmunogenicidad *in vivo*, ya que las áreas subcutáneas son ricas en células presentadoras de antígenos inmunoestimulantes. Recientemente, se probó una fusión de FVIII generada por Biogen con el fragmento Fc de inmunoglobulina y demostró tener un nivel similar de semivida *in vivo* a la de FVIII PEGilado pero, curiosamente, muy baja biodisponibilidad presumiblemente debido a la eliminación del fármaco por las células endoteliales mediada por FcRn. Estos datos han llevado a los desarrolladores de fármacos de FVIII a la conclusión de que las tecnologías existentes han "alcanzado su tope".

La tecnología XTEN de Amunix fusiona aproximadamente 850 aminoácidos hidrófilos (aproximadamente 80 kDa de tamaño) al péptido GLP-1. Esto potencia la semivida hasta sesenta horas en un mono cinomolgo, lo que es ligeramente inferior a un equivalente de GLP-1 conjugado a un polímero de PEG de 40 kDa. Por lo tanto, un polímero con un tamaño aumentado 2x proporciona esencialmente el mismo beneficio de rendimiento. Se observó un nivel de beneficio similar con XTEN unido a la hormona del crecimiento humano. En cuanto a intentar prolongar adicionalmente el nivel del beneficio de la semivida, hay varios retos. En primer lugar y principalmente, los aminoácidos hidrófilos usados para unir y estructurar el agua no son óptimos en lo relativo a sus características de unión al agua. En segundo lugar, el necesario uso de la maquinaria de traducción ribosómica para añadir el polímero limita la arquitectura a un solo brazo, estructuras lineales que han mostrado en muchos ejemplos de PEGilación que son inferiores a las arquitecturas ramificadas cuando mantienen constante el peso corporal y aumentan el nivel de ramificación. En tercer lugar, un péptido unido usado como una cadena principal de polímero es lo suficientemente inestable como para demostrar polidispersidad, cuya heterogeneidad se vuelve limitante en términos prácticos, de tal forma que no puede aumentarse fácilmente la longitud del polímero hidrófilo para lograr semividas superiores a la del PEG ramificado de 40 kDa (eso, sumado a otra complejidad relacionada con el uso de múltiples unidades repetidas en el vector plasmídico codificante, que en sí se vuelve limitante). Por tanto, esta tecnología se vuelve en un nicho en su aplicación, por ejemplo, para hacer que un péptido anteriormente producido sintéticamente mediante síntesis química pueda producirse con otras tecnologías en un sistema basado en células que tiene algunas ventajas percibidas (así como nuevas desventajas) pero con un rendimiento *in vivo* similar, especialmente la semivida de eliminación *in vivo*.

rhEPO es una proteína de 30,4 kDa con 165 aminoácidos y 3 sitios de glucosilación unidos a N y 1 unido a O. El 40 % de la masa es carbohidrato. Los carbohidratos no son necesarios para la actividad. *in vitro*, pero son absolutamente necesarios para la actividad *in vivo*. Aranesp es una forma de eritropoyetina humana modificada a nivel genético para que contenga 5 cadenas de oligosacáridos unidas a N frente a la forma nativa que contiene 3 cadenas. Los carbohidratos adicionales aumentan el peso molecular aproximado de la glucoproteína de 30 kDa a 37 kDa. En seres humanos, el cambio aumenta la semivida terminal media después de la inyección intravenosa de 7 horas a 21 horas y después de la inyección subcutánea de 16 horas a 46 horas, que es una mejora aproximada del triple en ambos casos. Mircera, que es una forma PEGilada de eritropoyetina humana recombinante demostró una semivida *in vivo* después de la inyección subcutánea de aproximadamente 140 horas, pero en pacientes con insuficiencia renal crónica, donde los pacientes, debido a la filtración renal del fármaco, muestran un aumento en la semivida de más de 2x, así como una afinidad reducida por el receptor que reduce la eliminación mecánica, lo que significa que la semivida física real es de menos de 70 horas y en línea con el peptidomimético Hematide de Affymax (PEGilado con un PEG ramificado de 40 kDa).

La tecnología de HESilación emplea una conjugación semisintética de un polímero de almidón procedente de maíz a un fármaco. Los datos muestran que un polímero de HESilación de 100 kDa es equivalente a un polímero lineal de PEG de 30 kDa en la eritropoyetina en ratones (producto equivalente de Mircera). Es posible utilizar un polímero más grande, pero el enfoque está fundamentalmente limitado por la naturaleza de la unión de agua-almidón. Asimismo, la equivalencia de un polímero de 100 kDa a un PEG lineal de 30 kDa (que por sí mismo es inferior a un PEG ramificado de 40 kDa) muestra que aún falta mucho por hacer en cuanto al rendimiento antes de que esto pueda igualarse a un PEG ramificado de 40 kDa y mucho menos proporcionar un beneficio de 4x requerido.

Estos ejemplos son ilustrativos de varios de los enfoques que se están probando y el rendimiento general que alcanzan. En pocas palabras, estas estrategias y tecnologías no logran su objetivo. Para los armazones no de anticuerpos, convergen y alcanzan su límite en las semividas de eliminación de aproximadamente 60 a 80 horas en monos. Aunque la línea vería, generalmente se desea lograr una semivida terminal media de 100 horas en monos para posibilitar una dosificación una vez a la semana en seres humanos. Asimismo, cuando la frecuencia de dosificación es superior a la semivida, esto impone demandas adicionales en la solubilidad, estabilidad y viscosidad de la formulación. Para otros tipos de proteínas, tales como el factor VIII, el valor absoluto de la semivida de partida y por tanto del valor diana necesario es menor, pero el múltiplo de rendimiento necesario para obtener un perfil de producto diana atractivo es similar y del orden de 3x a 4x. La cuestión, por lo tanto, es cómo lograrlo.

En primer lugar, una mayor actividad de fondo. Los esfuerzos para formular agentes biológicamente activos para la administración deben tratar una diversidad de variables que incluyen la vía de administración, la estabilidad biológica del agente activo y la solubilidad de los agentes activos en medios fisiológicamente compatibles. Las elecciones hechas en la formulación de agentes biológicamente activos y las rutas de administración seleccionadas pueden afectar a la biodisponibilidad de los agentes activos. Por ejemplo, la elección de la administración parenteral en la circulación sistémica para proteínas y polipéptidos biológicamente activos evita el entorno proteolítico que se encuentra en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, incluso cuando es posible la administración directa, tal como por inyección, de agentes biológicamente activos, las formulaciones pueden ser insatisfactorias por una diversidad de razones, incluyendo la generación de una respuesta inmune al agente administrado y respuestas a cualquier excipiente, incluyendo quemaduras y picaduras. Incluso si el agente activo no es inmunógeno y se pueden emplear excipientes satisfactorios, los agentes biológicamente activos pueden tener una solubilidad limitada y una semivida biológica corta que puede requerir una administración repetida o infusión continua, lo que puede ser doloroso y/o inconveniente.

Para algunos agentes biológicamente activos, se ha logrado cierto éxito en el desarrollo de formulaciones adecuadas de agentes funcionales conjugando los agentes con polímeros solubles en agua. La conjugación de agentes biológicamente activos con polímeros solubles en agua generalmente se considera que proporciona una diversidad de beneficios para la administración de agentes biológicamente activos, y en particular, proteínas y péptidos. Entre los polímeros solubles en agua empleados, el polietilenglicol (PEG) se ha conjugado más ampliamente con una variedad de agentes biológicamente activos, incluyendo péptidos biológicamente activos. Se han atribuido una reducción en la inmunogenicidad o antigenicidad, una semivida aumentada, una solubilidad aumentada, una eliminación reducida por el riñón y una degradación enzimática reducida a conjugados de diversos polímeros y agentes funcionales hidrosolubles, incluyendo conjugados de PEG. Como resultado de estos atributos, los conjugados poliméricos de agentes biológicamente activos requieren una dosificación menos frecuente y pueden permitir el uso de menos agente activo para alcanzar un criterio de valoración terapéutico. La dosificación menos frecuente reduce el número total de inyecciones, que pueden ser dolorosas y requieren visitas incómodas a los profesionales sanitarios.

Aunque se ha logrado cierto éxito con la conjugación de PEG, la "PEGilación" de agentes biológicamente activos sigue siendo un reto. A medida que los desarrolladores de fármacos progresan más allá de proteínas agonistas muy potentes, como la eritropoyetina y los diversos interferones, los beneficios del polímero hidrófilo de PEG son insuficientes para impulsar (i) los aumentos de solubilidad, estabilidad y la disminución de la viscosidad *in vitro*, y (ii) los aumentos en la biodisponibilidad, la semivida en suero y/o tejido y las reducciones de la inmunogenicidad *in vivo* que son necesarias para un producto comercialmente exitoso.

Se han introducido formas de PEG ramificadas para su uso en la preparación de conjugados para aliviar algunas de las dificultades y limitaciones encontradas con el uso de cadenas poliméricas de PEG lineales y largas. La experiencia hasta ahora demuestra que las formas de PEG ramificadas proporcionan un "desplazamiento de curva" en el beneficio de rendimiento frente a las cadenas de polímeros de PEG rectas lineales del mismo peso molecular total. Aunque los polímeros ramificados pueden superar algunas de las limitaciones asociadas con los conjugados formados con polímeros de PEG lineales largos, ni los conjugados poliméricos de PEG ramificados ni los lineales resuelven adecuadamente los problemas asociados con el uso de agentes funcionales conjugados, en particular, agentes inhibidores. Sin embargo, la PEGilación representa el estado de la técnica en la conjugación de polímeros hidrófilos a agentes diana. Los productos de compuesto PEGilado, entre ellos peginterferón alfa-2a (PEGASYS), pegfilgrastim (Neulasta), pegaptanib (Macugen) y certolizumab pegol (Cimzia), han alcanzado más de 6 mil millones de dólares en 2009. El PEG funcionalizado (adecuado para la conjugación) se fabrica mediante un proceso laborioso que implica la polimerización de polímeros lineales cortos que luego se funcionalizan de manera múltiple y luego se unen mediante dos reacciones de conjugación a un resto de lisina que se convierte en un reactivo de PEG de dos brazos. Debido a la cantidad de etapas sintéticas y a la necesidad de alta calidad, se requieren múltiples etapas de cromatografía. Los polímeros de PEG lineales con baja polidispersidad ($< 1,2$) tienen una restricción de tamaño de aproximadamente 20 kDa, 30 kDa o 40 kDa siendo 20 kDa el límite económicamente factible. Cuando se forma en un reactivo ramificado, entonces, el tamaño final del reactivo es de 40 kDa (2 x 20 kDa), 60 kDa (2 x 30 kDa), 80 kDa (2 x 40 kDa). Cuanto mayor sea el tamaño, más costosa será la fabricación con baja polidispersidad. Asimismo, cuanto mayor sea el tamaño, menores serán la solubilidad, estabilidad y viscosidad óptimas del polímero y del conjugado de polímero-fármaco asociado.

En resumen, los polímeros de PEG funcionan bien con moléculas agonistas de alta potencia a dosis bajas, tales como eritropoyetina e interferón. Sin embargo, a pesar de su éxito comercial, los productos PEGilados tienen estabilidad y solubilidad inadecuadas, el reactivo de PEG es costoso de fabricar y, lo que es más importante, los productos PEGilados tienen un lado positivo adicional limitado en cuanto a la mejora del rendimiento *in vivo* e *in vitro*.

En vista de las ventajas reconocidas de la conjugación de agentes funcionales a polímeros solubles en agua y de las limitaciones de los polímeros solubles en agua, tales como PEG, en la formación de conjugados adecuados para fines terapéuticos, son deseables polímeros hidrosolubles adicionales para formar conjugados con agentes funcionales. Los polímeros hidrosolubles, particularmente los que tienen muchas de las ventajas de PEG para su uso en la formación de conjugados, y que no padecen las desventajas observadas con PEG como un agente de conjugación, serían deseables para su uso en la formación de agentes terapéuticos y de diagnóstico.

No obstante, la PEGilación señala el camino hacia una solución para todo el problema de la biocompatibilidad. El PEG funciona debido a las características hidrófilas del polímero, que protegen al agente biológico conjugado de los cientos de mecanismos de eliminación *in vivo* no específicos en el organismo. La importancia del agua se reconoce de manera general, pero la perspectiva especial en esta tecnología es profundizar para apreciar que la parte crítica para la mejora del rendimiento es cómo se une el agua y la estructura del agua asociada. El PEG funciona debido a su naturaleza hidrófila, pero el agua no está estrechamente unida al polímero y, por lo tanto, al agente conjugado. Las moléculas de agua están en libre intercambio entre el compuesto PEGilado y el volumen de agua circundante, permitiendo que los sistemas de eliminación reconozcan a la proteína. La respuesta es encontrar un modo de "pegar" tan estrechamente el agua al polímero y por lo tanto al resto conjugado que se enmascare completamente el complejo frente a interacciones no específicas. Para lograrlo, es necesario que el polímero mantenga cargas tanto positivas como negativas, siendo por tanto netamente neutro, un zwitterión esencial. Ciertos polímeros zwitteriónicos mantienen y no liberarán moléculas de agua unidas a sus estructuras.

Para seguir avanzando, entonces, es necesario observar más de cerca: (i) otros ejemplos de restos hidrófilos que se unen en mayor medida y con propiedades físicas más favorables al agua y por lo tanto, con una biocompatibilidad fundamental mejorada *in vivo* e *in vitro* y (ii) ejemplos de polímeros en forma extendida (tamaño y arquitectura) mucho más grandes, que es el impulsor clave relacionado del rendimiento *in vivo* e *in vitro*.

Lo importante para estos polímeros es en qué medida se unen a las moléculas de agua y las propiedades físicas de dichas interacciones de unión al agua. Esta combinación de propiedades impulsa la biocompatibilidad fundamental del polímero y la medida en que dicho polímero puede conferir biocompatibilidad a un agente funcional al que está conjugado. La tecnología ideal podría usar un resto de unión a agua que se une estrechamente pero no de manera irreversible a una gran cantidad de agua, podría dar formato a estos restos de unión en una cadena principal de polímero con una longitud y flexibilidad suficientes para enmascarar una serie de fármacos y formatos deseados, puede tener una arquitectura de forma extendida (es decir, de múltiples brazos), podría funcionalizarse para una conjugación de alta eficiencia al resto de fármaco, podría fabricarse de manera no costosa con un número mínimo de etapas de producción y podría demostrar una alta calidad, según se valora analíticamente y un muy alto rendimiento, según se valora en sistemas funcionales *in vivo* (semivida terminal, inmunogenicidad, bioactividad) e *in vitro* (solubilidad, estabilidad, viscosidad, bioactividad). Una tecnología que permitiera la maximización de estos elementos llevaría el campo a nuevos niveles de rendimiento *in vivo* e *in vitro*.

Una de estas tecnologías usa como resto de unión a agua la 2-metacrililoetil fosforilcolina (HEMA-PC) derivada de

- fosforilcolina o un zwitterión relacionado, con un tamaño total del polímero de más de 50 kDa de peso molecular máximo (Mp) medido mediante dispersión de luz de múltiples ángulos, con la posibilidad de arquitecturas o pseudoarquitecturas altamente ramificadas, funcionalizadas para la conjugación de sitio específico a agentes biofarmacéuticos de interés, producido con técnicas que permiten un agente terapéutico bien caracterizado con alta calidad y baja polidispersidad y cuando se conjuga a un agente biofarmacéutico, confiere un aumento drástico en la semivida terminal frente a un agente biofarmacéutico equivalente modificado con otra tecnología de prolongación de la semivida (por ejemplo, conjugado con un polímero de PEG) y que confiere parámetros de solubilidad, estabilidad, viscosidad y de caracterización del conjugado que son un múltiplo de lo que se ve con PEG u otras tecnologías.
- 5 El tamaño del polímero tiene una importancia crítica. Cuando se usa con fines terapéuticos en el contexto de conjugados de polímero soluble-fármaco, la técnica anterior enseña que existe una compensación bien definida y descrita entre el tamaño del polímero y su calidad. El índice de polidispersidad (una aproximación clave para la calidad) es particularmente importante ya que habla de la heterogeneidad del polímero estadístico subyacente que, cuando se conjuga con un producto farmacéutico de interés, confiere dicha heterogeneidad al propio fármaco, lo que complica significativamente la síntesis fiable de la proteína terapéutica, requerida para una efectividad consistente y que es indeseable desde el punto de vista de la fabricación, regulatorio, clínico y del paciente.
- 10
- 15

La presente invención describe polímeros muy grandes con una calidad muy alta y un índice de polidispersidad muy bajo que están funcionalizados para la conjugación química, por ejemplo, con un fármaco soluble. De manera importante, los polímeros no son inertes, ni están destinados a adherirse a una superficie o gelificarse como hidrogel. Esto es completamente nuevo, sorprendente, muy útil y no se ha descrito previamente. Debido a su intención terapéutica, es esencial una sustancia farmacológica bien definida. Esto se manifiesta al nivel del polímero, el agente farmacéutico y el conjugado. De forma notable, se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de polímeros usando diversas estrategias y componentes con polímeros no funcionalizados. Estos estudios no son directamente relevantes en este caso, donde la conjugación específica es una etapa necesaria.

20

25

El estado de la técnica actual es que ya que está relacionado con los polímeros funcionalizados, contruidos a partir de monómeros hidrófilos mediante polimerización de radicales convencional, supuesta o controlada, es que solo se han descrito polímeros de bajo peso molecular (normalmente < 50 kDa). Además, a medida que se alcanza este peso molecular, se pierde el control del peso molecular, evidenciado por el índice de polidispersidad (PDI).

30

Por ejemplo, Ishihara et al (2004, Biomaterials 25, 71-76) utilizaron polimerización por radicales controlada para construir polímeros lineales de 2-metacrilolioxietil fosforilcolina (HEMA-PC) con un peso molecular de hasta 37 kDa. El PDI fue de 1,35, que es demasiado alto como para ser farmacéuticamente relevante. Además, estos autores declararon claramente, "En este método, es difícil controlar la distribución del peso molecular y aumentar el peso molecular". Lewis et al (Patente de los Estados Unidos 2004/0063881) también describen la homopolimerización de este monómero usando polimerización por radicales controlada y comunicaron pesos moleculares de hasta 11 kDa con un PDI de 1,45. En una publicación posterior, Lewis et al (2008, Bioconjugate Chem. 19, 2144-2155) sintetizaron nuevamente homopolímeros de HEMA-PC funcionalizados, en este caso con pesos moleculares de hasta 37 kDa. El PDI era de 2,01. Afirmaron que lograron un buen control solo con pesos moleculares muy limitados (insuficientes), aumentando drásticamente la polidispersidad. Informaron de una pérdida de control en el límite superior de su intervalo de peso molecular (37 kDa), que atribuyeron a la rápida conversión a mayores concentraciones de monómeros, lo que lleva a la conclusión de que no es posible crear polímeros de alto peso molecular de este tipo con un estrecho control de la polidispersidad.

35

40

45

Por ejemplo, Haddleton et al (2004, JACS 126, 13220-13221) utilizaron polimerización por radicales controlada para construir polímeros lineales pequeños de poli(metoxiPEG)metacrilatos para su uso en la conjugación con proteínas y en un intervalo de tamaño de 11.000 a 34.000 Dalton. En un intento de construir el mayor de estos polímeros, los autores aumentaron la temperatura de reacción y buscaron catalizadores que pudieran impulsar una polimerización más rápida. En una publicación posterior, Haddleton et al (2005, JACS 127, 2966-2973) sintetizaron nuevamente homopolímeros funcionalizados de poli(metoxiPEG)metacrilatos mediante polimerización por radicales controlada para conjugación con proteínas en el intervalo de tamaño de 4,1 a 35,4 kDa con un PDI en un intervalo superior a 1,25 incluso con esta distribución de peso molecular pequeña e insuficiente. En una publicación posterior, Haddleton et al (2007, JACS 129, 15156-15163) sintetizaron nuevamente polímeros funcionalizados mediante polimerización por radicales controlada para conjugación con proteínas en el bajo intervalo de tamaños de 8 a 30 kDa con un intervalo de PDI de 1,20 - 1,28. El planteamiento y la estrategia de Haddleton et al. se apartan de los métodos que es necesario emplear para producir polímeros de alto peso molecular y baja polidispersidad relevantes para la presente invención. Además, el enfoque en los polímeros de bajo peso molecular para la conjugación de proteínas refleja una falta de comprensión en cuanto al tamaño, la arquitectura y la calidad de los polímeros necesarios para llevar el campo biofarmacéutico al siguiente nivel. La publicación de patente WO2007/100902 desvela conjugados de polímero que contienen acrilolioxietilfosforilcolina y su preparación.

50

55

60

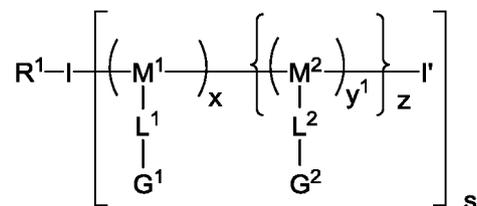
En el presente documento se describen polímeros de alto peso molecular que contienen zwitteriones (peso molecular máximo de >50 kDa medido usando dispersión de luz de múltiples ángulos) con bajos PDI concomitantes. Esto es sorprendente en vista del resumen anterior del estado de la técnica actual.

65

Breve resumen de la invención

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que se encuentre fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

- 5 La presente invención proporciona un conjugado que comprende: (a) al menos un polímero que comprende: al menos dos brazos de polímero que comprenden cada uno una pluralidad de monómeros seleccionados cada uno independientemente entre el grupo que consiste en metacrilato, acrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinilpiridina, vinilpirrolidona y viniléster, en donde cada monómero comprende un resto de fosforilcolina, un fragmento iniciador unido a un extremo proximal de cada brazo de polímero, en donde el resto iniciador es adecuado para la polimerización de radicales y un grupo terminal unido a un extremo distal de cada brazo de polímero, en donde el al menos un polímero tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.500 kDa y un índice de polidispersidad de menos de 2; y
- 10 (b) al menos un agente funcional que comprende un agente bioactivo o un agente de diagnóstico, unido al fragmento iniciador o al grupo terminal, en donde el agente bioactivo se selecciona entre el grupo que consiste en una proteína, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de un solo dominio, un avimer, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido y un ácido nucleico y el agente de diagnóstico se selecciona entre el grupo que consiste en un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo y un colorante.
- 15 En las reivindicaciones dependientes se definen realizaciones adicionales del conjugado. El conjugado puede representarse, por ejemplo, mediante la siguiente fórmula:



- 25 en la que R^1 es L^3-A^1 ; cada M^1 y M^2 se selecciona independientemente entre acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinilpiridina, vinilpirrolidona y viniléster; cada uno de G^1 y G^2 es un resto fosforilcolina; cada I y I' es independientemente un fragmento iniciador, de modo que la combinación de $I-I'$ es un iniciador, I^1 , para la polimerización de al menos un polímero mediante polimerización de radicales; como alternativa, cada I' se selecciona independientemente entre H, halógeno, nitrilo, -SCN y -NCS y alquilo C_{1-6} ; cada uno de L^1 , L^2 y L^3 es
- 30 independientemente un enlace o un enlazador; cada A^1 es un agente funcional seleccionado entre un grupo que consiste en una proteína, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de dominio único, un avímero, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico, un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo y un colorante; los subíndices x e y^1 pueden ser cada uno
- 35 independientemente un número entero de 1 a 1000; cada subíndice z es independientemente un número entero de 0 a 10; y el subíndice s es un número entero de 2 a 100.

Breve descripción de los dibujos

- 40 La **Figura 1** muestra un esquema para la preparación de los copolímeros aleatorios descritos en el presente documento. El iniciador $I-I'$ se escinde en el fragmento de iniciador I y un eliminador de radicales I' . Después, el fragmento de iniciador I reacciona con comonómeros M^1 y M^2 para iniciar el proceso de polimerización y genera la especie A. Después, el eliminador de radicales I' puede reaccionar de un modo reversible con la especie A para formar la especie B. Como alternativa, la especie A puede reaccionar con monómeros adicionales para continuar la propagación del polímero (especie C). De forma simultánea, la cadena polimérica creciente de la especie C reacciona de un modo reversible con el eliminador de radicales I' para formar el copolímero aleatorio, especie D.

La Figura 2 muestra conjugados de la presente invención.

- 50 La Figura 3 muestra conjugados de la presente invención.

Descripción detallada de la invención**I. General**

- 55 La presente invención proporciona un conjugado que comprende: (a) al menos un polímero que comprende: al menos dos brazos de polímero que comprenden cada uno una pluralidad de monómeros seleccionados cada uno independientemente entre el grupo que consiste en metacrilato, acrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinilpiridina, vinilpirrolidona y viniléster, en donde cada monómero comprende un resto de fosforilcolina, un fragmento iniciador unido a un extremo proximal de cada brazo de polímero, en donde el resto iniciador es adecuado para la

polimerización de radicales y un grupo terminal unido a un extremo distal de cada brazo de polímero, en donde el al menos un polímero tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.500 kDa y un índice de polidispersidad de menos de 2; y (b) al menos un agente funcional que comprende un agente bioactivo o un agente de diagnóstico, unido al fragmento iniciador o al grupo terminal, en donde el agente bioactivo se selecciona entre el grupo que consiste en una proteína, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de un solo dominio, un avimer, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido y un ácido nucleico y el agente de diagnóstico se selecciona entre el grupo que consiste en un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo y un colorante. En el presente documento también se describen polímeros de alto PM que tienen grupos hidrófilos o zwitteriones, tales como fosforilcolina y al menos un agente funcional (como se define en el presente documento). La fosforilcolina, como molécula altamente biocompatible, impulsa una biocompatibilidad fundamental. También tiene funciones de tipo chaperona, en términos de proteger a las proteínas frente a la temperatura u otro estrés. También puede posibilitar otras funciones, tales como la captación celular reversible. El agente funcional puede ser un agente bioactivo, tal como un fármaco, una proteína terapéutica o un agente de direccionamiento, así como un agente de detección, un agente de obtención de imágenes, un agente de marcaje o un agente de diagnóstico. Los polímeros de alto PM son útiles para el tratamiento de una variedad de afecciones y patologías seleccionando uno o más agentes funcionales adecuados. Puede unirse más de un agente bioactivo al polímero de alto PM, permitiendo de este modo el tratamiento no solo de un solo síntoma o mecanismo de la enfermedad, sino más bien de la enfermedad completa. Además, los polímeros de alto PM son útiles para fines diagnósticos y de obtención de imágenes mediante el acoplamiento de agentes de direccionamiento y de agentes de obtención de imágenes adecuados. Los polímeros de alto PM pueden incluir agentes tanto terapéuticos como de diagnóstico en un solo polímero, proporcionando agentes de tratamiento, que tratan la enfermedad así como la detectan y diagnostican. Los polímeros pueden unirse a los agentes bioactivos mediante enlaces estables o inestables.

Los polímeros pueden prepararse mediante una polimerización de radicales libres convencional o una polimerización de radicales controlados/vivos, tal como polimerización de radicales por transferencia de átomos (ATRP), usando monómeros que contienen zwitteriones, tales como fosforilcolina. Los iniciadores utilizados para la preparación de los polímeros de alto PM pueden tener múltiples sitios de iniciación, de manera que pueden prepararse polímeros de múltiples brazos, tales como estrellas. El iniciador también puede contener el agente bioactivo o grupos de unión que son capaces de unirse al agente bioactivo.

También se describen nuevos modos para conseguir arquitecturas poliméricas ramificadas en una superficie bioactiva. El concepto es uno de "puntos de ramificación" o "puntos de unión proximales" en la molécula diana para recrear un polímero efectivo de ≥ 2 brazos con polímeros de ≥ 1 brazo unidos a uno o más sitios localizados en una molécula diana. En la técnica anterior, la PEGilación indiscriminada de una proteína con un reactivo de sitio no específico (por ejemplo un reactivo de PEG funcionalizado con NHS) daría como resultado múltiples polímeros de PEG conjugados a múltiples grupos amina dispersos a través de la proteína. En este caso, lo que se describe es preferiblemente un enfoque de una etapa en el que el agente diana se modifica para ubicar dos sitios de conjugación únicos (por ejemplo, aminoácidos de cisteína) de manera que una vez que se forma la estructura terciaria de la proteína o péptido o agente, los dos sitios estarán en proximidad uno a otro. Después, este agente diana modificado se usa en una reacción de conjugación con un polímero que contiene la química de conjugación correspondiente (por ejemplo, reactiva a tiol). El resultado es un solo agente diana que se conjuga con dos polímeros con una estrecha proximidad entre sí, creando de este modo un punto de ramificación o "pseudo" ramificación. En otra realización, el agente diana contendría un solo sitio único, por ejemplo una cisteína libre, y se emplearía un agente enlazador tri(hetero)funcional para unir ≥ 2 polímeros lineales a este solo sitio, creando de nuevo una "pseudo" ramificación.

También se describen nuevos modos para conseguir una conjugación de eficacia muy alta y específica de sitio a péptidos y proteínas por medio de inteínas.

50 II. Definiciones

"Polímero" se refiere a una serie de grupos monoméricos unidos entre sí. Los polímeros de alto PM se preparan a partir de monómeros que incluyen, pero sin limitación, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, estirenos, vinil-piridina, vinil-pirrolidona y vinil ésteres, tales como acetato de vinilo. Los monómeros adicionales son útiles en los polímeros de alto PM descritos en el presente documento. Cuando se utilizan dos monómeros diferentes, los dos monómeros se llaman "comonómeros", lo que significa que los monómeros diferentes se copolimerizan para formar un solo polímero. El polímero puede ser lineal o ramificado. Cuando el polímero es ramificado, cada cadena de polímero se denomina "brazo de polímero". El extremo del brazo de polímero unido al resto iniciador es el extremo proximal y el extremo de crecimiento de la cadena del brazo de polímero es el extremo distal. En el extremo de crecimiento de la cadena del brazo de polímero, el grupo terminal del brazo de polímero puede ser el eliminador de radicales u otro grupo.

"Grupo hidrófilo" se refiere a un compuesto o polímero que atrae el agua y es típicamente soluble en agua. Los ejemplos de grupos hidrófilos incluyen polímeros hidrófilos y restos zwitteriónicos. Otros grupos hidrófilos incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, amina, ácido carboxílico, amida, sulfonato y fosfonato. Los polímeros hidrófilos incluyen, pero sin limitación, óxido de polietileno, polioxazolina, celulosa, almidón y otros polisacáridos. Resto zwitteriónico

se refiere a un compuesto que tiene una carga tanto positiva como negativa. Los restos zwitteriónicos útiles en los polímeros de alto PM pueden incluir un nitrógeno cuaternario y un fosfato cargado negativamente, tal como fosforilcolina: $\text{RO-P(=O)(O}^-\text{)-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{Me})_3$. Otros restos zwitteriónicos son útiles en los polímeros de alto PM de la presente invención (véanse las Patentes WO 1994/016748 y WO 1994/016749).

5 "Iniciador" se refiere a un compuesto capaz de iniciar una polimerización usando los comonómeros descritos en el presente documento. La polimerización puede ser una polimerización de radicales libres convencional o una polimerización de radicales controlados/vivos, tal como polimerización de radicales por transferencia de átomos (ATRP), polimerización por Adición-Fragmentación-Terminación reversible (RAFT) o polimerización mediada por nitróxido (NMP). La polimerización puede ser una polimerización "pseudó" controlada, tal como una transferencia degenerativa. Cuando el iniciador es adecuado para ATRP, contiene un enlace lábil que puede escindirse homolíticamente para formar un fragmento iniciador, I, que es un radical capaz de iniciar una polimerización de radicales, y un eliminador de radicales, I', que reacciona con el radical de la cadena polimérica creciente para terminar de un modo reversible la polimerización. El eliminador de radicales I' es típicamente un halógeno, pero también puede ser un resto orgánico, tal como un nitrilo.

10 "Enlazador" se refiere a un resto químico que une dos grupos entre sí. El enlazador puede ser escindible o no escindible. Los enlazadores escindibles pueden ser hidrolizables, escindibles enzimáticamente, sensibles al pH, fotolábiles o enlazadores de disulfuro, entre otros. Otros enlazadores incluyen enlazadores homobifuncionales y heterobifuncionales. Un "grupo enlazador" es un grupo funcional capaz de formar una unión covalente que consiste en uno o más enlaces a un agente bioactivo. Los ejemplos no limitantes incluyen los ilustrados en la Tabla 1.

15 "Enlazador hidrolizable" se refiere a un enlace o unión química, tal como un enlace covalente, que experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse puede depender no solo del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales entre los que se corta el enlace, sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Los ejemplos no limitantes de uniones hidrolíticamente susceptibles incluyen ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de fosfato, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, ortoésteres y algunos enlaces amida.

20 "Enlazador escindible enzimáticamente" se refiere a un enlace que se somete a degradación por una o más enzimas. Algunos enlaces hidrolíticamente susceptibles también pueden ser degradables enzimáticamente. Por ejemplo, las esterasas pueden actuar sobre ésteres de ácido carboxílico o ésteres de fosfato, y las proteasas pueden actuar sobre enlaces peptídicos y algunos enlaces amida.

25 "Enlazador sensible al pH" se refiere a un enlace que es estable a un pH y se somete a degradación a otro pH. Por ejemplo, el enlazador sensible al pH puede ser estable en condiciones neutras o básicas, pero lábil en condiciones ligeramente ácidas.

30 "Enlazador fotolábil" se refiere a un enlace, tal como un enlace covalente, que se escinde tras su exposición a la luz. El enlazador fotolábil incluye un resto aromático para absorber la luz entrante, que después activa un reordenamiento de los enlaces para escindir los dos grupos unidos por el enlazador fotolábil.

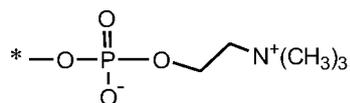
35 "Enlazador autoinmolutivo o de doble profármaco" se refiere a una unión en la que la función principal del enlazador es liberar un agente funcional únicamente después de la activación selectiva del activador (por ejemplo, una caída del pH o la presencia de una enzima específica del tejido), seguido de descomposición química espontánea para liberar el agente funcional.

40 "Agente funcional" se define para que incluya un agente bioactivo o un agente de diagnóstico. Un "agente bioactivo" se define para que incluya cualquier agente, fármaco, compuesto o mezcla de los mismos que se dirija a un emplazamiento biológico específico (agente de direccionamiento) y/o proporciona algún efecto local o fisiológico sistémico o farmacológico que puede demostrarse *in vivo* o *in vitro*. Los ejemplos no limitantes incluyen fármacos, vacunas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, scFv, diacuerpos, avímeros, vitaminas y cofactores, polisacáridos, hidratos de carbono, esteroides, lípidos, grasas, proteínas, péptidos, polipéptidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, y ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNnp, ARNi, ADN, ADNc, construcciones antisentido, ribozimas). Un "agente de diagnóstico" se define para que incluya cualquier agente que permita la detección o formación de imágenes de un tejido o enfermedad. Los ejemplos de agentes de diagnóstico incluyen, pero sin limitación, radiomarcadores, fluoróforos y colorantes.

45 "Proteína terapéutica" se refiere a péptidos o proteínas que incluyen una secuencia de aminoácidos que en su totalidad o en parte constituye un fármaco y puede usarse en aplicaciones farmacéuticas humanas o animales. Los expertos en la técnica conocen numerosas proteínas terapéuticas que incluyen, sin limitación, las descritas en el presente documento.

50 "Fosforilcolina", también denominada "PC", se refiere a lo siguiente:

65



donde * representa el punto de unión. La fosforilcolina es un grupo zwitteriónico e incluye sales (tales como sales internas), y formas protonadas y desprotonadas de las mismas.

5

El "polímero que contiene fosforilcolina" es un polímero que contiene fosforilcolina. Se contempla específicamente que en cada caso en el que se especifique un polímero que contiene fosforilcolina en esta solicitud para un uso particular, también se puede emplear una única fosforilcolina en dicho uso. "Polímero que contiene zwitterión" se refiere a un polímero que contiene un zwitterión.

10

"Polímero que contiene poli(acrililoxiethylfosforilcolina)" se refiere a un polímero de ácido acrílico que contiene al menos un monómero de acrililoxiethyl fosforilcolina tal como 2-metacrililoxiethyl fosforilcolina (es decir, fosfato de 2-metacrililoil-2'-trimetilamonio-etilo).

15

"Poner en contacto" se refiere al proceso de llevar a contacto al menos dos especies distintas de modo que puedan reaccionar. Debe apreciarse, sin embargo, que el producto de reacción resultante puede producirse directamente a partir de una reacción entre los reactivos añadidos o a partir de un intermedio de uno o más de los reactivos añadidos que pueden producirse en la mezcla de reacción.

20

"Polímero soluble en agua" se refiere a un polímero que es soluble en agua. Una solución de un polímero soluble en agua puede transmitir al menos un 75 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % de luz, transmitida por la misma solución después de la filtración. Sobre una base en peso, un polímero soluble en agua o segmento del mismo puede ser al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 95 % o un 100 % (en peso de polímero seco) soluble en agua.

25

El "peso molecular" en el contexto del polímero puede expresarse como un peso molecular promedio en número o un peso molecular promedio en peso o un peso molecular máximo. A menos que se indique otra cosa, todas las referencias al peso molecular en el presente documento se refieren al peso molecular máximo. Estas determinaciones del peso molecular, promedio en número, promedio en pico y máximo, pueden medirse usando cromatografía de permeación en gel u otras técnicas de cromatografía líquida. También pueden usarse otros métodos para medir los valores de peso molecular, tal como el uso de análisis de grupos terminales, o la medición de propiedades coligativas (por ejemplo, depresión del punto de congelación, elevación del punto de ebullición o presión osmótica) para determinar el peso molecular promedio en número, o el uso de técnicas de dispersión de luz, ultracentrifugación o viscosimetría para determinar el peso molecular promedio en peso. Los reactivos poliméricos de la invención son típicamente polidispersos (es decir, el peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso de los polímeros no son iguales), que poseen bajos valores de polidispersidad de preferiblemente menos de aproximadamente 1,5, según se juzga por cromatografía de permeación en gel. En otras realizaciones, las polidispersidades pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 1,2, más preferiblemente menos de aproximadamente 1,15, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1,10, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 1,05, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente 1,03.

30

35

40

45

Las expresiones "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse de un modo intercambiable en el presente documento.

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa la variación que se podría ver en mediciones tomadas entre diferentes instrumentos, muestras y preparaciones de muestras.

50

"Protegido", "forma protegida", "grupo protector" "grupo de protección" se refieren a la presencia de un grupo (es decir, el grupo protector) que previene o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo particular en una molécula en determinadas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo así como de las condiciones de reacción que se empleen y la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula, si los hubiera. El técnico experto reconocerá grupos protectores conocidos en la técnica, tales como los que se encuentran en el tratado de Greene, et al., "Protective Groups In Organic Synthesis", 3ª edición, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1999.

55

"Espaciador" y "grupo espaciador" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un átomo o una colección de átomos opcionalmente usados para unir restos de interconexión tales como un extremo de un polímero soluble en agua y un grupo reactivo de agente funcional y un grupo reactivo. Un espaciador puede ser hidrolíticamente estable o puede incluir un enlace hidrolíticamente susceptible o enzimáticamente degradable.

60

"Alquilo" se refiere a un radical alifático, lineal o ramificado, saturado que tiene el número de átomos de carbono

indicado. Por ejemplo, alquilo C₁-C₆ incluye, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, etc. Otros grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc. Alquilo puede incluir cualquier número de carbonos, tal como 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 3-4, 3-5, 3-6, 4-5, 4-6 y 5-6. El grupo alquilo es típicamente monovalente, pero puede ser divalente, tal como cuando el grupo alquilo une dos restos entre sí.

El término "inferior" referido anteriormente y más adelante en el presente documento junto con radicales o compuestos orgánicos define respectivamente un radical o compuesto que puede ser ramificado o no ramificado con hasta, e incluyendo, 7, preferiblemente hasta, e incluyendo 4 y (como no ramificado) uno o dos átomos de carbono.

"Alquileno" se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos, es decir, un radical de hidrocarburo divalente. Los dos restos unidos al alquileno pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del alquileno. Por ejemplo, un alquileno de cadena lineal puede ser el radical bivalente de -(CH₂)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Los grupos alquileno incluyen, pero sin limitación, metileno, etileno, propileno, isopropileno, butileno, isobutileno, secbutileno, pentileno y hexileno.

Los sustituyentes de los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados a menudo alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) pueden ser una diversidad de grupos seleccionados entre: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'C(O)NR''R''', -NR'C(O)₂R', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R', R'' y R''' se refiere cada uno independientemente a hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) no sustituido y heteroalquilo, arilo no sustituido, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo no sustituido, alcoxi o grupos tioalcoxi, o grupos aril-alquilo (C₁-C₄). Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Del anterior análisis de los sustituyentes, un experto en la técnica comprenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃ y -C(O)CH₂OCH₃). Preferiblemente, Los grupos alquilo sustituido y heteroalquilo tienen de 1 a 4 sustituyentes, más preferiblemente 1, 2 o 3 sustituyentes. Son excepciones aquellos grupos perhaloalquilo (por ejemplo, pentafluoroetilo) que también son preferidos y contemplados por la presente invención.

Los sustituyentes de los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados a menudo alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) y pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados entre, pero sin limitación: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'C(O)NR''R''', -NR'C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''''', -NR-C(NR'R'')=NR''''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R', R'', R''' y R'''' preferiblemente cada independientemente se refiere a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, *por ejemplo*, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o sin sustituir, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo hacen cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Del anterior análisis de los sustituyentes, un experto en la materia comprenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes a los grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃ y -C(O)CH₂OCH₃).

"Alcoxi" se refiere a un grupo alquilo que tiene un átomo de oxígeno que conecta el grupo alcoxi al punto de unión o está enlazado a dos carbonos del grupo alcoxi. Los grupos alcoxi incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, 2-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi, *terc*-butoxi, pentoxi y hexoxi. Los grupos alcoxi pueden estar adicionalmente sustituidos con una diversidad de sustituyentes descritos en el presente documento. Por ejemplo, los grupos alcoxi pueden estar sustituidos con halógenos para formar un grupo "halo-alcoxi".

"Carboxialquilo" significa un grupo alquilo (como se definen en el presente documento) sustituido con un grupo carboxi. El término "carboxicicloalquilo" significa un grupo cicloalquilo (como se define en el presente documento) sustituido con un grupo carboxi. El término "alcoxi" significa un grupo alquilo (como se define en el presente documento) sustituido con un grupo alcoxi. El término "carboxi" empleado en el presente documento se refiere a ácidos carboxílicos y sus ésteres.

"Haloalquilo" se refiere a un alquilo como se ha definido anteriormente donde algunos o todos los átomos de hidrógeno están reemplazados por átomos de halógeno. Halógeno (halo) representa preferiblemente cloro o flúor, pero también puede ser bromo o yodo. Por ejemplo, haloalquilo incluye trifluorometilo, fluorometilo y 1,2,3,4,5-pentafluorofenilo. El término "perfluoro" define un compuesto o radical que tiene todos los hidrógenos disponibles reemplazados

por flúor. Por ejemplo, perfluorofenilo se refiere a 1,2,3,4,5-pentafluorofenilo, perfluorometilo se refiere a 1,1,1-trifluorometilo, y perfluorometoxi se refiere a 1,1,1-trifluorometoxi.

5 "Alquilo sustituido con flúor" se refiere a un grupo alquilo en el que uno, algunos o todos los átomos de hidrógeno se han reemplazado por flúor.

"Citocina" en el contexto de esta invención es un miembro de un grupo de moléculas de señalización de proteínas que pueden participar en la comunicación célula-célula en respuestas inmunes e inflamatorias. Las citocinas son típicamente glucoproteínas pequeñas solubles en agua que tienen una masa de aproximadamente 8-35 kDa.

10 "Cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico que contiene de aproximadamente 3 a 12, de 3 a 10, o de 3 a 7 átomos de carbono endocíclicos. Los grupos cicloalquilo incluyen estructuras de anillo condensado, puenteado o espiro.

15 "Endocíclico" se refiere a un átomo o grupo de átomos que comprende parte de una estructura anular cíclica.

"Exocíclico" se refiere a un átomo o grupo de átomos que están unidos pero que no definen la estructura cíclica del anillo.

20 "Éster alquílico cíclico" se refiere a un grupo alquilo cíclico de 4 o 5 miembros que tiene 3 o 4 átomos de carbono endocíclicos y 1 átomo de oxígeno o azufre endocíclico (por ejemplo, oxetano, tietano, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno); o un grupo alquilo cíclico de 6 a 7 miembros que tiene 1 o 2 átomos de oxígeno o azufre endocíclicos (por ejemplo, tetrahidropirano, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, tetrahidrotiopirano, 1,3-ditiano, 1,4-ditiano, 1,4-oxatiano).

25 "Alquenilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, que tiene al menos un doble enlace. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero sin limitación, vinilo, propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, butadienilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, isopentenilo, 1,3-pentadienilo, 1,4-pentadienilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,5-hexadienilo, 2,4-hexadienilo o 1,3,5-hexatrienilo. Los grupos alquenilo también pueden tener de 2 a 3, 2 a 4, 2 a 5, 3 a 4, 3 a 5, 3 a 6, 4 a 5, 4 a 6 y 5 a 6 carbonos. El grupo alquenilo es típicamente monovalente, pero puede ser divalente, tal como cuando el grupo alquenilo une dos restos entre sí.

30 "Alquenileno" se refiere a un grupo alquenilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos, es decir, un radical de hidrocarburo divalente. Los dos restos unidos al alquenileno pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del alquenileno. Los grupos alquenileno incluyen, pero sin limitación, etenileno, propenileno, isopropenileno, butenileno, isobutenileno, sec-butenileno, pentenileno y hexenileno.

35 "Alquinilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, que tiene al menos un triple enlace. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero sin limitación, acetileno, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, isobutinilo, sec-butinilo, butadiinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, isopentinilo, 1,3-pentadiinilo, 1,4-pentadiinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 1,3-hexadiinilo, 1,4-hexadiinilo, 1,5-hexadiinilo, 2,4-hexadiinilo o 1,3,5-hexatriinilo. Los grupos alquinilo también pueden tener de 2 a 3, 2 a 4, 2 a 5, 3 a 4, 3 a 5, 3 a 6, 4 a 5, 4 a 6 y 5 a 6 carbonos. El grupo alquinilo es típicamente monovalente, pero puede ser divalente, tal como cuando el grupo alquinilo une dos restos entre sí.

40 "Alquinileno" se refiere a un grupo alquinilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos, es decir, un radical de hidrocarburo divalente. Los dos restos unidos al alquinileno pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del alquinileno. Los grupos alquinileno incluyen, pero sin limitación, etinileno, propinileno, butinileno, sec-butinileno, pentinileno y hexinileno.

45 "Cicloalquilo" se refiere a conjunto de anillo saturado o parcialmente insaturado, monocíclico, bicíclico condensado o policíclico puenteado que contiene de 3 a 12 átomos en el anillo, o el número de átomos indicado. Los anillos monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y ciclooctilo. Los anillos bicíclicos y policíclicos incluyen, por ejemplo, norbornano, decahidronaftaleno y adamantano. Por ejemplo, cicloalquilo C₃₋₈ incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclooctilo y norbornano.

50 "Cicloalquileno" se refiere a un grupo cicloalquilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos, es decir, un radical de hidrocarburo divalente. Los dos restos unidos al cicloalquileno pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del cicloalquileno. Los grupos cicloalquileno incluyen, pero sin limitación, ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno, ciclohexileno y ciclooctileno.

55 "Heterocicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo que tiene de 3 miembros de anillo a aproximadamente 20 miembros de anillo y de 1 a aproximadamente 5 heteroátomos, tales como N, O y S. También pueden ser útiles heteroátomos adicionales, incluyendo, pero sin limitación, B, Al, Si y P. Los heteroátomos también pueden estar oxidados, tales como, pero sin limitación, -S(O)- y -S(O)₂-. Por ejemplo, heterociclo incluye, pero sin limitación, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, morfolino, pirrolidinilo, pirrolinilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo,

pirazolinilo, piperazinilo, piperidinilo, indolinilo, quinuclidinilo y 1,4-dioxa-8-aza-espiro[4,5]dec-8-ilo.

"Heterocicloalquileo" se refiere a un grupo heterocicloalquilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos. Los dos restos unidos al heterocicloalquileo pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del heterocicloalquileo.

"Ariilo" se refiere a un conjunto de anillo monocíclico o bicíclico condensado, tricíclico o superior, aromático que contiene de 6 a 16 átomos de carbono en el anillo. Por ejemplo, ariilo puede ser fenilo, bencilo o naftilo, preferentemente fenilo. "Arieno" significa un radical divalente derivado de un grupo ariilo. Los grupos ariilo pueden estar mono, di o trisustituídos con uno, dos o tres radicales seleccionados entre alquilo, alcoxi, ariilo, hidroxilo, halógeno, ciano, amino, amino-alquilo, trifluorometilo, alquilendioxo y oxo-alquileo C₂-C₃; todos los cuales están opcionalmente sustituidos adicionalmente, por ejemplo como se ha definido anteriormente en el presente documento; o 1- o 2-naftilo; o 1- o 2-fenantrenilo. Alquilendioxo es un sustituto divalente unido a dos átomos de carbono adyacentes de fenilo, por ejemplo metilendioxo o etilendioxo. Oxi-alquileo C₂-C₃ también es un sustituyente divalente unido a dos átomos de carbono adyacentes de fenilo, por ejemplo oxietileno u oxipropileno. Un ejemplo para oxo-alquileo C₂-C₃-fenilo es 2,3-dihidrobenzofuran-5-ilo.

Se prefiere como ariilo un naftilo, fenilo o fenilo mono o disustituído con alcoxi, fenilo, halógeno, alquilo o trifluorometilo, especialmente fenilo o fenilo mono o disustituído con alcoxi, halógeno o trifluorometilo, y en particular fenilo.

Son ejemplos de grupos de fenilo sustituido como R, por ejemplo 4-clorofen-1-ilo, 3,4-diclorofen-1-ilo, 4-metoxifen-1-ilo, 4-metilfen-1-ilo, 4-aminometilfen-1-ilo, 4-metoxietilaminometilfen-1-ilo, 4-hidroxietilaminometilfen-1-ilo, 4-hidroxietil(metil)-aminometilfen-1-ilo, 3-aminometilfen-1-ilo, 4-N-acetilaminometilfen-1-ilo, 4-aminofen-1-ilo, 3-aminofen-1-ilo, 2-aminofen-1-ilo, 4-fenil-fen-1-ilo, 4-(imidazol-1-il)-fen-1-ilo, 4-(imidazol-1-il-metil)-fen-1-ilo, 4-(morfolin-1-il)-fen-1-ilo, 4-(morfolin-1-il-metil)-fen-1-ilo, 4-(2-metoxietilaminometil)-fen-1-ilo y 4-(pirrolidin-1-il-metil)-fen-1-ilo, 4-(tiofenil)-fen-1-ilo, 4-(3-tiofenil)-fen-1-ilo, 4-(4-metilpiperazin-1-il)-fen-1-ilo y 4-(piperidinil)-fenilo y 4-(piridinil)-fenilo opcionalmente sustituido en el anillo heterocíclico.

"Arieno" se refiere a un grupo ariilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos. Los dos restos unidos al arieno están unidos a átomos diferentes del arieno. Los grupos arieno incluyen, pero sin limitación, fenileno.

"Arieno-oxi" se refiere a un grupo arieno, como se ha definido anteriormente, donde uno de los restos unidos al arieno está unido a través de un átomo de oxígeno. Los grupos arieno-oxi incluyen, pero sin limitación, fenileno-oxi.

De forma análoga, los sustituyentes para los grupos ariilo y heteroarilo son variados y se seleccionan entre: -halógeno, -OR', -OC(O)R', -NR'R'', -SR', -R', -CN, -NO₂, -CO₂R', -CONR'R'', -C(O)R', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'C(O)₂R', -NR'C(O)NR'R'', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -N₃, -CH(Ph)₂, perfluoro alcoxi(C₁-C₄) y perfluoro alquilo (C₁-C₄), en un número que oscila entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R'' y R''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) y heteroalquilo, ariilo y heteroarilo no sustituido, (ariilo no sustituido)-alquilo (C₁-C₄) y (ariilo no sustituido)oxo-alquilo (C₁-C₄).

Dos de los sustituyentes de los átomos adyacentes del anillo ariilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de fórmula -T-C(O)-(CH₂)_q-U-, en la que T y U son independientemente -NH-, -O-, -CH₂- o un enlace simple, y q es un número entero de 0 a 2. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de ariilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en la que A y B son independientemente -CH₂-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 3. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así formado puede reemplazarse opcionalmente por un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes de los átomos adyacentes del anillo ariilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de fórmula -(CH₂)_s-X-(CH₂)_t-, en la que s y t son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂- o -S(O)₂NR'-. El sustituyente R' en -NR'- y -S(O)₂NR'- se selecciona entre hidrógeno o alquilo (C₁-C₆) no sustituido.

"Heteroarilo" se refiere a un conjunto de anillo monocíclico o condensado bicíclico o tricíclico que contiene de 5 a 16 átomos en el anillo, donde 1 a 4 de los átomos en el anillo son cada uno un heteroátomo N, O o S. Por ejemplo, heteroarilo incluye piridilo, indolilo, indazolilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzotienilo, benzofuranilo, furanilo, pirrolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, imidazolilo, tienilo u otros radicales sustituidos cualesquiera, especialmente mono- o di-sustituídos, con por ejemplo alquilo, nitro o halógeno. Piridilo representa 2-, 3- o 4-piridilo, ventajosamente 2- o 3-piridilo. Tienilo representa 2- o 3-tienilo. Quinolinilo representa preferiblemente 2-, 3- o 4-quinolinilo. Isoquinolinilo representa preferiblemente 1-, 3- o 4-isoquinolinilo. Benzopiranilo, benzotiopiranilo representa preferiblemente 3-benzopiranilo o 3-benzo-tiopiranilo, respectivamente. Tiazolilo representa preferiblemente 2- o 4-tiazolilo, y del modo más preferido, 4-tiazolilo. Triazolilo es preferiblemente 1-, 2- o 5-(1,2,4-triazolilo). Tetrazolilo es preferiblemente 5-tetrazolilo.

Preferiblemente, heteroarilo es piridilo, indolilo, quinolinilo, pirrolilo, tiazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo,

imidazolilo, tienilo, furanilo, benzotiazolilo, benzofuranilo, isoquinolinilo, benzotienilo, oxazolilo, indazolilo, o cualquiera de los radicales sustituidos, especialmente mono- o di-sustituidos.

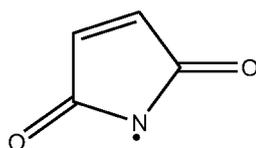
5 Como se usa en el presente documento, el término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 heteroátomos, tales como N, O y S. También pueden ser útiles heteroátomos adicionales, incluyendo, pero sin limitación, B, Al, Si y P. Los heteroátomos también pueden estar oxidados, tales como, pero sin limitación, $-S(O)-$ y $-S(O)_2-$. Por ejemplo, heteroalquilo puede incluir éteres, tioéteres, alquil-aminas y alquil-tioles.

10 Como se usa en el presente documento, el término "heteroalquileno" se refiere a un grupo heteroalquilo, como se ha definido anteriormente, que une al menos dos de otros grupos. Los dos restos unidos al heteroalquileno pueden unirse al mismo átomo o a átomos diferentes del heteroalquileno.

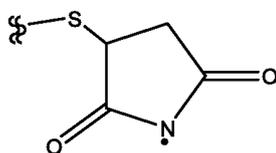
15 "Electrófilo" se refiere a un ion o átomo o conjunto de átomos, que puede ser iónico, que tiene un centro electrófilo, es decir, un centro que busca electrones, capaz de reaccionar con un nucleófilo. Un electrófilo (o reactivo electrofílico) es un reactivo que forma un enlace con su compañero de reacción (el nucleófilo) al aceptar ambos electrones de enlace de ese compañero de reacción.

20 "Nucleófilo" se refiere a un ion o átomo o conjunto de átomos, que puede ser iónico, que tiene un centro nucleófilo, es decir, un centro que busca un centro electrófilo o capaz de reaccionar con un electrófilo. Un nucleófilo (o reactivo nucleófilo) es un reactivo que forma un enlace con su compañero de reacción (el electrófilo) donando ambos electrones de enlace. Un "grupo nucleófilo" se refiere a un nucleófilo después de que ha reaccionado con un grupo reactivo. Los ejemplos no limitantes incluyen amino, hidroxilo, alcoxi, haloalcoxi y similares.

25 "Maleimido" se refiere a un grupo pirrol-2,5-diona-1-ilo que tiene la estructura:



que tras la reacción con un sulfhidrilo (por ejemplo, un tioalquilo) forma un grupo -S-maleimido que tiene la estructura



30 donde "." indica el punto de unión del grupo maleimido y "S" indica el punto de unión del átomo de azufre del tiol al resto del grupo portador de sulfhidrilo original.

35 Para los fines de esta divulgación, "aminoácidos de origen natural" que se encuentran en proteínas y polipéptidos son L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-cisteína, L-glutamina, ácido L-glutámico, L-glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y/o L-valina. Los "aminoácidos de origen sintético" que se encuentran en las proteínas son cualquier aminoácido distinto a los citados como aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen sintético incluyen, sin limitación, los isómeros D de los aminoácidos de origen natural y las mezclas de isómeros D y L de los aminoácidos de origen natural. Otros aminoácidos, tales como 4-hidroxiprolina, desmosina, isodesmosina, 5-hidroxilisina, epsilon-N-metil-lisina, 3-metilhistidina, aunque se encuentran en proteínas de origen natural, se consideran aminoácidos de origen sintético que se encuentran en las proteínas para el fin de esta descripción, ya que generalmente se introducen por medios distintos de la traducción ribosómica de ARNm.

45 "Lineal" en referencia a la geometría, arquitectura o estructura general de un polímero, se refiere a un polímero que tiene un solo brazo de polímero.

50 "Ramificado", en referencia a la geometría, arquitectura o estructura general de un polímero, se refiere a un polímero que tiene 2 o más "brazos" de polímero que se extienden desde una estructura central, tal como un grupo L, que pueden obtenerse a partir de un iniciador empleado en una reacción de polimerización por radicales de transferencia atómica. Un polímero ramificado puede poseer 2 brazos de polímero, 3 brazos de polímero, 4 brazos de polímero, 5 brazos de polímero, 6 brazos de polímero, 7 brazos de polímero, 8 brazos de polímero, 9 brazos de polímero o más. Para los fines de esta divulgación, los compuestos que tienen tres o más brazos de polímero que se extienden desde un solo grupo lineal se denomina que tienen una estructura de "peine" o arquitectura de "peine". También pueden conseguirse ramificados a través de estructuras "estadísticas" para crear arquitecturas de tipo dendrímico más

amplias. El grupo que une los brazos del polímero puede ser una pequeña molécula que tenga múltiples puntos de unión, tal como glicerol, o estructuras más complejas que tengan 4 o más puntos de unión a polímero, tales como dendrímeros y estructuras hiperramificadas. El grupo también puede ser una nanopartícula adecuadamente funcionalizada para permitir la unión de los múltiples brazos de polímero.

5 Composición "farmacéuticamente aceptable" o "composición farmacéutica" se refiere a una composición que comprende un compuesto de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refieren a un excipiente que se puede incluir en las composiciones de la invención y que no causa ningún efecto toxicológico adverso significativo sobre el paciente. Los ejemplos no limitantes de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, NaCl, soluciones salinas normales, solución de Ringer lactada, sacarosa normal y glucosa normal.

15 "Paciente" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un organismo vivo que padece o es propenso a una afección que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de una composición farmacéutica como se proporciona en el presente documento. Los ejemplos no limitantes incluyen seres humanos, otros mamíferos y otros animales no mamíferos.

20 "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente funcional conjugado o de una composición farmacéutica útil para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección identificada, o para presentar un efecto terapéutico o inhibidor detectable. El efecto puede detectarse por cualquier método de ensayo conocido en la técnica.

25 La "semivida biológica" de una sustancia es un parámetro farmacocinético que especifica el tiempo requerido para que una mitad de la sustancia se elimine de un organismo después de la introducción de la sustancia en el organismo.

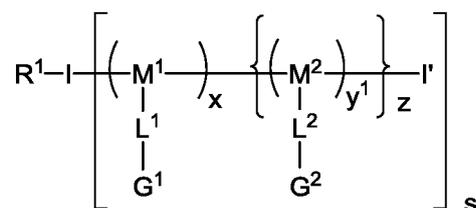
III. Polímeros de alto peso molecular

30 En el presente documento se describe un polímero de alto peso molecular que tiene grupos hidrófilos y un grupo funcional o grupo enlazador. También se describe un polímero que tiene al menos dos brazos de polímero, tendiendo cada uno una pluralidad de monómeros seleccionados cada uno independientemente entre acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinil-piridina, vinil-pirrolidona o un vinil éster, tal como acetato de vinilo, en los que cada monómero incluye un grupo hidrófilo. El polímero también incluye un fragmento de iniciador unido a un extremo proximal del brazo de polímero, en el que el resto iniciador es adecuado para la polimerización de radicales. El polímero
35 también incluye un grupo terminal unido a un extremo distal del brazo de polímero. Al menos uno del fragmento iniciador y el grupo terminal del polímero incluye un agente funcional o un grupo enlazador.

40 En el presente documento también se describe un polímero que tiene un brazo de polímero que tiene una pluralidad de monómeros seleccionados cada uno independientemente entre acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinil-piridina, vinil-pirrolidona o un vinil éster, tal como acetato de vinilo, en los que cada monómero incluye un grupo hidrófilo. El polímero también incluye un fragmento de iniciador unido a un extremo proximal del brazo de polímero, en el que el resto iniciador es adecuado para la polimerización de radicales. El polímero también incluye un grupo terminal del polímero unido a un extremo distal del brazo de polímero. Al menos uno del fragmento iniciador y el grupo terminal del polímero incluye un agente funcional o un grupo enlazador. Además, el polímero tiene un peso molecular máximo (Pm) de 50 kDa a 1.500 kDa, como se midió por dispersión de luz de múltiples ángulos.
45

50 El al menos un polímero en el conjugado de la presente invención tiene un peso molecular de 50 a 1.500 kilo-Daltons (kDa). En algunas realizaciones, el polímero de alto PM en el conjugado de la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, aproximadamente 100 kDa, aproximadamente 200 kDa, aproximadamente 250 kDa, aproximadamente 300 kDa, aproximadamente 350 kDa, aproximadamente 400 kDa, aproximadamente 450 kDa, aproximadamente 500 kDa, aproximadamente 750 kDa, aproximadamente 1.000 kDa o aproximadamente 1.500 kDa.

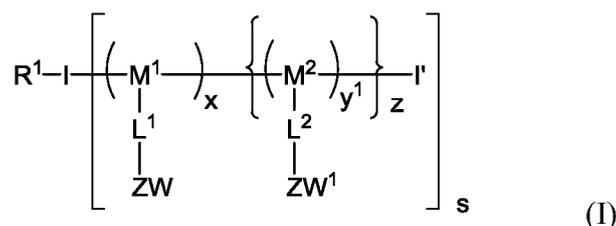
55 El conjugado de la presente invención puede ser de la fórmula:



en la que R¹ es L³-A¹; cada M¹ y M² se selecciona independientemente entre acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinil-piridina, vinil-pirrolidona y vinil-éster; cada uno de G¹ y G² es un resto fosforilcolina; cada

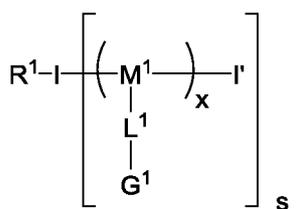
I y I' es independientemente un fragmento iniciador, de modo que la combinación de I-I' es un iniciador, I¹, para la polimerización de al menos un polímero mediante polimerización de radicales; como alternativa, cada I' se selecciona independientemente entre H, halógeno, nitrilo, -SCN y -NCS y alquilo C₁₋₆; cada uno de L¹, L² y L³ es independientemente un enlace o un enlazador; cada A¹ es un agente funcional seleccionado entre un grupo que
 5 consiste en una proteína, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de dominio único, un avímero, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico, un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo y un colorante; los subíndices x e y¹ pueden ser cada uno independientemente un número entero de 1 a 1000; cada subíndice z es independientemente un número entero de 0
 10 a 10; y el subíndice s es un número entero de 2 a 100.

En el presente documento se describe un polímero de Fórmula I:

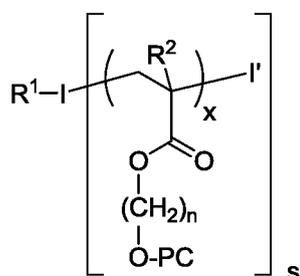


15 en la que R¹ de la fórmula I puede ser H, L³-A¹, LG¹ o L³-LG¹. Cada M¹ y M² de la fórmula I puede seleccionarse independientemente entre acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinil-piridina, vinil-pirrolidona o vinil-éster. Cada uno de ZW y ZW¹ de la fórmula I puede ser independientemente un resto zwitteriónico. Cada I es un fragmento iniciador y I' un eliminador de radicales de modo que la combinación de I-I' es un iniciador, I¹, para la polimerización del polímero de fórmula I mediante polimerización de radicales. Como alternativa, cada I' puede
 20 seleccionarse independientemente entre H, halógeno o alquilo C₁₋₆. Cada L¹, L² y L³ de fórmula I puede ser un enlazador. Cada A¹ de fórmula I puede ser un agente funcional. Cada LG¹ de fórmula I puede ser un grupo enlazador. Los subíndices x e y¹ de la fórmula I pueden ser cada uno independientemente un número entero de 1 a 1000. Cada subíndice z de la fórmula I puede ser independientemente un número entero de 1 a 10. El subíndice s de la fórmula I puede ser un número entero de 1 a 100. La suma de s, x, y¹ y z puede ser tal para que el polímero de fórmula I tenga un peso molecular máximo de aproximadamente 50kDa a aproximadamente 1.500kDa, como se midió por dispersión de luz de múltiples ángulos.

El conjugado de la invención puede tener la fórmula:

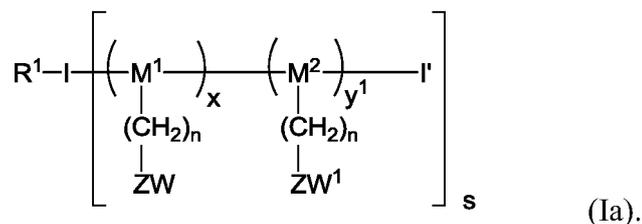


El conjugado de la invención puede tener la fórmula:



en la que R² se selecciona entre H y alquilo C₁₋₆, y O-PC es fosforilcolina y n es un número entero de 1 a 12.

Los polímeros de alto PM empleados en el conjugado de la presente invención pueden tener cualquier número
 40 adecuado de comonómeros, M². Por ejemplo, el número de comonómeros, subíndice z, puede ser de 1 a 10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. El número de comonómeros, subíndice z, también puede ser de 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3 o 1 a 2. En algunas realizaciones, el polímero de alto PM puede tener dos monómeros diferentes donde el subíndice z es 1, tal como en la fórmula Ia:

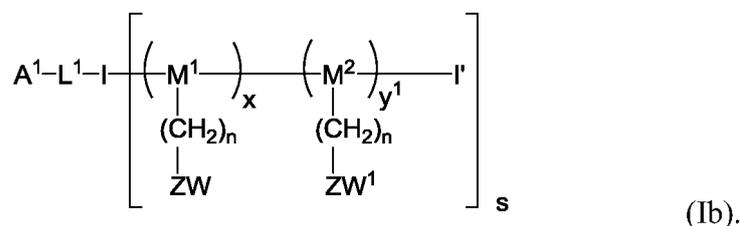


5 En el polímero de alto PM puede haber presentes comonómeros adicionales M^2 , tales como M^{2a} , M^{2b} , M^{2c} , M^{2d} , M^{2e} , M^{2f} , M^{2g} , M^{2h} , etc., y se definen como anteriormente para M^2 , donde cada comonómero está presente con un valor de y^1 igual o diferente, y teniendo unido cada comonómero un grupo ZW^1 correspondiente.

10 Los monómeros diferentes de los polímeros de alto PM también pueden estar presentes en cualquier proporción adecuada. Por ejemplo, los monómeros M^2 , colectiva o individualmente, pueden estar presentes en relación al monómero M^1 en una proporción de 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 y 1:100. Además, cada monómero M^2 puede estar presente en cualquier proporción adecuada relativa al M^1 o cualquier otro monómero M^2 , tal como 100:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 y 1:100.

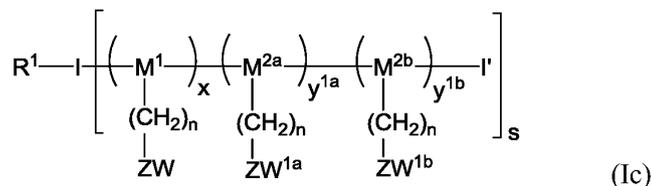
15 Los polímeros de alto PM empleados en el conjugado de la presente invención pueden tener cualquier arquitectura adecuada. Por ejemplo, los polímeros de alto PM pueden ser lineales o ramificados. Cuando los polímeros de alto PM son ramificados, pueden tener cualquier número adecuado de brazos de polímero, como se define por el subíndice s de la fórmula I, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y hasta 100 brazos. El polímeros de alto PM puede adoptar cualquier arquitectura adecuada. Por ejemplo, los polímeros de alto PM pueden ser lineales, 20 ramificados, en forma de estrellas, dendrímeros, peines, etc.

25 Un agente funcional de los polímeros de alto PM puede estar unido al fragmento iniciador I o al eliminador de radicales I', o a ambos. Cuando hay presentes múltiples agentes funcionales, L^1 puede ser un enlazador de ramificación de modo que dos o más agentes funcionales pueden estar unidos al fragmento iniciador I. El polímero de alto PM puede tener la fórmula Ib:



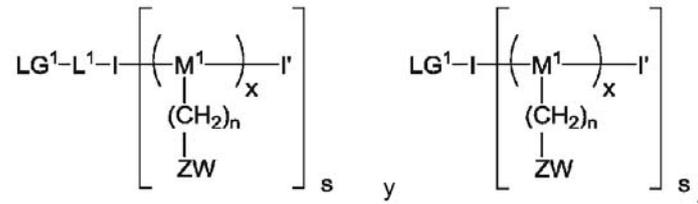
30 En la fórmula Ib, el agente funcional A^1 puede ser un fármaco, una proteína terapéutica o un agente de direccionamiento. El enlazador L^1 puede ser un enlazador escindible, tal como cuando se une a un fármaco o proteína terapéutica para facilitar la liberación del fármaco o proteína terapéutica. Como alternativa, el enlazador L^1 puede ser un enlazador no escindible.

35 Cuando hay presentes múltiples comonómeros M^2 , cada comonómero M^2 puede tener unido un grupo zwitteriónico diferente. Por ejemplo, el polímero de alto PM puede tener la fórmula Ic:



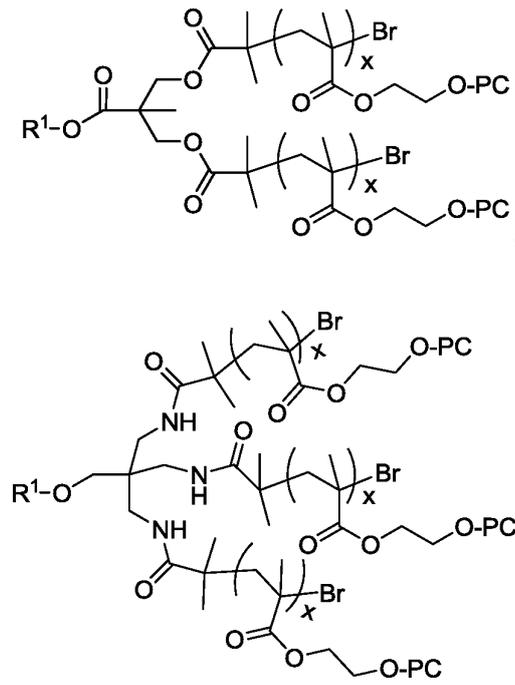
40 en la que cada uno de ZW^{1a} y ZW^{1b} es como se ha definido anteriormente para ZW , y cada uno de y^{1a} e y^{1b} es como se ha definido anteriormente para y^1 .

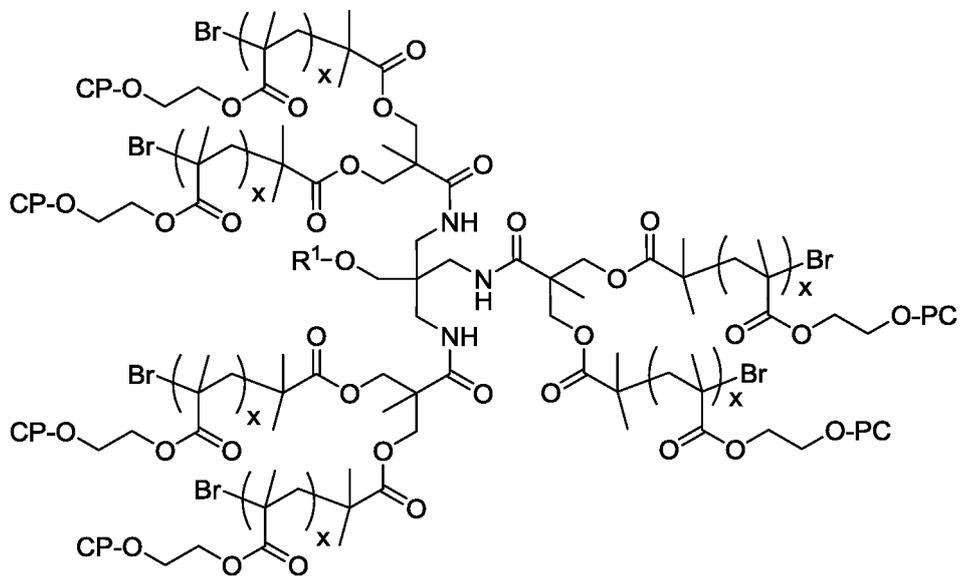
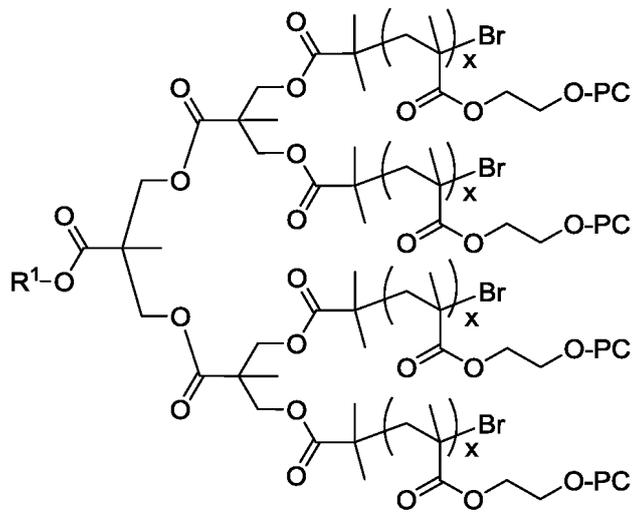
Los polímeros de alto PM pueden tener grupos enlazadores LG unidos al fragmento iniciador I, tal como se muestra en las siguientes estructuras:

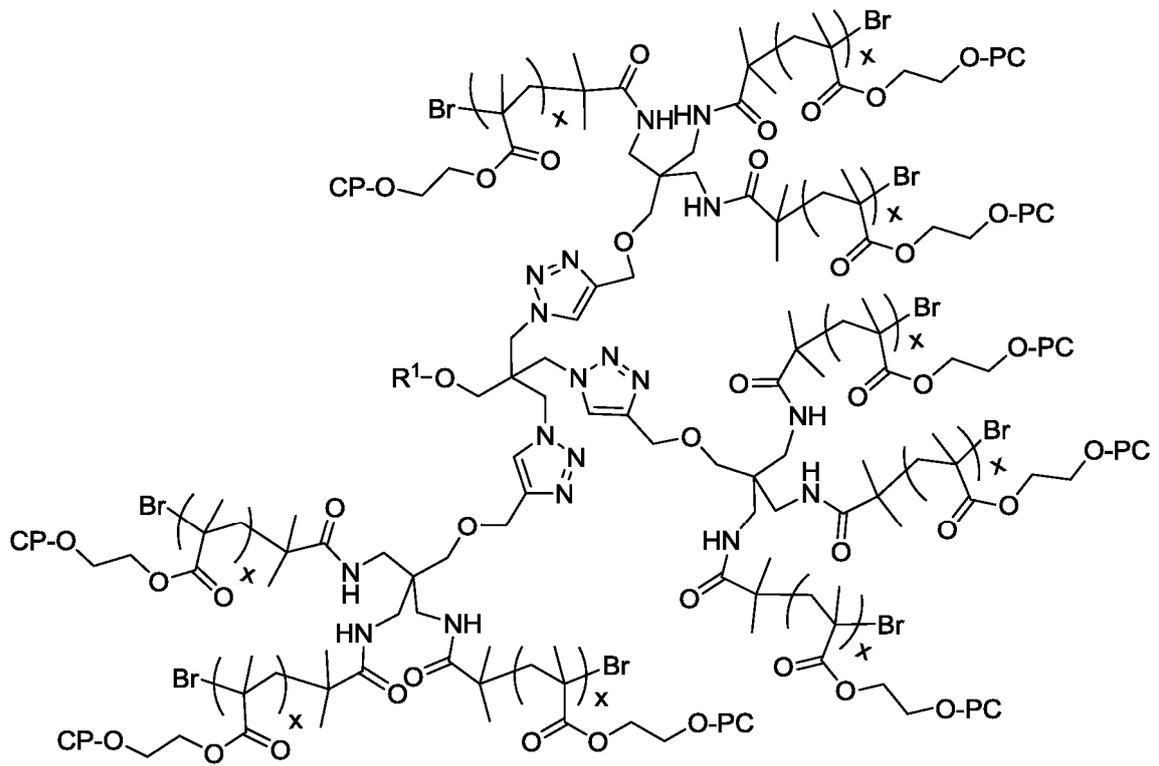


Los polímeros de alto PM pueden modificarse mediante una polimerización posterior con uno o más monómeros adicionales. Por ejemplo, en la fórmula Ic anterior, los monómeros M¹ y M^{2a} pueden copolimerizarse en una primera polimerización, y el monómero M^{2b} puede polimerizarse en una segunda polimerización. Teniendo dos bloques se formaría un copolímero de bloque, siendo el primer bloque un polímero de alto PM de M¹ y M^{2a}, y el segundo bloque un homopolímero de M^{2b}. Como alternativa, tras la polimerización de los monómeros M¹ y M^{2a}, el monómero M^{2b} puede copolimerizarse con el monómero M^{2c}, formando de este modo un copolímero de bloque donde el primer bloque es un polímero de alto PM de M¹ y M^{2a}, y el segundo bloque es un polímero de alto PM de M^{2b} y M^{2c}. Pueden prepararse estructuras poliméricas adicionales copolimerizando los monómeros M¹, M^{2a} y M^{2b} en una primera polimerización, seguido de copolimerización de los monómeros M^{2c}, M^{2d}, y otros, en una segunda copolimerización. Pueden prepararse bloques adicionales mediante todavía una tercera polimerización usando monómeros adicionales. Dichos polímeros proporcionan bloques de copolímeros que pueden tener propiedades diferentes, fármacos y agentes funcionales.

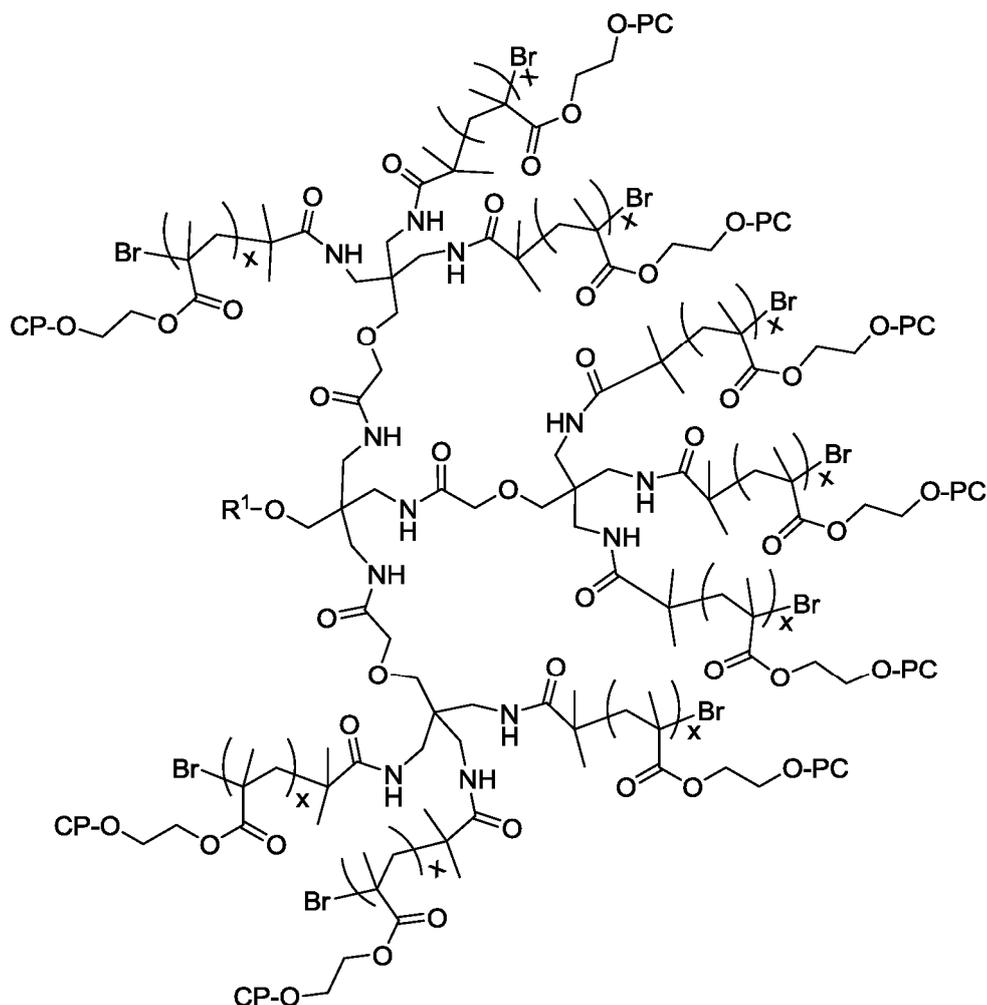
En algunas realizaciones, el conjugado de la invención puede ser







o



en el que O-PC es fosforilcolina.

- 5 En algunas realizaciones, R¹ es L³-A¹; A¹ es un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de dominio único, un avímero, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, una proteína, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico, un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo o un colorante; y L³ es - (CH₂CH₂O)₁₋₁₀.

10

A. Iniciadores

Los polímeros de alto PM empleados en el conjugado de la presente invención se polimerizan usando cualquier iniciador adecuado. Los iniciadores útiles en la presente invención pueden describirse mediante la fórmula: I-(I')_m,
 15 donde el subíndice m es un número entero de 1 a 100. El fragmento iniciador I puede ser cualquier grupo que inicie la polimerización. El eliminador de radicales I' puede ser cualquier grupo que terminará de un modo reversible la cadena polimérica creciente. El eliminador de radicales I' puede ser un halógeno, tal como bromo, permitiendo que el extremo del polímero se funcionalice después de la polimerización. El eliminador de radicales I' puede denominarse como grupo terminal. Además, el fragmento iniciador I puede funcionalizarse opcionalmente un grupo R¹ que puede incluir una
 20 diversidad de grupos funcionales para ajustar la funcionalidad del polímero de alto PM.

20

Los iniciadores útiles en la presente invención pueden tener un solo eliminador de radicales I', o cualquier número adecuado de ramificaciones, por lo que hay múltiples eliminadores de radicales I' cada uno capaz de terminar de un modo reversible una cadena polimérica creciente. Cuando el fragmento iniciador I está ramificado y es capaz de iniciar
 25 múltiples cadenas de polímeros, el subíndice m es mayor a uno, por lo que hay tantos eliminadores de radicales I' como cadenas poliméricas crecientes.

25

El polímero empleado en el conjugado de la presente invención tiene una pluralidad de brazos de polímero. Por ejemplo, el polímero puede tener de 2 a aproximadamente 100 brazos de polímero, o de aproximadamente 2 a
 30 aproximadamente 50 brazos de polímero, o de 2 a aproximadamente 20 brazos de polímero, o de 2 a aproximadamente 10 brazos de polímero, o de 2 a aproximadamente 8 brazos de polímero, o de 2 a aproximadamente

30

4 brazos de polímero. De acuerdo con la invención, el polímero tiene un índice de polidispersidad (IPD) de menos de 2, preferiblemente de menos de 1,2.

5 El fragmento iniciador puede estar unido al extremo proximal de 2 a aproximadamente 100 brazos de polímero. El polímero puede tener un índice de polidispersidad de menos de 2,0. El fragmento iniciador puede estar unido al extremo proximal de 2 brazos de polímero. El fragmento iniciador puede estar unido al extremo proximal de 4 brazos de polímero. El fragmento iniciador puede estar unido al extremo proximal de 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 o 12 brazos de polímero.

10 También pueden obtenerse polímeros pseudo-ramificados uniendo múltiples polímeros ramificados, no ramificados, como se describen en el presente documento a un solo agente funcional para que los polímeros estén en proximidad cercana. La proximidad puede obtenerse uniendo los polímeros a puntos cercanos en el agente funcional, cisteínas en una proteína, por ejemplo. Como alternativa, la proximidad puede proporcionarse mediante la estructura del agente funcional, una proteína por ejemplo, de manera que los polímeros unidos a regiones dispares de la proteína se ponen en estrecha proximidad debido al plegamiento y estructuras secundaria y terciaria de la proteína. La estrecha proximidad de los dos polímeros de la presente invención en un solo agente funcional, independientemente de cómo se consiga la proximidad, puede conferir propiedades similares a las de un polímero de la presente invención que tiene una pluralidad de brazos de polímero.

20 El enlace entre fragmento iniciador I y el eliminador de radicales I' es lábil, de modo que durante el proceso de polimerización, los monómeros M¹ y los comonómeros M² se insertan entre el fragmento iniciador I y el eliminador de radicales I'. Por ejemplo, durante una polimerización de radicales libres, tal como ATRP, el fragmento iniciador I y el eliminador de radicales I' se disocian, como se muestra en la Figura 1, para formar radicales de I e I'. Después, el radical del fragmento iniciador I reacciona con los monómeros en solución para hacer crecer el polímero y forma un radical de propagación del polímero (la especie A y la especie C de la Figura 1). Durante el proceso de polimerización, el radical del eliminador de radicales I' reaccionará de un modo reversible con el radical de propagación del polímero para detener el crecimiento del polímero. El enlace entre el monómero y el eliminador de radicales I' también es lábil, por lo que el enlace puede escindirse y permitir que el radical de propagación del polímero reaccione con un monómero adicional para hacer crecer el polímero. El resultado final del proceso de polimerización es que el fragmento iniciador I está en un extremo de la cadena polimérica y el eliminador de radicales I' está en el extremo opuesto de la cadena polimérica.

30 El radical del fragmento iniciador I está típicamente en un carbono secundario o terciario, y puede estabilizarse mediante un carbono de carbonilo adyacente. El eliminador de radicales I' es típicamente un halógeno, tal como bromo, cloro o yodo. Conjuntamente, el fragmento iniciador I y el eliminador de radicales I' forman el iniciador I¹ útiles en la preparación de los polímeros de alto PM descritos en el presente documento.

35 Puede utilizarse una amplia diversidad de iniciadores para preparar los polímeros de alto PM descritos en el presente documento, incluyendo varios iniciadores expuestos en el documento US 6.852.816. En algunas realizaciones, los iniciadores empleados para las reacciones ATRP para preparar polímeros de alto PM como se describen en el presente documento se seleccionan entre alcanos, cicloalcanos, ácidos alquil carboxílicos o ésteres de los mismos, ácidos cicloalquilcarboxílicos o ésteres de los mismos, éteres y alquil éteres cíclicos, grupos alquil arilo, alquilamidas, ácidos alquil-aril carboxílicos y ésteres de los mismos, y también que portan un eliminador de radicales I' donde se preparan polímeros de alto PM no ramificados y más de un eliminador de radicales I' donde se preparan moléculas ramificadas.

45 Los eliminadores de radicales I' útiles en la presente invención incluyen halógenos, tales como Br, Cl e I, tiocianato (-SCN) e isotiocianato (-N=C=S). Otros grupos son útiles para el eliminador de radicales I'. El eliminador de radicales I' puede ser bromo.

50 Los iniciadores empleados para las reacciones de ATRP pueden ser hidroxilados. En algunas realizaciones, los iniciadores empleados para las reacciones ATRP para preparar polímeros de alto PM como se describen en el presente documento se seleccionan entre alcanos, cicloalcanos, ácidos alquil carboxílicos o ésteres de los mismos, ácidos cicloalquilcarboxílicos o ésteres de los mismos, éteres, alquil éteres cíclicos, grupos alquil arilo, alquilamidas, ácidos alquil-aril carboxílicos y ésteres de los mismos, que portan un grupo hidroxilo y también que portan un eliminador de radicales I' donde deben prepararse polímeros de alto PM, o como alternativa, más de un eliminador de radicales I' donde deben prepararse moléculas ramificadas.

60 Los iniciadores empleados para las reacciones de ATRP pueden tener uno o más grupos amina. En algunas realizaciones, los iniciadores empleados para las reacciones de ATRP para preparar de alto PM descritos en el presente documento son alcanos, cicloalcanos, ácidos alquil carboxílicos o ésteres de los mismos, ácidos cicloalquilcarboxílicos o ésteres de los mismos, éteres, alquil éteres cíclicos, grupos alquil arilo, alquilamidas, ácidos alquil-aril carboxílicos y ésteres de los mismos, que portan un grupo amina y también que portan un eliminador de radicales I' donde deben prepararse polímeros de alto PM, o como alternativa, más de un eliminador de radicales I' donde deben prepararse moléculas ramificadas.

65 También pueden emplearse como iniciadores, ácidos alquilcarboxílicos, que incluyen ácidos alquil dicarboxílicos, que tienen al menos un eliminador de radicales I', y están sustituidos con grupos amino o hidroxilo. Donde se emplea ATRP

para preparar polímeros de alto PM como se describe en el presente documento, los iniciadores pueden ser ácidos alquilcarboxílicos que portan uno o más halógenos seleccionados entre cloro y bromo.

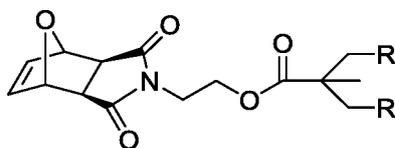
5 También pueden emplearse alcanos sustituidos con dos o más grupos seleccionados entre -COOH, -OH y -NH₂, y al menos un eliminador de radicales I', como iniciadores para la preparación de polímeros de alto PM donde se emplea ATRP para preparar polímeros de alto PM como se describe en el presente documento.

10 Los iniciadores también pueden contener uno o más grupos, incluyendo -OH, amino, monoalquilamino, dialquilamino, -O-alquilo, -COOH, -COO-alquilo o grupos fosfato (o formas protegidas de los mismos).

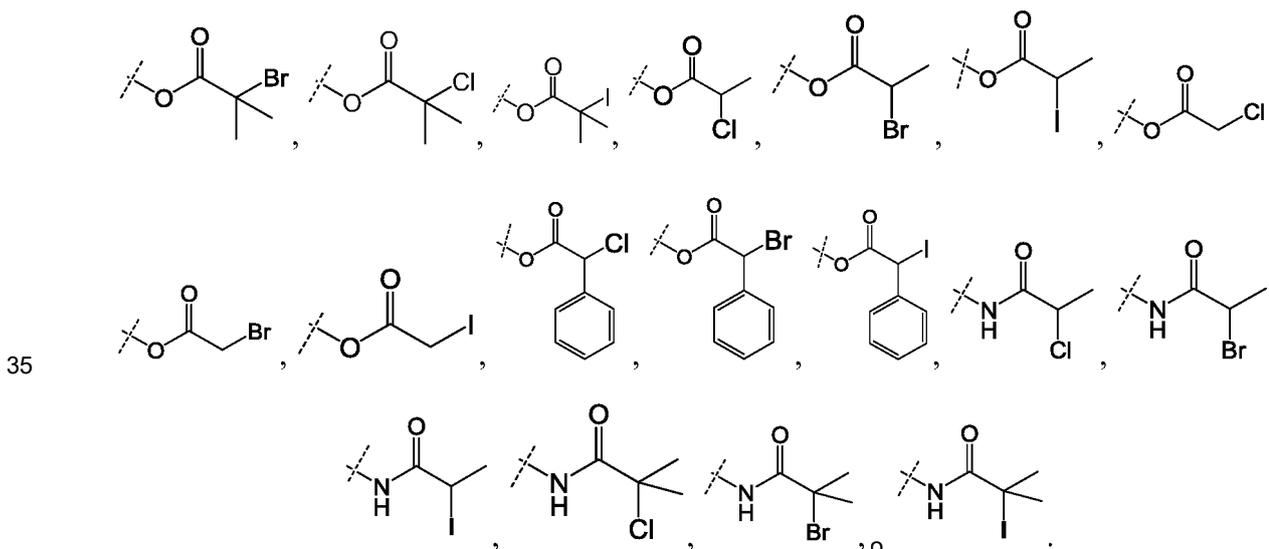
Se encuentra disponible en el mercado una amplia diversidad de iniciadores, por ejemplo éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético disponible de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las formas adecuadamente protegidas de esos iniciadores pueden prepararse usando métodos estándar en la técnica según sea necesario.

15 Otros iniciadores incluyen iniciadores térmicos, redox o fotoiniciadores, incluyendo, por ejemplo, peróxido de alquilo, peróxidos de alquilo sustituido, peróxidos de arilo, peróxidos de arilo sustituido, peróxidos de acilo, hidroperóxidos de alquilo, hidroperóxidos de arilo sustituido, hidroperóxidos de arilo, hidroperóxidos de arilo sustituido, peróxidos de heteroalquilo, peróxidos de heteroalquilo sustituido, hidroperóxidos de heteroalquilo, hidroperóxidos de heteroalquilo sustituido, peróxidos de heteroarilo, peróxidos de heteroarilo sustituido, hidroperóxidos de heteroarilo, hidroperóxidos de heteroarilo sustituido, perésteres de alquilo, perésteres de alquilo sustituido, perésteres de arilo, perésteres de arilo sustituido, compuestos azo y compuestos haluro. Los iniciadores específicos incluyen hidroperóxido de cumeno (CHP), hidroperóxido de *tert*-butilo (TBHP), perbenzoato de *tert*-butilo, (TBPB), carbonatoperóxido sódico, peróxido de benzoílo (BPO), peróxido de lauroílo (LPO), metiletil cetona 45 %, persulfato potásico, persulfato de amonio, 2,2-azobis(2,4-dimetil-valeronitrilo), 1,1-azobis(ciclo-hexanocarbonitrilo), diclorhidrato de 2,2-azobis(N,N-dimetilenoisobutiramidina) y diclorhidrato de 2,2-azobis (2-amido-propano). Pares redox, tales como persulfato/sulfito y Fe (2+) peróxido o persulfato de amonio y N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED).

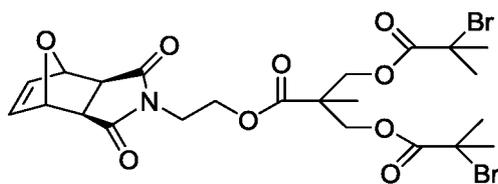
30 Otros iniciadores más útiles para preparar los polímeros de alto PM descritos en el presente documento, son ramificados. Los iniciadores adecuados que tienen un solo punto de ramificación incluyen los siguientes:



donde el radical R puede ser cualquiera de los siguientes:

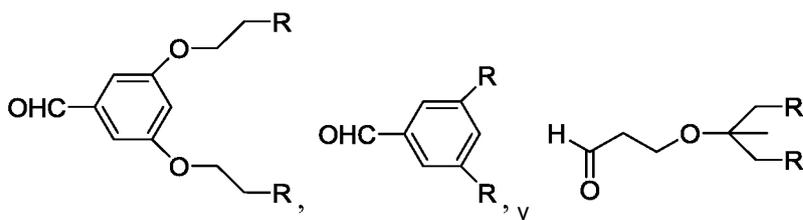


40 El iniciador puede ser:

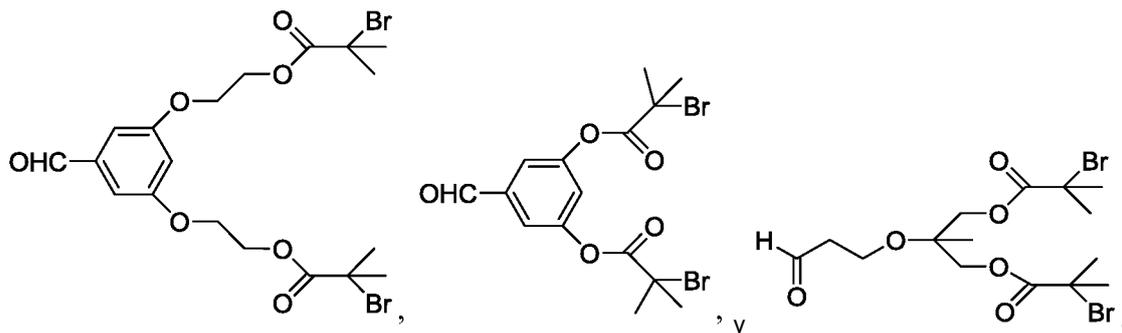


que es una maleimida protegida que puede desprotegerse después de la polimerización para formar la maleimida para la reacción con grupos funcionales adicionales.

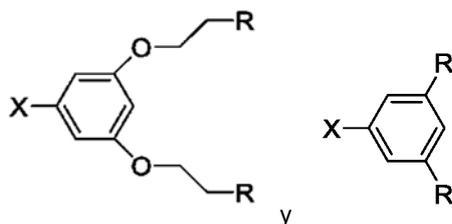
- 5 Los iniciadores ramificados adicionales incluyen, pero sin limitación, los siguientes, donde el radical R es como se ha definido anteriormente:



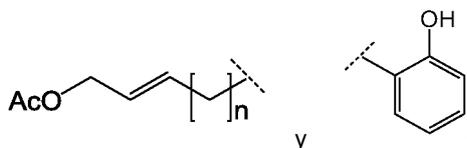
- 10 Los iniciadores ramificados incluyen, pero sin limitación, los siguientes:



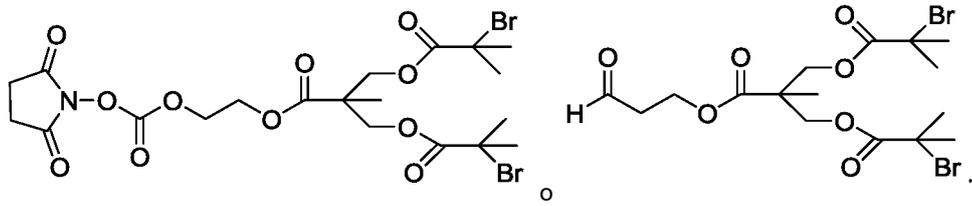
- 15 Otros iniciadores ramificados útiles para preparar los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen los siguientes:



- 20 donde el radical R es como se ha definido anteriormente, y el radical X puede ser CHO, SO₂Cl, SO₂CH=CH₂, NHCOCH₂I, N=C=O y N=C=S, entre otros. Los grupos X adicionales pueden incluir los siguientes:

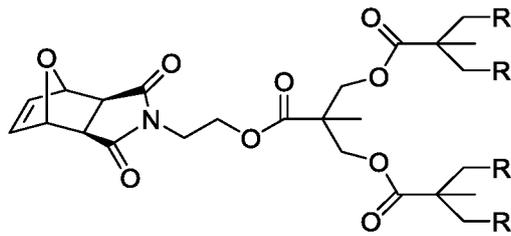


- 25 Otros iniciadores más incluyen, pero sin limitación, los siguientes:

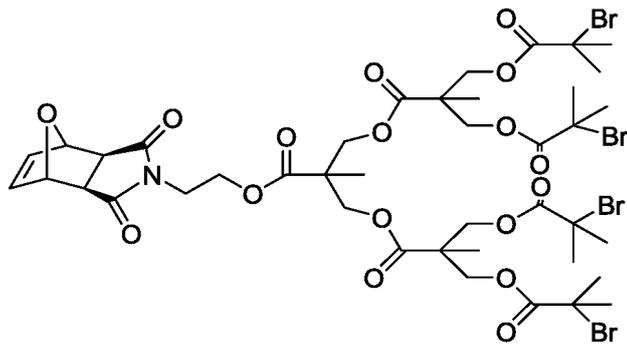


El iniciador puede tener varios puntos de ramificación para proporcionar una pluralidad de brazos de polímero, tales como:

5

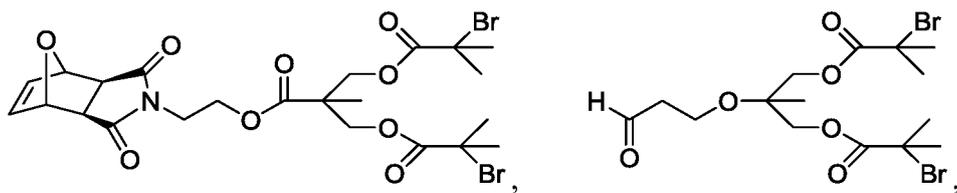


donde el radical R es como se ha definido anteriormente. El iniciador puede tener la siguiente estructura:

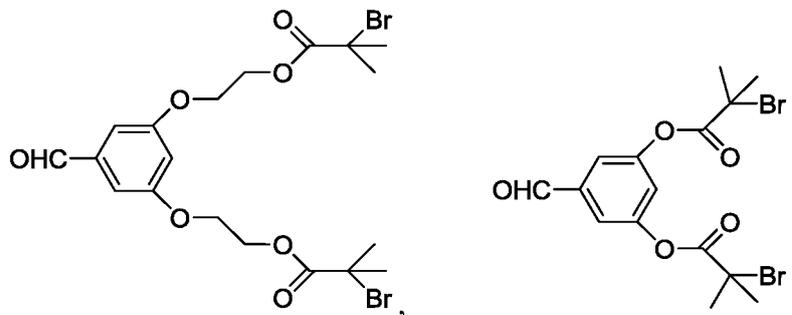


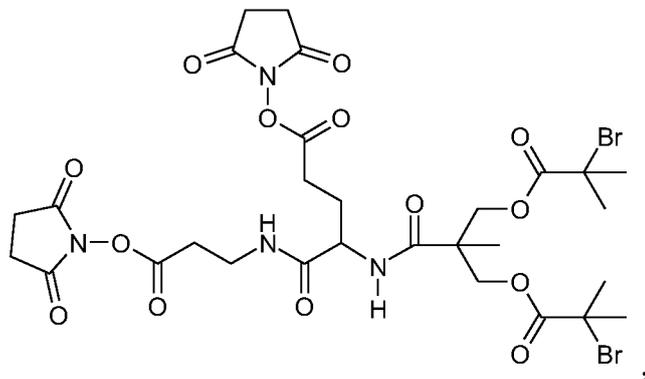
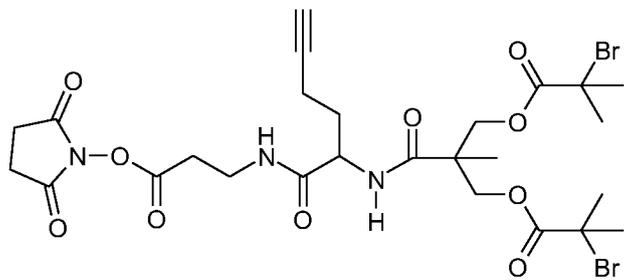
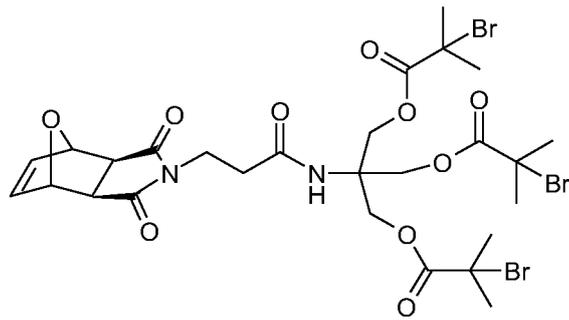
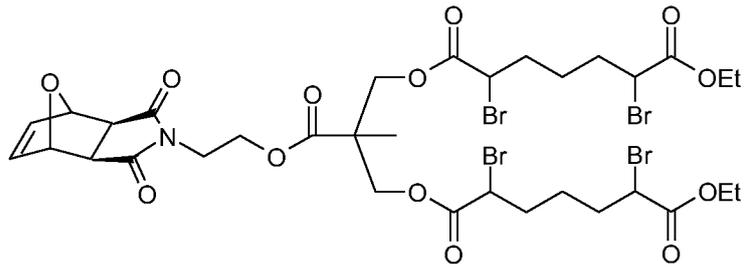
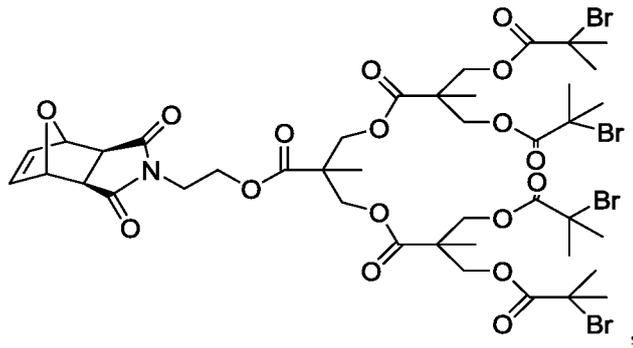
10

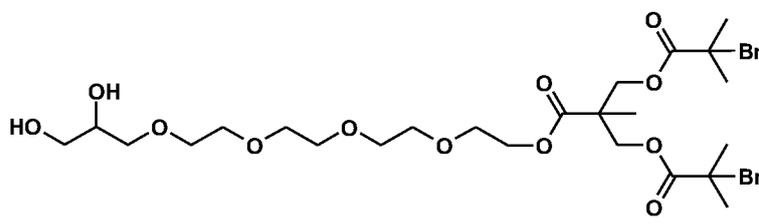
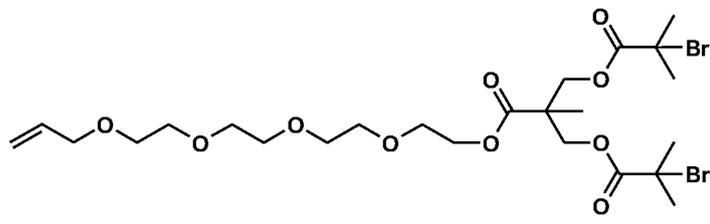
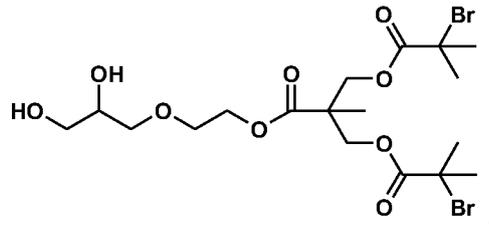
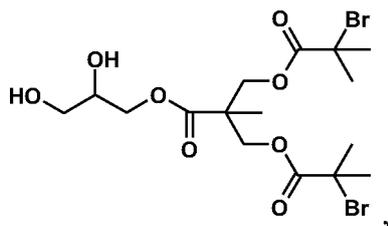
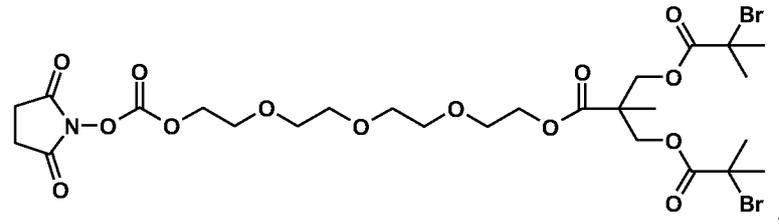
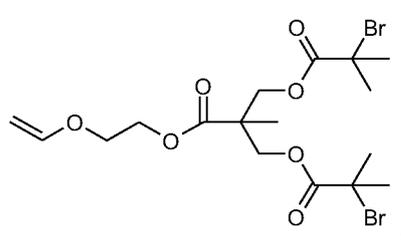
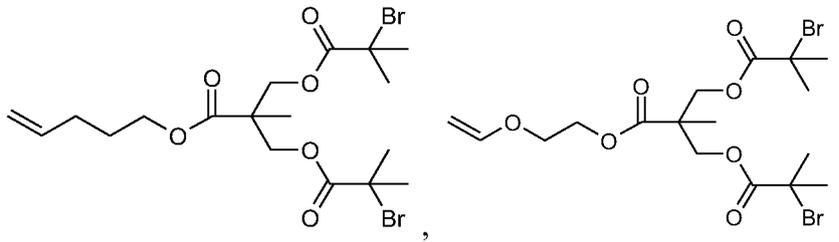
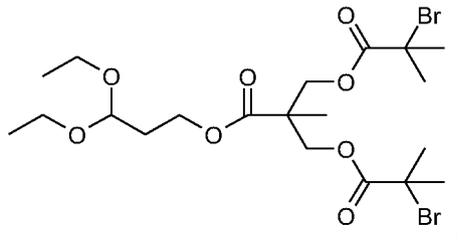
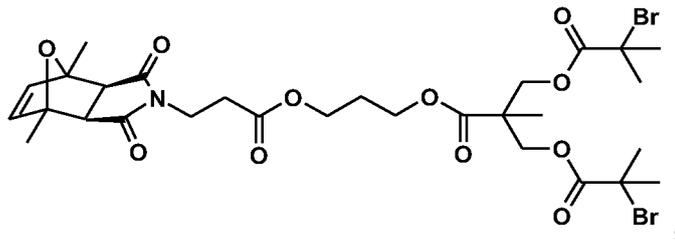
El iniciador puede tener las siguientes estructuras:

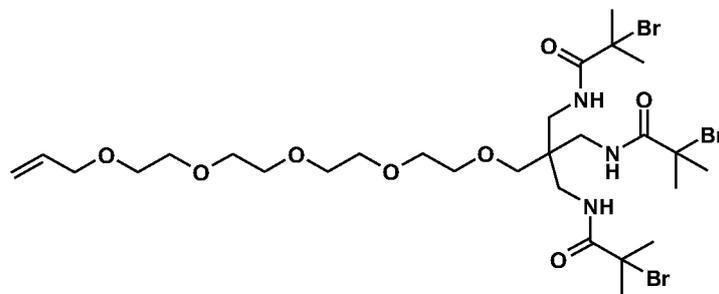
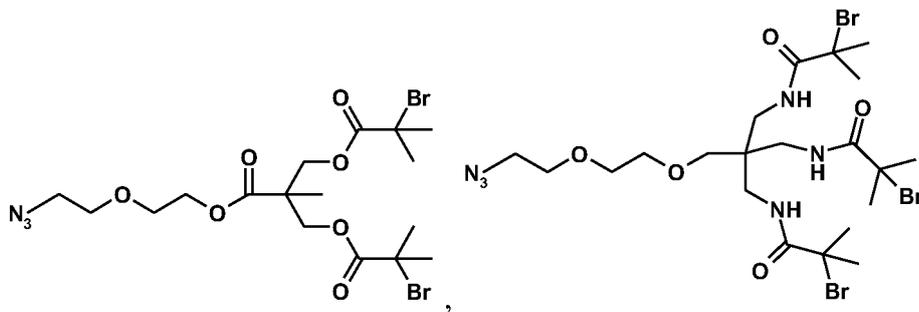
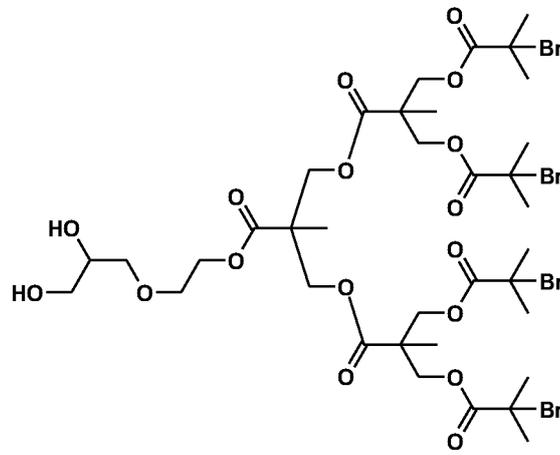
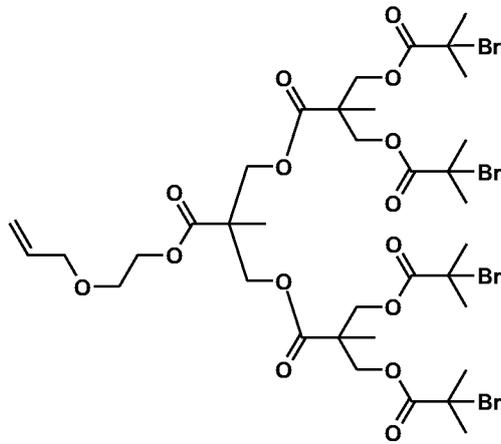


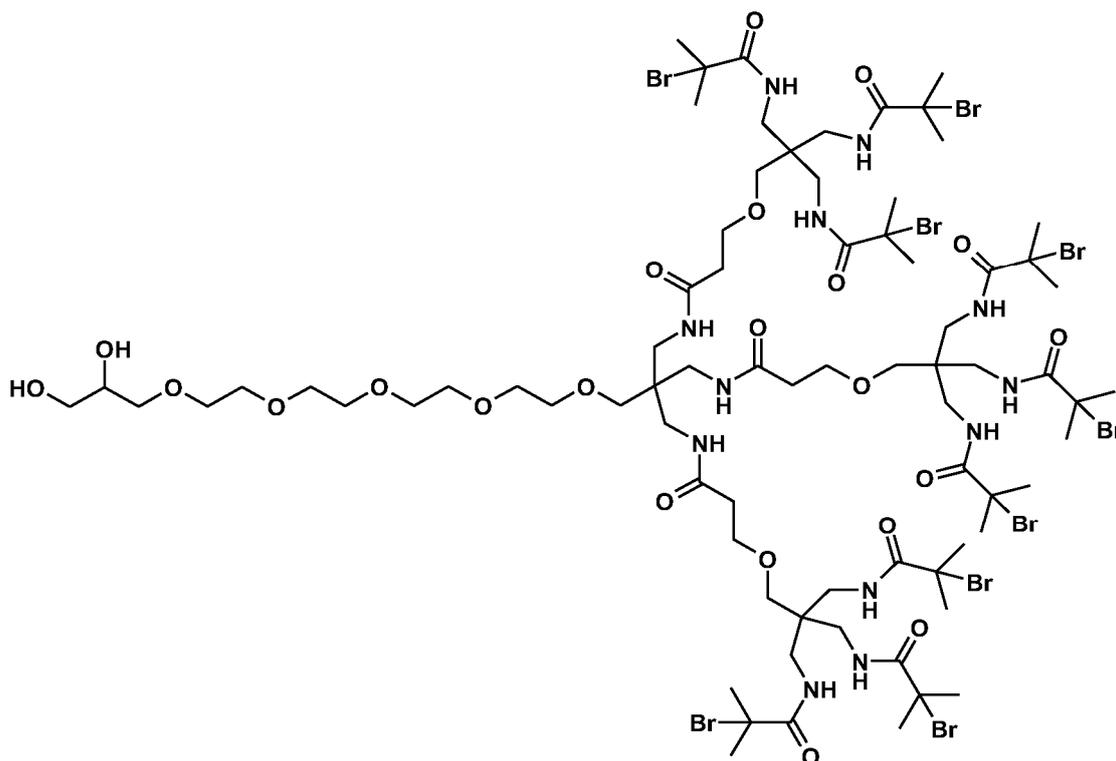
15





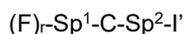






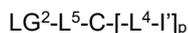
Como se ha descrito anteriormente, el iniciador puede añadirse a la mezcla de polimerización por separado, o puede incorporarse en otra molécula, tal como un monómero (estructura hiperramificada) o un fragmento de polímero (tal como copolímeros de injerto). La iniciación de la polimerización puede realizarse mediante calor, luz UV u otros métodos conocidos para un expertos en la materia.

El iniciador I-I' puede tener la fórmula:



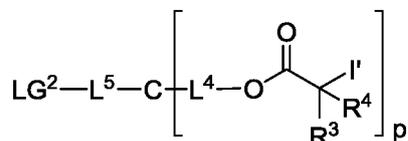
donde el fragmento iniciador I corresponde a F-Sp¹-C-Sp². Cada radical F es un grupo funcional para la reacción con un agente funcional o grupo enlazador de la presente invención. El radical r es de 1 a 10. Los radicales Sp¹ y Sp² son espaciadores y pueden ser cualquier grupo adecuado para formar un enlace covalente, tal como alquilo C₁₋₆, arilo o heteroarilo. El radical C puede ser cualquier núcleo que proporcione uno o una pluralidad de puntos para la unión de uno o más espaciadores, Sp² (que pueden ser iguales o diferentes), y uno o más eliminadores de radicales, I', y que proporcione uno o una pluralidad de puntos para la unión a uno o más espaciadores, Sp¹ (que pueden ser iguales o diferentes), y uno o más grupos funcionales, F (que pueden ser iguales o diferentes). El núcleo C puede ser cualquier estructura adecuada, tal como una estructura ramificada, una estructura reticulada que incluye heteroátomos, tales como silsesquioxanos, y un polímero lineal corto con múltiples grupos funcionales pendientes. Además, el núcleo C puede estar unido a no o más espaciadores Sp¹ y Sp² mediante cualquier grupo adecuado para formar un enlace covalente, incluyendo, pero sin limitación, ésteres, amidas, éteres y cetonas. El eliminador de radicales I' es un grupo o átomo transferible radicalmente, tal como, pero sin limitación, un halógeno, Cl, Br, I, OR¹⁰, SR¹¹, SeR¹¹, OC(=O)R¹¹, OP(=O)R¹¹, OP(=O)(OR¹¹)₂, O-(R¹¹)₂, S-C(=S)N(R¹¹)₂, CN, NC, SCN, CNS, OCN, CNO, N₃, OH, O, alcoxi C₁-C₆, (SO₄), PO₄, HPO₄, H₂PO₄, triflato, hexafluorofosfato, metanosulfonato, arilsulfonato, haluro de ácido carboxílico. R¹⁰ es un alquilo de 1 a 20 átomos de carbono o un alquilo de 1 a 20 átomos de carbono en el que cada uno de los átomos de hidrógeno puede estar reemplazado por un haluro, alqueno de 2 a 20 átomos de carbono, alquino de 2 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido con 1 a 5 átomos de halógeno o grupos alquilo con 1 a 4 átomos de carbono, aralquilo, arilo, alquilo sustituido con arilo, en el que el grupo arilo es fenilo o fenilo sustituido y el grupo alquilo es de 1 a 6 átomos de carbono, y R¹¹ es arilo o un grupo alquilo C₁-C₂₀ lineal o ramificado o donde está presente un grupo N(R¹¹)₂, los dos grupos R¹¹ pueden unirse para formar un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros. El espaciador Sp¹ une covalentemente al grupo funcional F y al núcleo C, mientras que el espaciador Sp² une covalentemente al núcleo C y al eliminador de radicales I'.

El iniciador puede tener la fórmula:



en la que cada I' se selecciona independientemente entre halógeno, -SCN o -NCS. L⁴ y L⁵ son cada uno

independientemente un enlace o un enlazador, de modo que uno de L^4 y L^5 es un enlazador. C es un enlace o un grupo del núcleo. LG^2 es un grupo enlazador. Y el subíndice p es de 1 a 100, en el que cuando el subíndice p es 1, C es un enlace, y cuando el subíndice p es de 2 a 100, C es un grupo del núcleo. El iniciador puede tener la fórmula:



5

en la que cada R^3 y R^4 se selecciona independientemente entre H, CN y alquilo C_{1-6} .

B. Monómeros

10

Los monómeros útiles para preparar los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen cualquier monómero capaz de la polimerización de radicales. Normalmente, dichos monómeros tienen un grupo vinilo. Los monómeros adecuados incluyen acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinil-piridina, vinil-pirrolidona y vinil ésteres, tales como monómeros de acetato de vinilo. Los monómeros útiles incluyen un grupo hidrófilo. El grupo hidrófilo puede ser cualquier grupo hidrófilo adecuado. Por ejemplo, el grupo hidrófilo puede incluir grupos zwitteriónicos y polímeros hidrófilos. Cada grupo hidrófilo puede incluir un grupo zwitteriónico. Los grupos zwitteriónicos incluyen cualquier compuesto que tenga tanto una carga negativa como una carga positiva. Los grupos que tienen una carga negativa y adecuados para su uso en los zwitteriones incluyen, pero sin limitación, fosfato, sulfato, otros oxoaniones, etc. Los grupos que tienen una carga positiva y adecuados para su uso en los zwitteriones incluyen, pero sin limitación, iones amonio. El zwitterión puede ser fosforilcolina. Otros zwitteriones útiles incluyen los que se describen en los documentos WO1994016748 y WO1994016749. Los polímeros hidrófilos útiles incluyen óxido de polietileno, polioxazolina, celulosa, dextrano y otros polímeros polisacáridos. Un experto en la técnica apreciará que son útiles otros polímeros hidrófilos.

15

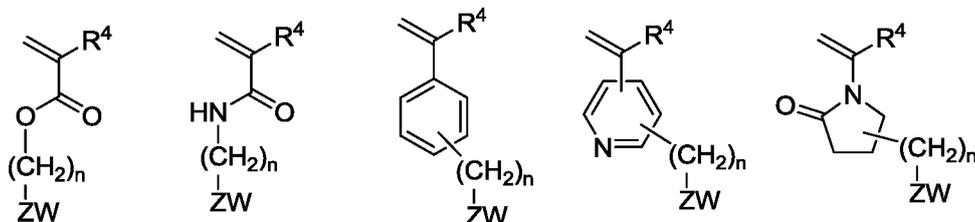
20

25

Otros grupos hidrófilos incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, amina, ácido carboxílico, amida, sulfonato y fosfonato. Los monómeros que incluyen dichos grupos hidrófilos incluyen, pero sin limitación, acrilamida, N-isopropilacrilamida (NiPAAM) y otra acrilamida sustituida y ácido acrílico.

30

Los monómeros, M^1 , que contienen el resto zwitteriónico, ZW, incluyen los siguientes:



Otros monómeros son bien conocidos para un experto en la técnica, e incluyen acetato de vinilo y derivados del mismo.

35

El grupo hidrófilo puede ser un grupo zwitteriónico. El monómero puede ser 2-(metacrililoietil)-2'-(trimetilamonioetil) fosfato (HEMA-PC). El monómero puede ser 2-(acrililoietil)-2'-(trimetilamonioetil) fosfato.

C. Enlazadores

40

Los polímeros de alto PM descritos en el presente documento también pueden incorporar cualquier enlazador adecuado L. Los enlazadores L^3 proporcionan la unión de los agentes funcionales al fragmento iniciador I y los enlazadores L^1 y L^2 proporcionan la unión de los grupos zwitteriónicos a los comonómeros M^1 y M^2 . Los enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles, homobifuncionales o heterobifuncionales. Otros enlazadores pueden ser tanto heterobifuncionales como escindibles, u homobifuncionales y escindibles.

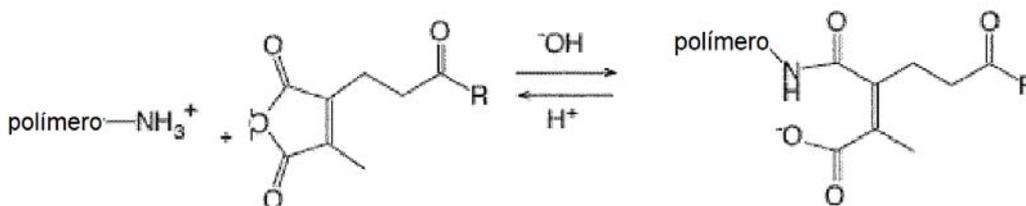
45

Los enlazadores escindibles incluyen aquellos que son enlazadores hidrolizables, enlazadores escindibles enzimáticamente, enlazadores sensibles al pH, enlazadores de disulfuro y enlazadores fotolábiles, entre otros. Los enlazadores hidrolizables incluyen aquellos que tienen un grupo funcional éster, carbonato o carbamato en el enlazador, de modo que la reacción con agua escinde el enlazador. Los enlazadores escindibles enzimáticamente incluyen aquellos que se escinden mediante enzimas y pueden incluir un grupo funcional éster, amida o carbamato en el enlazador. Los enlazadores sensibles al pH incluyen aquellos que son estables a un pH pero son lábiles a otro pH. Para los enlazadores sensibles al pH, el cambio en el pH puede ser de condiciones ácidas a básicas, de condiciones

50

básicas a ácidas, de condiciones ligeramente ácidas a fuertemente ácidas o de condiciones ligeramente básicas a fuertemente básicas. Los enlazadores sensibles al pH adecuados son conocidos para un experto en la técnica e incluyen, pero sin limitación, cetales, acetales, iminas o iminios, siloxanos, silazanos, silanos, enlaces maleamatos-amida, orto ésteres, hidrazonas, derivados de ácido carboxílico activado y vinil éteres. Los enlazadores de disulfuro se caracterizan por tener un enlace disulfuro en el enlazador y se escinden en condiciones de reducción. Los enlazadores fotolábiles incluyen aquellos que se escinden tras su exposición a la luz, tal como radiación visible, infrarroja, ultravioleta o electromagnética en otras longitudes de onda.

5 Otros enlazadores útiles en la presente invención incluyen aquellos descritos en las solicitudes de patente de Estados Unidos N.º 2008/0241102 (asignada a Ascendis/Complex Biosystems) y 2008/0152661 (asignada a Mirus), y las solicitudes de patente internacional N.º WO 2004/010957 y 2009/117531 (asignadas a Seattle Genetics) y O1/24763, 2009/134977 y 2010/126552 (asignadas a Immunogen). Los enlazadores de Mirus útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los siguientes:



15 Otros enlazadores incluyen los descritos en *Bioconjugate Techniques*, Greg T. Hermanson, Academic Press, 2ª ed., 2008, y los que se describen en *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 6974-6998 (Bertozzi, C.R. y Sletten, E.M).

20 En algunas realizaciones, los enlazadores L¹, L² y L³ pueden tener una longitud de hasta 30 átomos, siendo cada átomo independientemente C, N, O, S y P. En otras realizaciones, los enlazadores L¹ y L² pueden ser cualquiera de los siguientes: -alquilo C₁₋₁₂-, -cicloalquilo C₃₋₁₂-, -(alquilo C₁₋₈)-(cicloalquilo C₃₋₁₂)-(alquilo C₀₋₈)-, -(CH₂)₁₋₁₂O-, -(CH₂)₁₋₆O-(CH₂)₁₋₆-, -(CH₂)₁₋₄NH-(CH₂)₁₋₄-, -(CH₂)₁₋₄O-(CH₂)₁₋₄-, -(CH₂)₁₋₄O-(CH₂)₁₋₄-, -(CH₂)₁₋₁₂O-(CH₂)₁₋₁₂-, -(CH₂)₁₋₁₂-(C=O)-O-, -(CH₂)₁₋₁₂O-(C=O)-, -(fenilo)-(CH₂)₁₋₃-(C=O)-O-, -(fenilo)-(CH₂)₁₋₃-(C=O)-NH-, -(alquilo C₁₋₆)-(C=O)-O-(alquilo C₀₋₆)-, -(CH₂)₁₋₁₂-(C=O)-O-(CH₂)₁₋₁₂-, -CH(OH)-CH(OH)-(C=O)-O--CH(OH)-CH(OH)-(C=O)-NH-, -S-maleimido-(CH₂)₁₋₆-, -S-maleimido-(alquilo C₁₋₃)-(C=O)-NH-, -S-maleimido-(alquilo C₁₋₃)-(cicloalquilo C₅₋₆)-(alquilo C₀₋₃)-, -(alquilo C₁₋₃)-(cicloalquilo C₅₋₆)-(alquilo C₀₋₃)-(C=O)-O-, -(alquilo C₁₋₃)-(cicloalquilo C₅₋₆)-(alquilo C₀₋₃)-(C=O)-NH-, -S-maleimido-(alquilo C₀₋₃)-fenil-(alquilo C₀₋₃)-, -(alquilo C₀₋₃)-fenil-(C=O)-NH-, -(CH₂)₁₋₁₂-NH-(C=O)-, -(CH₂)₁₋₁₂-(C=O)-NH-, -(fenilo)-(CH₂)₁₋₃-(C=O)-NH-, -S-(CH₂)₁₋₁₂-(C=O)-NH-(fenilo)-, -(CH₂)₁₋₁₂-(C=O)-NH-(CH₂)₁₋₁₂-, -(CH₂)₂-(C=O)-O-(CH₂)₂-(C=O)-O-(CH₂)₂-(C=O)-NH-, -(alquilo C₁₋₆)-(C=O)-N-(alquilo C₁₋₆)-, acetal, cetalo, aciloxialquilo éter, -N=CH-, -(alquilo C₁₋₆)-S-S-(alquilo C₀₋₆)-, -(alquilo C₁₋₆)-S-S-(alquilo C₁₋₆)-(C=O)-O-, -(alquilo C₁₋₆)-S-S-(alquilo C₁₋₆)-(C=O)-NH-, -S-S-(CH₂)₁₋₃-(C=O)-NH-(CH₂)₁₋₄-NH-(C=O)-(CH₂)₁₋₃-, -S-S-(alquilo C₀₋₃)-(fenilo)-, -S-S-(alquilo C₁₋₃)-(fenilo)-(C=O)-NH-(CH₂)₁₋₅-, -(alquilo C₁₋₃)-(fenilo)-(C=O)-NH-(CH₂)₁₋₅-(C=O)-NH-, -S-S-(alquilo C₁₋₃)-, -(alquilo C₁₋₃)-(fenilo)-(C=O)-NH-, -O-(alquilo C₁₋₆)-S(O₂)-(alquilo C₁₋₆)-O-(C=O)-NH-, -S-S-(CH₂)₁₋₃-(C=O)-, -(CH₂)₁₋₃-(C=O)-NH-N=C-S-S-(CH₂)₁₋₃-(C=O)-NH-(CH₂)₁₋₅-, -(CH₂)₁₋₃-(C=O)-NH-(CH₂)₁₋₅-(C=O)-NH-, -(CH₂)₀₋₃-(heteroarilo)-(CH₂)₀₋₃-, -(CH₂)₀₋₃-fenil-(CH₂)₀₋₃-, -N=C(R)-, -(alquilo C₁₋₆)-C(R)=N-(alquilo C₁₋₆)-, -(alquilo C₁₋₆)-(arilo)-C(R)=N-(alquilo C₁₋₆)-, -(alquilo C₁₋₆)-C(R)=N-(arilo)-(alquilo C₁₋₆)- y -(alquilo C₁₋₆)-O-P(O)(OH)-O-(alquilo C₀₋₆)-, en los que R es H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆ o un grupo arilo que tiene 5-8 átomos endocíclicos.

40 En algunas realizaciones diferentes, los enlazadores L¹, L² y L³ pueden ser cualquiera de los siguientes: -alquilo C₁₋₁₂-, -cicloalquilo C₃₋₁₂-, -(CH₂)₁₋₆O-(CH₂)₁₋₆-, -(CH₂)₁₋₄NH-(CH₂)₁₋₄-, -(CH₂)₁₋₁₂O-, -(CH₂)₁₋₄O-(CH₂)₁₋₄-, -(CH₂)₁₋₁₂-(CO)-O-, -(CH₂)₁₋₁₂-(CO)-NH-, -(CH₂)₁₋₁₂O-(CO)-, -(CH₂)₁₋₁₂NH-(CO)-, -(CH₂)₁₋₄O-(CH₂)₁₋₄-, -(CH₂)₁₋₁₂-, -(CH₂)₁₋₁₂-(CO)-O-(CH₂)₁₋₁₂-, -(CH₂)₁₋₁₂-(CO)-NH-(CH₂)₁₋₁₂-, -(CH₂)₁₋₁₂O-(CO)-(CH₂)₁₋₁₂-, -(CH₂)₁₋₁₂NH-(CO)-(CH₂)₁₋₁₂-, -(cicloalquilo C₃₋₁₂)-, -(alquilo C₁₋₈)-(cicloalquilo C₃₋₁₂)-, -(cicloalquilo C₃₋₁₂)-(alquilo C₁₋₈)-, -(alquilo C₁₋₈)-(cicloalquilo C₃₋₁₂)-(alquilo C₁₋₈)- y -(CH₂)₀₋₃-arilo-(CH₂)₀₋₃-.

45 En otras realizaciones más, cada uno de los enlazadores L¹, L² y L³ es un enlazador escindible seleccionado independientemente entre enlazadores hidrolizables, enlazadores escindibles enzimáticamente, enlazadores sensibles al pH, enlazadores de disulfuro y enlazadores fotolábiles.

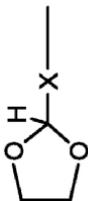
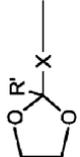
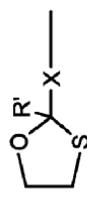
50 Otros enlazadores útiles en la presente invención incluyen enlazadores autoinmolativos. Los enlazadores autoinmolativos son conocidos para alguien experto en la técnica, tales como aquellos útiles para conjugados de anticuerpo fármaco. En la patente de Estados Unidos N.º 7.754.681 se describen enlazadores autoinmolativos ejemplares.

55 D. Grupos Enlazadores LG

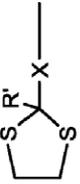
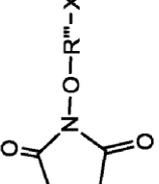
Los enlazadores y agentes funcionales pueden reaccionar con un grupo enlazador en el fragmento iniciador I para

- formar un enlace. Los grupos enlazadores LG pueden ser cualquier grupo funcional adecuado capaz de formar un enlace a otro grupo funcional, uniendo de este modo los dos grupos entre sí. Por ejemplo, los grupos enlazadores LG útiles en la presente invención incluyen los utilizados en la química de clic, química de maleimida y NHS-ésteres, entre otros. Los grupos enlazadores implicados en la química de clic incluyen, pero sin limitación, azidas y alquinos que forman un anillo triazol mediante el proceso de cicloadición de Huisgen (véase la patente de Estados Unidos N.º 7.375.234). La química de maleimida implica la reacción de la olefina de maleimida con un nucleófilo, tal como -OH, -SH o -NH₂, para formar un enlace estable. Otros grupos enlazadores incluyen los descritos en Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, Academic Press, 2ª ed., 2008.
- 5
- 10 Algunos ejemplos no limitantes de la reacción de los grupos enlazadores y algunos grupos que se encuentran típicamente o se introducen en los agentes funcionales se exponen en la Tabla I.

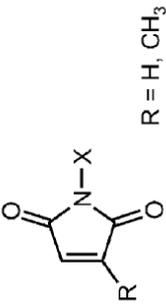
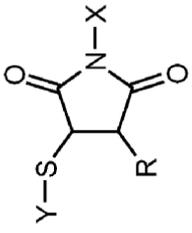
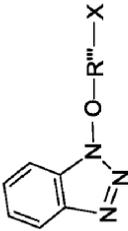
Tabla I

Grupos ilustrativos que pueden reaccionar con un grupo enlazador (LG)	Grupos enlazadores reactivos ejemplares (mostrados como unidos a -X)	Producto Y-X
Y-COOH	HO-X (hidroxilo o formas activadas del mismo (por ejemplo, tresilato, mesilato, etc.))	Y-C(=O)O-X
Y-COOH	HS-X (tiol)	Y-C(=O)S-X
Y-SH	R'-S-S-X (disulfuro)	Y-S-S-X
Y-SH	(piridil)-S-S-X (ditiopiridilo)	Y-S-S-X
Y-NH ₂	H(O=)C-X aldehído	Y-N=CH-X
Y-NH ₂	(HO) ₂ HC-X de hidrato aldehído	Y-NH-CH ₂ -X después de reducción
Y-NH ₂	(R'O) ₂ CH-X o 	Y-N=CH-X o Y-NH-CH ₂ -X después de reducción
Y-NH ₂	acetal R'OC(OH)X o hemiacetal	Y-N=CH-X o Y-NH-CH ₂ -X después de reducción
Y-NH ₂	R'(O)=C-X cetona	Y-N=CR'-X o Y-NH-C(R')H-X después de reducción
Y-NH ₂	(R'O) ₂ C(R')X o 	Y-N=C(R')X o Y-NH-C(R')H-X después de reducción
Y-NH ₂	cetal R'OC(R')(OH)X hemiacetal	Y-N=C(R')X o Y-NH-C(R')H-X después de reducción
Y-NH ₂	R'(S)=C-X cetona tiona (tioacetona)	Y-N=C(R')X o Y-NH-C(R')H-X después de reducción
Y-NH ₂	(R'O)(R'S)C(R')X o 	Y-N=C(R')X o Y-NH-C(R')H-X después de reducción
	monotiocetal	

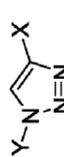
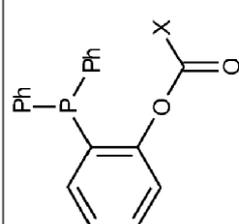
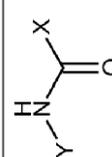
(continuación)

Grupos ilustrativos que pueden reaccionar con un grupo enlazador (LG)	Grupos enlazadores reactivos ejemplares (mostrados como unidos a -X)	Producto Y-X
Y-NH ₂	R'SC(R')(SH)-X o ditiocemicetal	Y-N=C(R')-X o Y-NH-C(R')H-X después de reducción Y-N=C(R')-X o Y-NH-C(R')H-X después de reducción
Y-NH ₂	(R'S) ₂ C(R')-X o 	
Y-SH	ditiocetal	Y-S-CH ₂ -C(OH)(R'')-X-
Y-OH Y-COOH (anión) Y-NHR''	epóxido (oxirano) 	Y-O-CH ₂ -C(OH)(R'')-X- Y-C(=O)O-CH ₂ -C(OH)(R'')-X- Y-NR''-CH ₂ -C(OH)(R'')-X-
Y-SH		Y-S-CH ₂ -C(SH)(R'')-X
Y-OH Y-COOH (anión) Y-NHR''	tioepóxido	Y-O-CH ₂ -C(SH)(R'')-X- Y-C(=O)O-CH ₂ -C(SH)(R'')-X- Y-NR''-CH ₂ -C(SH)(R'')-X-
Y-SH Y-OH Y-NHR''	HO-(C=O)-X carboxilo	Y-S-(C=O)-X Y-O-(C=O)-X Y-N(R'')-(C=O)-X
Y-SH Y-OH Y-NHR''	(alcohol)-(C=O)-X éster del ácido carboxílico (alcohol indica un grupo saliente de alcohol adecuado esterificado, por ejemplo, p-nitrofenilo)	Y-S-(C=O)-X Y-O-(C=O)-X Y-NR''-(C=O)-X
Y-NH ₂	N-hidroxisuccinimida éster 	Y-NH-R'''-X

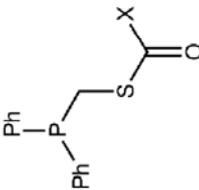
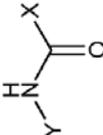
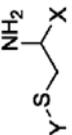
(continuación)

Grupos ilustrativos que pueden reaccionar con un grupo enlazador (LG)	Grupos enlazadores reactivos ejemplares (mostrados como unidos a -X)	Producto Y-X
Y-SH		
Y-NH ₂		Y-NH-R'''-X
Y-NH ₂	1-benzotriazol éster	Y-NH-(C=NH)-X (amidina)
Y-(C=NH)-O-((CH ₂) ₁₋₃)-CH ₃ (imido éster)	CH ₃ -((CH ₂) ₁₋₃)-O-(C=NH)-X (imidoéster)	Y-(C=NH)-HN-X (amidina)
Y-COOH	H ₂ N-X	Y-(C=O)-NH-X
Y-(C=O)-R''	H ₂ N-X Amina	Y-(R'')C=N-X o Y-(R'')CH-NH-X tras reducción
Y-COOH	H ₂ N-(C=O)-NH-X urea	Y-(C=O)-NH-(C=O)-NH-X Y-(R'')C=N-(C=O)-NH-X o Y-(R'')CH-NH-(C=O)-NH-X tras reducción
Y-(C=O)-R''	H ₂ N-(C=O)-O-X carbamato	Y-(C=O)-NH-(C=O)-O-X Y-(R'')C=N-(C=O)-O-X o Y-(R'')CH-NH-(C=O)-O-X tras reducción
Y-COOH	H ₂ N-(C=S)-NH-X tiourea	Y-(C=O)-NH-(C=S)-NH-X Y-(R'')C=N-(C=S)-NH-X o Y-(R'')CH-NH-(C=S)-NH-X tras reducción
Y-(C=O)-R''	H ₂ N-(C=S)-O-X tiocarbamato	Y-(C=O)-NH-(C=S)-O-X Y-(R'')C=N-(C=S)-O-X o Y-(R'')CH-NH-(C=S)-O-X tras reducción
Y-NH-NH ₂	H ₂ N-HN-X	Y-(R'')C=N-HN-X hidrazona
Y-OH	R''-(O=C)-X	Y-NH-N=C(R'')-X hidrazona
Y-NH ₂	O=C=N-X isocianato	Y-NH-(C=O)-NH-X
Y-OH	S=C=N-X isotiocianato	Y-O-(C=O)-NH-X
Y-NH ₂		Y-NH-(C=S)-NH-X
Y-OH		Y-O-(C=S)-NH-X

(continuación)

Grupos ilustrativos que pueden reaccionar con un grupo enlazador (LG)	Grupos enlazadores reactivos ejemplares (mostrados como unidos a -X)	Producto Y-X
Y-SH	$H_2C=CH-(C=O)-X$ o $H_2C=C(CH_3)-(C=O)-X$ carbonilos alfa-beta insustituídos	$Y-S-CH_2CH_2-(C=O)-X$ $Y-S-CH_2-CH(CH_3)-(C=O)-X$
Y-SH	$H_2C=CH-(C=O)-O-X$ carboxilos alfa-beta insustituídos	$Y-S-CH_2CH_2-(C=O)O-X$
Y-SH	$H_2C=C(CH_3)-(C=O)-O-X$ carboxilos alfa-beta insustituídos (metacrilatos)	$Y-S-CH_2CH(CH_3)-(C=O)O-X$
Y-SH	$H_2C=CH-(C=O)NH-X$ amidas alfa-beta insustituídas (acrilamidas)	$Y-S-CH_2CH_2-(C=O)NH-X$
Y-SH	vinilpiridin-X (2- o 4-vinilpiridina)	$Y-S-CH_2-CH_2-(\text{piridil})-X$
Y-SH	$H_2C=CH-SO_2-X$ (vinil sulfona)	$Y-S-H_2C-CH_2-SO_2-X$
Y-SH	$ClH_2C-CH_2-SO_2-L$ (cloroetil sulfona)	$Y-S-H_2C-CH_2-SO_2-X$
Y-SH	(halógeno)- $CH_2-(C=O)-O-X$ (halógeno)- $CH_2-(C=O)-NH-X$ (halógeno)- $CH_2-(C=O)-X$ (halógeno es preferiblemente I o Br)	$Y-S-CH_2-(C=O)-O-X$ $Y-S-CH_2-(C=O)-NH-X$ $Y-S-CH_2-(C=O)-X$
Y-O(C=O)- CH_2 - (halógeno) Y-NH(C=O)- CH_2 - (halógeno)	HS-X	$Y-O(C=O)-CH_2-S-X$ $Y-NH(C=O)-CH_2-S-X$
Y-(C=O)- CH_2 - (halógeno) (halógeno es preferiblemente I o Br)		$Y-(C=O)-CH_2-S-X$
Y-SH	(halógeno)- $CH_2-(C=O)O-X$ (halógeno)- $CH_2-(C=O)NH-X$ (halógeno)- $CH_2-(C=O)-X$ (halógeno es preferiblemente I o Br)	$Y-S-CH_2(C=O)O-X$ $Y-S-CH_2(C=O)NH-X$ $Y-S-CH_2(C=O)-X$
Y-N ₃	$HC\equiv C-X$	
Y-N ₃		

(continuación)

Grupos ilustrativos que pueden reaccionar con un grupo enlazador (LG)	Grupos enlazadores reactivos ejemplares (mostrados como unidos a -X)	Producto Y-X
Y-N ₃		
Y-SH		
Y-NH ₂	(F ₅ -Ph)-OC(O)-X	Y-NH-C(O)-X

R' es alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, o un grupo arilo que tiene 5-8 átomos endocíclicos;
R'' es H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, o un grupo arilo que tiene 5-8 átomos endocíclicos;
R''' es un derivado carbonilo ^{*}(C=O)-, ^{*}(C=O)-(CH₂)₁₋₈-S-S-, ^{*}(C=O)-(CH₂)₁₋₈-(C=O)-O-, ^{*}(C=O)-(CH₂)₁₋₈-O-(C=O)-NH-, o ^{*}(C=O)-(CH₂)₁₋₈-NH-(C=O)-O-,
^{*}(C=O)-O-(CH₂)₁₋₈-O-(C=O)-NH- o ^{*}(C=O)-O-(CH₂)₁₋₈-NH-(C=O)-, donde ^{***} indica el punto de unión a grupos succinimido o benzotriazolilo;
X e Y son cada uno el agente activo, enlazador, monómero o fragmento iniciador I -C(O)NR^{1a}R^{1b} -NR^{1a}R^{1b}, alquil C₁₋₆-NR^{1a}R^{1b}, -N(R^{1a})C(O)R^{1b}, -N(R^{1a})C(O)OR^{1b}, -OP(O)(OR^{1a})₂, -S(O)₂OR^{1a}, -S(O)₂NR^{1a}R^{1b}, -CN, -NO₂, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo

E. Agentes funcionales

Los agentes funcionales útiles en los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen cualquier agente biológico o compuesto sintético capaz de dirigirse a un ligando, receptor, complejo, orgánulo, célula, tejido, lámina epitelial u órgano particular o para tratar una afección o patología particular. En algunas realizaciones, el agente bioactivo es un fármaco, una proteína terapéutica, una molécula pequeña, un péptido, un peptoide, un oligonucleótido (aptámero, ARNpi, microARN), una nanopartícula, un carbohidrato, un lípido, un glucolípido, un fosfolípido o un agente de direccionamiento. Otros agentes funcionales útiles en los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen radiomarcadores, agentes de contraste, fluoróforos y colorantes.

Los agentes funcionales pueden unirse al fragmento iniciador I o al depurador de radicales I' o a ambos, de los polímeros de alto PM. Los agentes funcionales pueden unirse al fragmento iniciador I o al depurador de radicales I' antes o después de la polimerización mediante los enlazadores no escindibles descritos anteriormente. El agente funcional también puede ser absorbido por fisis o absorbido iónicamente al polímero de alto PM en lugar de unirse covalentemente.

La preparación de los polímeros de alto PM como se describen en el presente documento enlazados a un agente funcional se puede llevar a cabo primero uniendo el agente funcional a un grupo de enlace unido a un fragmento iniciador y sometiendo el agente funcional acoplado a condiciones adecuadas para la síntesis de los polímeros de alto PM. En estos casos, un grupo de enlace adecuado puede ser un iniciador (por ejemplo, compuesto/grupo yodado, bromado o clorado) para su uso en reacciones de ATRP. Tal esquema de reacción es posible cuando el agente funcional es compatible con las reacciones de polimerización del polímero y cualquier elaboración posterior requerida. Sin embargo, el acoplamiento de agentes funcionales a polímeros de alto PM preformados puede usarse cuando el agente funcional no es compatible con las condiciones adecuadas para la polimerización. Además, cuando el coste hace que la pérdida de un agente produzca rendimientos sintéticos imperfectos, a menudo encontrados particularmente en reacciones sintéticas de múltiples etapas, puede emplearse el acoplamiento del agente funcional a polímeros de alto PM preformados como se describen en el presente documento.

Cuando un agente funcional no es compatible con las condiciones empleadas para las reacciones de polimerización, puede ser deseable introducir el agente funcional después de la reacción de polimerización.

Los agentes bioactivos, A, pueden seleccionarse ampliamente. En algunas realizaciones, los agentes bioactivos pueden seleccionarse entre uno o más fármacos, vacunas, aptámeros, armazones de avimero basados en armazones de dominio A humano, diacuerpos, camélidos, anticuerpos IgNAR de tiburón, armazones de fibronectina de tipo II con especificadas modificadas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, vitaminas y cofactores, polisacáridos, hidratos de carbono, esteroides, lípidos, grasas, proteínas, péptidos, polipéptidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNsn, ARNi, microARN, ADN, ADNc, construcciones antisentido, ribozimas, etc., y combinaciones de los mismos). En una realización, los agentes bioactivos pueden seleccionarse entre proteínas, péptidos, polipéptidos, solubles o unidos a células, extracelulares o intracelulares, cinesinas, motores moleculares, enzimas, materiales de la matriz extracelular y combinaciones de los mismos. En otra realización, los agentes bioactivos pueden seleccionarse entre nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNsn, ARNi, ADN, ADNc, construcciones antisentido, ribozimas, etc. y combinaciones de los mismos). En otra realización, los agentes bioactivos pueden seleccionarse entre esteroides, lípidos, grasas y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el agente bioactivo puede unirse a la matriz extracelular, tal como cuando la matriz extracelular es de ácido hialurónico o de proteoglicano de sulfato de heparina y el agente bioactivo es un resto cargado positivamente, tal como colina para interacciones de unión no específicas, electrostáticas, de tipo velcro. En otra realización, el agente bioactivo puede ser una secuencia peptídica que se une de manera no específica o específica.

Los agentes bioactivos pueden diseñarse y/o seleccionarse para que tengan una actividad completa (tal como un alto nivel de agonismo o antagonismo). Como alternativa, puede seleccionarse un agente bioactivo multifuncional para modular la actividad de una proteína diana mientras se tiene un impacto completo en otra.

Al igual que las proteínas de mosaico contienen dominios o subdominios de unión extracelular (por ejemplo, VEGF y factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina), las secuencias de estos sitios de unión se pueden replicar como un agente bioactivo para la unión del polímero. De manera más amplia, las proteínas de mosaico representan cadenas de dominios de muchas funciones (unión a dianas, unión a la matriz extracelular, espaciadoras, aumentos de la avidéz, enzimáticas). El conjunto de agentes bioactivos seleccionados para una aplicación particular puede ensamblarse de un modo similar para replicar un conjunto de actividades funcionales deseadas.

Otros agentes funcionales, A, incluyen especies cargadas, tales como colina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y ácido hialurónico, entre otros. Las especies cargadas son útiles para facilitar el acoplamiento iónico, a vidrio, por ejemplo.

Proteínas y anticuerpos terapéuticos

En una realización particularmente útil, el agente funcional es una proteína terapéutica. Numerosas proteínas terapéuticas se describen a lo largo de la solicitud, tales como y sin limitación, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), GM-CSF, interferón alfa, interferón beta, hormona del crecimiento humana, imiglicerasa y ligando RANK.

5 En una realización, los agentes polifuncionales pueden seleccionarse entre polisacáridos, proteínas o agentes peptídicos bioactivos específicamente identificados, incluyendo, pero sin limitación: A β , agalsidasa, alefacept, fosfatasa alcalina, asparaginasa, amdoxovir (DAPD), antida, becaplermina, toxina botulínica, incluyendo los tipos A y B y compuestos de peso molecular inferior con actividad de toxina botulínica, calcitoninas, CD1d, cianovirina, denileucina diftotox, eritropoyetina (EPO), agonistas de EPO, alfa dornasa, proteína estimulante de la eritropoyesis

(NESP), factores de la coagulación tal como Factor V, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor VIII con dominio B eliminado, Factor IX, Factor X, Factor XII, Factor XIII, factor de von Willebrand; ceredasa, Fc gamma r2b, cerezima, alfa glucosidasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, colágeno, ciclosporina, alfa defensinas, beta defensinas, desmopresina, exendina-4, citocinas, receptores de citocina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de 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 tal como proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 6, la hormona paratiroidea, péptido relacionado con la hormona paratiroidea, OP-1; factor de crecimiento de fibroblastos de ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento de fibroblastos 21, ligando CD40, ICOS, CD28, B7-1, B7-2, TLR y otros receptores inmunitarios innatos, heparina, seroalbúmina humana, heparina de bajo peso molecular (HBPM), 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 a interleucina-2, antagonista del receptor de interleucina-1, de interleucina-3, interleucina-4, receptor de interleucina-4, interleucina-6, interleucina-8, interleucina-12, interleucina-17, interleucina-21, receptor de interleucina-13, receptor de interleucina-17; lactoferrina y fragmentos de lactoferrina, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), insulina, proinsulina, análogos de insulina, amilina, péptido C, somatostatina, análogos de somatostatina, incluyendo octreotida, vasopresina, hormona foliculoestimulante (FSH), imiglicerasa, vacuna contra la influenza, factor de crecimiento insulínico (IGF), insulintropina, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), activadores del plasminógeno tales como alteplasa, urocinasa, reteplasa, estreptocinasa, pamiteplasa, lanoteplasa, y tenetepilasa; factor de crecimiento nervioso (NGF), trk A, trk B, osteoprotegerina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores 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 linfocitos T, moléculas/antígenos CD, factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, TNF- α y TNF- β), receptores de TNF (por ejemplo, receptor TNF- α y receptor TNF- β), CTLA4, receptor CTLA4, proteína 1 quimioatrayente de monocitos, factores de crecimiento endotelial, hormona paratiroidea (PTH), PTHrP, péptido de tipo glucagón, somatotropina, timosina alfa 1, rasburicasa, inhibidor de timosina alfa 1 IIB/IIIA, timosina beta 10, timosina beta 9, timosina beta 4, alfa-1 antitripsina, compuestos de fosfodiesterasa (PDE), VLA-4 (antígeno muy tardío-4), inhibidores de VLA-4, bisfosfonatos, anticuerpo del virus sincitial respiratorio, gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (Dnase), proteína bactericida/aumentadora de la permeabilidad (BPI), y anticuerpo anti-CMV. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales incluyen etanercept (una proteína de fusión dimerica que consiste en la porción de unión a ligando extracelular del receptor de TNF humano de 75 kD unida a la porción Fc de IgG1), abcximab, adalimumab, afelimomab, alemtuzumab, anticuerpo contra linfocito B, atilizumab, basiliximab, bevacizumab, bicromab, bertilimumab, CDP-484, CDP-571, CDP-791, CDP-860, CDP-870, cetuximab, clenoliximab, daclizumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, epratuzumab, fontolizumab, gavilimumab, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab tiuxetan, infliximab, inolimumab, keliximab, labetuzumab, lerdelimomab, olizumab, lym-1 radiomarcado, metelimomab, mepolizumab, mitumomab, muromonad-CD3, nebacumab, natalizumab, odulimumab, omalizumab, oregovomab, palivizumab, pemtumomab, pexelizumab, rhuMab-VEGF, rituximab, satumomab pendetida, sevirumab, siplizumab, tositumomab, I¹³¹ tositumomab, trastuzumab, tuvirumab, visilizumab, y fragmentos y miméticos de los mismos.

En una realización, el agente bioactivo es una proteína de fusión. Por ejemplo y sin limitación, el componente bioactivo puede ser una inmunoglobulina o una porción de una inmunoglobulina fusionada a una o más secuencias de péptido útiles concretas. Por ejemplo, el agente bioactivo puede contener un fragmento Fc de anticuerpo. En una realización, el agente bioactivo es una proteína de fusión de CTLA4. Por ejemplo, el agente bioactivo puede ser una proteína de fusión Fc-CTLA4. En otra realización, el agente bioactivo es una proteína de fusión de factor VIII. Por ejemplo, el agente bioactivo puede ser una proteína de fusión Fc-Factor VIII.

En una realización particularmente útil, el agente bioactivo es una proteína humana o un polipéptido humano, por ejemplo, una proteína humana o un polipéptido humano producidos de manera heteróloga. Numerosas proteínas y polipéptidos se describen en el presente documento, para los que existe una forma humana correspondiente (es decir, la proteína o péptido se produce normalmente en células humanas en el cuerpo humano). Por lo tanto, en una realización, el agente bioactivo es la forma humana de cada una de las proteínas y polipéptidos descritos en el presente documento para los que existe una forma humana. Los ejemplos de tales proteínas humanas incluyen, sin limitación, anticuerpos humanos, enzimas humanas, hormonas humanas y citocinas humanas tales como factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos, interferones (por ejemplo,

interferones alfa e interferones beta), hormona del crecimiento humana y eritropoyetina.

- Otros ejemplos de proteínas terapéuticas que (solas o como diana de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o de una proteína distinta de un anticuerpo) pueden servir como agentes bioactivos incluyen, sin limitación, factor VIII, factor eliminado del dominio b VIII, factor VIIa, factor IX, factor X, anticoagulantes; hirudina, alteplasa, tpa, reteplasa, tpa, tpa - 3 de 5 dominios eliminados, insulina, insulina lispro, insulina aspart, insulina glargina, análogos de insulina de acción prolongada, complemento C5, hgh, glucagones, tsh, folitropina-beta, fsh, gm-csf, pdgh, ifn alfa2, ifn alfa2a, ifn alfa2b, inf-apha1, ifn consenso, ifn-beta, ifn-beta 1b, ifn-beta 1a, ifn-gamma (por ejemplo, 1 y 2), ifn-lambda, ifn-delta, il-2, il-11, hbsag, ospa, mab murino dirigido contra el antígeno t-linfocito, mab murino dirigido contra tag-72, glucoproteína asociada a tumor, fragmentos fab derivados de mab quimérico dirigido contra el receptor de superficie plaquetaria gpII(b)/III(a), fragmento mab murino dirigido contra el antígeno asociado a tumor ca125, lisil oxidasa, LOX2, fragmento mab murino dirigido contra el antígeno carcinoembrionario humano, cea, fragmento mab murino dirigido contra miosina cardiaca humana, fragmento mab murino dirigido contra el antígeno de superficie de tumor psma, fragmentos mab murinos (mezcla fab/fab2) dirigido contra hmw-maa, fragmento de mab murino (fab) dirigido contra antígeno asociado a carcinoma, fragmentos mab (fab) dirigidos contra nca 90, un antígeno de reacción cruzada no específica de granulocitos de superficie, mab quimérico dirigido contra el antígeno cd20 encontrado en la superficie de linfocitos b, mab humanizado dirigido contra la cadena alfa del receptor il2, mab quimérico dirigido contra la cadena alfa del receptor il2, mab quimérico dirigido contra tnf-alfa, mab humanizado dirigido contra un epitopo en la superficie del virus sincitial respiratorio, mab humanizado dirigido contra her 2, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, mab humano dirigido contra el antígeno asociado a tumor de citoqueratina anti-ctla 4, mab dirigido contra el antígeno de superficie de 20 de linfocitos b dornasa-alfa dnasa, beta glucocerebrosidasa, tnf-alfa, proteína de fusión a toxina de il-2-difteria, proteína de fusión a fragmento de tnfr-igg laronidasa, dnaasas, alefacept, darbepoyetina alfa (factor estimulante de colonias), tositumomab, mab murino, alemtuzumab, rasburicasa, agalsidasa beta, teriparatida, derivados de hormona paratiroidea, adalimumab (lgg1), anakinra, modificador biológico, nesiritida, péptido natriurético humano b (hbnp), factores estimulantes de colonias, pegvisomant, antagonista del receptor de hormona de crecimiento humano, proteína c recombinante activada, omalizumab, bloqueador de inmunoglobulina e (Ige), lbrutumomab tiuxetan, ACTH, glucagón, somatostatina, somatotropina, timosina, la hormona paratiroidea, hormonas pigmentarias, somatomedina, eritropoyetina, hormona luteinizante, gonadotropina coriónica, factores hipotalámicos liberadores, etanercept, hormonas antiidiuréticas, prolactina y hormona estimulante de la tiroides. Además, puede modificarse cualquiera de estos para tener un punto de conjugación de sitio específico (un extremo N-terminal o C-terminal u otra ubicación) usando aminoácidos naturales (por ejemplo, una sustitución de serina a cisteína) (por ejemplo, formaldehído según el método de Redwood Biosciences) o no naturales. Los restos de aminoácidos no naturales pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: azidonorleucina, 3-(1-naftil)alanina, 3-(2-naftil)alanina, p-etinil-fenilalanina, p-propargil-oxi-fenilalanina, m-etinil-fenilalanina, 6-etinil-triptófano, 5-etinil-triptófano, ácido (R)-2-amino-3-(4-etinil-1H-pirol-3-il)propánico, p-bromofenilalanina, p-yodofenilalanina, p-azidofenilalanina, p-acetilfenilalanina, 3-(6-cloroindolil)alanina, 3-(6-bromoindolil)alanina, 3-(5-bromoindolil)alanina, azidohomoalanina, homopropargilglicina, p-clorofenilalanina, ácido α -aminocaprílico, O-metil-L-tirosina, N-acetilgalactosamina- α -treonina y N-acetilgalactosamina- α -serina.
- Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden servir como agentes bioactivos (por sí mismos o fragmentos de dichos anticuerpos) incluyen, aunque sin limitación, HERCEPTIN™ (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal anti HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; REOPRO™ (abciximab) (Centocor) que es un receptor anti-glucoproteína IIb/IIIa en las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZENAPAX™ (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un inmunosupresor, anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado para la prevención del rechazo de aloinjerto renal agudo; PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular murino anti-17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG murino anti-idiotipo (epitopo GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo de integrina anti- α v β 3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath; Campath 1H/IDP-03 que es un anticuerpo IgG1 humano anti CD52 (Leukosite); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ que es un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 de primate (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ es un anticuerpo anti CD20 murino radiomarcado (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Lab); 5G1.I es un anticuerpo humanizado anti-complemento 5 (CS) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF- α (CATIBASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF- α humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti- α 4 β 7 (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); CAT-152, un anticuerpo anti-TGF- β 2 humano (Cambridge Ab Tech); Cetuximab (BMS) es un anticuerpo de receptor anti-EGF monoclonal (EGFr); Bevacicumab (Genentech) es un anticuerpo monoclonal humano anti-VEGF; Infiximab (Centocore, JJ) es un anticuerpo monoclonal quimérico (de ratón y humano) utilizado para tratar trastornos autoinmunes; Gemtuzumab ozogamicina (Wyeth) es un anticuerpo monoclonal utilizado para la

quimioterapia; y Ranibizumab (Genentech) es un anticuerpo monoclonal quimérico (de ratón y humano) utilizado para tratar la degeneración macular.

5 Otros anticuerpos, tales como anticuerpos de dominio único son útiles en la presente invención. Un anticuerpo de dominio único (sdAb, llamado Nanobody por Ablynx) es un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico. Al igual que un anticuerpo completo, el sdAb es capaz de unirse selectivamente a un antígeno específico. Con un peso molecular de solo 12-15 kDa, los anticuerpos de dominio único son mucho más pequeños que los anticuerpos comunes (150-160 kDa). Un anticuerpo de dominio único es una cadena peptídica de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, que comprende un dominio variable (VH) de una cadena pesada de anticuerpo o de una IgG común.

15 A diferencia de los anticuerpos enteros, los sdAbs no muestran una citotoxicidad activada por el sistema del complemento porque carecen de una región Fc. Los sdAbs derivados de camélidos y peces pueden unirse a antígenos ocultos que no son accesibles para los anticuerpos completos, por ejemplo para los sitios activos de enzimas.

20 Se puede obtener un anticuerpo de dominio único (sdAb) mediante la inmunización de dromedarios, camellos, llamas, alpacas o tiburones con el antígeno deseado y posterior aislamiento del ARNm que codifica la cadena pesada de los anticuerpos. Como alternativa, pueden producirse mediante bibliotecas de exploración sintéticas. Los camélidos son miembros de la familia biológica Camelidae, la única familia viva en el suborden Tylopoda. Los camellos, dromedarios, camellos bactrianos, llamas, alpacas, vicuñas y los guanacos están en este grupo.

Proteínas, péptidos y aminoácidos

25 Las proteínas y péptidos para su uso como agentes bioactivos como se describen en el presente documento pueden producirse por cualquier método útil que incluya la producción por síntesis *in vitro* y por producción en sistemas biológicos. Los ejemplos típicos de métodos de síntesis *in vitro* que se conocen bien en la técnica incluyen síntesis en fase sólida ("SPPS") y condensación de fragmentos en fase sólida ("SPFC"). Los sistemas biológicos usados para la producción de proteínas también se conocen bien en la técnica. Las bacterias (por ejemplo, *E coli* y *Bacillus sp.*) y levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*) se usan ampliamente para la producción de proteínas heterólogas. Además, la expresión génica heteróloga para la producción de agentes bioactivos para su uso como se describe en el presente documento se puede llevar a cabo usando líneas celulares animales tales como líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células CHO). En una realización particularmente útil, los agentes bioactivos se producen en animales transgénicos o clonados tales como vacas, ovejas, cabras y aves (por ejemplo, de pollo, codornices, patos y pavos), cada uno como se entiende en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.781.030, expedida el 24 de agosto de 2004.

40 Los agentes bioactivos tales como proteínas producidas en aves domesticadas, tales como pollos pueden denominarse agentes bioactivos "derivados de aves" (por ejemplo, proteínas terapéuticas derivadas de aves). La producción de proteínas terapéuticas derivadas de aves es conocida en la técnica y se describe en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.730.822, expedida el martes 4 de mayo de 2004.

45 En realizaciones en las que el agente bioactivo es una proteína o polipéptido, los grupos funcionales presentes en los aminoácidos de la secuencia del polipéptido de la proteína se pueden usar para unir el agente al polímero de alto PM. Los enlaces a agentes bioactivos de proteína o polipéptido se pueden hacer a aminoácidos de origen natural en su secuencia o a aminoácidos de origen natural que se han añadido a la secuencia o se han insertado en lugar de otro aminoácido, por ejemplo, el reemplazo de una serina por una cisteína.

50 Los péptidos útiles en la presente invención también incluyen, pero sin limitación, un péptido macrocíclico, un ciclotido, un aptámero, un dominio A del receptor de LDL, un armazón proteico (como se analiza en la Patente de los Estados Unidos número 60/514.391), un receptor soluble, una enzima, un multímero peptídico, un multímero de dominio, un multímero de fragmentos de anticuerpo y una proteína de fusión.

55 Los agentes bioactivos de proteína o polipéptido también pueden comprender aminoácidos de origen sintético además de los aminoácidos comunes de origen natural que se encuentran en proteínas y polipéptidos. Además de estar presentes con el fin de alterar las propiedades de un polipéptido o proteína, se pueden introducir aminoácidos no naturales para proporcionar un grupo funcional que se puede usar para vincular la proteína o el polipéptido directamente al polímero de alto PM. Además, pueden usarse de este modo aminoácidos de origen natural, por ejemplo, cisteína, tirosina y triptófano.

60 Los aminoácidos de origen sintético se pueden introducir en proteínas y péptidos por una diversidad de medios. Algunas de las técnicas para la introducción de aminoácidos no naturales se analizan en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.162.218 y la Patente de los Estados Unidos n.º 20080214439. En primer lugar, se pueden introducir aminoácidos de origen sintético mediante la modificación química de un polipéptido o proteína en la cadena lateral de aminoácido o en el extremo amino o el extremo carboxilo. Los ejemplos no limitantes de modificación química de una proteína o péptido podrían ser metilación por agentes tales como diazometano, o la introducción de acetilación en un grupo amino presente en la cadena lateral de la lisina o en el extremo amino de un péptido o proteína. Otro ejemplo

de la modificación del grupo amino de proteína/polipéptido para preparar un aminoácido de origen sintético es el uso de éster 3-mercaptopropionimidato de metilo o 2-iminotiolano para introducir una funcionalidad portadora de tiol (sulfhidrilo, -SH) unida a posiciones en una proteína o polipéptido que lleva una amina primaria. Una vez introducidos, dichos grupos se pueden emplear para formar un enlace covalente a la proteína o polipéptido.

5 En segundo lugar, los aminoácidos de origen sintético se pueden introducir en proteínas y polipéptidos durante la síntesis química. Los métodos sintéticos se utilizan típicamente para preparar polipéptidos que tienen menos de aproximadamente 200 aminoácidos, que usualmente tienen menos de aproximadamente 150 aminoácidos, y más habitualmente tienen 100 o menos aminoácidos. Las proteínas o polipéptidos más cortos que tienen menos de
10 aproximadamente 75 o menos de aproximadamente 50 aminoácidos se pueden preparar mediante síntesis química.

Los métodos de preparación sintéticos que son particularmente convenientes para permitir la inserción de aminoácidos no naturales en una ubicación deseada son conocidos en la técnica. Los métodos de preparación de polipéptidos sintéticos adecuados pueden basarse en los métodos de síntesis en fase sólida de Merrifield donde los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena en crecimiento (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156). Los sistemas automatizados para sintetizar polipéptidos mediante dichas técnicas ahora están disponibles comercialmente en proveedores tales como Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif. 94404; New Brunswick Scientific, Edison, N.J. 08818; y Pharmacia, Inc., Biotechnology Group, Piscataway, N.J. 08854.

20 Los ejemplos de aminoácidos de origen sintético que se pueden introducir durante la síntesis química de polipéptidos incluyen, pero sin limitación: D-aminoácidos y mezclas de las formas D y L de los 20 aminoácidos de origen natural, N-formil glicina, ornitina, norleucina, hidroxiprolina, beta-alanina, hidroxivalina, norvalina, fenilglicina, ciclohexilalanina, t-butilglicina (t-leucina, ácido 2-amino-3,3-dimetilbutanoico), hidroxil-t-butilglicina, ácido amino butírico, cicloleucina, 4-hidroxiprolina, ácido piroglutámico (5-oxoprolina), ácido azetidina carboxílico, ácido pipercolínico, ácido indolin-2-carboxílico, ácido tetrahydro-3-isoquinolin carboxílico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,6-diaminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,6-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, 5-hidroxilisina, ácido neuramínico, y 3,5-diyodotirosina.

En tercer lugar, se pueden introducir aminoácidos de origen no natural a través de síntesis biológica *in vivo* o *in vitro* mediante la inserción de un codón sin sentido (por ejemplo, un codón ámbar u ocre) en una secuencia de ADN (por ejemplo, el gen) que codifica el polipéptido en el codón correspondiente a la posición donde se va a insertar el aminoácido de origen sintético. Dichas técnicas se analizan, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º: 5.162.218 y 6.964.859. Se pueden usar una diversidad de métodos para insertar el codón mutante, incluyendo la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos. La secuencia alterada se transcribe y se traduce posteriormente, *in vivo* o *in vitro* en un sistema que proporciona un ARNt supresor, dirigido contra el codón sin sentido que ha sido acilado química o enzimáticamente con el aminoácido deseado de origen sintético. El aminoácido sintético se insertará en la ubicación correspondiente al codón sin sentido. Para la preparación de polipéptidos más grandes y/o glucosilados, habitualmente se prefieren técnicas de preparación recombinante de este tipo. Entre los aminoácidos que se pueden introducir de esta manera se encuentran: formil glicina, fluoroalanina, ácido 2-amino-3-mercapto-3-metilbutanoico, homocisteína, homoarginina y similares. Otros enfoques similares para obtener aminoácidos no naturales en una proteína incluyen métodos de sustitución con metionina.

45 Cuando los aminoácidos de origen sintético tienen una funcionalidad que es susceptible de modificación selectiva, son particularmente útiles para formar un enlace covalente a la proteína o polipéptido. Las circunstancias en las que una funcionalidad es susceptible de modificación selectiva incluyen aquellas en las que la funcionalidad es única o donde otras funcionalidades que podrían reaccionar en las condiciones de interés se ven impedidas, ya sea estereoquímicamente o de otro modo.

Otros anticuerpos, tales como anticuerpos de dominio único son útiles en la presente invención. Un anticuerpo de dominio único (sdAb, llamado Nanobody por Ablynx) es un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico. Al igual que un anticuerpo completo, el sdAb es capaz de unirse selectivamente a un antígeno específico. Con un peso molecular de solo 12-15 kDa, los anticuerpos de dominio único son mucho más pequeños que los anticuerpos comunes completos (150-160 kDa). Un anticuerpo de dominio único es una cadena peptídica de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, que comprende un dominio variable (VH) de una cadena pesada de anticuerpo o de una IgG común.

A diferencia de los anticuerpos enteros, los sdAbs no muestran una citotoxicidad activada por el sistema del complemento porque carecen de una región Fc. Los sdAbs derivados de camélidos y peces pueden unirse a antígenos ocultos que no son accesibles para los anticuerpos completos, por ejemplo para los sitios activos de enzimas.

60 Se puede obtener un anticuerpo de dominio único (sdAb) mediante la inmunización de dromedarios, camellos, llamas, alpacas o tiburones con el antígeno deseado y posterior aislamiento del ARNm que codifica la cadena pesada de los anticuerpos. Como alternativa, pueden producirse mediante bibliotecas de exploración sintéticas. Los camélidos son miembros de la familia biológica Camelidae, la única familia viva en el suborden Tylopoda. Los camellos, dromedarios, camellos bactrianos, llamas, alpacas, vicuñas y los guanacos están en este grupo.

Los péptidos útiles en la presente invención también incluyen, pero sin limitación, un péptido macrocíclico, un ciclotido, un dominio A del receptor de LDL, un armazón proteico (como se analiza en la Patente de los Estados Unidos número 60/514.391), un receptor soluble, una enzima, un multímero peptídico, un multímero de dominio, un multímero de fragmentos de anticuerpo y una proteína de fusión.

5 También se describen nuevas formas de lograr arquitecturas de polímeros ramificados en una superficie bioactiva. El concepto es uno de "puntos de ramificación" o "puntos de unión proximales" en la molécula objetivo para recrear un polímero efectivo de ≥ 2 brazos con ≥ 1 polímeros de brazos unidos a sitios localizados en una molécula diana. En la técnica anterior, la PEGilación indiscriminada de una proteína con un reactivo no específico del sitio (por ejemplo, un reactivo PEG funcionalizado con NHS) daría como resultado múltiples polímeros de PEG conjugados a múltiples grupos amino dispersos a través de la proteína. En este caso, lo que se describe es preferentemente un enfoque en una etapa en el que el agente diana se modifica para ubicar dos sitios de conjugación únicos (por ejemplo, aminoácidos de cisteína) de manera que una vez que se forma la estructura terciaria de la proteína o el péptido o agente, los dos sitios se encontrarán próximos entre sí. Posteriormente, se usa este agente diana modificado en una reacción de conjugación con un polímero que contiene la química de conjugación correspondiente (por ejemplo, reactivo con tiol). El resultado es un agente diana único que se conjuga con dos polímeros muy próximos entre sí, creando así un punto de ramificación o "pseudo" ramificación. En otra realización, el agente diana contendría un solo sitio único, por ejemplo, se emplearían una cisteína libre y un agente de enlace tri(hetero)funcional para unir ≥ 2 polímeros lineales a este sitio único, de nuevo creando una "pseudo" ramificación.

20 Fármacos

En otra realización, los agentes bioactivos también se pueden seleccionar entre fármacos o agentes terapéuticos específicamente identificados, incluyendo, pero sin limitación: tacrina, memantina, rivastigmina, galantamina, donepezilo, levetiracetam, repaglinida, atorvastatina, alefacept, tadalafilo, vardenafilo, sildenafil, fosamprenavir, oseltamivir, valaciclovir y valganciclovir, abarelix, adefovir, alifuzosina, alosetron, amifostina, amiodarona, ácido aminocaproico, aminohipurato sódico, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, amlodipina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, aprepitant, aripirazol, asparaginasa, atazanavir, atomoxetina, antraciclinas, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, buserelina, busulfán, cabergolina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucino, cilastatina sódica, cisplatino, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, camptotecinas, ácido 13-cis-retinoico, ácido retinoico todo trans; dacarbazina, dactinomicina, daptomicina, daunorubicina, deferoxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, dutasterida, eletriptán, emtricitabina, enfuvirtida, eplerenona, epirubicina, estramustina, etinil estradiol, etopósido, exemestano, ezetimibe, fentanilo, fexofenadina, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximasterona, flutamida, fluticazona, fondaparinux, fulvestrant, gamma-hidroxitbutirato, gefitinib, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidroxiurea, icodextrina, idarubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, itraconazol, goserelina, laronidasa, lansoprazol, letrozol, leucovorina, levamisol, lisinopril, lovotiroxina sódica, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, memantina, mercaptopurina, mequinol, metaraminol bitartrato, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, miglustat, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, modafinilo, naloxona, naproxeno, nevirapina, nicotina, nilutamida, nitazoxanida, nitisinona, noretindrona, octreotida, oxaliplatino, palonosetron, pamidronato, pemetrexed, pergolida, pentostatina, pilcamicina, porfímero, prednisona, procarbazona, proclorperazina, ondansetron, palonosetron, oxaliplatino, raltitrexed, rosuvastatina, sirolimus, estreptozocina, pimecrolimus, sartaconazol, tacrolimus, tamoxifeno, tegaserod, temozolomida, tenipósido, testosterona, tetrahidrocannabinol, talidomida, tioguanina, tiotepa, tiotropio, topiramato, topotecán, treprostínilo, tretinoína, valdecoxib, celecoxib, rofecoxib, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, voriconazol, dolasetrón, granisetrón, formoterol, fluticasona, leuprolida, midazolam, alprazolam, anfotericina B, podofilotoxinas, antivirales de nucleosidasa, aroil hidrazonas, sumatriptán, eletriptán; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davercina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, loratadina, desloratadina, leucomicina, miocamicina, rokitamicina, andazitromicina, y swinolida A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, trovafloxacino, alatrofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, enoxacino, gatifloxacino, gemifloxacino, grepafloxacino, lomefloxacino, esparfloxacino, temafloxacino, pefloxacino, amifloxacino, fleroxacino, tosufloxacino, prulifloxacino, irloxacino, pazufloxacino, clinafloxacino, y sitafloxacino; aminoglucósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, ampicacina, kanamicina, neomicina, y estreptomina, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato; polimixinas tales como polimixina B, capreomicina, bacitracina, penems; penicilinas, incluyendo agentes sensibles a la penicilinasasa como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a la penicilinasasa como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos de microorganismos gramnegativos como ampicilina, amoxicilina, y hetacilina, cilina, y galampicilina; penicilinas antipseudomonas como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, y piperacilina; cefalosporinas como cefpodoxima, cefprozilo, ceftbuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradrina, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxilo, cefaloglicina, cefuroxima, ceforanida, cefotaxima, cefatrizina, cefacetilo, cefepima, cefixima, cefonicid, cefoperazona, cefotetán, cefmetazol, ceftazidima, loracarbef, y moxalactama, monobactams como aztreonam; y carbapenems tales como imipenem, meropenem, y ertapenem, isetionato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaina, sulfato de metaproterenol, dipreionato de beclometasona, acetamida de triamcinolona, acetónido de budesónida, salmeterol, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolin sódico, y tartrato de ergotamina; taxanos tal como paclitaxel; SN-38 y tirfostinas. Los agentes bioactivos también se pueden seleccionar del grupo que consiste en aminohipurato sódico, anfotericina B, doxorubicina, ácido

aminocaproico, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, metaraminol bitartrato, pamidronato disódico, daunorrubicina, lovotiroxina sódica, lisinopril, cilastatina sódica, mexiletina, cefalexina, deferoxamina, y amifostina en otra realización.

5 Otros agentes bioactivos útiles en la presente invención incluyen agentes de direccionamiento a la matriz extracelular, restos de transporte funcionales y agentes de marcaje. Los agentes de direccionamiento a la matriz extracelular incluyen, pero sin limitación, restos de unión a heparina, restos de unión a metaloproteína de matriz, dominios de unión a lisil oxidasa, restos cargados negativamente o restos cargados positivamente y ácido hialurónico. Los restos de transporte funcionales incluyen, pero sin limitación, restos de transporte de la barrera hematoencefálica, restos de transporte intracelular, restos de transporte de orgánulos, dominios de transporte epitelial y restos de direccionamiento a tumores (folato, otros). En algunas realizaciones, los agentes de direccionamiento útiles en la presente invención se dirigen a anti-TrkA, anti A-beta (péptido 1-40, péptido 1-42, forma monomérica, forma oligomérica), anti-IGF1-4, agonista RANKL, anti-ApoE4 o anti-ApoAI, entre otros.

15 Agentes de diagnóstico

Los agentes de diagnóstico útiles en los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen agentes de obtención de imágenes y agentes de detección tales como radiomarcadores, fluoróforos, colorantes y agentes de contraste.

20 El agente de obtención de imágenes se refiere a un marcador que está unido al polímero de alto PM de la presente invención para obtener imágenes de un tumor, órgano o tejido en un sujeto. El resto de obtención de imágenes puede unirse covalentemente o no covalentemente al polímero de alto PM. Los ejemplos de restos de formación de imágenes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, radionúclidos, fluoróforos, tales como fluoresceína, rodamina, Texas Red, Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 y la gama de fluoróforos AlexaFluor (Invitrogen, Carlsbad, CA), anticuerpos, gadolinio, oro, nanomateriales, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, derivados de los mismos y mezclas de los mismos.

30 Radiomarcador se refiere a un núclido que muestra radiactividad. Un "núclido" se refiere a un tipo de átomo especificado por su número atómico, masa atómica y estado energético, tal como carbono 14 (^{14}C). "Radiactividad" se refiere a la radiación, incluyendo partículas alfa, partículas beta, nucleones, electrones, positrones, neutrinos y rayos gamma, emitidos por una sustancia radiactiva. Los radionúclidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, flúor 18 (^{18}F), fósforo 32 (^{32}P), escandio 47 (^{47}Sc), cobalto 55 (^{55}Co), cobre 60 (^{60}Cu), cobre 61 (^{61}Cu), cobre 62 (^{62}Cu), cobre 64 (^{64}Cu), galio 66 (^{66}Ga), cobre 67 (^{67}Cu), galio 67 (^{67}Ga), galio 68 (^{68}Ga), rubidio 82 (^{82}Rb), itrio 86 (^{86}Y), itrio 87 (^{87}Y), estroncio 89 (^{89}Sr), itrio 90 (^{90}Y), rodio 105 (^{105}Rh), plata 111 (^{111}Ag), indio 111 (^{111}In), yodo 124 (^{124}I), yodo 125 (^{125}I), yodo 131 (^{131}I), estaño 117m ($^{117\text{m}}\text{Sn}$), tecnecio 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), prometio 149 (^{149}Pm), samario 153 (^{153}Sm), holmio 166 (^{166}Ho), lutecio 177 (^{177}Lu), renio 186 (^{186}Re), renio 188 (^{188}Re), talio 201 (^{201}Tl), astatino 211 (^{211}At) y bismuto 212 (^{212}Bi). Como se usa en el presente documento, el "m" en $^{117\text{m}}\text{Sn}$ y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ representa el estado meta. Además, los elementos radiactivos naturales tales como uranio, radio y torio, que típicamente representan mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de radionúclidos. ^{67}Cu , ^{131}I , ^{177}Lu y ^{186}Re son radionúclidos emisores de beta y gamma. ^{212}Bi es un radionúclido emisor de alfa y beta. ^{211}At es un radionúclido emisor de alfa. ^{32}P , ^{47}Sc , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho y ^{188}Re son ejemplos de radionúclidos emisores de beta. ^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{201}Tl son ejemplos de radionúclidos emisores de gamma. ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb y ^{86}Y radionúclidos emisores de positrones. ^{64}Cu es un radionúclido emisor de beta y positrones. Los agentes de obtención de imágenes y de detección también pueden diseñarse en los polímeros de la invención mediante la adición de isótopos de origen natural, tales como deuterio, ^{13}C o ^{15}N durante la síntesis del iniciador, enlazadores, grupos de enlace, comonomeros.

50 Los agentes de contraste útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, agentes de contraste a base de gadolinio, agentes de contraste a base de hierro, agentes de contraste a base de yodo, sulfato de bario, entre otros. Un experto en la materia apreciará que otros agentes de contraste son útiles en la presente invención.

Nanopartículas

55 Los agentes funcionales también pueden incluir nanopartículas. Las nanopartículas útiles en la presente invención incluyen partículas que tienen un tamaño que varía de 1 a 1000 nm. Las nanopartículas pueden ser perlas, partículas metálicas o pueden ser, en algunos casos, micelas y en otros pueden ser liposomas. Otras nanopartículas incluyen nanotubos de carbono, puntos cuánticos y oro coloidal. Las nanopartículas se pueden empaquetar con agentes de diagnóstico y/o terapéuticos.

60 Los expertos en la materia también reconocerán que la invención se puede usar para permitir la detección coincidente de más de un agente del mismo tipo o diferente. Asimismo, el uso de químicas de enlazadores flexibles también se puede utilizar para presenciar la pérdida de un marcador fluorescente, por ejemplo, a medida que la molécula se capta al interior de la célula y en un ambiente de pH bajo.

65 Conjugados

Los polímeros descritos en el presente documento pueden unirse a una variedad de agentes funcionales descritos anteriormente para formar un conjugado de la presente invención. La presente invención proporciona un conjugado que comprende: (a) al menos un polímero que comprende: al menos dos brazos de polímero que tienen una pluralidad de monómeros, cada uno seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinil-piridina, vinil pirrolidona y ésteres de vinilo, tales como acetato de vinilo, en donde cada monómero incluye un resto de fosforilcolina, un fragmento iniciador unido a un extremo proximal del brazo del polímero, en donde el resto iniciador es adecuado para la polimerización por radicales y un grupo terminal unido a un extremo distal de cada brazo de polímero, en donde el al menos un polímero tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.500 kDa y un índice de polidispersidad de menos de 2; y (b) al menos un agente funcional que tiene un agente bioactivo o un agente de diagnóstico, unido al fragmento iniciador o al grupo terminal, en donde el agente bioactivo se selecciona entre el grupo que consiste en una proteína, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de un solo dominio, un avimer, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido y un ácido nucleico y el agente de diagnóstico se selecciona entre el grupo que consiste en un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo y un colorante.

El agente bioactivo del conjugado de la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de un solo dominio, un avimer, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, una proteína, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido o un ácido nucleico. El agente de diagnóstico del conjugado se selecciona entre el grupo que consiste en un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo o un tinte. En algunas realizaciones, se unen al menos dos polímeros al agente funcional. En algunas realizaciones, se unen al menos dos polímeros al agente funcional mediante grupos reactivos proximales en el agente funcional para crear una estructura pseudo ramificada. En otras realizaciones, el conjugado incluye al menos dos agentes funcionales unidos al polímero.

IV. Preparación de polímeros de alto peso molecular que contienen zwitterión/fosforilo

Los polímeros de alto PM descritos en el presente documento pueden prepararse por cualquier medio conocido en la técnica. Un proceso para preparar un polímero de alto PM descrito en el presente documento incluye la etapa de poner en contacto una mezcla de un primer monómero y un segundo monómero con un iniciador, I¹, en condiciones suficientes para preparar un polímero de alto PM mediante una polimerización de radicales libres, en el que el primer monómero comprende una fosforilcolina, y cada uno del segundo monómero e iniciador comprende independientemente al menos uno de un agente funcional o un grupo enlazador para la unión al agente funcional.

La mezcla para preparar los polímeros de alto PM descritos en el presente documento puede incluir una diversidad de otros componentes. Por ejemplo, la mezcla también puede incluir un catalizador, ligando, disolvente y otros aditivos. En algunas realizaciones, la mezcla también incluye un catalizador y un ligando. Más adelante se describen con mayor detalle catalizadores y ligandos adecuados.

En el proceso puede usarse cualquier monómero adecuado, tal como los descritos anteriormente.

Los polímeros de alto PM descritos en el presente documento pueden prepararse por cualquier método de polimerización adecuado, tal como polimerización de radicales vivos. La polimerización por radicales vivos, se analiza por Odian, G. en Principles of Polymerization, 4^a, Wiley-Interscience John Wiley & Sons: Nueva York, 2004, y se aplica a polímeros zwitteriónicos, por ejemplo, en el documento US 6.852.816. Se pueden emplear varias metodologías de polimerización por radicales vivos diferentes, incluyendo polimerización de radicales libres estable (SFRP), transferencia por adición-fragmentación de radicales (RAFT) y polimerización mediada por nitróxido (NMP). Además, la polimerización por radicales por transferencia de átomos (ATRP), proporciona un método conveniente para la preparación de los polímeros de alto PM de la invención.

La preparación de polímeros mediante ATRP implica la polimerización de radicales de monómeros partiendo con un iniciador que porta uno o más halógenos. El iniciador halogenado se activa mediante un catalizador (o una mezcla de catalizadores cuando se emplea CuBr₂) tal como una sal de metal de transición (CuBr) que puede solubilizarse mediante un ligando (por ejemplo, bipyridina o PMDETA). La polimerización RAFT utiliza compuestos de tiocarbonilto, tales como ditiocarbonatos, ditiocarbamatos, tritiocarbonatos y xantatos, para median en el proceso de polimerización a través de un proceso de transferencia de cadena reversible. Otros procesos de radicales "vivos" o controlados útiles en la preparación de los copolímeros aleatorios de la invención incluyen NMP.

Iniciadores

Los iniciadores útiles para la preparación de los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen cualquier iniciador adecuado para la polimerización a través de polimerización de radicales. Los iniciadores pueden ser adecuados para polimerización de radicales por transferencia de átomos (ATRP), tal como los descritos anteriormente. Otros iniciadores útiles incluyen aquellos para la polimerización de radicales mediada por nitróxido

(NMP) o polimerización reversible de adición-fragmentación-terminación (RAFT o MADIX). Pueden utilizarse otras técnicas más para controlar un proceso de polimerización de radicales libres, tales como el uso de procesos de iniferters, transferencia degenerativa o telomerización. Además, los iniciadores útiles en la presente invención incluyen aquellos que tienen al menos un punto de ramificación, tal como los descritos anteriormente. En otras realizaciones, los iniciadores son útiles para la polimerización de radicales controlada.

Los polímeros de alto PM descritos en el presente documento que tienen arquitecturas complejas incluyendo compuestos ramificados que tienen múltiples brazos de polímero incluyendo, pero sin limitación, estructuras de peine y estrella. Las arquitecturas de peine pueden conseguirse empleando iniciadores lineales que portan tres o más átomos de halógeno, preferiblemente los halógenos son átomos de cloro, bromo o yodo, más preferiblemente los halógenos son átomos de cloro o bromo. También pueden prepararse arquitecturas de estrella empleando compuestos que portan múltiples halógenos en un solo átomo de carbono o moléculas cíclicas que portan múltiples halógenos. En algunas realizaciones, los compuestos que tienen arquitectura en estrella tienen 3 brazos de polímero y en otras realizaciones tienen 4 brazos de polímero. Véanse los iniciadores descritos anteriormente.

Catalizadores y ligandos

Los catalizadores para su uso en ATRP o polimerizaciones de transferencia de radicales grupales pueden incluir sales adecuadas de Cu^{1+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ru^{2+} , Ru^{3+} , Cr^{2+} , Cr^{3+} , Mo^{2+} , Mo^{3+} , W^{2+} , W^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{4+} , Rh^{3+} , Rh^{4+} , Re^{2+} , Re^{3+} , Co^{1+} , Co^{2+} , Co^{3+} , V^{2+} , V^{3+} , Zn^{1+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ni^{3+} , Au^{1+} , Au^{2+} , Ag^{1+} y Ag^{2+} . Las sales adecuadas incluyen: halógeno, alcoxi C_1 - C_6 , sulfatos, fosfato, triflato, hexafluorofosfato, metanosulfonato, sales arilsulfonato. El catalizador puede ser sales cloruro o bromuro de los iones metálicos recitados anteriormente. El catalizador puede ser CuBr , CuCl o RuCl_2 .

Es deseable el uso de uno o más ligandos para solubilizar los catalizadores de metal de transición. Los ligandos adecuados se usan de manera útil en combinación con una diversidad de catalizadores de metales de transición, que incluyen cloruro o bromuro de cobre, o sales de metales de transición de cloruro de rutenio, que son parte del catalizador. La elección de un ligando afecta a la función del catalizador ya que los ligandos no solo ayudan a solubilizar catalizadores de metales de transición en medios de reacción orgánicos, sino que también ajustan su potencial redox.

La selección de un ligando también se basa en la solubilidad y separabilidad del catalizador de la mezcla del producto. Cuando la polimerización se va a realizar en una fase líquida, los ligandos/catalizadores solubles son generalmente deseables, aunque pueden emplearse catalizadores inmovilizados. Los ligandos adecuados incluyen aquellos grupos piridilo (incluyendo alquil piridinas por ejemplo, 4,4-dialquil-2,2'-bipiridinas) y grupos piridilo que portan un grupo imino sustituido con alquilo, cuando están presentes, grupos alquilo más largos proporcionan solubilidad en mezclas de monómeros menos polares y medios de disolvente. También pueden emplearse trifenilfosfinas y otros ligandos de fósforo, además de ligandos de indanilo o ciclopentadienilo, con catalizadores de metal de transición (por ejemplo, complejos de Ru^{+2} -haluro o Fe^{+2} -haluro con trifenilfosfina, indanilo o ciclopentadienilo).

En algunas realizaciones se emplea una cantidad aproximadamente estequiométrica de compuesto metálico y ligando en el catalizador, basada en las proporciones molares de los componentes cuando el ion metálico está totalmente complejoado. La proporción entre el compuesto metálico y el ligando puede estar en el intervalo de 1:(0,5 a 2) o en el intervalo de 1:(0,8 a 1,25).

En general, cuando el catalizador es cobre, los ligandos de nitrógeno bidentados o multidentados producen catalizadores más activos. Además, los ligandos puenteados o cíclicos y las poliaminas alifáticas ramificadas proporcionan catalizadores más activos que los ligandos lineales simples. Cuando el bromo es el contraión, se necesitan ligandos bidentados o tetradentados por Cu^{+1} . Cuando se emplean contraiones más complejos, tales como triflato o hexafluorofosfato, pueden emplearse dos ligandos bidentados o uno tetradentado. La adición de cobre metálico puede ser particularmente ventajosa cuando se desee una polimerización más rápida, que el cobre metálico y Cu^{+2} pueden experimentar una reacción redox para formar Cu^{+1} . La adición de algo de Cu^{+2} al comienzo de algunas reacciones de ATRP puede emplearse para disminuir la cantidad de terminación normal.

La cantidad de catalizador empleada en las reacciones de polimerización puede ser el equivalente molar del iniciador que está presente. Como el catalizador no se consume en la reacción, sin embargo, no es esencial incluir una cantidad de catalizador tan alta como la del iniciador. La proporción de catalizador a cada halógeno contenido en el iniciador, basada en el compuesto de metal de transición en algunas realizaciones es de aproximadamente 1:(1 a 50), en otras realizaciones de aproximadamente 1:(1 a 10), en otras realizaciones de aproximadamente 1:(1 a 5) y en otras realizaciones de 1:1.

Condiciones de polimerización

El proceso de polimerización de radicales vivos de la invención se realiza preferiblemente para conseguir un grado de polimerización en el intervalo de 3 a aproximadamente 2000, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 500. El grado de polimerización puede estar en el intervalo de 10 a 100, o como alternativa en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 50. El grado de polimerización en la técnica de polimerización por radicales de transferencia de grupo o átomo está directamente relacionado con la proporción inicial de iniciador con respecto a monómero. Por

lo tanto, las proporciones iniciales de iniciador con respecto a monómero pueden estar en el intervalo de 1:(3 a aproximadamente 2.000) o de aproximadamente 1:(5 a 500), o de aproximadamente 1:(10 a 100) o de aproximadamente 1:(10 a 50).

5 Las reacciones de polimerización se realizan típicamente en la fase líquida, empleando una sola solución homogénea. La reacción puede ser, sin embargo, heterogénea, comprendiendo una fase sólida y una líquida (por ejemplo, una suspensión o emulsión acuosa). Cuando se emplea un disolvente no polimerizable, el disolvente empleado se selecciona teniendo en cuenta la naturaleza del monómero zwitteriónico, el iniciador, el catalizador y su ligando; y además, cualquier comonómero que pueda emplearse.

10 El disolvente puede comprender un solo compuesto o una mezcla de compuestos. El disolvente puede ser agua. El agua puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 100 % en peso, basado en el peso de los monómeros presentes en la reacción. Cuando va a polimerizarse un comonómero insoluble en agua con un monómero zwitteriónico, puede ser deseable emplear un disolvente o codisolvente (junto con agua) que permita la solubilización de todos los monómeros presentes. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen, sin limitación, formamidas (por ejemplo, N,N'-dimetilformamida), éteres (por ejemplo, tetrahidrofurano), ésteres (acetato de etilo) y, lo más preferentemente, alcoholes. Cuando va a emplearse una mezcla de agua y disolvente orgánico, los alcoholes alquílicos C₁-C₄ miscibles con agua (metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol y terbutanol) son disolventes orgánicos útiles. Las combinaciones de agua y metanol son adecuadas para realizar reacciones de polimerización. La reacción también puede realizarse en disolventes supercríticos tales como CO₂.

25 Como se ha indicado anteriormente, puede ser deseable incluir agua en la mezcla de polimerización en una cantidad de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 100 % en peso basado en el peso de los monómeros a polimerizar. El disolvente no polimerizable total puede ser del 1 % al 500 % en peso, basado en el peso de los monómeros presentes en la mezcla de reacción. El disolvente no polimerizable total puede ser de 10 % a 500 % en peso o, como alternativa, del 20 % al 400 %, basado en el peso de los monómeros presentes en la mezcla de reacción. En algunos casos también es deseable manipular la solubilidad de un reactivo de entrada, tal como un iniciador o monómero, por ejemplo modificando la temperatura o disolvente u otro método para modificar las condiciones de reacción de una manera dinámica.

30 El tiempo de contacto del monómero zwitteriónico y el agua antes del contacto con el iniciador y el catalizador puede minimizarse formando una premezcla que comprende todos los componentes distintos del monómero zwitteriónico y para que el monómero zwitteriónico se añada a la premezcla en último lugar.

35 Las reacciones de polimerización pueden realizarse a cualquier temperatura adecuada. La temperatura puede ser de ambiente (temperatura ambiente) a 120 °C. Las polimerizaciones pueden realizarse a una temperatura por encima de temperatura ambiente en el intervalo de 60 ° a 80 °C. La reacción puede realizarse a temperatura ambiente (temperatura de la sala).

40 Los compuestos de la invención pueden tener una polidispersidad (de peso molecular) de menos de 1,5, según se juzga por cromatografía de permeación en gel. Las polidispersidades pueden estar en el intervalo de 1,2 a 1,4. Las polidispersidades pueden ser menores de 1,2.

45 Puede usarse una diversidad de procedimientos de tratamiento para purificar el polímero de interés, tal como precipitación, fraccionamiento, reprecipitación, separación de membrana y criodesecado de los polímeros.

Términos de polímero no halogenados

50 Puede ser deseable reemplazar el halógeno, u otro fragmento iniciador I', con otra funcionalidad. Puede emplearse una diversidad de reacciones para la conversión del halógeno alifático. La conversión del halógeno alifático puede incluir la reacción para preparar un alquilo, alcoxi, cicloalquilo, arilo, heteroarilo o grupo hidroxilo. Los halógenos también pueden someterse a una reacción de eliminación para dar lugar un alqueno (doble enlace). Otros métodos de modificación de los términos halogenados se describen en Matyjaszewski et al. Prog. Polym. Sci. 2001, 26, 337.

Unión de agentes funcionales

60 El acoplamiento de agentes funcionales a los polímeros de alto PM descritos en el presente documento puede realizarse empleando condiciones químicas y reactivos aplicables a las reacciones que se estén realizando. Algunos métodos ejemplares se describen en Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, Academic Press, 2ª ed., 2008 (incorporado en el presente documento en su totalidad). Otras técnicas de bioconjugación se describen en Bertozzi et al. Angewandte Chemie 2009, 48, 6974, y Gautier et al. Chem. Commun. 2008, 2591.

65 Cuando, por ejemplo, el acoplamiento requiere la formación de un éster o una amida, las reacciones de deshidratación entre un ácido carboxílico y un alcohol o amina pueden emplear un agente deshidratante (por ejemplo, una carbodiimida, tal como dicitohexilcarbodiimida, DCC o el agente soluble en agua clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, EDC). Como alternativa, pueden emplearse ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS)

para preparar amidas. La reacción para preparar amidas que emplean ésteres de NHS se realiza típicamente casi a un pH neutro en fosfato, bicarbonato, borato, HEPES u otros tampones que contienen nonamina de 4° a 25 °C. En reacciones que emplean EDC como un agente de deshidratación, puede emplearse un pH de 4,5-7,5 o puede emplearse un pH de 4,5 a 5. El ácido morfolinoetanosulfónico, MES, es un tampón de reacción de carbodiimida eficaz.

Los grupos tiol pueden hacerse reaccionar en una diversidad de condiciones para preparar productos diferentes. Cuando se hace reaccionar un tiol con una maleimida para formar un enlace tioéter, la reacción se realiza típicamente a un pH de 6,5-7,5. El exceso de grupos maleimida se puede inactivar mediante la adición de reactivos tiol libres tales como mercaptoetanol. Cuando los enlaces disulfuro están presentes como una unión, pueden prepararse mediante intercambio de tiol-disulfuro entre un sulfhidrilo presente en el grupo bioactivo y una funcionalidad X que es un disulfuro, tal como un disulfuro de piridilo. Las reacciones que implican disulfuros de piridilo pueden realizarse a un pH 4 - pH 5 y la reacción puede controlarse a 343 nm para detectar la piridin-2-tiona liberada. Los grupos tiol también pueden hacerse reaccionar con epóxidos en una solución acuosa para producir hidroxitióteres. Un tiol también puede hacerse reaccionar a un pH ligeramente alcalino con un haloacetato, tal como yodoacetato, para formar un enlace tioéter.

La reacción de grupos guanido (por ejemplo, aquellos de una arginina en una proteína o polipéptido de interés) con un glioxal puede realizarse a pH 7,0-8,0. La reacción típicamente tiene lugar a 25 °C. El derivado, que contiene dos restos de fenilglioxal por grupo guanido, es más estable en condiciones ligeramente ácidas (por debajo de pH 4) que a pH neutro o alcalino, y permite el aislamiento de los materiales unidos. A valores de pH neutro o alcalino, la unión se descompone lentamente. Cuando se hace reaccionar un residuo de arginina de una proteína o polipéptido con un reactivo de fenilglioxal, aproximadamente el 80 % de la unión se hidrolizará para regenerar el residuo de arginina original (en ausencia de exceso de reactivo) en aproximadamente 48 horas a 37° a aproximadamente pH 7.

Las reacciones de imidoéster con aminas se realizan típicamente a un pH de 8-10, y preferiblemente a aproximadamente pH 10. La unión de amidina formada a partir de la reacción de un imidoéster con una amina es reversible, particularmente a pH alto.

Los haloacetales pueden hacerse reaccionar con grupos sulfhidrilo en un amplio intervalo de pH. Para evitar reacciones secundarias entre residuos de histidina que puedan estar presentes, particularmente cuando el grupo sulfhidrilo está presente en una proteína o polipéptido, la reacción puede realizarse a aproximadamente pH 8,3.

Los aldehídos pueden hacerse reaccionar con aminas en una diversidad de condiciones para formar iminas. Cuando el aldehído o la amina están inmediatamente adyacentes a un grupo arilo, el producto es una base de Schiff que tiende a ser más estable que cuando no está presente un grupo arilo. Las condiciones para la reacción de aminas con aldehídos para formar un enlace imina incluyen el uso de un pH básico de aproximadamente pH 9 a aproximadamente pH 11 y una temperatura de aproximadamente 0 °C a temperatura ambiente, durante 1 a 24 horas. Como alternativa, cuando se desea un acoplamiento preferencial a la amina N-terminal de una proteína, pueden emplearse pH bajos de aproximadamente 4-7. Los tampones que incluyen tampones que contienen borohidruro y aminas terciarias se emplean a menudo para la preparación de iminas. Cuando se desea, los conjugados de imina, que son hidrolíticamente susceptibles, pueden reducirse para formar un enlace amina que no es hidrolíticamente susceptible. La reducción puede realizarse con una diversidad de agentes reductores adecuados que incluyen borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico.

Las condiciones de reacción proporcionadas anteriormente están destinadas a proporcionar una orientación general para el experto. El técnico experto reconocerá que las condiciones de reacción pueden variarse según sea necesario para promover la unión del agente funcional a los polímeros de alto PM descritos en el presente documento y que puede obtenerse una orientación para la modificación de las reacciones de textos convencionales de química orgánica. Se puede obtener orientación adicional a partir de textos tales como Wong, S.S., "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking", (CRC Press 1991), que analiza reacciones químicas relacionadas.

Se han mostrados diferentes proteínas recombinantes para su conjugación con éxito a una gran diversidad de polímeros de tamaños y arquitecturas diferentes mediante diferentes procesos químicos de conjugación. Se han aprendido muchas lecciones durante el transcurso de los esfuerzos de desarrollo de los procesos (conjugación, procesado cadena abajo, desarrollo analítico) y posteriormente se describen algunas características únicas de la tecnología. El conjugado se refiere exclusivamente a una proteína u otros agentes terapéuticos conjugados covalentemente a los polímeros de la presente invención.

En el área de las reacciones de conjugación, las bajas proporciones de exceso molar del polímero de 1 - 2 veces son útiles para obtener una buena eficacia de conjugación. Para alcanzar un bajo exceso molar de polímero y mantener todavía una buena eficacia de conjugación (>20 %), la concentración de proteína debe ser mucho mayor que la concentración normalmente aceptable de 1 - 2 mg/ml. La concentración que puede alcanzarse para una proteína particular cualquiera utilizada dependerá de la estabilidad y las propiedades biofísicas de esa proteína. Los intervalos ejemplares incluyen 5 - 10 mg/ml, 10 - 15 mg/ml, 15 - 20 mg/ml, 20 - 25 mg/ml, 25 - 30 mg/ml, 30 - 50 mg/ml, 50 - 100 mg/ml, >100 mg/ml.

En el otro lado de la reacción, un desafío principal es la concentración de polímero que también se requiere que esté

a un nivel muy alto para eficacias de conjugación óptimas, siendo una concentración normal superior a 100 mg/ml. Curiosamente, los polímeros descritos en el presente documento demuestran una solubilidad extrema con baja viscosidad incluso a concentraciones en exceso de 500 mg/ml. Esta característica hace posible manipular la reacción de conjugación, tal como mezclar de manera muy fácil, mientras que con otros polímeros, tales como PEG a dicha concentración, la solución es demasiado viscosa para poder manipularse. El uso de una diversidad de dispositivos para mejorar el mezclado mejora adicionalmente el proceso. Por ejemplo, puede utilizarse un baño ultrasónico con control de temperatura para el mezclado inicial a fin de facilitar la solubilización del polímero y a su vez mejorar la eficacia de conjugación. Algunos dispositivos ultrasónicos alternativos, tales como VialTweeter de Hielscher Ultrasonic GmbH mejoran la eficacia con la que se libera energía ultrasónica en comparación con un baño ultrasónico. Desde un punto de vista teórico, la onda ultrasónica crea una onda de oscilación que facilita la interacción entre el polímero y la proteína. Esto se traduce en una mayor y mejor eficacia de conjugación. La adición de un mecanismo de control de temperatura, tal como un sistema de refrigeración, protege las proteínas lábiles al calor en este sistema. Para aumentar la escala de dicho proceso a una escala industrial grande (por ejemplo, una escala de kilogramos o superior), es útil otra instrumentación, tal como la tecnología de mezclado acústico resonante desarrollada por Resodyn. De hecho, este tipo de mezclador se ha utilizado con éxito para solubilizar polímeros altamente viscosos y fluidos con una viscosidad por encima de 1.000 cP. Los polímeros descritos en el presente documento a la mayor concentración práctica son solo una fracción de dicho nivel de viscosidad y, por lo tanto, hacen que la tecnología de mezclado acústico resonante sea particularmente atractiva. Algunas ventajas adicionales de dicha tecnología incluyen un carácter no invasivo y totalmente ocultable, así como el rápido tiempo de mezclado. Estas propiedades lo hacen altamente deseable generalmente para productos farmacéuticos proteicos y específicamente para combinación con la tecnología de esta invención.

En la industria, los subproductos de combinación poli-PEGilados indeseables han sido durante mucho tiempo un problema, que aumenta el coste de los bienes durante la fabricación a la vez que también aumenta la complejidad reguladora y los obstáculos para la aprobación de los productos. Curiosamente, muchos conjugados purificados diferentes derivados de todos los polímeros de esta invención y que se han ensayado siempre dan como resultado una proporción molar igual entre proteína y polímero. Esta es una característica única y altamente deseable en comparación con otros polímeros y tecnologías de conjugación.

En el área de procesado cadena abajo, como se ha descrito previamente, los polímeros preferidos descritos en el presente documento son neutros en carga neta debido a su naturaleza zwitteriónica. Por lo tanto, no interactúan con resinas de intercambio aniónico o catiónico en cualquiera de las condiciones cromatográficas incluyendo amplios intervalos de pH y fuerza iónica. En otras palabras, el polímero libre fluirá a través de cualquier intercambiador iónico independientemente del pH y la fuerza iónica. Sin embargo, tras la conjugación a diferentes proteínas, el comportamiento cromatográfico del conjugado está dictado por la proteína. Debido a la presencia del efecto protector del polímero y la carga alterada de la proteína durante la química de conjugación, la interacción del conjugado con la resina de intercambio iónico se debilita en comparación con la proteína nativa. Esta propiedad se observa para proteínas básicas y ácidas que interactúan con resinas de intercambio catiónico y aniónico, respectivamente. Estas también son propiedades altamente deseables desde un punto de vista de fabricación puesto que permiten el diseño de un método de purificación altamente eficiente, simple, económico y ortogonal para la separación del conjugado de los contaminantes relacionados con el producto que incluyen: polímero libre no reactivo, proteínas libres sin reaccionar y agregados; y contaminantes del proceso, tales como endotoxina, reactivos de conjugación y aditivos. Es suficiente una sola etapa cromatográfica de intercambio iónico.

Por ejemplo, para un conjugado ácido de proteína donde la reacción de conjugación se realiza a una baja fuerza iónica (por ejemplo, NaCl 0-20 mM) con un tampón de pH mayor que el pI de la proteína, tras la finalización de la reacción de conjugación, los contenidos del recipiente de reacción de conjugación pueden aplicarse directamente sobre la resina de intercambio aniónico (por ejemplo, resina IEX de tipo Q) donde el polímero libre sin reaccionar fluirá a través de la resina, después la columna puede proseguirse y lavarse con un tampón de baja fuerza iónica al mismo pH, similar a la reacción de conjugación. Después, la fracción de enlace puede eluirse por etapas con concentraciones crecientes de sal. La primera fracción de proteína es el conjugado puro, ya que se une más débilmente a la resina de intercambio iónico en comparación con la proteína nativa y otros contaminantes, tales como agregados y endotoxina. Un gradiente escalonado es altamente deseable puesto que minimiza el riesgo potencial de que la proteína nativa se filtre desde la columna. Por ejemplo, usando una resina de intercambio aniónico fuerte, un conjugado de polímero de citocina se eluirá alrededor de NaCl 30-60 mM a pH 7 mientras que la citocina nativa no se eluirá hasta 100 mM o superior; en tales condiciones, la forma dimérica y agregada de la citocina se eluye típicamente a NaCl 200 mM o superior; i finalmente la endotoxina se eluye a un nivel incluso superior de concentración de sal.

Para un conjugado de proteína básico, la separación se consigue usando un intercambiador catiónico (por ejemplo, resina IEX de tipo SP) una fuerza iónica baja (por ejemplo, NaCl 0-20 mM) con un tampón de pH inferior al pI de la proteína. En este proceso, el polímero libre sin reaccionar todavía estará en el flujo a través de la fracción junto con endotoxina y otros contaminantes cargados negativamente mientras que el conjugado y la proteína libre sin reaccionar permanecen unidos a la columna. Aumentando la fuerza iónica del tampón de elusión, la primera fracción de proteína eluida es el conjugado debido a la interacción más débil con la resina IEX en comparación con la proteína nativa. Un conjugado de Fab' típico se eluirá a NaCl 30-60 mM mientras que el Fab' nativo se eluirá a NaCl 100-200 mM.

La experiencia con la purificación de muchos conjugados de proteínas diferentes, incluyendo conjugados de proteína ácidos (tales como citocinas y proteínas multidominio basadas en armazón) y conjugados de proteína básicos (tales como Fab') muestra que la fuerza iónica requerida para la elusión del conjugado es ampliamente independiente del tamaño del polímero (incluso superior a un millón de daltons) y de la arquitectura (arquitecturas de múltiples brazos).
 5 Esta es una característica altamente deseable de la tecnología de plataforma que permite el diseño de un proceso de fabricación genérico donde no se requieren grandes esfuerzos de desarrollo del proceso con cambios en los polímeros y, hasta cierto punto, en agentes terapéuticos.

Desde el punto de vista de la fabricación, el proceso de purificación cadena abajo descrito anteriormente tiene las
 10 siguientes ventajas:

1. Es altamente escalable;
- 15 2. Es adecuado para los procesos de producción comerciales actuales ya que las resinas están disponibles en el mercado y la instrumentación requerida ya está disponible como un estándar industrial;
3. La técnica de muestra puede utilizarse tanto para analíticas durante el proceso (IPA) así como para aumentar la escala de producción;
- 20 4. Es factible el desarrollo de un proceso genérico;
5. Es económico debido a su naturaleza de una sola etapa y diseño ortogonal;
6. Tiene una excelente recuperación (los rendimientos de los procesos actuales están por encima del 80 %).

En el área del desarrollo analítico, la naturaleza zwitteriónica de los polímeros descritos en el presente documento tiene dos impactos sobre el desarrollo de los análisis SDS-PAGE de conjugados. En primer lugar, el análisis SDS-PAGE ha sido durante mucho tiempo un método ubicuo y conveniente para el análisis de proteínas, ya que proporciona un método rápido, de alta resolución, alto rendimiento y bajo coste para la caracterización semicuantitativa de
 30 proteínas. Sin embargo, la propiedad neutra de carga neta y también el gran radio hidrodinámico del polímero significa que el polímero migra poco o (para polímeros de un tamaño muy grande) casi en absoluto en una matriz de poliacrilamida incluso con un gel tan bajo como el 4 %. En segundo lugar, los polímeros descritos en el presente documento no pueden teñirse por tinciones de tipo azul de Coomassie, potencialmente debido a su propiedad neutra de carga neta que impide que el colorante azul de Coomassie interactúe con el polímero. Sin embargo, una vez la
 35 proteína se conjuga con el polímero, el conjugado se vuelve coloreable. Estas son dos propiedades indeseables para la para la mayoría de los bioquímicos de proteínas a primera vista; sin embargo, la combinación de estas dos propiedades permite el diseño de una técnica altamente deseable y única que permite el análisis rápido y fácil de la eficacia de conjugación directamente de la mezcla de reacción sin purificación adicional. En esta técnica, la mezcla de reacción de conjugación se carga en el gel SDS-PAGE y se separa según el protocolo convencional. Después, el
 40 gel se tiñe con azul de Coomassie y después se destiñe de acuerdo con el protocolo convencional. La presencia del conjugado mostrará bandas teñidas con azul de Coomassie cercanas al pocillo de carga, mientras que la proteína más pequeña migra a su peso molecular y mostrará una reducción concomitante en la intensidad de la banda en comparación con una reacción de control sin polímero. Por lo tanto es muy fácil distinguir aquellas reacciones con una
 45 conjugación ineficiente, ya que el polímero solo no mostrará ninguna tinción en la región de alto peso molecular del gel. Cabe señalar que dicha técnica para el análisis de la reacción de conjugación es imposible para la reacción de PEGilación puesto tanto del polímero PEG como las proteínas PEGiladas se tiñen con azul de Coomassie y migran a una posición muy similar en el gel, especialmente los polímeros de PEG muy grandes; además, los polímeros de PEG muestran la propiedad altamente indeseable de distorsionar el patrón de migración de geles de SDS-PAGE. Este último problema no se observa para los polímeros como de describen en el presente documento, puesto que la
 50 propiedad neutra de carga neta del polímero libre sin reaccionar hace que sea poco posible que entren en la matriz del gel (mientras que solo el conjugado y la proteína libre no conjugada lo harán).

Otra propiedad interesante de los polímeros descritos en el presente documento es que no tienen absorbancia de UV de 280 nm debido a la ausencia de un grupo aromático. Sin embargo, absorben a 220 nm. Hay al menos 10 veces
 55 menos de absorbancia para el polímero cuando se compara con una concentración de masa igual de solución de proteína. Esto es muy útil cuando se intenta identificar la presencia de conjugado en la mezcla de reacción utilizando diferentes métodos cromatográficos, tales como exclusión por tamaño o análisis IEX. Al comparar la proporción UV280/UV220, es muy fácil identificar la presencia de conjugado a medida que aumenta dramáticamente la proporción. La misma técnica puede utilizarse para controlar el producto de elusión tanto a escala analítica como a escala de
 60 producción.

V. Composiciones

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de la divulgación y uno
 65 o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la divulgación pueden estar presentes como una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco, metabolito, análogo o derivado de los mismos, en las

composiciones farmacéuticas de la divulgación. Como se usa en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica.

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en la formulación de los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen: vehículos sólidos, tales como lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico, y similares; y vehículos líquidos tales como jarabes, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, agua y similares. Los vehículos pueden incluir cualquier material de retardo conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o metacrilato de metilo.

10 Otras cargas, excipientes, saporíferos y otros aditivos tales como los conocidos en la técnica, también se pueden incluir en una composición farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

15 Las preparaciones farmacéuticas incluyen todos los tipos de formulaciones. En algunas realizaciones, son formulaciones parenterales (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intracraneal, intraespinal, intracapsular e intraósea) adecuadas para inyección o infusión (por ejemplo, polvos o soluciones concentradas que pueden reconstituirse o diluirse, así como suspensiones y soluciones). Cuando la composición es un sólido que requiere reconstitución o un concentrado que requiere dilución con medios líquidos, se puede emplear cualquier medio líquido adecuado. Los ejemplos preferidos de medios líquidos incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de Hank, solución de dextrosa, y albúmina sérica humana al 5 %.

20 Cuando un compuesto o composición farmacéutica que comprende un polímero de alto PM descrito en el presente documento es adecuado para el tratamiento de trastornos de proliferación celular, incluyendo, pero sin limitación, cánceres, el compuesto o composición farmacéutica puede administrarse a un sujeto a través de una diversidad de rutas que incluyen la inyección directamente en los tumores, la corriente sanguínea o las cavidades corporales.

25 Aunque las composiciones farmacéuticas pueden ser soluciones líquidas, suspensiones o polvos que pueden reconstituirse inmediatamente antes de la administración, también pueden adoptar otras formas. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en forma de jarabes, caldos, bolos, gránulos, pastas, suspensiones, cremas, pomadas, comprimidos, cápsulas (duras o blandas), pulverizaciones, emulsiones, microemulsiones, parches, supositorios, polvos y similares. Las composiciones también se pueden preparar para rutas de administración distintas a la administración parenteral incluyendo, pero sin limitación, tópica (incluyendo bucal y sublingual), pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosa, oral, ocular, etc. Pueden usarse dispositivos de inyección sin agujas para lograr la administración subdérmica, subcutánea y/o intramuscular. Dichos dispositivos pueden combinarse con los polímeros y conjugados de la presente invención para administrar formulaciones de viscosidad baja (<20 cP), media (20 - 50 cP) y alta (> 100 cP).

30 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más polímeros de alto PM como se describe en el presente documento.

35 Otras composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más polímeros de alto PM descritos en el presente documento que funcionan como ligandos biológicos que son específicos para un antígeno o molécula diana. Dichas composiciones pueden comprender un polímero de alto PM como se describe en el presente documento, donde el agente bioactivo es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento FAb₂ o FAb' o una región variable de anticuerpo. Como alternativa, el compuesto puede ser un polímero de alto PM y el polipéptido puede comprender la secuencia de unión a antígeno de un anticuerpo de cadena única. Cuando un agente bioactivo presente en un polímero de alto PM descrito en el presente documento funciona como un ligando específico para un antígeno o molécula diana, estos compuestos también pueden emplearse como reactivos de diagnóstico y/u obtención de imágenes y/o en ensayos diagnósticos.

40 La cantidad de un compuesto en una composición farmacéutica variará dependiendo de varios factores. Puede ser una dosis terapéuticamente efectiva que sea adecuada para un recipiente de dosis única (por ejemplo, un vial). La cantidad del compuesto puede ser una cantidad adecuada para una jeringa de un solo uso. La cantidad puede ser adecuada para dispensadores de usos múltiples (por ejemplo, recipientes adecuados para la administración de gotas de formulaciones cuando se usan para administrar formulaciones tópicas). Un experto en la técnica podrá determinar la cantidad de un compuesto que produce una dosis terapéuticamente eficaz experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades crecientes de una composición farmacéutica para lograr un criterio de valoración clínicamente deseado.

45 En general, un excipiente farmacéuticamente aceptable estará presente en la composición en una cantidad de

aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 99,999 % en peso, o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente 99 % en peso. Las composiciones farmacéuticas pueden contener de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 10 %, o de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 %, o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 %, o de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 40 %, o de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 50 %, o de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %, o de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %, o de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %, o de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 % en peso de excipiente. Otros intervalos adecuados de excipientes incluyen de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 98 %, de aproximadamente de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 95 %, o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 80 % en peso.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen en una diversidad de fuentes ya conocidas, incluyendo, pero sin limitación, "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995) y Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª Edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

VI. Tratamiento.

Los polímeros de alto PM como se describen en el presente documento son útiles para tratar cualquier patología o afección. La patología o afección puede ser aguda o crónica.

Las patologías y afecciones que pueden tratarse usando los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen cáncer, trastornos autoinmunitarios, trastornos genéticos, infecciones, inflamación, trastornos neurológicos y trastornos metabólicos.

Los cánceres que pueden tratarse con los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides, cáncer de hígado, cáncer pleural, cáncer de páncreas, cáncer cervical, cáncer de testículo, cáncer de colon, cáncer de ano, cáncer del conducto biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer rectal, cáncer del apéndice, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer renal, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de piel, coriocarcinomas; cánceres de cabeza y cuello, sarcomas osteogénicos, fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, melanoma, leucemia y linfoma.

Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse usando los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, diabetes mellitus tipo 1 (diabetes mellitus dependiente de insulina o DM1D), enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, trombocitopenia autoinmune, vasculitis, tal como granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behçet, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (lupus), esclerodermia, esclerosis sistémica, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, espondiloartropatías tales como espondilitis anquilosante, psoriasis, dermatitis herpetiforme, enfermedades inflamatorias del intestino, pénfigo vulgar y vitíligo.

Algunos trastornos metabólicos tratables por los polímeros de alto PM descritos en el presente documento incluyen trastornos de almacenamiento lisosomal, tal como la mucopolisacaridosis IV o el síndrome de Morquio, deficiencia del activador/Gangliosidosis GM2, alfa manosidosis, aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, deficiencia crónica de hexosaminidasa A, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis, enfermedad de Gaucher, gangliosidosis GM1, hipofosfatasa, enfermedad de células I/mucopolipidosis II, enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre infantil/ISSD, deficiencia de hexosaminidasa A juvenil, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, trastornos de las mucopolisacaridosis, como la polidistrofia pseudo-Hurler/mucopolipidosis III A, síndrome de Hurler, síndrome de Scheie, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Hunter, síndrome de Sanfilippo, Morquio, deficiencia de hialuronidasa, Maroteaux-Lamy, síndrome de Sly, mucopolipidosis I/sialidosis, Mucopolipidosis y Mucopolipidosis, deficiencia múltiple de sulfatasa, enfermedad de Niemann-Pick, lipofuscinosis ceroides neuronales, enfermedad de Pompe/enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, picnodisostosis, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schindler, enfermedad de Salla/enfermedad por almacenamiento de ácido siálico, Tay-Sachs/gangliosidosis GM2 y enfermedad de Wolman.

Los conjugados de la invención y las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que contienen conjugados de la invención se pueden usar para tratar una diversidad de afecciones. Por ejemplo, hay muchas afecciones para las que los expertos en la materia conocen terapias de tratamiento en las que se emplean agentes funcionales como se describe en el presente documento. La invención contempla que los conjugados de la invención (por ejemplo, polímeros que contienen fosforilcolina conjugados con una variedad de agentes funcionales, como se define en la reivindicación 1) y las composiciones que contienen los conjugados de la invención se pueden emplear para tratar dichas afecciones y que dichos conjugados proporcionan una terapia de tratamiento mejorada con respecto al mismo agente funcional no acoplado a un polímero que contiene fosforilcolina.

Por lo tanto, la divulgación contempla el tratamiento de una afección que se sabe que es tratable por un cierto agente bioactivo mediante el tratamiento de la afección usando el mismo cierto agente bioactivo conjugado con un polímero que contiene fosforilcolina.

5 En el presente documento también se describen métodos para tratar una afección sensible a un agente biológico que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o de una composición farmacéuticamente aceptable de la invención como se ha descrito anteriormente. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del agente o agentes bioactivos para mantener el efecto deseado. La dosificación y/o protocolo de administración apropiado para cualquier sujeto dado puede variar dependiendo de varios factores, incluyendo la gravedad de la patología, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación de fármacos, sensibilidades de reacción, y tolerancia/respuesta a la terapia. Las cantidades terapéuticamente eficaces para una situación dada se pueden determinar mediante una experimentación rutinaria que se encuentra dentro de la habilidad y el criterio del médico.

15 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar individualmente. Como alternativa, pueden administrarse secuencialmente dos o más composiciones farmacéuticas o en un cóctel o combinación que contiene dos polímeros de alto PM como se describe en el presente documento o un polímero de alto PM como se describe en el presente documento y otro agente bioactivo. Otros usos de los agentes bioactivos expuestos en el presente documento se pueden encontrar en textos de referencia estándar tal como el Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ y Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990).

25 También se describe la modificación de proteínas relacionadas con hematología, tales como Factor VIII, Factor VII, Factor IX, El factor X y las proteasas, como las serina proteasas de secuencia nativa o secuencia de muteína y de función nativa o alterada (por ejemplo, mediante presentación en fagos, referencia: Catalyst Biosciences de South San Francisco con tecnología para alterar la especificidad de unión de una enzima existente). Véase también la Patente de los Estados Unidos 7.632.921. Se divulga la modificación de la enzima para permitir la conjugación específica de un sitio de un polímero funcionalizado. Se divulga el uso de químicas flexibles entre el polímero y la enzima, de modo que la proteína pueda ser liberada *in vivo* en la configuración adecuada, por ejemplo, para posibilitar un perfil de liberación próximo a orden cero. Un perfil de producto diana para un Factor VIII de próxima generación podría implicar un conjugado covalente de FVIII recombinante o de FVIII recombinante con dominio B eliminado al que se une un polímero en forma extendida de múltiples brazos que contiene zwitteriones con un peso molecular de más de 50 kDa a un aminoácido de sitio específico, tal como una cisteína. La farmacología clínica del conjugado demostraría una estructura de agua inigualable para proteger al conjugado de la eliminación y los sistemas inmunitarios. El conjugado demostraría una semivida de eliminación de más de 50 horas en humanos (preferentemente más de 80 horas). El conjugado demostraría una semivida aumentada 2x (preferentemente 4x) frente a un FVIII PEG-BDD de 60 kDa con la misma bioactividad. El conjugado utilizado en pacientes mostraría una formación de anticuerpos clínicamente insignificante. El conjugado biofarmacéutico se usaría de manera profiláctica (una vez por semana o menos frecuente) y para el tratamiento bajo demanda de pacientes con hemofilia. También se usaría como terapia de rescate para pacientes con anticuerpos neutralizantes de FVIII existentes, por ejemplo, de la terapia biofarmacéutica de FVIII anterior. El fármaco permitiría una formulación líquida para administración IV y/o subcutánea y con alta estabilidad, alta concentración y baja viscosidad. El principio activo podría estar en el intervalo de 250 a 2.000 UI formado por 30 a 250 microgramos de conjugado de polímero-fármaco en un volumen nominal ideal de 0,4 ml. El coste del polímero podría ser bajo y la eficacia de conjugación del polímero al FVIII o la proteína BDD FVIII podría ser muy elevada, por ejemplo, de más del 75 %. Dicho producto y perfil de producto utilizarían la extrema biocompatibilidad del polímero y como se transfiere a la proteína. Específicamente, la extrema biocompatibilidad podría manifestarse con una unión de agua muy estrecha, solubilidad extrema, muy alta concentración, muy baja viscosidad y extrema estabilidad. Técnicamente, esto se traduce en una semivida de eliminación incrementada >2x (o idealmente >4x) frente a la PEGilación o sus tecnologías equivalentes, una inmunogenicidad extremadamente baja o nula, alta concentración y formulaciones líquidas estables a temperatura ambiente. Los beneficios del perfil del producto incluyen una dosificación menos frecuente, una dosis más baja para la misma área bajo la curva, tratamiento seguro y eficaz para pacientes no tratados previamente, terapia de rescate para pacientes con anticuerpos neutralizantes, en la administración subcutánea a domicilio, jeringa/autoinyector precargado con almacenamiento a temperatura ambiente, agujas de jeringa de mayor calibre (diámetro inferior), menores volúmenes de inyección y mayor vida útil. En el apartado de fabricación, pueden lograrse la síntesis en un solo recipiente, pesos moleculares muy elevados, arquitecturas complejas y bajo coste de fabricación. Además, es posible la conjugación de polímero a fármaco con alta eficacia. Estos beneficios de fabricación pueden traducirse en medicinas más baratas y más disponibles y con mayores márgenes brutos.

60 También se describe la unión de polímeros que contienen zwitteriones de alto PM a multímeros de dominios de clase A de receptor de LDL modificados recombinantes o secuencias consenso relevantes como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos 60/514.391 asignada a Avidia. Los expertos en la materia entenderán que los avímeros se pueden empobrecer en lisina y luego se pueden agregar lisinas y/u otros aminoácidos a los extremos N y/o C para la unión específica al sitio de un polímero funcionalizado. Una lisina N-terminal es preferentemente el segundo aminoácido (después de la metionina) y puede impulsar la conjugación específica de sitio relativo de un

iniciador impulsado por amina, tal como un polímero funcionalizado que contiene un grupo aldehído o acetal. Los expertos en la materia también conocerán el beneficio de las composiciones de avímeros con aminoácidos relativamente hidrófilos y bajo pI y alta estabilidad, de tal manera que puede bajarse mucho el pH en la reacción de conjugación, tal como para conjugar preferencialmente a la amina de la lisina en lugar de las uniones multipunto que también se conjugan al grupo amina N-terminal u otros grupos amina presentes en la proteína. El agente terapéutico puede tener un polímero conjugado con el extremo N y otro conjugado al extremo C mediante una lisina C-terminal (una estructura ramificada efectiva). Dicho avímero también puede producirse en sistemas de mamífero con una cisteína adicional N o C-terminal añadida para la conjugación de sitio específico con un polímero funcionalizado que reacciona con tiol. El grupo funcional del polímero también puede contener elementos dirigidos a los tejidos. La química que une el polímero al avímero puede ser flexible de modo que se rompa *in vivo*, por ejemplo en suero o en una forma de respuesta al pH, etc. Los monómeros y multímeros compuestos de otros dominios de interés utilizados de manera similar incluyen dominios EGF, dominios Notch/INR, dominios DSL, dominios anato, dominios de integrina beta u otros dominios como los descritos en la familia de patentes a las que se hace referencia.

También se describe la unión de polímeros que contienen zwitterión de alto PM a péptidos y péptidos sintéticos y especialmente péptidos sintéticos más largos con múltiples dominios. Un gran problema con los péptidos de múltiples dominios es que son inestables y también tienen un aclaramiento muy rápido. La unión de un polímero que contiene zwitterión altamente biocompatible como los descritos en el presente documento resuelve estos problemas. El polímero aumenta la estabilidad y también aumenta el tiempo de residencia *in vivo*. Esto permite péptidos lineales simples (no estructurados) como fármacos, por ejemplo, módulos de alrededor de veinte aminoácidos por módulo funcional en series de dos, tres, cuatro o más módulos con el objetivo de lograr un beneficio de avidez o un beneficio multifuncional. Cada módulo también podría tener un poco de estructura (como un péptido "restringido") o cada módulo podría ser un dominio peptídico anudado, tal como un nudo de cisteína o un elemento macrocíclico. La clave es que se produzca sintéticamente y pueden ensartarse juntos con un resto de sitio específico para la conjugación del polímero en N-terminal o C-terminal (o ambos) o con el punto de conjugación con el polímero en medio, pudiendo ser dicho punto de unión un aminoácido de sitio específico que es un aminoácido natural o un aminoácido no natural. En un sentido, este es un avímero sintético con propiedades preferenciales. Todos los aminoácidos pueden ser sintéticos, también. Dicho péptido más los polímeros descritos en el presente documento describen un nuevo y poderoso formato de fármaco del futuro.

Los expertos en la materia entenderán que la amplitud de la aplicación de los polímeros de alto peso molecular descritos en el presente documento es muy amplia. Una lista parcial de las modalidades terapéuticas que pueden beneficiarse de la conjugación de tales polímeros consiste en: avímero (armazón de dominio A del receptor LDL), adnectina (armazón de fibronectina tipo III), Ablynx (camélido, familia de las llamas), NAR (tiburón), anticuerpos de un brazo y/o un solo dominio de todas las especies (rata, conejo, tiburón, llama, camello, otro), diacuerpos, otras proteínas basadas en múltiples dominios, tales como multímeros de dominios de fibronectina modificados, fragmentos de anticuerpos (monómero scFv, dímeros scFv como agonistas o antagonistas), Fab, Fab'-2, dominios extracelulares solubles (sTNFR1, por ejemplo o fragmento de receptor cMet soluble), combinación con Amunix XTEN que comprende una cadena de aminoácidos hidrófilos de hasta 1.500 aminoácidos como parte del marco de lectura abierto, oligonucleótidos tales como aptámeros, microARN, ARNip, anticuerpos completos (conjugados con la región Fc; conjugado a regiones no Fc), fusiones de Fc (conjugado a regiones no Fc; conjugado a proteína fusionada), el uso de dichos polímeros como reemplazo para el armazón de anticuerpo CovX (donde se conjuga un polímero de mayor peso molecular directamente al péptido en sí), más ampliamente la unión de los polímeros de esta invención incluso a un anticuerpo natural o muteína de longitud completa (cuerpo CovX, pepticuerpo, humanizado u otro anticuerpo, la nueva plataforma Zyngenia de Carlos Barbas, donde los péptidos se conjugan en diferentes ubicaciones en el anticuerpo para crear fármacos modulares multifuncionales en la parte superior del armazón de un anticuerpo). Véanse también las diversas estructuras de dominio indicadas en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 60/514.391. De particular interés son los conjugados para unirse e inhibir las dianas de la superficie celular, situación en la cual las arquitecturas de gran tamaño en forma extendida y bajas velocidades de disociación de los conjugados de polímero descritos en la presente invención pueden tener un efecto biológico particularmente ventajoso.

La presente divulgación describe conjugados para administración oftálmica y preferentemente intravítrea o subconjuntiva que tienen una semivida terminal media intravítrea de más de 10 días, según se mide por la presencia física de conjugado activo. El conjugado activo también puede contener dos agentes funcionales, unidos covalentemente a un extremo del polímero. En este caso, los dos agentes funcionales podrían ser aptámeros para VEGF y PDGF para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad húmeda y seca.

También se contempla la conjugación de los polímeros de alto PM descritos en el presente documento a GLP-1, receptor TACI soluble, BAFF, así como los inhibidores de BAFF, insulina y sus variantes, muteína IL-12 (equivalente funcional de anti-IL-23), equivalente de anti-IL-17, FGF21 y muteínas, ligando RANK y sus antagonistas, factor H y proteínas de fusión para la inhibición la alternativa de complemento (Taligen), inhibidores de la sinapsis inmunitaria, activadores de la sinapsis inmunitaria, inhibidores de las vías coestimuladoras de linfocitos T y/o linfocitos B, activadores o inhibidores de células neuronales y/o sus células de matriz de soporte, enzimas de la matriz extracelular, tales como lisil oxidada o metaloproteinasas/metaloproteasas, activadores o inhibidores de linfocitos T reguladores o células productoras de anticuerpos, como protectores de células de procesos inflamatorios o de eliminación, tales como unión a células beta del páncreas y de este modo ejerciendo una función protectora para prolongar la vida útil

de la célula en el organismo (es decir, la reparación de la biocompatibilidad mediante la unión de estas a células o tejidos o proteínas en el organismo que puedan beneficiarse de un refuerzo de la biocompatibilidad para reducir la eliminación y/o su implicación en procesos localizados o generalizados, ya sean activos o pasivos), para tratar enfermedades genéticas, para hacer de chaperona de una proteína existente pero mal plegada, para estimular la colocalización de dos entidades solubles o de la superficie celular, tal como asociando un módulo inhibidor de la superficie celular (ITIM) a un módulo activador de la superficie celular (ITAM) para inhibir un tipo celular, tal como un mastocito.

También se contempla el uso de los polímeros descritos en el presente documento para mediar la penetración celular. Por ejemplo, la conjugación de los polímeros descritos en el presente documento a través de su estructura iniciadora o extremos terminales a uno o más péptidos derivados de proteínas y péptidos anfipáticos, tanto secundarios como primarios (Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17, 638-642). Los expertos en la materia también reconocerán la posibilidad de combinación con la tecnología de péptidos grapados que agrega restos de hidrocarburos a los péptidos para facilitar la penetración celular.

También se contempla la combinación de la invención con otras tecnologías de administración de fármacos, tales como PLGA. Así como la naturaleza hidrófila de PEG mejoró varias propiedades de PLGA, la tecnología de polímeros de alto PM descrita en el presente documento debería mejorar aún más esto. Por ejemplo, el aumento de la carga de fármaco como un porcentaje de la masa total (estado de la técnica biofarmacéutica actual <20 % pero generalmente menor del 10 %), también generalmente el % de estallido es >5 %. La unión al agua mejorada de los polímeros de la presente invención impulsa la solubilidad e impulsa una mayor carga y mejor rendimiento *in vivo* de PLGA cargado con conjugado biofarmacéutico-polímero.

La presente divulgación contempla conjugados que demuestran una menor inmunogenicidad para un conjugado de fármaco-polímero particular (por lo que habrá una incidencia reducida de anticuerpos neutralizantes). También contempla escudamiento, enmascaramiento o desinmunización. No es que los anticuerpos neutralizantes existentes se eliminen, sino que el conjugado fármaco-polímero se puede administrar a pacientes que ya tienen o han tenido una respuesta de anticuerpos de forma nativa o porque el paciente en particular se trató previamente con un medicamento biofarmacéutico inmunogénico y desarrolló anticuerpos. En este último conjunto de pacientes, la presente invención contempla la capacidad de "rescatar" a dichos pacientes y volver a habilitarlos para recibir terapia. Esto es útil, por ejemplo, con el Factor VIII porque los pacientes pueden mantenerse en la terapia con Factor VIII (en lugar de fallar y luego pasan a una terapia con Factor VII, por ejemplo). Estos aspectos de protección del sistema inmunológico de la tecnología actual también permiten que los medicamentos se formulen para inyección subcutánea o sin agujas, donde las poblaciones de células inmunes dendríticas locales y otras innatas y adaptativas aumentan la incidencia de inmunogenicidad. En la medida que los conjugados de fármaco-polímero de la presente invención reducen la inmunogenicidad *de novo* y se esconden de los anticuerpos neutralizantes existentes, luego, la tecnología permite la dosificación subcutánea y evita las interacciones de anticuerpos y, por lo tanto, amplía la base de pacientes elegibles y también disminuye la incidencia de eventos adversos relacionados con la inyección, como la anafilaxis.

La presente divulgación permite la posibilidad de incluir diferentes poblaciones de conjugado de polímero para el mismo o diferentes restos terapéuticos para combinar en una única formulación. El resultado es diseñar cuidadosamente las propiedades *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, tomar un solo resto terapéutico y conjugarlo o bien en un solo recipiente o en recipientes separados a dos polímeros de tamaño y arquitectura diferentes. Las dos poblaciones se comportarán de manera diferente. *in vivo*. Una población puede ser más pequeña o contener menos polímeros ramificados. La segunda población puede tener arquitecturas mayores y más ramificadas. El conjugado con los polímeros más pequeños se eliminará más rápidamente. Esto es excelente como dosis de carga o como un bolo específicamente, por ejemplo, para eliminar las citocinas existentes (por ejemplo, con la conjugación de un scFv anti-TNF o anti-IL-6 como resto del fármaco) del suero. El conjugado con los polímeros más grandes se eliminará de forma más lenta y eliminará el TNF α o la IL-6 producidos *de novo*, por ejemplo. Esto se puede hacer con diferentes proporciones de las poblaciones, por ejemplo, 1:1 o 2:1 o 10:1 o 100:1, etc. El resto terapéutico conjugado es el mismo, pero hay diferentes propiedades finales como resultado de los diferentes polímeros conjugados y es otra forma de impactar la biología. Otro ejemplo sería con insulina u otras proteínas agonistas, donde el objetivo es tener una inyección única que tenga tanto un aspecto de bolo (actividad rápida) como también un aspecto basal (prolongado). Para el factor VIII, una población de Factor VIII conjugado puede tener un conector hidrolizable entre el polímero y la enzima, por lo que la enzima se desprende rápidamente. La segunda población podría tener un enlazador estable y, por lo tanto, proporcionar un aspecto de mayor duración (crónica, profilaxis).

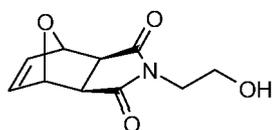
La presente divulgación puede crear conjugados de tal manera que después de la inyección IV y/o SC, se consigue una cinética de orden cero de liberación. La duración la liberación (1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 12 meses) dependerá del tamaño y la arquitectura y de la química de enlazador del polímero. Esto puede ser funcionalmente equivalente a un dispositivo médico o bomba que libera una cantidad constante de medicamento desde un reservorio geográficamente localizado. En el caso de la presente divulgación, el fármaco no estará contenido físicamente. En cambio, estará en circulación continua o gracias a su direccionamiento, se enriquecerá en un tejido particular, pero está diseñado de manera tal que el inicio es similar o equivalente a una cinética de orden cero con liberación lineal y ráfaga mínima y equivalente a una carga del 100%.

Los expertos en la materia reconocerán que la presente divulgación permite la introducción de puntos de ruptura o puntos débiles en los polímeros e iniciadores, de modo que las estructuras de polímeros más grandes y/o los conjugados se descompongan con el tiempo en piezas más pequeñas que se eliminen fácil y rápidamente por el cuerpo. Los ejemplos de primer orden incluyen un enlazador sensible entre el iniciador y el fármaco, enlaces éster en cualquier lugar (iniciador, armazón polimérico, monómeros). Dichos puntos débiles pueden romperse de manera pasiva (por ejemplo, mediante hidrólisis) o activa (mediante enzimas). Otros enfoques para impulsar la descomposición o eliminación pueden incluir el uso de grupos protectores o químicos de profármacos de manera que, con el tiempo, se produce un cambio en la química expuesta, impulsando dicha química expuesta la destrucción o dirige al conjugado de polímero liberado al riñón o al hígado u otro sitio para su destrucción o eliminación.

VII. Ejemplos

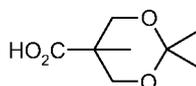
En los ejemplos 98, 99, 103-106 y 119, se desvelan conjugados con un peso molecular de 50 kDa a 1.500 kDa y un IPD de menos de 2. Los ejemplos quedan fuera del ámbito de las reivindicaciones se incluyen con propósitos de referencia.

Ejemplo 1. Preparación de N-(2-hidroxiethyl)-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida



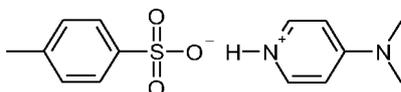
Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 50 ml de etanol y 2,0 gramos de anhídrido exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftálico. La mezcla en agitación se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo y se añadió gota a gota una solución de 0,73 gramos de etanolamina en 20 ml de etanol durante 10 minutos. La reacción se calentó a reflujo durante 4 horas, después se refrigeró durante una noche. La filtración y el aclarado con etanol produjeron 0,73 gramos del producto deseado en forma de un sólido cristalino de color blanco. El filtrado se concentró y se enfrió de nuevo para obtener un segundo cultivo de cristal. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,90 (s, 2H, CH), 3,71 (m, 2H, OCH₂), 3,77 (t, J = 5,0 Hz, NCH₂), 5,29 (t, J = 1,0 Hz, 2H, OCH), 6,53 (t, J = 1,0 Hz, 2H, CH=CH).

Ejemplo 2. Preparación de ácido isopropilideno-2,2-bis(hidroxiacetil)propiónico



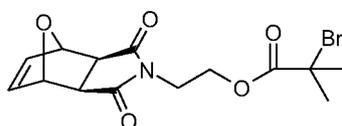
Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 50 ml de acetona, 13,8 ml de 2,2-dimetoxipropano, 10 gramos de ácido 2,2-bis(hidroxiacetil)propiónico y 0,71 gramos de monohidrato del ácido p-toluenosulfónico. La mezcla se agitó durante dos horas a temperatura ambiente, después se neutralizó con 1 ml de amoniaco 2 M en metanol. El disolvente se evaporó y la mezcla se disolvió en diclorometano, después se extrajo dos veces con 20 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó para dar 10,8 gramos del producto en forma de un sólido cristalino de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,20 (s, 3H, CH₃CC=O), 1,43 (s, 3H, CH₃), 1,46 (s, 3H, CH₃), 3,70 (d, J=12,4 Hz, 2H, OCH₂), 4,17 (d, J = 12,4 Hz, 2H, OCH₂).

Ejemplo 3. Preparación de p-toluenosulfonato de N,N-dimetilpiridinio (DPTS)



Una solución de 1,9 gramos de monohidrato del ácido p-toluenosulfónico en 10 ml de benceno se secó mediante destilación azeotrópica usando un purgador Dean-Stark, después se añadieron 3,42 gramos de 4-dimetilaminopiridina. Se formó mucho sólido y se necesitaron 25 ml más de benceno para movilizar la reacción, que se agitó lentamente según se enfriaba a temperatura ambiente. El sólido resultante se aisló por filtración, se lavó con 10 ml de benceno y se secó para producir 7,88 gramos del producto en forma de un sólido de color blanco.

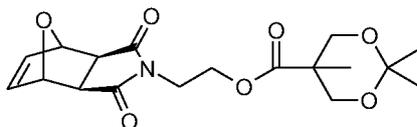
Ejemplo 4. Preparación de iniciador de bromopropionato de maleimida protegido



Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 50 ml de tetrahidrofurano, 2 gramos de N-(2-hidroxi-etil)-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida y 2,0 ml de trietilamina. La mezcla en agitación se enfrió a 0 grados y se añadió gota a gota una solución de 1,18 ml de bromuro de 2-bromoisobutirilo en 5 ml de tetrahidrofurano durante 30 minutos. La reacción se dejó en agitación en hielo durante 3 horas, seguido de temperatura ambiente durante una noche. La concentración de la mezcla de reacción dio un residuo oleoso, que se purificó por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 30-50 % en hexano, dando 1,96 gramos del producto deseado en forma de un polvo de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,89 (s, 6H, CH₃), 2,87 (s, 2H, CH), 3,82 (t, J = 5,4 Hz, 2H, NCH₂), 4,33 (t, J = 5,4 Hz, 2H, OCH₂), 5,27 (t, J = 1,0 Hz, 2H, OCH), 6,51 (t, J = 1,0 Hz, 2H, CH_{vinilo}).

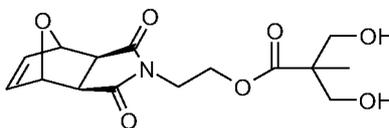
Ejemplo 5. Preparación de iniciador de bis(bromopropionato) de maleimida protegido

Ácido de isopropilideno maleimida protegido.



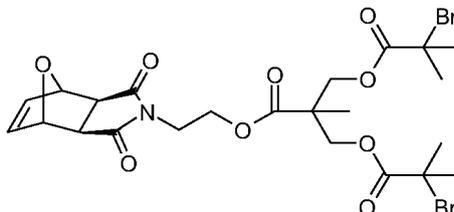
Una solución de 2,00 gramos de N-(2-hidroxi-etil)-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida y 1,67 gramos de ácido isopropilideno-2,2-bis(hidroxi-metil)propiónico en 30 ml de diclorometano seco, junto con 563 mg de DPTS se trató gota a gota con una solución de 2,37 gramos de N,N'-diciclohexilcarbodiimida en 10 ml de diclorometano seco. Comenzó a formarse mucho sólido según la mezcla de reacción se agitaba a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró y el precipitado se lavó con una pequeña cantidad de diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se concentraron para dar un aceite transparente que contenía una pequeña cantidad de sólido. Este aceite se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, usando en primer lugar 20-100 % de acetato de etilo en hexano. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para dar 3,17 gramos del producto final en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,19 (s, 3H, CH₃CC=OO), 1,37 (s, 3H, CH₃), 1,41 (s, 3H, CH₃), 1,55 (s, 6H, (CH₃)₂C), 2,86 (s, 2H, C=OCHCHC=O), 3,58 (d, J = 12 Hz, CH₂O), 3,78 (t, J = 5,4 Hz, CH₂CH₂O), 4,14 (d, J = 12 Hz, CH₂O), 4,30 (t, J = 5,4 Hz, CH₂CH₂O), 5,27 (t, 2H, CHOCH), 6,51 (s, 2H, CH=CH).

Diol de maleimida protegido.



Una solución del compuesto de isopropilideno de antes en 50 ml de metanol se trató con 1,0 gramos de resina de intercambio iónico Dowex 50Wx8-100 (forma H⁺) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, momento en el cual la reacción pareció completa según TLC (gel de sílice, acetato de etilo). La mezcla se filtró y la resina sólida se lavó con una pequeña cantidad de metanol. Los extractos orgánicos combinados se concentraron y se pusieron a alto vacío para dar 1,55 gramos de un aceite ligeramente turbio, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

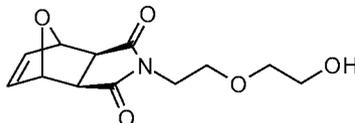
Iniciador de bis(bromopropionato) de maleimida protegido.



Una solución del producto en bruto de antes en 40 ml de tetrahidrofurano anhidro (THF), junto con 1,45 ml de trietilamina, se enfrió en un baño de agua enfriada con hielo y se añadió gota a gota una solución de 1,23 ml de bromuro de 2-bromoisobutirilo en 20 ml de THF anhidro durante unos pocos minutos. La reacción se agitó en el frío durante 30 minutos, después se dejó calentar a temperatura ambiente durante 6 horas. Se añadieron 600 μl más de trietilamina, seguido de 0,5 ml más de bromuro de 2-bromoisobutirilo. La reacción era ácida según un papel de pH, por lo que se añadieron 200 μl más de trietilamina para llevar el pH de la solución a 9. La reacción se agitó durante una noche, se concentró y el residuo se repartió entre 50 ml de diclorometano y 50 ml de agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró para dar un aceite. Esto se sometió a cromatografía en columna

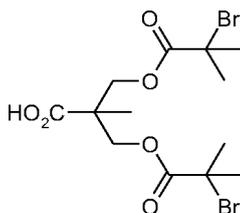
ultrarrápida sobre gel de sílice, en primer lugar con 20 %, después con 30 % y finalmente con 40 % de acetato de etilo en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 1,63 g de un aceite que se solidificó a un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,32 (s, 3H, CH₃CC=O), 1,91 [s, 12H, (CH₃)₂CBr], 2,90 (s, 2H, CHC=O), 3,78 (t, 2H, NCH₂CH₂O), 4,28 (t, 2H, NCH₂CH₂O), 4,31 (c app, 4H, CH₂OC=O), 5,30 (s, 2H, CHOCH), 6,52 (s, 2H, CH=CH).

Ejemplo 6. Preparación de N-[2-(2-hidroxi)etil]-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida



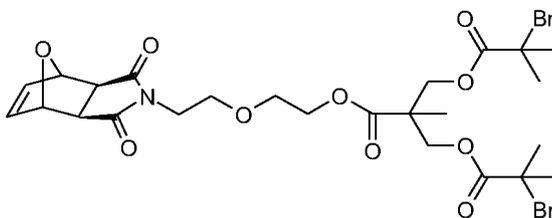
Un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 100 ml de metanol y 20 gramos de anhídrido exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftálico. La mezcla en agitación se enfrió a 0 grados y se añadió gota a gota una solución de 0,73 gramos de 2-(2-amino)etanol en 40 ml de metanol durante 45 minutos. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se calentó a reflujo suave durante una noche. La solución se concentró y el producto se disolvió en 100 ml de diclorometano, después se lavó con 100 ml de salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico, se concentró y se purificó mediante un paso a través de un lecho de gel de sílice con 100 ml de diclorometano y 100 ml de acetato de etilo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,90 (s, 2H, CH), 3,49 (m, 2H, OCH₂), 3,59 (m, 4H, OCH₂), 3,65 (m, 2H, NCH₂), 5,15 (t, J = 0,8 Hz, 2H, OCH), 6,55 (t, J = 0,8 Hz, 2H, CH=CH).

Ejemplo 7. Preparación de ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutil)hidroximetil]propiónico



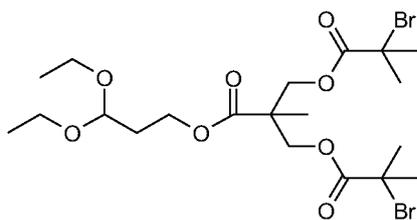
Un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 200 ml de diclorometano, 8,0 gramos de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico y 33,5 ml de trietilamina. La mezcla en agitación se enfrió a 0 grados y se añadió gota a gota una solución de 14,7 ml de bromuro de 2-bromoisobutilo en 30 ml de diclorometano durante 30 minutos. La reacción se dejó en agitación en hielo durante 1,5 horas, después se dejó calentar a temperatura ambiente durante una noche. El precipitado se llevó a solución con más cantidad de diclorometano y la mezcla se lavó con 400 ml de ácido clorhídrico 0,5 N y se secó sobre sulfato sódico anhidro. La concentración de la mezcla de reacción dio un residuo oleoso, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 30-40 % en hexano que contenía ácido acético al 1 %, dando 27,4 gramos del producto deseado en forma de un sólido ceroso de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ = 1,33 (s, 3H, CCH₃), 1,90 (s, 12H, (CH₃)₂CBr), 4,30 (d, J = 5,4 Hz, 2H, NCH₂), 4,39 (d, J = 5,4 Hz, 2H, OCH₂).

Ejemplo 8. Preparación de iniciador de bis(bromopropionato) extendido de maleimida protegido



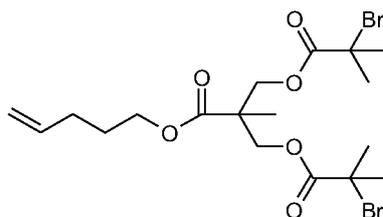
Un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 100 ml de diclorometano, 1,0 gramos de N-[2-(2-hidroxi)etil]-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida, 2,5 gramos del dibromo ácido del Ejemplo 7, 0,5 gramos de dimetilaminopiridina y 0,35 gramos de DPTS. Se burbujeó nitrógeno brevemente a través de la solución y se añadieron lentamente 1,6 gramos de DCC. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. La filtración y la evaporación dio un residuo oleoso de color rosa, que se purificó por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ = 1,34 (s, 3H, CH₃), 1,90 (s, 6H, CH₃), 2,94 (s, 2H, CH), 3,64 (m, 6H, OCH₂), 4,22 (t, J = 5,4 Hz, 2H, NCH₂), 4,35 (c app, 4H, OCH₂), 5,15 (t, J = 1,0 Hz, 2H, OCH), 6,54 (t, J = 1,0 Hz, 2H, CH=CH).

Ejemplo 9. Preparación de iniciador de acetal bis(bromopropionato)



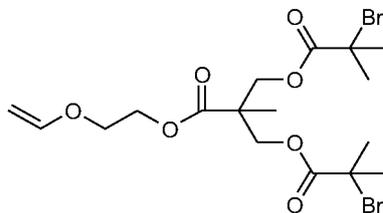
5 A una solución de 1,03 gramos de 3,3-dietoxi-1-propanol y 3,0 gramos de ácido 2,2-bis(2-
 bromoisobutiloximetil)propiónico en 50 ml de diclorometano, junto con 817 mg de p-toluenosulfonato de N,N-
 dimetilpiridinio, se trató con 1,58 gramos de N,N'-diciclohexilcarbodiimida y la reacción se agitó a temperatura ambiente
 durante una noche. La reacción se filtró y el precipitado se lavó con una pequeña cantidad de diclorometano. Los
 extractos orgánicos combinados se concentraron y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida
 10 sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10-20 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto deseado se
 combinaron y se concentraron para dar 2,87 gramos de un aceite incoloro y transparente. Este material todavía no era
 puro según RMN ¹H, por lo que se sometió de nuevo cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando
 diclorometano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 2,00 gramos del producto
 deseado en forma de un aceite viscoso y transparente. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,20 (t, 6H, CH₃CH₂O), 1,34
 (s, 3H, CH₃CC=O), 1,92 [s, 12H, (CH₃)₂CBr], 1,98 (c app, 2H, CHCH₂CH₂), 3,50 (m, 2H, OCH₂CH₃), 3,66 (m, 2H,
 15 OCH₂CH₃), 4,24 (t, 2H, CH₂CH₂OC=O), 4,37 (c app, 4H, CH₂OC=OCBr), 4,60 (t, 1H, O-CH-O).

Ejemplo 10. Preparación de iniciador de bis(bromopropionato) de vinilo 1



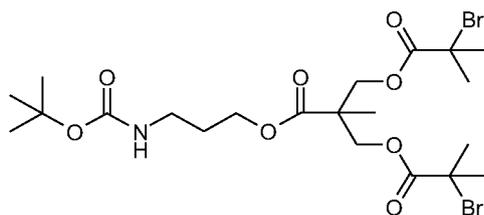
20 Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 30 ml de diclorometano, 86
 miligramos de 4-penten-1-ol, 432 miligramos del dibromo ácido del Ejemplo 7 y 88 miligramos de DPTS. Se burbujeó
 nitrógeno brevemente a través de la solución y se añadieron lentamente 169 µl de N,N'-diisopropilcarbodiimida. La
 reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche, después se añadieron 0,1 gramos de DPTS
 y la reacción se agitó de nuevo durante una noche. La filtración y la evaporación dio un residuo oleoso, que se purificó
 25 por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 20-40 % en hexano. El disolvente se retiró
 del primer producto que salió de la columna, produciendo 0,13 gramos del producto deseado en forma de un aceite
 incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ = 1,34 (s, 3H, CH₃), 1,77 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1,90 (s, 12H, CH₃), 2,15 (c, J
 = 7,2 Hz, 2H, CHCH₂CH₂), 4,16 (t, J = 6,4 Hz, 2H, OCH₂), 4,36 (c app., 4H, CCH₂O), 5,02 (m, 2H, CH₂=CH), 5,82 (m,
 30 1H, CH₂=CH).

Ejemplo 11. Preparación de iniciador de bis(bromopropionato) de vinilo 2



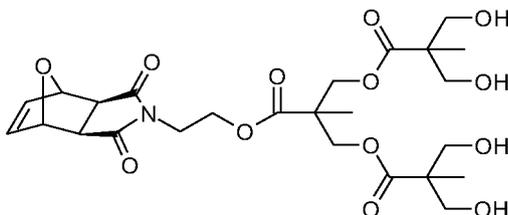
35 Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 25 ml de diclorometano,
 370 miligramos de monovinil éter de etilenglicol, 432 miligramos del dibromo ácido del Ejemplo 7 y 590 gramos de
 DPTS. El matraz se lavó abundantemente con nitrógeno y se añadieron lentamente 681 µl de N,N'-
 diisopropilcarbodiimida. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se
 40 filtró y después se secó sobre gel de sílice para cromatografía ultrarrápida usando acetato de etilo al 5-10 % en hexano,
 produciendo el producto en forma de un aceite incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,36 (s, 3H, CH₃), 1,92 (s,
 12H, CH₃), 3,90 (c app., J = 5,4 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 4,05 (dd, 1H, J = 2,4, 6,8 Hz, =CH), 4,19 (dd, J = 2,4, 14,4 Hz,
 1H, =CH), 4,39 (m, 2H, NCH₂CH₂O), 4,40 (c app, 4H, OCH₂), 6,45 (dd, 1H, J = 6,8, 14,4 Hz, =CHO).

45 Ejemplo 12. Preparación de iniciador de boc-amino bis(maleimida)



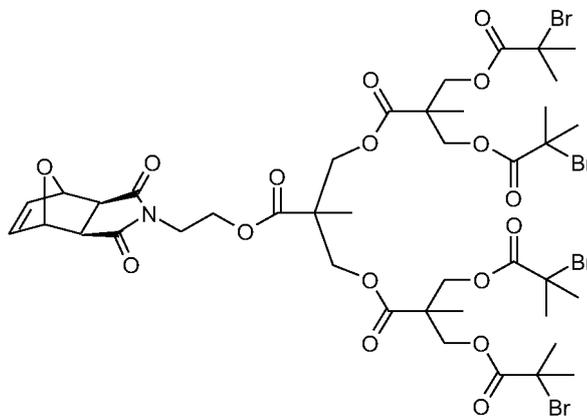
Una solución de 2,19 gramos de N-Boc-3-amino-1-propanol y 5,20 gramos de ácido 2,2-bis(2-bromoisobutiriloximetil)propiónico en 50 ml de diclorometano, junto con 350 mg de DPTS, se trató con 3,0 gramos de N,N'-diciclohexilcarbodiimida y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se filtró y el precipitado se lavó con una pequeña cantidad de diclorometano. La concentración dio un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 5-20 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar un aceite que contenía un poco de residuo sólido. Este material se recogió en acetato de etilo y se filtró. La concentración dio de nuevo un aceite que todavía contenía un poco de sólido, por lo que el material se recogió de nuevo en acetato de etilo, se filtró y se concentró para dar el producto deseado en forma de un aceite transparente. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,8 (s a, 1H, NH), 4,37 (c app, 4H, CH₂OC=OBr), 4,22 (t, 2H, CH₂CH₂OC=O), 3,20 (c app, 2H, NHCH₂), 1,92 [s, 12H, (CH₃)₂CBr], 1,85 (t, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1,43 (s, 9H, (CH₃)₃O), 1,35 (s, CH₃CC=O).

15 Ejemplo 13. Preparación de 4-ol de maleimida protegido



Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 30 ml de diclorometano, 1,6 gramos del diol del Ejemplo 7, 1,71 gramos de ácido isopropilideno-2,2-bis(hidroximetil)propiónico y 0,5 gramos de DPTS. Se burbujeó nitrógeno brevemente a través de la solución, se añadieron lentamente 1,70 ml de N,N'-diisopropilcarbodiimida y la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. La filtración y la evaporación dio un residuo oleoso, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 10-40 % en hexano. Una segunda purificación por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando metanol al 2 % en diclorometano produjo aproximadamente 2 gramos de aceite incoloro. Este aceite se disolvió en 25 ml de metanol y se agitó durante 60 horas a temperatura ambiente con resina Dowex 50WX8-100 (forma H⁺). La reacción se filtró, se concentró, después se pasó a través de un lecho de gel de sílice con 150 ml de metanol al 15 % en diclorometano. La evaporación produjo 1,3 gramos de una espuma dura prácticamente incolora. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,13 (s, 6H, CH₃), 1,25 (s, 3H, CH₃), 2,96 (s, 2H, CHC=ON), 3,57-3,65 (m, 8H, CH₂OH), 3,64 (t, J = 2,8 Hz, 2H, CH₂CH₂OC=O), 4,22 (c app., 4H, C(CH₃)CH₂OC=O), 4,22 (t, J = 2,8 Hz, CH₂CH₂OC=O), 5,21 (t, J = 0,8 Hz, CHOCH), 6,55 (t, J = 0,8 Hz, CH=CH).

Ejemplo 14. Preparación de iniciador de tetra(bromopropionato) de maleimida protegido



Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 20 ml de diclorometano, 0,55 gramos del tetraol del Ejemplo 13 y 1,69 ml de trietilamina. La mezcla en agitación se enfrió a 0 grados y se

añadió gota a gota una solución de 0,99 ml de bromuro de 2-bromoisobutirilo en 10 ml de diclorometano. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche, después se lavó con 50 ml de bicarbonato sódico semisaturado. La concentración de la mezcla de reacción dio un residuo oleoso de color pardo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 40 % en hexano. El residuo de color pardo se disolvió en metanol y se trató con carbón para retirar el color, produciendo 0,68 gramos del producto deseado en forma de un aceite de color pardo claro. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,26$ (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CC}=\text{O}$), 1,34 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{CC}=\text{O}$), 1,90 (s, 24H, $(\text{CH}_3)_2\text{CBr}$), 2,95 (s, 2H, CH), 3,78 (t, $J = 5$ Hz, 2H, NCH_2), 4,25 (m, 6H, OCH_2C (4H) y $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ (2H)), 4,35 (c app, 8H, OCH_2), 5,23 (t, $J = 1$ Hz, 2H, CHOCH), 6,55 (t, $J = 1$ Hz, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$).

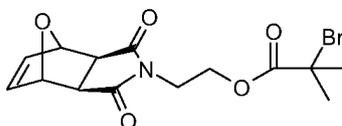
10 Ejemplo 15. Preparación de polímeros zwitteriónicos de alto peso molecular

Un protocolo representativo para producir polímeros hidrófilos hechos a medida de alto peso molecular del monómero zwitteriónico, 2-metacrililoietil fosforilcolina (HEMA-PC), usando un proceso de radicales libres controlados "vivos", polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), es como se indica a continuación.

15

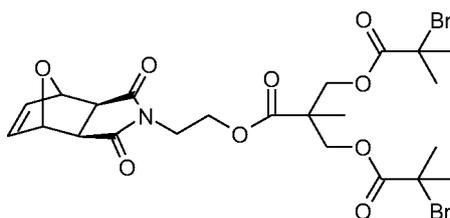
Se utilizaron los siguientes iniciadores:

PMC2M1 (del Ejemplo 4)



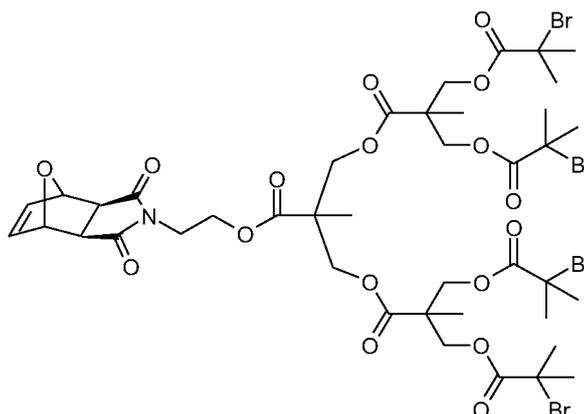
20

PMC2M2 (del Ejemplo 5)



25

PMC2M4 (del Ejemplo 14)



30 El iniciador y el ligando (2,2'-bipiridilo) se introdujeron en un tubo Schlenk. Se introdujo gota a gota dimetil formamida o dimetilsulfóxido de modo que el porcentaje en peso del iniciador y el ligando fue aproximadamente 20 %. La solución resultante se enfrió a -78 °C usando una mezcla de hielo seco/acetona y se desgasificó al vacío durante 10 min. El tubo se cargó de nuevo en una atmósfera de nitrógeno y el catalizador (CuBr a menos que se indique otra cosa), se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno, se introdujo en el tubo Schlenk (la proporción molar de bromo/catalizador/ligando se mantuvo a 1/1/2). La solución se volvió inmediatamente de color pardo oscuro. El tubo Schlenk se cerró herméticamente y se mantuvo a -78 °C. La solución se purgó aplicando un ciclo de vacío/nitrógeno tres veces. Se preparó una solución de HEMA-PC mezclando una cantidad definida de monómero, se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno, con etanol desgasificado de graduación 100 %. La solución de monómero se añadió gota a gota en el tubo Schlenk y se homogeneizó mediante una ligera agitación. La temperatura se mantuvo a -78 °C. Se aplicó un vacío completo a la mezcla de reacción durante al menos 10 a 15 min hasta que cesó el burbujeo de la solución. Después el tubo se cargó de nuevo con nitrógeno y se calentó a temperatura ambiente. La solución se agitó, y según procedía la polimerización, la solución se volvió viscosa. Después de 3 a 8 horas, la reacción se interrumpió

35

40

mediante exposición directa al aire para oxidar Cu (I) a Cu (II), la mezcla se volvió de color azul-verde y se pasó a través de una columna de sílice para retirar el catalizador de cobre. La solución recogida se concentró por evaporación rotatoria y la mezcla resultante se precipitó con tetrahidrofurano o se dializó frente a agua, seguido de criodesecado para producir un polvo de color blanco de flujo libre.

5

Los datos de varias reacciones de polimerización se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Iniciador	Iniciador (μmol)	Monómero (g)	Catalizador (μmol)	Ligando (μmol)	Etanol (ml)	GPC (g/mol)	GPC (IPD)	Conversión de monómero
1	PMC2M1	10,4	1,05	10,4	21,0	4,0	54000	1,22	83 %
2	PMC2M1	10,5	2,11	10,5	21,0	8,0	110000	1,38	97 %
3	PMC2M2	10,2*	1,14	22,6	45,0	3,7**	50000	1,15	92 %
4	PMC2M2	4,87	0,97	9,75	19,4	4,0	100000	1,16	98 %
5	PMC2M2	4,87	3,03	9,75	19,4	9,2	198000	1,11	70 %
6	PMC2M4	5,85	1,17	23,3	47,0	4,0	91300	1,06	93 %
7	PMC2M4	4,72	2,21	18,8	38,0	8,0	176650	1,16	87 %

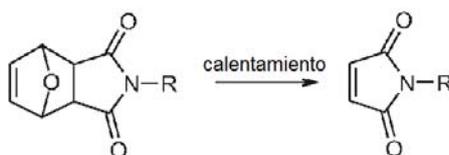
* CuCl
** Isopropanol/etanol (2/1, v/v)

El peso molecular máximo (g/mol) y la polidispersidad (IPD) se determinaron mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) en una columna Shodex OHpak SB-806M HQ calibrada con patrones de poli(óxido de etileno).

5 **Ejemplo 16. Desprotección de polímeros funcionalizados con maleimida protegida con furano usando reacción inversa a Diels-Alder**

Los polímeros del Ejemplo 15 se disolvieron en etanol (del 20 al 50 % p/p) en un matraz de fondo redondo. El etanol se retiró lentamente por evaporación rotatoria para hacer una película fina sobre la pared del matraz. El recipiente de reacción se puso en un baño de aceite a una temperatura de al menos 110 °C durante 90 min al vacío y después se enfrió a temperatura ambiente.

La desprotección del grupo funcional de maleimida se controló por RMN ¹H (400 MHz, d-metanol):



15 Antes de desprotección: δ (ppm): 5,2 (2H, -CH-O-CH-) y 6,6 (2H, -CH=CH-).

Después de desprotección: δ (ppm): 6,95 (2H, -CO-CH=CH-CO-).

20 **Ejemplo 17. Digestión con pepsina de IgG humana y purificación de fragmentos F(ab')₂**

Se adquirió IgG humana completa de Innovative Research, Jackson Immunochem y/o Rockland Laboratories para su uso en la producción de fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ para la conjugación con los polímeros funcionalizados del ejemplo 15. La IgG se digirió usando pepsina inmovilizada (Thermo Scientific) después de ajustar el pH a 4,5 con tampón de acetato de sodio, ya sea mediante diálisis o utilizando una columna de desalinización PD-10 (GE Healthcare). Después del ajuste del pH, se lavó tres veces una cantidad de 0,5 ml de pepsina inmovilizada con tampón de acetato de sodio, pH 4 y se resuspendió en un volumen final de 0,5 ml. Se añadió 1 ml de IgG a la pepsina inmovilizada a una concentración de 10 mg/ml y se colocó en un mecedor/agitador a 37 °C. Se dejó que la digestión se produjese durante cuatro horas. Después de cuatro horas, se retiró una muestra de 40 μ l y se analizó mediante HPLC usando una columna Shodex Protein KW-802.5 con una fase móvil de PBS. El pico de IgG se resolvió a partir del pico de F(ab')₂ y la progresión de la digestión se determinó basándose en el porcentaje digerido. La pepsina inmovilizada es una enzima proteolítica utilizada para generar fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ al eliminar solo los dominios Fc más allá de las regiones bisagra. Esto da como resultado fragmentos F(ab')₂ compuestos por dos fragmentos Fab' que se unen a anticuerpos conectados por un enlace disulfuro covalente en la región bisagra.

Después de la digestión de IgG en F(ab')₂, se centrifugaron las muestras para separar el gel de la pepsina inmovilizada de los fragmentos de anticuerpo digeridos y se lavó tres veces la resina. Los enjuagues se combinaron con el sobrenadante original. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se purificaron a partir de los fragmentos Fc utilizando una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) y PBS. El F(ab')₂ purificado se eluyó primero seguido de fragmentos Fc. El F(ab')₂ purificado se almacenó a 2-8 °C.

Ejemplo 18. Conjugación de polímeros funcionalizados con maleimida a fragmentos Fab'

Se produjeron fragmentos Fab' a partir de la preparación de F(ab')₂ del ejemplo 17 mediante reducción de los enlaces disulfuro usando borohidruro de sodio a una concentración final de 15 mM en solución. La preparación de F(ab')₂ se diluyó con PBS que contenía EDTA 4 mM y se añadió un volumen igual de borohidruro de sodio en el mismo tampón y la mezcla se colocó en una placa de agitación a temperatura ambiente. Se dejó que la reacción transcurriera durante 1-1,5 horas a temperatura ambiente y se monitorizó el progreso de la reducción mediante HPLC usando una columna Shodex Protein KW-802.5 y PBS como fase móvil. La reducción se consideró completa cuando se había consumido más del 90 % del F(ab')₂. Inmediatamente después de la reducción de disulfuro, se ajustó el pH de la mezcla hasta aproximadamente 4-5 con HCl 0,1 N. Después de ajustar el pH de la solución, la muestra se mezcló durante 10 minutos adicionales y luego se ajustó el pH hasta 6,5-7,5 usando NaOH 0,1 N. Mientras se agita, se añadió a la mezcla un exceso 10 molar de un polímero funcionalizado con maleimida del ejemplo 16 y se incubó a temperatura ambiente. Se retiró una muestra en el momento cero para su análisis por HPLC y nuevamente a las 1 y 2 horas para monitorizar el progreso de la reacción. Se equipó un sistema de HPLC 2695 de Waters Alliance 2695 con un detector de fotiododos Waters 2996 y una columna Shodex Protein KW-803 con una fase móvil de PBS. La eficiencia de conjugación se controló a 220 nm y 280 nm. Después de 2 horas, las muestras se purificaron utilizando un AKTA Prime Plus (GE Healthcare) y una columna de exclusión por tamaños preparativa Superdex 200 HR 10/30. El tampón de elución usado fue PBS. El Fab' conjugado con polímero eluyó en primer lugar, seguido de polímero libre y Fab' sin reaccionar. Las fracciones recogidas se analizaron usando la columna Shodex Protein KW-803 con fase móvil de PBS. Las fracciones

que contenían el conjugado Fab' purificado se combinaron y se concentraron usando filtros Vivaspin 2 (3000 MWCO) de Sartorius.

Ejemplo 19. Conjugación de aptámero anti-VEGF a polímero funcionalizado con maleimida de 200 kDa

Aptámero anti-VEGF (Agilent, Boulder, CO) que contenía una amina terminal se conjugó con el polímero funcionalizado con maleimida del ejemplo 15 (Muestra 5) después de la desprotección de acuerdo con el ejemplo 16. Se usó reactivo de Traut para convertir la amina terminal a un tiol como se expone a continuación. Se disolvió aptámero (5,4 mg) en 500 µl de tampón de bicarbonato de sodio 0,1 M, pH=8,0. En un vial separado, Se disolvieron 7,2 mg de 2-iminotiolano HCl (Reactivo de Traut, Sigma) en 3,6 ml de agua purificada para producir una solución de 2 mg/ml. Se añadió una cantidad de 100 µl de 2-iminotiolano HCl a la mezcla de aptámero y se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La muestra de aptámero que contenía el reactivo de Traut se pasó sobre una columna de desalinización PD-10 para eliminar cualquier 2-iminotiolano sin reaccionar y el tampón final se cambió a PBS que contenía EDTA 4 mM. Una pequeña porción de la muestra de aptámero que contenía el grupo tiol terminal se mezcló a temperatura ambiente con una barra de agitación y se agregaron a la reacción 14,0 mg de polímero funcionalizado con maleimida, agitando constantemente. Se retiró una muestra de 60 µl en el momento 0 para el análisis por HPLC usando una columna KW-803, fase móvil de PBS y un caudal de 1 ml/min. Las muestras se monitorizaron a longitudes de onda de 220 y 280 nm, así como por detección de índice de refracción. Las alícuotas se retiraron y se probaron después de 2 horas y nuevamente después de agitar a 4 °C durante la noche.

El conjugado de aptámero se purificó utilizando un gradiente isocrático en un sistema Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) con tampón de fosfato como eluyente. El conjugado purificado se eluyó primero, seguido del polímero sin reaccionar y el aptámero residual.

Ejemplo 20. Preparación de microesferas de PLGA utilizando conjugado de polímero-aptámero

El conjugado de polímero-aptámero del ejemplo 19 se formuló en una mezcla de disolventes de aceite en aceite con microesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). El conjugado de polímero-aptámero (20 mg) se suspendió en una solución de 100 mg/ml de PLGA en cloroformo al 0,1 % en diclorometano a temperatura ambiente. El conjugado suspendido se mezcló con poli(dimetil)siloxano para producir una dispersión homogénea de las microesferas. La mezcla se transfirió a un matraz que contenía heptano y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Las microesferas resultantes se aislaron y se recogieron utilizando un filtro de 0,2 micrómetros y se secaron al vacío durante la noche.

Ejemplo 21. Conjugación de muteína de factor VIII a polímero funcionalizado con maleimida de 50, 100 y 200 kDa (polímero de 2 brazos) y a polímero funcionalizado de 100 y 200 kDa (polímero de 4 brazos)

La conjugación de sitio específico de BDD Factor VIII con muteína de cisteína (Patente de los Estados Unidos 7.632.921) se redujo usando Tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP) inmovilizada o ditionitriol (DTT) para liberar el "remate". Tras la reducción, el agente reductor, TCEP inmovilizado, se eliminó mediante centrifugación, o cuando se usó TDT, la eliminación se realizó utilizando una columna de desalinización PD-10 (GE Healthcare). La cisteína reducida en BDD Factor VIII se trató con un exceso molar de 1 a 10 veces de los polímeros funcionalizados con maleimida del ejemplo 16 con pesos moleculares de 50-200 kDa (2 brazos) o 100-200 kDa (4 brazos) hasta 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Las muestras finales conjugadas de BDD Factor VIII se purificaron usando cromatografía de intercambio aniónico usando un gradiente de cloruro de sodio. La muteína conjugada se separó del Factor VIII no reaccionado y del polímero funcionalizado con maleimida libre. Las muestras fraccionadas se analizaron mediante SEC HPLC y SDS-PAGE para su confirmación. Todas las fracciones que contenían la muteína conjugada del Factor VIII se combinaron y se intercambiaron con el tampón utilizando columnas desaladoras PD-10 en la formulación final en tampón de fosfato de sodio. En determinados casos, dependiendo del peso molecular del polímero funcionalizado con maleimida utilizado en las reacciones de conjugación, se requirió una purificación adicional utilizando SEC para separar el Factor VIII conjugado de las especies que no reaccionaron.

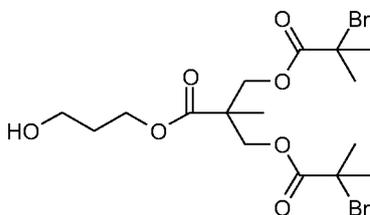
Ejemplo 22. Conjugación de scFv a polímeros funcionalizados con maleimida de 50-200 kDa

Los fragmentos scFv modificados con cisteínas protegidas en el extremo C-terminal se diluyeron con PBS que contenía EDTA 4 mM y se añadió un volumen igual de borohidruro de sodio en el mismo tampón. La mezcla se colocó en una placa de agitación a temperatura ambiente. Como alternativa, la reducción se llevó a cabo utilizando TCEP inmovilizado en un intervalo de pH de 6-7. Se dejó que la reacción transcurriera durante 0,5-2 horas a temperatura ambiente y se monitorizó el progreso de la reducción mediante HPLC usando una columna Shodex Protein KW-802.5 y PBS como fase móvil. Inmediatamente después de la reducción de disulfuro, Las muestras se hicieron reaccionar mientras se agitaba con un exceso 10 molar de un polímero funcionalizado con maleimida del ejemplo 16 a temperatura ambiente. Se retiró una muestra en el momento cero para su análisis por HPLC y nuevamente a las 1 y 2 horas para monitorizar el progreso de la reacción. Se equipó un sistema de HPLC 2695 de Waters Alliance 2695 con un detector de fotodiodos Waters 2996 y una columna Shodex Protein KW-803 con una fase móvil de PBS. La eficiencia de conjugación se controló a 220 nm y 280 nm. Después de 2 horas, las muestras se purificaron utilizando un AKTA Prime Plus (GE Healthcare) y una columna de exclusión por tamaños preparativa Superdex 200 HR 10/30.

El tampón de elución usado fue PBS. El scFv conjugado con polímero eluyó en primer lugar, seguido de polímero libre y Fab' sin reaccionar. Las fracciones recogidas se analizaron usando la columna Shodex Protein KW-803 con fase móvil de PBS. Las fracciones que contenían el conjugado de scFv purificado se combinaron y se concentraron usando filtros Vivaspin 2 (3000 MWCO) de Sartorius.

5

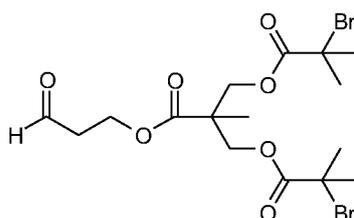
Ejemplo 23. Síntesis de ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 3-hidroxiopropil éster



Una solución de 4,40 gramos de 1,3-propanodiol y 5,00 gramos de ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico (del Ejemplo 7) en 50 ml de acetonitrilo seco, junto con 500 mg de DPTS, se trató con 2,86 gramos de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la reacción se filtró y el filtrado se concentró para dar un aceite que contenía un poco de sólido. Este se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30 % en hexano y las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 1,75 gramos del producto en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,35 (s, 3H, CCH₃), 1,92 (s y solapamiento m, 14H, (CH₃)₂CBr y CH₂CH₂CH₂), 3,71 (c app., J = 6 Hz, 2H, HOCH₂), 4,31 (t, J = 6 Hz, 2H, CH₂OC=O), 4,37 (c app, 4H, CH₂OC=OCBr).

20

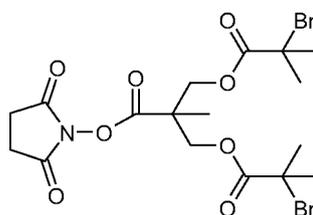
Ejemplo 24. Síntesis de ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 3-oxopropanol éster



Una solución de 1,01 gramos de ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 3-hidroxiopropil éster (del Ejemplo 23) en 25 ml de diclorometano se trató con 1,75 gramos de peryodinato de Dess-Martin [Org. Synth. Coll. Vol. X, 696 (2004)] y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, momento en el cual la reacción parecía estar completa según TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 30 % en hexano). La reacción se filtró y se concentró, y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30 % en hexanos para dar 730 mg del producto de aldehído deseado en forma de un aceite incoloro y transparente, que se protegió de la luz y se almacenó en el frigorífico en una caja de guantes cargada con nitrógeno. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,33 (s, 3H, CCH₃), 1,92 (s, 12H, (CH₃)₂CBr), 2,83 (t, J = 6,4 Hz, 2H, HC=OCH₂), 4,34 (c app, 4H, OCH₂), 4,48 (t, J = 6,4 Hz, HC=OCH₂CH₂), 9,79 (s a, 1H, CHO).

35

Ejemplo 25. Ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, N-hidroxisuccinimida éster



Una solución de 500 mg de ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico (del Ejemplo 7) y 133 mg de N-hidroxisuccinimida en 5 ml de diclorometano se trató con 286 mg de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, momento en el cual la reacción parecía estar completa según TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 30 % en hexano). La reacción se filtró y se concentró, y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 518 mg del éster de NHS deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,55 (s, 3H, CCH₃), 1,95 (s, 12H, (CH₃)₂CBr), 2,84 (s ancho, 4H, O=CCH₂CH₂C=O), 4,49 (s, 4H, CH₂OC=OCBr).

45

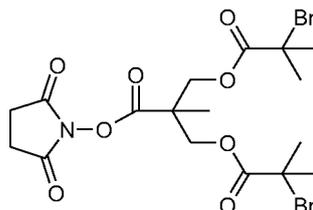
Ejemplo 26. Preparación de polímeros zwitteriónicos de alto peso molecular funcionalizados con aldehído y

éster de NHS

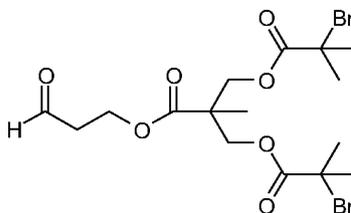
Un protocolo representativo para producir polímeros hidrófilos hechos a medida de alto peso molecular del monómero zwitteriónico, 2-metacrililoilietil fosforilcolina (HEMA-PC), usando un proceso de radicales libres controlados "vivos", polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), es como se indica a continuación.

Se utilizaron los siguientes iniciadores:

NHSM2 (del Ejemplo 25)



AIC2M2 (del Ejemplo 24)



El iniciador y el ligando (2,2'-bipiridilo) se introdujeron en un tubo Schlenk. Se introdujo gota a gota dimetil formamida o dimetilsulfóxido de modo que el porcentaje en peso del iniciador y el ligando fue aproximadamente 20 %. La solución resultante se enfrió a -78 °C usando una mezcla de hielo seco/acetona y se desgasificó al vacío durante 10 min. El tubo se cargó de nuevo en una atmósfera de nitrógeno y el catalizador (CuBr a menos que se indique otra cosa), se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno, se introdujo en el tubo Schlenck (la proporción molar de bromo/catalizador/ligando se mantuvo a 1/1/2). La solución se volvió inmediatamente de color pardo oscuro. El tubo Schlenk se cerró herméticamente y se mantuvo a -78 °C. La solución se purgó aplicando un ciclo de vacío/nitrógeno tres veces. Se preparó una solución de HEMA-PC mezclando una cantidad definida de monómero, se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno, con etanol desgasificado de graduación 100 %. La solución de monómero se añadió gota a gota en el tubo Schlenk y se homogeneizó mediante una ligera agitación. La temperatura se mantuvo a -78 °C. Se aplicó un vacío completo a la mezcla de reacción durante al menos 10 a 15 min hasta que cesó el burbujeo de la solución. Después el tubo se cargó de nuevo con nitrógeno y se calentó a temperatura ambiente. La solución se agitó, y según procedía la polimerización, la solución se volvió viscosa. Después de 3 a 8 horas, la reacción se interrumpió mediante exposición directa al aire para oxidar Cu (I) a Cu (II), la mezcla se volvió de color azul-verde y se pasó a través de una columna de sílice para retirar el catalizador de cobre. La solución recogida se concentró por evaporación rotatoria y la mezcla resultante se precipitó con tetrahidrofurano o se dializó frente a agua, seguido de criodesecado para producir un polvo de color blanco de flujo libre.

Los datos de las reacciones de polimerización se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Iniciador	Iniciador (μmol)	Monómero (g)	Catalizador (μmol)	Ligando (μmol)	Etanol (ml)	GPC (g/mol)
1	NHSM2	13,5	2,03	27,0	54,1	8,0	81250
2	AIC2M2	13,5	2,03	27,0	54,1	8,0	83000

Ejemplo 27. Conjugación de la hormona del crecimiento humana a polímero funcionalizado con aldehído de 75 kDa

Se preparó una muestra de hormona de crecimiento humana (hGH) a una concentración de 10 mg/ml en tampón fosfato. En un matraz independiente, se pesó cianoborohidruro de sodio a una concentración de 100 mM y se diluyó en 10 ml de tampón de fosfato de sodio, el documento pH6. Esto se usó inmediatamente después de diluir con PBS. Se añadió un volumen igual de cianoborohidruro de sodio en solución a la mezcla de reacción que contenía el polímero funcionalizado con aldehído del ejemplo 26 y hGH. La reacción se mezcló a temperatura ambiente o a 4 °C durante la noche. El porcentaje de conjugación de la reacción se controló mediante HPLC usando una columna Shodex Protein KW-803 y PBS como la fase móvil.

Las muestras se purificaron utilizando el AKTA Prime Plus (GE Healthcare) y la columna de exclusión por tamaños preparativa Superdex 200 HR 10/30. El tampón de elución usado fue PBS. La hGH conjugada se eluyó primero seguida por el polímero funcionalizado con aldehído libre y la hGH sin reaccionar. Las fracciones recogidas se analizaron mediante HPLC usando una columna Shodex Protein KW-803 con fase móvil de PBS. Las fracciones que contenían el conjugado de hGH purificado se combinaron y se concentraron usando filtros Vivaspin 2 (3000 MWCO) de Sartorius.

Ejemplo 28. Conjugación de hematida a polímero funcionalizado con éster de NHS de 75 kDa

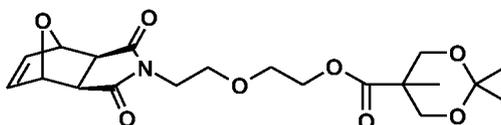
Se intercambié el tampón de una solución de Hematida a una concentración entre 1-10 mg/ml con un tampón por un tampón de borato de sodio 0,1 M, pH 9, usando una columna de desalación PD-10 (GE Healthcare). El polímero funcionalizado con éster de NHS del ejemplo 26 se añadió en un exceso de 10 molar a las muestras en constante agitación de Hematida a temperatura ambiente. Las reacciones se produjeron a temperatura ambiente durante 2 horas o durante la noche a 4 °C. Las muestras para determinar el grado de conjugación se analizaron mediante HPLC utilizando una columna Shodex KW-803 y una fase móvil de PBS. Se extrajeron partes alícuotas de las muestras en el momento cero y a las 1 y 2 horas después de la conjugación. Al cabo de dos horas o después de la noche, se añadió glicina 1 M para inactivar la reacción.

Las muestras se purificaron utilizando un AKTA Prime Plus (GE Healthcare) y una columna de exclusión por tamaños preparativa Superdex 200 HR 10/30. El tampón de elución usado fue PBS. El polímero funcionalizado con éster de NHS conjugado con hematida eluyó primero seguido de polímero libre, Hematida sin reaccionar y otras moléculas pequeñas. Las fracciones recogidas se analizaron mediante HPLC usando una columna Shodex Protein KW-803 con fase móvil de PBS. Las fracciones que contenían el conjugado de Hematida purificado se combinaron y se concentraron usando filtros Vivaspin 2 (3000 MWCO) de Sartorius.

Ejemplo 29. Polimerización a alta presión de HEMA-PC

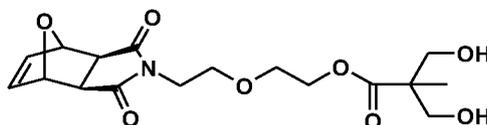
La polimerización del monómero de HEMA-PC a alta presión se realizó en un recipiente a presión de acero inoxidable revestido de vidrio. La proporción de HEMA-PC/iniciador de maleimida protegida de 2 brazos (del Ejemplo 8/CuBr/bipiridilo) varió de 500-10000/1/2/4; T = 22 °C en etanol; [HEMA-PC]₀ = 0,86 M en etanol con DMF (1-1,5 %p/p en etanol). La presión varió de 1 bar a 6 kbar.

Ejemplo 30. Preparación de N-[2-(2-hidroxietoxi)etil]-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida, isopropilideno-2,2-bis(hidroxi)metil)propionato



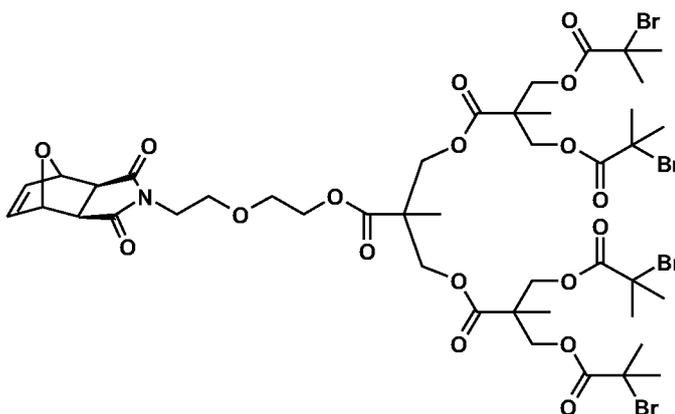
Una solución de 11,0 gramos de N-[2-(2-hidroxietoxi)etil]-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida y 8,22 gramos de ácido isopropilideno-2,2-bis(hidroxi)metil)propiónico en 250 ml de diclorometano, junto con 1,3 gramos de DPTS y 5,24 gramos de DMAP se trató con 12,9 gramos de DCC y la reacción se agitó durante una noche. La reacción se filtró y se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida en dos porciones sobre gel de sílice con acetato de etilo al 40 - 50 % en hexano para dar el producto deseado en forma de un aceite transparente.

Ejemplo 31. Preparación de N-[2-(2-hidroxietoxi)etil]-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida, 2,2-bis(hidroxi)metil)propionato



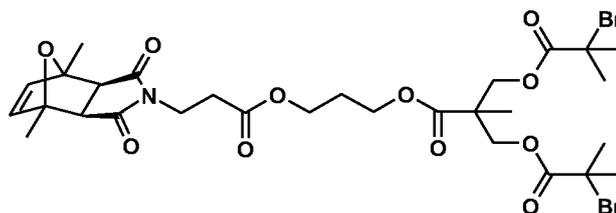
El producto de antes se disolvió en 100 ml de metanol y se trató con 2,0 gramos de resina de intercambio iónico Dowex 50Wx8-100 (forma H⁺) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró y se concentró para dar el producto deseado en forma de un aceite que se usó sin purificación adicional. RMN (CD₃OD): δ 6,546 (t, 2H, CH=CH, J = 0,8 Hz), 5,158 (t, 2H, CH-O, J = 0,8 Hz), 4,180 (m, 2H, CH₂-CH₂-O-C=O, J = 4,9 Hz), 3,63 (m, 10H, N-CH₂ y N-CH₂-CH₂ y CH₂-CH₂-O-C=O y CH₂-OH), 2,936 (s, 2H, CH-CH), 1,147 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 32. Preparación de iniciador de N-[2-(2-hidroxietoxi)etil]-exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftalimida, 2,2-bis-[2,2-bis(2-bromo)isobutirilo] propioniloximetil) propionato



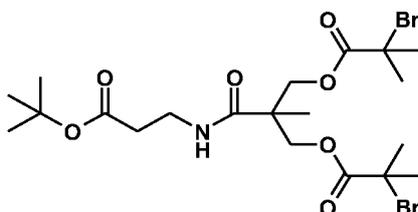
5 A una solución de 1,5 gramos del diol de la etapa previa y 3,72 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico en 50 ml de diclorometano, junto con 500 mg de DPTS y 810 mg de DMAP, se trató con 1,40 gramos de diisopropilcarbodiimida y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se concentró y el residuo se sometió a cromatografía varias veces sobre gel de sílice con acetato de etilo al 40 % en hexano. Las fracciones apropiadas en cada caso se combinaron y se concentraron para dar el producto deseado en forma de un aceite. RMN (CD₃OD): δ 6,55 (t, 2H, CH=CH, J = 0,8 Hz), 5,17 (t, 2H, CH-O, J = 0,8 Hz), 3,34 (m, 12H, CCH₂), 4,23 (m, 2H, CH₂-CH₂-O-C=O, J = 4,7 Hz), 3,68 (m, 2H, N-CH₂, J = 4,7 Hz), 3,64 (c app, 4H, N-CH₂-CH₂ y CH₂-CH₂-O-C=O), 2,95 (s, 2H, CH-CH), 1,907 (s, 24H, Br-C-CH₃), 1,34 (s, 6H, CH₃), 1,308 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 33. Preparación de iniciador de N-(ácido 3-propiónico)-exo-3,6-epoxi-3,6-dimetil-1,2,3,6-tetrahidroftalimida, éster con ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 3-hidroxiopropil éster



15 Una solución de 738 mg de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 3-hidroxiopropil éster y 399 mg de N-(ácido 3-propiónico)-exo-3,6-epoxi-3,6-dimetil-1,2,3,6-tetrahidroftalimida en 20 ml de acetonitrilo seco, junto con 50 mg de DPTS y 100 mg de DMAP, se trató con 375 mg de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30 - 40 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 1,02 gramos del producto deseado en forma de un aceite transparente. Según RMN ¹H, parecía que aproximadamente un 10 % del producto ya había experimentado una reacción inversa a Diels-Alder. RMN (CDCl₃): δ 6,19 (s, 2H, CH=CH), 4,37 (c app, 4H, CCH₂O, J = 10,9, 29,7 Hz), 4,23 (t, 2H, CH₂CH₂O, J = 6,3 Hz), 4,15 (t, 2H, CH₂CH₂O, J = 6,3 Hz), 3,62 (t, 2H, NCH₂, J = 7,4 Hz), 3,22 (s, 2H, CHC=O), 2,48 (t, 2H, CH₂C=O, J = 7,4 Hz), 2,00 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂, J = 6,3 Hz), 1,92 (s, 12H, Br-C (CH₃)₂), 1,78 (s, 6H, CH₃), 1,35 (s, 3H, CH₃).

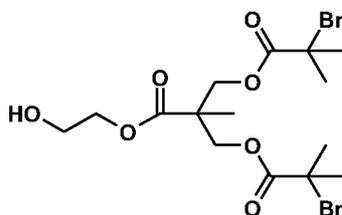
Ejemplo 34. Preparación de N-(ácido 3-propiónico, t-butil éster)-2,2-Bis[(2-bromoisobutiriloxi) metil] propionamida



35 Una solución de 1,00 gramos de clorhidrato de éster t-butílico de b-alanina en 50 ml de diclorometano se trató con 25 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Las capas se separaron y los materiales orgánicos se secaron sobre sulfato sódico. A esta solución se le añadieron 2,38 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, seguido de 1,92 ml de diisopropiletilamina y 2,1 gramos de HBTU y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 50 ml más de diclorometano, se lavó con 2 x 50 ml de agua y se secó sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron un aceite, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida con acetato de etilo al 20 - 25 % en hexano. Las

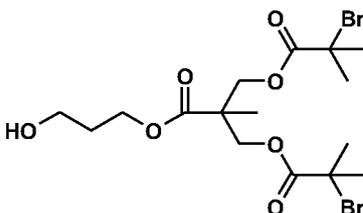
fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 730 mg de un sólido de color blanco. RMN (CDCl₃): δ 6,70 (t, 1H, NH, J = 5,4 Hz), 4,33 (c app, 4H, CH₂O, J = 16,3, 11,4 Hz), 3,51 (c, 2H, NCH₂, J = 6,0 Hz), 2,46 (t, 2H, CH₂CO, J = 6,0 Hz), 1,93 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,33 (s, 3H, CH₃).

5 **Ejemplo 35. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 2-hidroxietil éster**



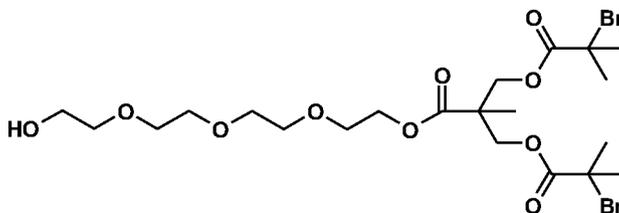
10 Una solución de 4,32 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico y 12,41 gramos de etilenglicol en 50 ml de diclorometano, junto con 883 mg de DPTS se trató con 1,39 gramos de diisopropilcarbodiimida y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 20 % - 40 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 2,7 gramos del producto deseado en forma de un aceite transparente. RMN (CD₃OD): δ 4,38 (c app., 4H, CCH₂, J = 11,2, 30,2 Hz), 4,20 (t, 2H, CH₂OH, J = 5,0 Hz), 3,75 (t, 2H, CH₂CH₂OH, J = 5,0 Hz), 1,90 (s, 12H, Br-CCH₃), 1,36 (s, 3H, CH₃).

20 **Ejemplo 36. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 3-hidroxi-propil éster**



25 Una solución de 5,31 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico y 4,68 gramos de 1,3-propanodiol en 80 ml de diclorometano y 20 ml de acetonitrilo se trató con 1,0 gramos de DPTS, seguido de 3,0 gramos de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, la reacción se filtró, se concentró y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar un aceite transparente, que no era del todo puro. La recromatografía sobre gel de sílice con acetona al 10 - 15 % en hexano dio el producto deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN (CDCl₃): δ 4,38 (c app., 4H, CCH₂O, J = 11,2 Hz), 4,31 (t, 2H, CH₂CH₂O, J = 6,3 Hz), 3,71 (c, 2H, CH₂OH, J = 5,9 Hz), 1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,9 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1,35 (s, 3H, CH₃).

35 **Ejemplo 37. Iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 11-hidroxi-3,6,9-trioxaundecanoato**

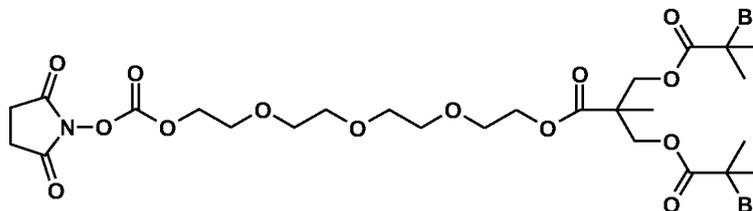


40 Una solución de 1,86 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico y 4,18 gramos de tetraetilenglicol en 50 ml de diclorometano, junto con 250 mg de DPTS, se trató con 1,15 gramos de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró y el filtrado se diluyó con 50 ml de diclorometano y se lavó con 20 ml de agua. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en primer lugar con acetato de etilo al 50 - 70 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron, se filtraron y se concentraron para dar 1,19 gramos del producto deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN (CDCl₃): δ 4,38 (c app., 4H, CCH₂O, J = 31,8, 11,2 Hz), 4,31 (t, 2H, CH₂CH₂OC=O, J = 5,0 Hz), 3,6 - 3,73 (m, 14H, CH₂O), 2,46 (t, 1H, OH, J = 6,3 Hz),

1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,35 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 38. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 11-hidroxi-3,6,9-trioxaundecanoato, carbonato de NHS

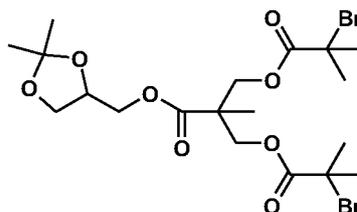
5



Una solución de 630 gramos del compuesto de hidroxilo anterior y 1,28 gramos de carbonato de disuccinimidilo en 3 ml de acetonitrilo seco se trató con 610 mg de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente. La reacción todavía era heterogénea, por lo que se añadieron 4 ml de THF seco, y después de 2 horas, la reacción se volvió de color amarillo y se hizo homogénea, pero contenía varias manchas en la TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 50 % en hexano). La reacción se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 50 - 60 % en hexano. Se aislaron dos fracciones, y la fracción con el Fr más bajo se concentró para dar 260 mg del producto deseado en forma de un aceite transparente. RMN (CDCl₃): δ 4,47 (m, 2H, CH₂O(C=O)O), 4,37 (c app, 4H, CCH₂O, J = 11,2, 31,6 Hz), 4,30 (m, 2H, CH₂CH₂O(C=O)C), 3,79 (m, 2H, CH₂CH₂O(C=O)C), 3,71 (t, 2H, CH₂CH₂O(C=O)O, J = 5,0 Hz), 3,67 (s, 4H, CH₂O), 3,65 (s, 4H, CH₂O), 2,84 (s, 4H, CH₂C=O), 1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,35 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 39. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, éster de solcetal

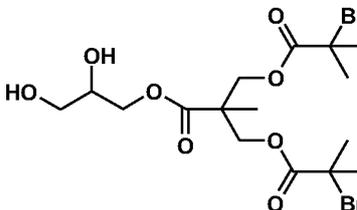
20



Una solución de 918 mg de solcetal y 3,0 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, junto con 200 mg de DPTS se trató con 2,15 gramos de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 1,85 gramos del producto deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN (CDCl₃): δ 4,38 (c app., 4H, CCH₂O), 4,32 (m, 1H, OCH), 4,19 (m, 2H, CHCH₂OC=O), 4,07 (d de d, 1H, OCH₂CH, J = 6,7, 8,6 Hz), 3,76 (d de d, 1H, OCH₂CH, J = 5,7, 8,6 Hz), 1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,43 (s, 3H, (CH₃)₂CO), 1,36 (s, 3H, CH₃), 1,35 (s, 3H, (CH₃)₂CO).

Ejemplo 40. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 2,3-dihidroxipropil éster

30

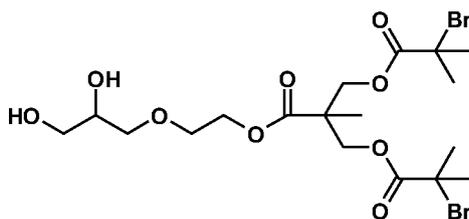


35

Una solución de 1,0 gramos del cetal previo en 50 ml de metanol se trató con 750 mg de Dowex 50Wx8-100 y la reacción se agitó durante una noche. Después, la reacción se filtró, se concentró y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 20 - 40 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 630 mg del producto deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN (CDCl₃+D₂O): δ 4,40 (c app de d, 4H, CCH₂O, J = 2,8, 11,5, 30,2 Hz), 4,24 (c app de d, 2H, CHCH₂OC=O, J = 4,5, 6,6, 11,5 Hz), 3,96 (m, 1H, CH), 3,66 (c app de d, 2H, HOCH₂CH, J = 3,8, 5,6, 11,5, 37,9 Hz), 1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,37 (s, 3H, CH₃).

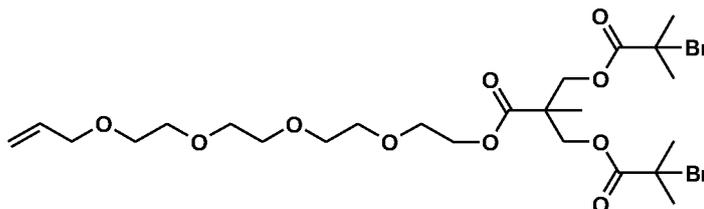
Ejemplo 41. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 2-(2,3-dihidroxipropoxi)etil éster

45



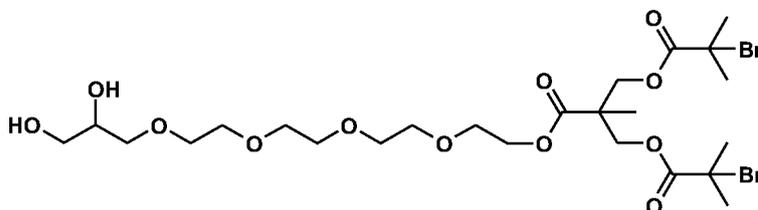
A una solución de 1,5 gramos de ácido 2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]-2-hidroximetilpropiónico, 2-(aliloxi)etil éster en 15 ml de agua y 15 ml de t-butanol se añadieron 2,86 gramos (3 equiv.) de ferricianuro potásico, 1,20 gramos (3 equiv.) de carbonato potásico, 7,5 mg de osmiato potásico dehidrato, 11 mg de quinuclidina y 276 mg (1 equiv.) de metanosulfonamida, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción pareció completa por TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 50 % en hexano), por lo que la reacción se vertió en 100 ml de agua, después se extrajo con 100 ml de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo oleoso, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30 - 40 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron, se trataron con carbono decolorante, se filtraron y se concentraron para dar 850 mg del producto deseado en forma de un aceite casi incoloro. RMN (CDCl₃): δ 4,39 (c app de d, 4H, CCH₂O, J = 4,1, 11,1,3,0, 37,6 Hz), 4,31 (t, 2H, OCH₂CH₂OC=O, J = 4,7 Hz), 3,87 (m, 1H, CH-OH), 3,54 - 3,77 (m, 2H, CH₂-OH), 3,72 (m, 2H, OCH₂CH), 3,58 (t app, 2H, OCH₂CH₂OC=O), 2,68 (d, 1H, CH-OH, J = 5,1 Hz), 2,15 (t app, 1H, CH₂-OH, J = 6,1 Hz), 1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,36 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 42. Iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 12-(aliloxi)-3,6,9,12-tetraoxadodecanoato



A una solución de 1,60 g de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico y 870 mg de 12-(aliloxi)-3,6,9,12-tetraoxadodecano en 30 ml de acetonitrilo seco, junto con 218 mg de DPTS y 362 mg de DMAP, se añadieron 917 mg de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla se filtró y se concentró, y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en primer lugar con acetato de etilo al 50 - 60 % en hexanos, y las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 1,35 gramos del producto deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN (CDCl₃): δ 5,87-5,97 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 5,28 (cd, 1H, H-CH=CH), 5,18 (cd, 1H, H-CH=CH), 4,37 (c app, CH₂OC=O), 4,30 (dd, 2H, CH₂CH₂OC=O), 4,02 (d, 2H, CH₂=CHCH₂), 3,60-3,72 (m, 14H, CH₂CH₂OCH₂), 1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,35 (s, 3H, CH₃).

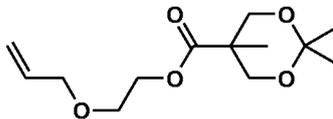
Ejemplo 43. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 12-(2,3-dihidroxipropoxi)-3,6,9,12-tetraoxadodecil éster



A una mezcla de 1,29 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 12-(aliloxi)-3,6,9,12-tetraoxadodecil éster en 15 ml de agua y 15 ml de t-butanol se añadieron 1,98 gramos (3 equiv.) de ferricianuro potásico, 829 mg (3 equiv.) de carbonato potásico, 8 mg de osmiato potásico dehidrato, 11 mg de quinuclidina y 190 mg (1 equiv.) de metanosulfonamida, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción pareció completa por TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 50 % en hexano), por lo que la reacción se vertió en 50 ml de agua, después se extrajo con 100 ml de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo oleoso, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 5 % en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se trataron dos veces con dos pequeñas espátulas de carbono activado, filtrando entre tratamientos. La filtración y la concentración dieron un aceite de color gris claro que contenía una pequeña cantidad

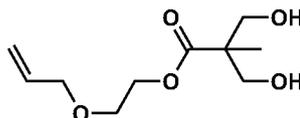
de sólido, por lo que se recogió en acetato de etilo y se filtró, después se concentró para dar 1,06 gramos del producto deseado en forma de un aceite de color gris claro, que todavía contenía una pequeña cantidad de sólido. RMN (CDCl₃): δ 4,38 (c app., 4H, CCH₂OC=O), 4,30 (t, 2H, CH₂CH₂OC=O, J = 5,0 Hz), 3,85 (p, 1H, CHOH, J = 5 Hz), 3,71 (t, 2H, OCH₂CHOH, J = 4,8 Hz), 3,72 - 3,55 (m, 16H, OCH₂CH₂O y CH₂OH), 3,12 (s, 1H, CHOH), 2,37 (s, 1H, CH₂OH), 1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,35 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 44. Preparación de ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico, 2-(aliloxi)etil éster



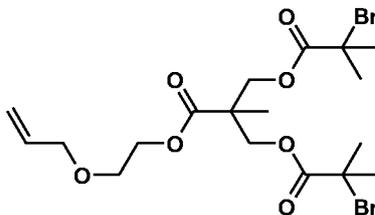
Una solución de 1,4 gramos de monoalil éter de etilenglicol y 2,35 gramos de ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico en 25 ml de THF anhidro se trató con 500 mg de p-toluenosulfonato de 4-dimetilaminopiridinio (DPTS) y 1,44 gramos de dimetilaminopiridina (DMAP), seguido de la adición de 3,38 gramos de dicitohexilcarbodiimida, y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se filtró y se concentró para dar un residuo semisólido, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 20 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se filtraron para dar 2,83 gramos (81 %) de un aceite transparente que contenía una pequeña cantidad de sólido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,23 (s, 3H, C=OCCH₃), 1,39 (s, 3H, CH₃), 1,43 (s, 3H, CH₃), 3,66 (m, 4H), 4,02 (dd, 2H, CH₂=CHCH₂), 4,20 (d, 2H), 4,31 (t, 2H, C=OOCH₂), 5,18 (dd, 1H, =CH), 5,28 (dd, 1H, =CH), 5,89 (m, =CHCH₂).

Ejemplo 45. Ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico, 2-(aliloxi)etil éster



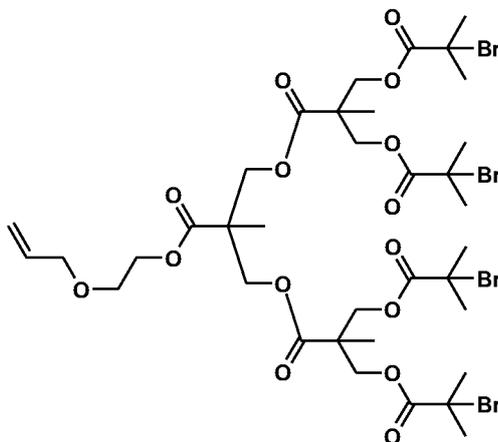
Una solución de 2,72 gramos de ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico, 2-(aliloxi)etil éster en 50 ml de metanol se trató con 1,0 gramo de resina Dowex 50W-X8 (forma H⁺) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró y el filtrado se concentró para dar un aceite, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 5 % en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 2,23 gramos del producto en forma de un aceite transparente de color amarillo claro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,84-5,94 (ddt, 1H, H₂C=CHCH₂), 5,28 (cd, 1H, HHC=CHCH₂), 5,22 (cd, 1H, HHC=CHCH₂), 4,36 (t app, 2H, OCH₂CH₂), 4,02 (dt, 2H, H₂C=CHCH₂), 3,86 (dd, 2H, CH₂OH), 3,74 (dd, 2H, CH₂OH), 3,68 (t app, 2H, OCH₂CH₂), 2,90 (d a, 2H, OH), 1,11 (s, CH₃).

Ejemplo 46. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 2-(aliloxi)etil éster



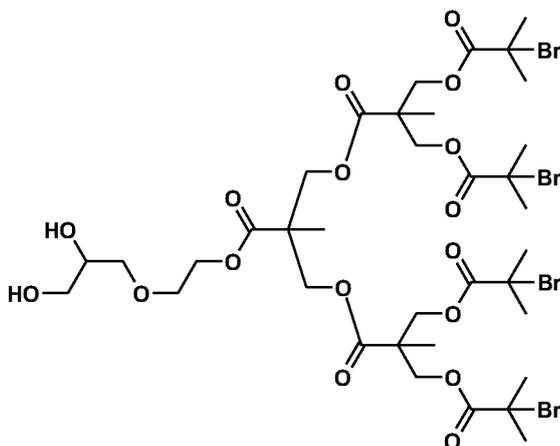
Una solución de 1,2 gramos de aliloxietanol, 5,0 gramos de ácido 2,2-bis(2-bromoisobutiriloximetil)propiónico y 690 mg de DPTS en 100 ml de diclorometano se agitó a temperatura ambiente según se añadían 2,86 gramos de DCC como una solución en una pequeña cantidad de diclorometano. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, después se filtró y se concentró para dar un aceite. Esto se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar un aceite transparente, que no era suficientemente puro. Este aceite se sometió de nuevo a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 3 - 4 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 2,78 gramos del producto deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN (CDCl₃): δ 5,89 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 5,28 (d de c, 1H, H-CH=CH, J = 17,2, 1,7 Hz), 5,20 (d de c, 1H, H-CH=CH, J = 10,5, 1,5 Hz), 4,38 (c app, 4H, CH₂OC=O), 4,31 (t, 2H, OCH₂, J = 4,7 Hz), 4,01 (d de t, 2H, OCH₂, J = 5,6, 1,5 Hz), 3,65 (t, 2H, OCH₂, J = 4,7 Hz), 1,91 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,35 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 47. Iniciador de ácido 2,2-bis-[2,2-bis(2-bromoisobutiriloximetil)propioniloximetil]propiónico, 2-(aliloxi)etil éster



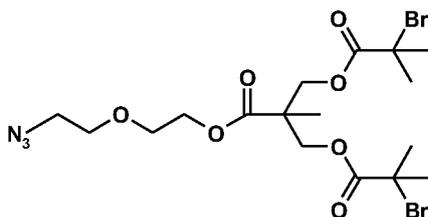
- Una solución de 2,42 gramos de ácido 2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]-2-hidroxi metilpropiónico, 2-(aliloxi)etil éster y 1,73
 5 gramos de ácido 2,2-[bis-(2-bromoisobutiriloxi)metil] propiónico en 25 ml de acetonitrilo seco, junto con 200 mg de
 DPTS y 580 mg de DMAP, se trató con 1,03 gramos de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante
 una noche. Según la TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 30 % en hexano) parecía que la reacción estaba incompleta,
 por lo que se añadieron 812 mg más de ácido 2,2-[bis-(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico y 400 mg de DCC, y la
 10 reacción se agitó de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se filtró y se concentró,
 y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en primer lugar con 20 % y después
 con acetato de etilo al 30 % en hexanos. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron
 para dar 1,27 gramos del compuesto deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN (CDCl₃): δ 5,88 (m,
 1H, CH₂CH=CH₂), 5,28 (d de c, 1H, H-CH=CH, J = 17,4, 1,6 Hz), 5,20 (d de c, 1H, H-CH=CH, J = 10,3, 1,3 Hz), 4,24
 - 4,44 (m, 14H, CH₂OC=O), 4,01 (d, 2H, CH₂=CHCH₂, J = 5,6), 3,65 (t, 2H, CH₂CH₂OCH₂, J = 4,7 Hz), 1,91 (s, 24H,
 15 Br-C (CH₃)₂), 1,33 (s, 6H, CH₃), 1,30 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 48. Preparación de iniciador de 2,2-bis-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 2-[(2,3-dihidroxi)propoxi]etil éster



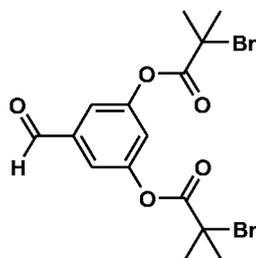
- 20 A una mezcla de 1,21 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, 2-(aliloxi)etil éster en 15 ml de
 agua y 15 ml de t-butanol se añadieron 1,14 gramos (3 equiv.) de ferricianuro potásico, 480 mg (3 equiv.) de carbonato
 25 potásico, 7,5 mg de osmiato potásico dehidrato, 11 mg de quinuclidina y 110 mg (1 equiv.) de metanosulfonamida, y
 la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción parecía completa según la
 TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 50 % en hexano), por lo que la reacción se vertió en 50 ml de agua, después se
 extrajo con 100 ml de diclorometano, seguido de 50 ml más de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados
 se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo oleoso, que se sometió a
 30 cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano y las fracciones que
 contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 620 mg del producto deseado en forma de un aceite
 incoloro y transparente. RMN (CDCl₃): δ 4,28-4,41 (m, 14H, CCH₂OC=O), 3,86 (m, 1H, CH₂CHOHCH₂), 3,69-3,75 (m,
 3H), 3,56-3,65 (m, 3H), 2,78 (dd, 1H, OH), 2,23 (t app, 1H, OH), 1,92 (s, 24H, CH₃CBr), 1,34 (s, 6H, CH₃), 1,31 (s, 3H,
 CH₃).

- 35 **Ejemplo 49. Preparación de iniciador de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, (2-azidoetoxi)etil éster**



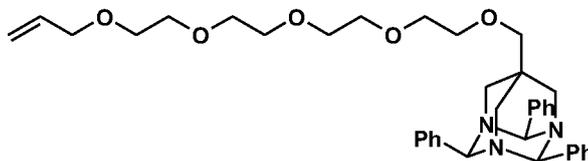
5 A una solución de 3,30 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico y 1,0 gramo de 2-(2-azidoetoxi)etanol en 20 ml de acetonitrilo seco, junto con 225 mg de DPTS, se añadieron 1,89 gramos de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró y se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10 - 15 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 2,06 gramos del producto deseado en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN (CDCl₃): δ 4,39 (c app., 4H, CCH₂O, J = 11,1, 33,8 Hz), 4,31 (t, 2H, OCH₂CH₂OC=O, J = 5 Hz), 3,72 (t, 2H, CH₂N₃, J = 5 Hz), 3,67 (t, 2H, CH₂CH₂N₃, J = 5 Hz), 3,38 (t, 2H, OCH₂CH₂OC=O, J = 5 Hz), 1,92 (s, 12H, Br-C(CH₃)₂), 1,36 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 50. Preparación de 3,5-bis-(2-bromoisobutiriloxi) benzaldehído



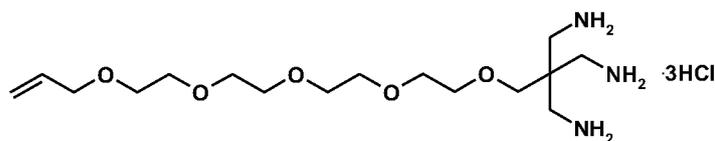
15 Una solución de 1,0 gramo de 3,5-dihidroxibenzaldehído y 4,0 ml (4 equiv.) de trietilamina en 20 ml de diclorometano se enfrió con un baño de hielo-agua y se añadió gota a gota una solución de 3,35 gramos de bromuro de 2-bromoisobutirilo en 5 ml de diclorometano durante unos pocos minutos según se formaba la mayoría del sólido. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, momento en el cual la reacción parecía estar completa según TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 30 % en hexano). La reacción se lavó con 25 ml de agua, después se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron, se trataron con una pequeña cantidad de carbono decolorante, se filtraron y se concentraron para dar 2,2 gramos de un aceite, que cristalizó en el frigorífico para dar un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,08 (s, 12H, CH₃), 7,29 (t, 1H, J = 2,4 Hz, ArH), 7,61 (d, J = 2,4 Hz, 2H, ArH), 10,0 (s, 1H, CHO).

Ejemplo 51. Preparación de 7-(13-aliloxi-2,5,8,11-tetraoxatridecil)-2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo[3,3,1,13,7] decano



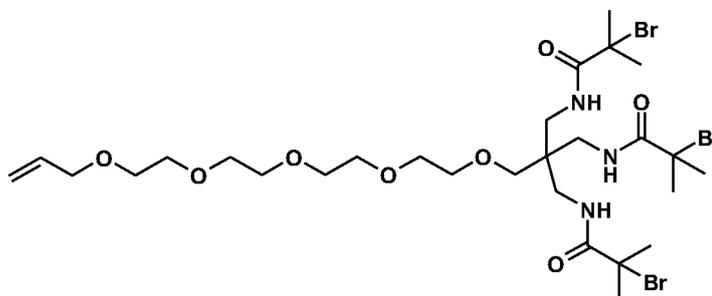
30 Una solución de 870 mg de metanosulfonato de 11-aliloxi-3,6,9-trioxaundecan-1-ol y 1,01 gramos de 2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo[3,3,1,13,7]decano-7-metanol (documento WO2000/037658) en 10 ml de THF seco se trató con 410 mg de hidruro sódico (al 60 % en aceite) y la reacción se calentó a 80 °C durante 20 horas. Después, la reacción se interrumpió cuidadosamente mediante la adición de unos pocos ml de agua, se vertió en 20 ml de NaCl sat., después se extrajo con 3 x 10 ml de diclorometano. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 25-35 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 920 mg del producto deseado en forma de un aceite incoloro. RMN (DMSO-d₆): δ 7,70-7,82 (m, 6H, PhH), 7,26-7,51 (m, 9H, PhH), 3,69-3,75 (m, 3H), 3,56-3,65 (m, 3H), 2,78 (dd, 1H, OH), 2,23 (t app, 1H, OH), 1,92 (s, 24H, CH₃CB_r), 1,34 (s, 6H, CH₃), 1,31 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 52. Preparación de triclorhidrato de 1-amino-15-aliloxi-2,2-bis(aminometil)-4,7,10,13-tetraoxapentadecano



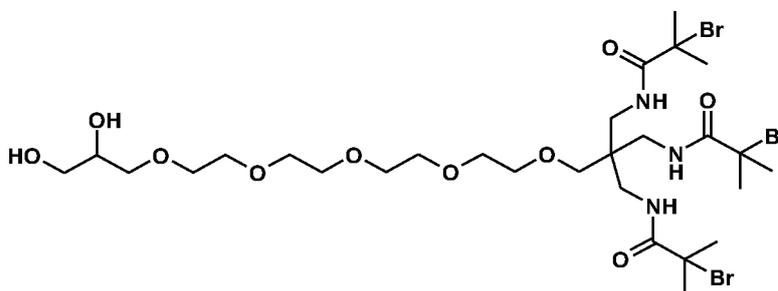
El compuesto de triazaadamantano de la reacción previa se recogió en 20 ml de etanol y 4 ml de éter, después se trató con 2 ml de ácido clorhídrico concentrado. La reacción se mezcló y después se dejó reposar a 4 °C durante 1,5 horas. Después se añadieron 30 ml de éter y la mezcla se enfrió de nuevo durante 30 minutos más. Después se añadieron 100 ml de éter y el producto sólido se recuperó por filtración, se lavó con éter y se secó al vacío para dar 564 mg del producto en forma de un sólido de color blanco. RMN (DMSO-d₆): δ 7,75 (m, 6H, CCH), 7,44 (m, 6H, CCHCH), 7,30 (m, 3H, CCHCHCH), 5,86 (m, 1H, CH₂=CH), 5,70 (s, 1H, NCH (ecuatorial)), 5,250 (s, 2H, NCH(axial)), 5,23 (d de c, 1H, CH₂=CH), 5,11 (d de c, 1H, CH₂=CH), 3,93 (d de t, 2H, CH-CH₂-O), 3,55-3,25 (m, 16H, OCH₂CH₂O), 3,26 (m, 2H, NCH₂), 3,19 (d, 2H, NCH₂), 2,88 (s, 2H, NCH₂), 2,719 (s, 2H, CCH₂O).

Ejemplo 53. Preparación de Iniciador de N-(2-Bromo-2-metilpropionil)-1-Amino-15-aliloxi-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4,7,10,13-tetraoxapentadecano

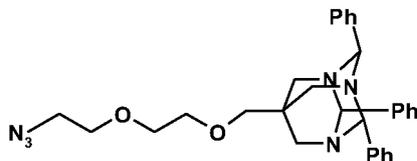


El clorhidrato de triamina del procedimiento anterior se recogió en 25 ml de diclorometano, la solución se enfrió con un baño de hielo y agua y se trató con 1,35 ml de trietilamina, seguido de la adición de 0,46 ml de bromuro de 2-bromoisobutirilo. Después, la reacción se agitó según se dejaba calentar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, la mezcla de reacción se lavó con 3 x 10 ml de HCl 1 N, 2 x 10 ml de NaHCO₃ sat., 10 ml de NaCl sat. y se secó sobre sulfato de magnesio. La solución se filtró y se concentró para dar un residuo, que se lavó abundantemente a través de un lecho de gel de sílice con acetato de etilo. La concentración dio 989 mg del producto deseado en forma de un aceite viscoso. RMN (DMSO-d₆): δ 8,004 (t, 3H, NH), 5,87 (m, 1H, CH), 5,23 (d de c, 1H, CH₂=CH), 5,12 (d de c, 1H, CH₂=CH), 3,93 (d de t, 2H, CH₂-CH), 3,6 - 3,45 (m, 16H, OCH₂CH₂O), 3,289 (s, 2H, CCH₂O), 3,12 (d, 6H, CCH₂N), 1,907 (s, 18H, CH₃).

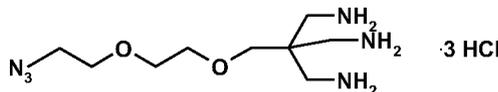
Ejemplo 54. Preparación de iniciador de N-(2-Bromo-2-metilpropionil)-1-Amino-15-(2,3-dihidroxi-2-propil)-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4,7,10,13-tetraoxapentadecano



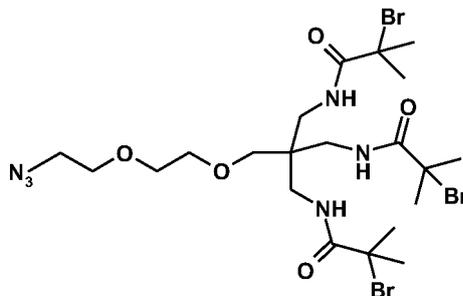
A una mezcla de 350 mg del alqueno del procedimiento anterior en 5 ml de t-butanol y 5 ml de agua se añadieron 433 mg (3 equiv.) de ferricianuro potásico, 182 mg (3 equiv.) de carbonato potásico, 42 mg (1 equiv.) de metanosulfonamida, 7,5 mg de quinuclidina y 4 mg de osmiato potásico dihidrato, y la solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción parecía completa según TLC (gel de sílice, metanol al 5 % en diclorometano), por lo que se añadieron 50 ml de agua y la solución se extrajo con 50 ml de diclorometano, seguido de 2 x 25 ml más de diclorometano. Los extractos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se concentraron y el residuo de color gris oscuro se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 2-5 % en diclorometano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 310 mg del compuesto dihidroxi deseado en forma de un aceite de color gris claro. RMN (CDCl₃): δ 7,91 (t, 3H, NH), 3,88 (m, 1H, HOCH₂CHOHCH₂), 3,55-3,72 (m complejo, 21H), 3,35 (s, 1H, OCH₂C(CH₂)₃), 3,19 (d, 6H, J = 6,4 Hz, CH₂NH), 1,99 (s, 18H, CH₃).

Ejemplo 55. Preparación de 7-(7-Azido-2,5-dioxaheptil)-2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo[3,3,1,13,7]decano

5 A una solución de 1,1 gramos de 2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo[3,3,1,13,7]decano-7-metanol (documento WO2000/037658) y 585 mg de metanosulfonato de 2-(2-azidoetoxi)etilo en 15 ml de THF anhidro se añadieron 224 mg de NaH (al 60 % en aceite) y la solución se calentó a 70 °C durante una noche. Se añadieron 245 mg más de NaH y 600 mg de metanosulfonato de 2-(2-azidoetoxi)etilo y el calentamiento se continuó de nuevo durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con 25 ml de agua y se extrajo con 50 ml de diclorometano. La capa orgánica se lavó con NaCl saturado, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró para dar un residuo. Este material se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10 - 25 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 1,15 gramos del producto deseado en forma de un aceite, que no era completamente puro, pero se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN(DMSO) extremadamente compleja.

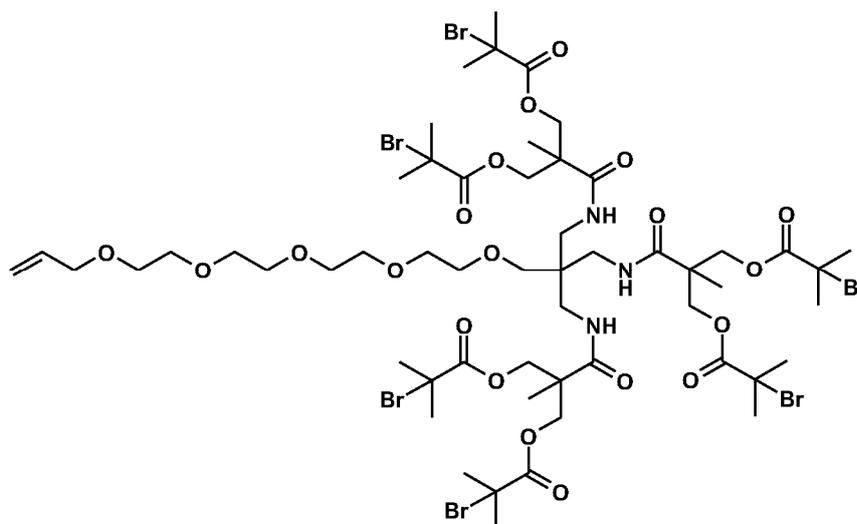
Ejemplo 56. Preparación de triclorhidrato de 1-amino-9-azido-2,2-bis(aminometil)-4,7-dioxanonano

20 Una solución de 1,15 gramos del compuesto de triazaadamantano del procedimiento previo en 20 ml de etanol y 4 ml de éter se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo y se añadieron 3 ml de HCl concentrado. Un producto sólido comenzó a formarse inmediatamente y la reacción se dejó en reposo en el frío durante 10 minutos. Se añadieron 30 ml más de éter y la reacción se refrigeró durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con 100 ml más de éter y el producto sólido se aisló por filtración, se lavó con más éter y se secó al vacío para dar 800 mg del producto en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 57. Preparación de iniciador de N-(2-Bromo-2-metilpropionil)-1-Amino-9-azido-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4,7-dioxanonano

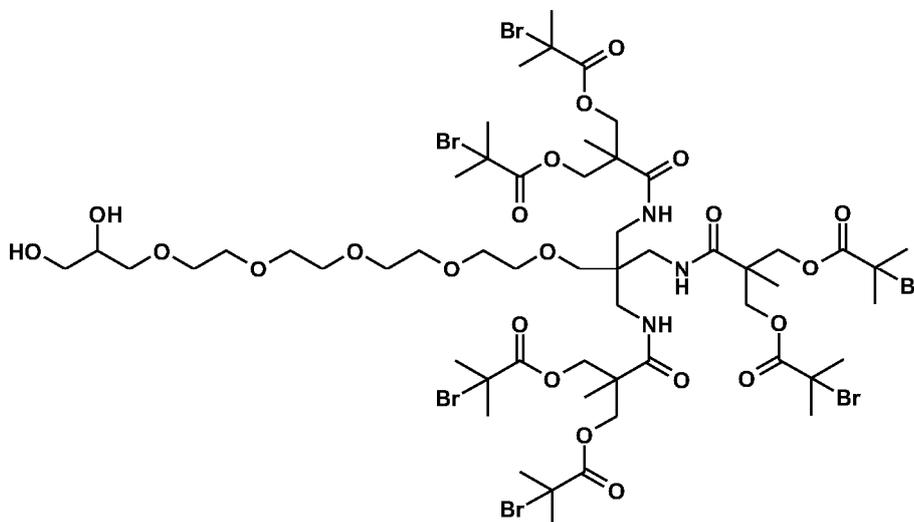
30 Una solución de 800 mg de la sal triclorhidrato del procedimiento anterior en 25 ml de diclorometano se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo, después se trató con 3,5 ml de trietilamina. A esta mezcla se añadieron gota a gota 1,07 ml de bromuro de 2-bromoisobutirilo y la reacción se agitó mientras se calentaba a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, la mezcla se lavó con 3 x 10 ml de HCl 1 N, 2 x 10 ml de NaHCO₃ saturado y con 10 ml de NaCl saturado, después se secó sobre sulfato de magnesio. La filtración y la concentración dieron un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 20-30 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 630 mg del producto deseado en forma de un aceite. RMN(CDCl₃): δ 7,76 (t, 3H, NH, J = 6,3 Hz), 3,68 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3,63 (m, 2H, N₃CH₂CH₂O), 3,40 (t, 2H, N₃CH₂, J = 5,0 Hz), 3,37 (s, 2H, CCH₂O), 3,19 (d, 6H, CCH₂N, J = 6,8 Hz), 1,99 (s, 18H, CH₃).

Ejemplo 58. Iniciaron de 6 brazos de 13-Aliloxi-2,5,8,11-tetraoxatridecilo



5 A una solución de 0,9 gramos de trichlorhidrato de 1-amino-15-aliloxi-2,2-bis(aminometil)-4,7,10,13-tetraoxapentadecano y 3,89 gramos de ácido 2,2-bis[(2-bromoisobutiriloxi]metil)propiónico en 25 ml de diclorometano, junto con 530 mg de DPTS y 890 mg de DMAP, se añadieron 2,7 gramos de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró y se concentró, y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 50-70 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 1,9 gramos del producto deseado en forma de un aceite viscoso. RMN (CDCl₃): δ 7,78 (t, 3H, NH, J = 6,5 Hz), 5,91 (m, 1H, CH), 5,27 (d de c, 1H, CH₂=CH, J = 17,4, 1,6 Hz), 5,18 (d de c, 1H, CH₂=CH, J = 10,4, 1,4 Hz), 4,38 (c app, 12H, CH₂OC=O), 4,01 (d de t, 2H, CH-CH₂, J = 5,7, 1,4 Hz), 3,61 (dos m, 16H, OCH₂CH₂O), 3,30 (s, 2H, CCH₂O), 3,14 (d, 6H, CH₂N, J = 6,1 Hz), 1,92 (d, 36H, BrC(CH₃)₂, J = 1,2 Hz), 1,38 (s, 9H, CH₃).

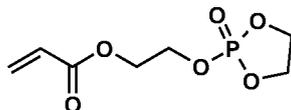
Ejemplo 59. Iniciador de 6 brazos de 13-(2,3-dihidroxi)propil)-2,5,8,11-tetraoxatridecilo



15 A una mezcla de 1,0 gramo del alqueno del procedimiento anterior en 10 ml de agua y 10 ml de t-butanol se añadieron 638 mg (3 equiv.) de ferricianuro potásico, 268 mg (3 equiv.) de carbonato potásico, 10 mg de osmiato potásico dehidrato, 12 mg de quinuclidina y 61 mg (1 equiv.) de metanosulfonamida, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se vertió en 50 ml de agua, después se extrajo con 50 ml de diclorometano, seguido de 25 ml más de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo oleoso, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 2-4 % en diclorometano, y las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 417 mg del producto deseado en forma de un aceite viscoso. RMN (CDCl₃): δ 7,78 (t, 3H, NH, J = 6,0 Hz), 4,39 (c app, 12H, CH₂OC=O), 3,86 (s ancho, 1H, OH-CH), 3,62 (m, 20H, OCH₂CH₂O y OHCHCH₂O y OH-CH₂), 3,27 (s, 2H, CCH₂O), 3,13 (s, 6H, NCH₂), 2,40 (s, 2H, OH), 1,92 (s, 36H, BrC(CH₃)₂), 1,38 (s, 9H, CH₃).

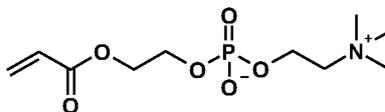
Ejemplo 60. Preparación de fosfato de 2-(acrililoxi)etil-2'-(trimetilamonio)etilo, sal interna

30

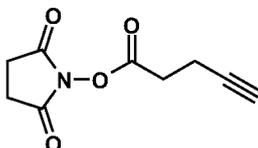
1^{er} intermedio

- 5 Una solución de 11,6 gramos de 2-hidroxietilacrilato y 14,0 ml de trietilamina en 100 ml de acetonitrilo seco, en una atmósfera de nitrógeno, se enfrió a -20 °C y se añadió gota a gota una solución de 14,2 gramos de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en 10 ml de acetonitrilo seco durante aproximadamente 30 minutos. La reacción se agitó en el frío durante 30 minutos, después se filtró en una atmósfera de nitrógeno. El precipitado se lavó con 10 ml de acetonitrilo frío y el filtrado se usó directamente en la siguiente reacción.

10

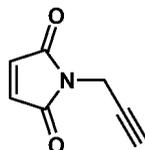
Fosfato de 2-(acrililoxietil-2'-(trimetilamonio)etilo, sal interna

- 15 A la solución del procedimiento anterior se añadieron 14,0 ml de trimetilamina (condensada usando un condensador de hielo seco acetona en una atmósfera de nitrógeno), la mezcla de reacción se cerró herméticamente en un recipiente a presión y se agitó a 65 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se dejó en agitación mientras se enfriaba a temperatura ambiente y según alcanzaba 30 °C, comenzó a formarse un sólido. Después, el recipiente se puso en un frigorífico a 4 °C durante una noche. Estrictamente en una atmósfera de nitrógeno, el sólido se recuperó por filtración,
- 20 se lavó con 20 ml de acetonitrilo seco frío, después se secó en una corriente de nitrógeno durante 15 minutos. Después, el sólido se secó a alto vacío durante una noche para dar 12,4 gramos de producto en forma de un sólido de color blanco. RMN (CDCl₃): δ 6,41 (dd, 1H, J = 1,6, 17,2 Hz, vinilo CH), 6,18 (dd, 1H, J = 10,6, 17,2 Hz, vinilo CH), 5,90 (dd, 1H, J = 1,6, 10,4 Hz, vinilo CH), 4,35 (m, 2H), 4,27 (m, 2H), 4,11 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,22 (s, 9H, N(CH₃)₃).

25 **Ejemplo 61. Preparación de 4-Pentin-1-ol, éster de NHS**

- 30 Una solución de 1,02 gramos de ácido 4-pentinoico y 1,20 gramos de N-hidroxisuccinimida en 20 ml de acetonitrilo seco se trató con 300 mg de DPTS, seguido de 2,8 gramos de DCC, y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró y se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 1,62 gramos del producto deseado en forma de un sólido de color blanco. RMN(CDCl₃): δ 2,89 (d de d, 2H, CH₂C=O, J = 7,9, 6,4 Hz), 2,85 (s, 4H, O=CCH₂CH₂C=O), 2,62 (d app de d de d, 2H, CHCCH₂, J = 8,6, 6,9, 2,7 Hz), 2,06 (t, 1H, CH, J = 2,7 Hz).

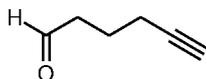
35

Ejemplo 62. Preparación de N-propargilmaleimida

- 40 Una solución de 1,08 gramos de clorhidrato de propargilamina en 50 ml de bicarbonato sódico saturado se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo y se añadieron en porciones 2,0 gramos de N-carboetoximaleimida durante unos pocos minutos. La reacción se agitó al frío durante 30 min, después mientras se calentaba a temperatura ambiente durante 25 min. Después, la reacción se extrajo con 3 x 25 ml de diclorometano, que se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El residuo se recogió en 10 ml de acetato de etilo y se calentó a 50 °C durante dos horas para completar la ciclación. La reacción se concentró y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30 % en hexano. Una segunda cromatografía como la de antes dio 1,24 g del producto en forma de un aceite de color amarillo muy claro. RMN(CDCl₃): δ 6,77 (s, 2H, CHC=O), 4,30 (d, 2H, NCH₂, J = 2,4 Hz), 2,22 (t, 1H, CCH, J = 2,5 Hz).

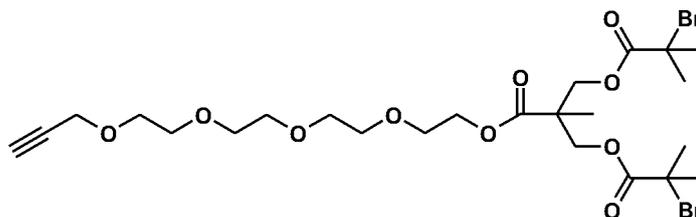
50

Ejemplo 63. Preparación de 5-Hexin-1-al



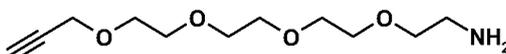
Una solución de 694 mg de 5-hexin-1-ol en 20 ml de diclorometano se trató a temperatura ambiente con 3,0 gramos de peryodinano Dess-Martin y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se filtró y el filtrado se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo en hexano. La concentración de las fracciones apropiadas dio el producto en forma de un aceite de color amarillo muy claro. RMN(CDCl₃): δ 9,81 (t, 1H, CH=O, J = 2,6 Hz), 2,61 (t de d, 2H, CH₂CH=O, J = 7,1, 1,2 Hz), 2,28 (t de d, 2H, CCH₂, J = 7,1, 2,6 Hz), 1,99 (t, 1H, CCH, J = 2,6 Hz), 1,86 (p, 2H, CCH₂CH₂, J = 7,0 Hz).

Ejemplo 64. Preparación de ácido Bis [2,2-(2-bromoisobutil)hidroximetil]propiónico, 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-ol éster



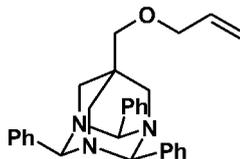
Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra de agitación se cargó con 30 ml de acetonitrilo seco, 3,0 gramos de ácido bis[2,2-(2-bromoisobutil)hidroximetil]propiónico y 1,63 gramos de 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-ol. A la solución se añadieron 300 mg de DPTS, seguido de 1,86 gramos (1,3 equiv.) de DCC y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. La filtración y la concentración de la mezcla de reacción dieron un residuo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 20-50 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 1,82 gramos del producto deseado en forma de un aceite transparente que contenía una pequeña cantidad de sólido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,35 (s, 3H, CH₃CC=O), 1,92 (s, 12H, (CH₃)₂CBr), 2,43 (t, J = 2,4, 1H, CCH), 3,64-3,72 (m, 14H, OCH₂CH₂O), 4,21 (d, 2H, J = 2,4, HCCCH₂), 4,30 (c app, 2H, OCH₂CH₂OC=O), 4,34 (dd, 2H, CH₂OC=OCBr).

Ejemplo 65. Preparación de 3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-amina



Una solución de 3,5 gramos de 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-ol, 1-metanosulfonato en 50 ml de amoníaco acuoso concentrado se agitó y se calentó a 100 °C en un recipiente a presión durante 2 horas. Después, el recipiente se enfrió y la reacción se concentró para dar un aceite de color amarillo. A esto se le añadieron 20 ml de etanol absoluto y la solución se concentró de nuevo para dar un aceite de color amarillo, que se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con metanol al 7 % en diclorometano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 2,24 gramos del producto deseado en forma de un aceite de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,54 (t, 1H, J = 2,4, CCH), 3,23 (t app, 2H, CH₂NH₂), 3,66 (m, 8H, OCH₂CH₂O), 3,74 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3,86 (t app, 2H, CH₂CH₂NH₂), 4,26 (d, J = 2,4, 2H, CH₂CCH).

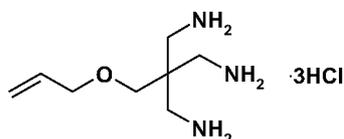
Ejemplo 66. Preparación de 7-Aliloximetil-2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo [3,3,1,13,7] decano



Una mezcla de 50 ml de DMSO y 2,8 gramos de KOH en polvo se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se añadieron 4,0 gramos de 2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo [3,3,1,13,7] decano-7-metanol, seguido rápidamente de 1,46 gramos (1,2 equiv.) de bromuro de alilo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, después se repartió entre 100 ml de éter y 100 ml de agua. La capa acuosa se extrajo con 3 x 50 ml más de éter y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron una espuma sólida, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 5 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 3,51 gramos (80 %) del producto deseado en forma de una espuma de color amarillo triturable. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,68 (s, 2H, NCH₂ adyacente a los fenilos ecuatoriales), 2,92 (s, 2H, CCH₂), 3,28 (d, J = 13,4 Hz, 2H, NCH₂ entre fenilos axiales y

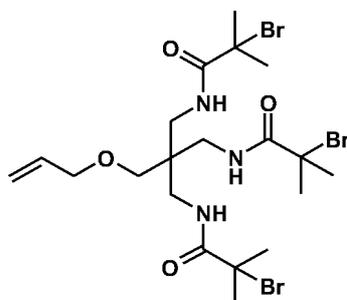
ecuatoriales), 3,51 (d, J = 13,4 Hz, 2H, NCH₂ fenilo axial más cercano), 3,73 (d de t, J = 1,5, 5,4 Hz, 2H, CHCH₂O), 5,04 (d de c, J = 1,5, 10,4 Hz, 1H, CH₂=CH), 5,07 (d de c, J = 1,7, 17,2 Hz, 1H, CH₂=CH), 5,42 (s, 2H, NCH axial), 5,65 (s, 1H, NCH ecuatorial), 5,71 (m, J = 5,4, 10,4, 17,2 Hz, 1H, CH₂=CH), 7,2 - 7,9 (m, 15H, fenilo).

5 **Ejemplo 67. Preparación de triclorhidrato de 2,2-bis(aminometil)-4-oxahept-6-enilamina**



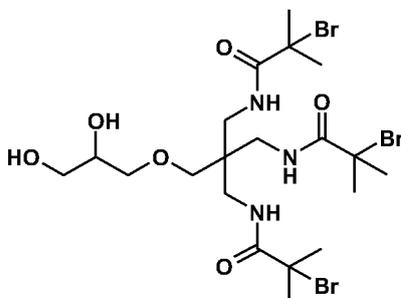
10 Una solución de 3,51 gramos de 7-aliloximetil-2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo [3,3,1,13,7] decano en 30 ml de tetrahidrofurano se trató con 30 ml de HCl 1 N y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El THF se retiró en el evaporador rotatorio y el residuo acuoso se extrajo con 3 x 25 ml de éter. La capa acuosa se concentró a sequedad, se añadieron 20 ml de metanol y la solución se concentró de nuevo a sequedad. El sólido de color blanco resultante se puso a alto vacío durante una noche para dar 2,10 gramos (93 %) del producto deseado en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, D₂O): δ = 3,34 (s, 6H, CH₂NH₃), 3,76 (s, 2H, OCH₂C(CH₂)₃), 4,11 (m, 2H, CH₂=CHCH₂), 5,28-5,39 (m, 2H, CH₂=CHCH₂), 5,92-6,03 (m, CH₂=CHCH₂).

15 **Ejemplo 68. Preparación de N-(2-Bromo-2-metilisobutiril)-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4-oxahept-6-enilamina**



20 Una mezcla de 2,10 gramos de triclorhidrato de 2,2-bis(aminometil)-4-oxa-hept-6-ilamina en 250 ml de diclorometano se trató con 10 ml de trietilamina, después se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo. A esta solución se le añadieron gota a gota 5,77 gramos de bromuro de 2-bromoisobutirilo durante unos pocos minutos. El baño de hielo se retiró y la solución se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se extrajo con 100 ml de agua y la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron un residuo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 2-6 % en diclorometano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 3,66 gramos (79 %) del producto deseado en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,99 (s, 18H, CH₃), 3,20 (d, 6H, J = 6,8, CH₂NH₂), 3,34 (s, 2H, OCH₂C(CH₂)₃), 3,99 (m, 2H, CH₂=CHCH₂), 5,19-5,30 (m, 2H, CH₂=CHCH₂), 5,87-5,97 (m, 1H, CH₂=CHCH₂), 7,72 (t app, J = 6,8, 3H, NH).

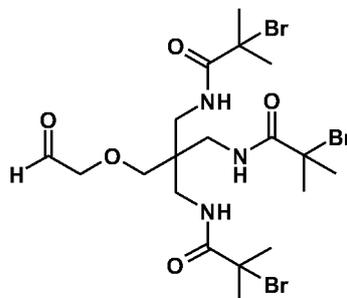
30 **Ejemplo 69. Preparación de N-(2-Bromo-2-metilpropionil)-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4-oxa-6,7-dihidroxiheptil amina**



35 Una solución de 5,39 gramos de N-(2-bromo-2-metilpropionil)-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4-oxahept-6-enilamina en 60 ml de t-butanol y 60 ml de agua se trató con 8,8 gramos (3 equiv.) de ferricianuro potásico, 3,68 gramos (3 equiv.) de carbonato potásico, 850 mg (1 equiv.) de metanosulfonamida, 160 mg de quinuclidina y 130 mg de osmiato potásico dehidrato, y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se repartió entre 150 ml de acetato de etilo y 150 ml de agua y la capa acuosa se extrajo con 2 x 30 ml más de acetato

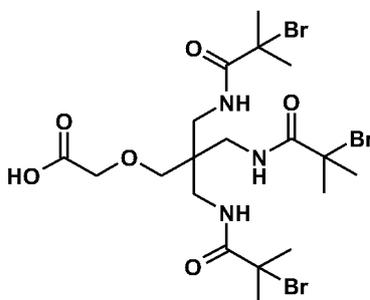
de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo semisólido. Esto se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 2-4 % en diclorometano y las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 5,33 gramos del producto deseado en forma de una espuma de color gris.

5 **Ejemplo 70. N-(2-Bromo-2-metilpropionil)-6-amino-5,5-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil) aminometil]-3-oxahexanal**



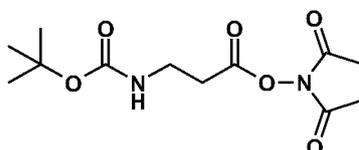
10 A una solución de 5,33 g de N-(2-bromo-2-metilpropionil)-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4-oxa-6,7-dihidroxiheptil amina en 200 ml de THF y 50 ml de agua se añadieron 3,5 gramos de metaperyodato sódico y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, después se concentró para retirar la mayoría del THF. El residuo se repartió entre 100 ml de acetato de etilo y 50 ml de agua y el material acuoso se lavó con 25 ml de acetato
15 de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con 50 ml de NaCl sat. y se secaron sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron un residuo de color gris, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano y las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 3,87 gramos del producto deseado en forma de un sólido prácticamente blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,00 (s, 18H, CH₃), 3,19 (d, 6H, J = 6,8, CH₂NH), 3,31 (s, 2H, OCH₂C(CH₂)₃), 4,32 (s, 2H, CHOCH₂), 8,01 (t app, J = 6,8, 20 3H, NH), 9,70 (s, 1H, CHO).

Ejemplo 71. Preparación de ácido N-(2-bromo-2-metilpropionil)-5,5-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-3-oxa-6-aminohexanoico



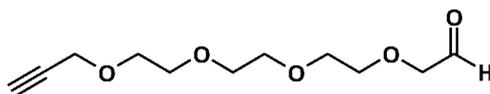
25 Una solución de ácido crómico (reactivo de Jones) se preparó disolviendo 2,55 gramos de trióxido de cromo en 2,2 ml de ácido sulfúrico conc., se enfrió con un baño de hielo y la mezcla se diluyó cuidadosamente a 10 ml con agua. Una alícuota de 7 ml de este reactivo se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo y se añadió gota a gota una solución
30 de 3,67 gramos de N-(2-bromo-2-metilpropionil)-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4-oxa-6-oxohexilamina en 20 ml de acetona durante 5 minutos. La reacción se agitó en el frío durante 20 minutos, después se repartió entre 200 ml de acetato de etilo y 200 ml de agua. La capa acuosa se extrajo con 25 ml más de acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se lavaron con 25 ml de NaCl saturado y se secaron sobre sulfato sódico. La solución se filtró y se concentró para dar un aceite espeso y oscuro. Este se sometió a cromatografía en columna
35 ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 2 % en diclorometano que contenía ácido acético al 0,1 %. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 3,58 gramos del producto deseado en forma de una espuma. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,01 (s, 18H, CH₃), 3,21 (d, 6H, J = 2,8, CH₂NH), 3,36 (s, 2H, OCH₂C(CH₂)₃), 4,13=2 (s, 2H, CH₂CO₂H), 8,15 (t app, J = 2,8, 3H, NH).

40 **Ejemplo 72. Preparación de N-Boc-β-alanina, N-hidroxisuccinimida éster**



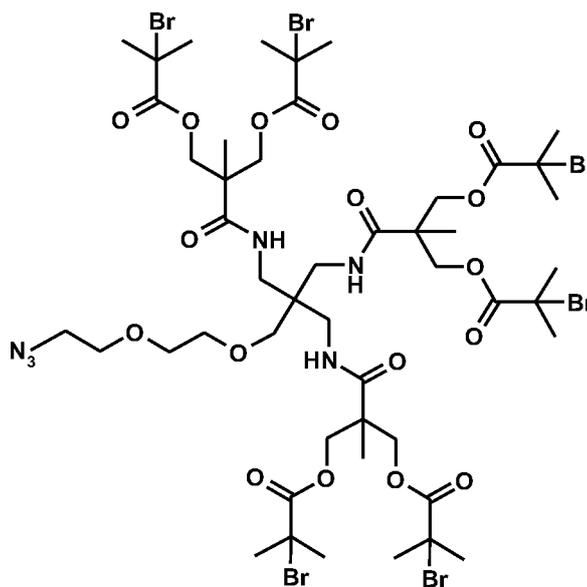
Una solución de 8,0 gramos de N-Boc-β-alanina y 5,0 gramos de N-hidroxisuccinimida, junto con 100 mg de DPTS, en 80 ml de acetonitrilo anhidro se trató con 10,5 gramos de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró y el precipitado se lavó con acetonitrilo. El filtrado se concentró para dar un aceite, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30-40 % en hexano para dar el producto deseado en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 5,93 (m, 6H, NHS, CH₂COON), 3,53 (c app, 2H, NHCH₂), 5,2 (s a, 1H, NH).

Ejemplo 73. Preparación de 3,6,9,12-Tetraoxa-14-inpentadecanal



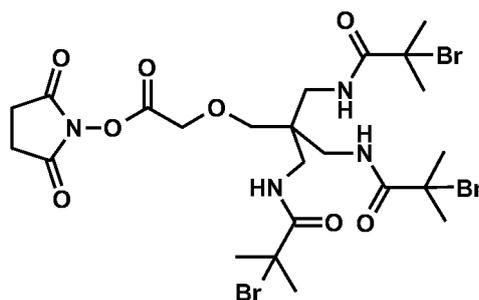
A una solución de 1,0 gramo de 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-ol y 67 mg de TEMPO en 5 ml de diclorometano se añadieron 1,52 gramos de diacetato de yodobenceno y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se concentró para dar un aceite de color amarillo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 50-100 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 300 mg del producto en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,44 (t, 1H, J = 2,4, CCH), 3,65-3,77 (m, 12H, OCH₂CH₂O), 4,17 (d, J = 0,8, 2H, CH₂CHO), 4,21 (d, 2H, J = 2,4, CH₂CCH), 9,74 (s, 1H, CHO).

Ejemplo 74. Preparación de iniciador de 6 brazos de 7-azidooxi-2,5-dioxaheptilo



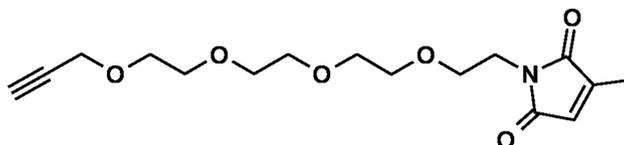
Una solución de 800 mg de triclohidrato de 1-amino-9-azido-2,2-bis(aminometil)-4,7-dioxanonano, 3,89 g de ácido bis[2,2-(2-bromoisobutil)hidroximetil]propiónico, 530 mg de DPTS y 890 mg de dimetilaminopiridina en diclorometano se trató con 2,7 g de N,N'-diclohexilcarbodiimida y se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano para dar 2,1 g del producto deseado. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,38 (s, 9H, CH₃), 1,92 (s, 36H, CH₃), 3,15 (d, J = 6,6 Hz, 6H, CH₂NH), 3,32 (s, 2H, OCH₂C), 3,42 (t, J = 5,2 Hz, 2H, N₃CH₂), 3,60 (m, 2H, OCH₂CH₂O), 3,66 (m, 2H, OCH₂CH₂O), 3,69 (t, J = 5,2 Hz, 2H, N₃CH₂), 4,38 (dd, J = 11,1, 17,0 Hz, 12H, CCH₂O), 7,57 (t ancho, J = 6,6 Hz, NH₂).

Ejemplo 75. Preparación de ácido N-(2-bromo-2-metilpropionil)-5,5-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-3-oxa-6-aminoheptanoico, N-hidroxisuccinimidil éster



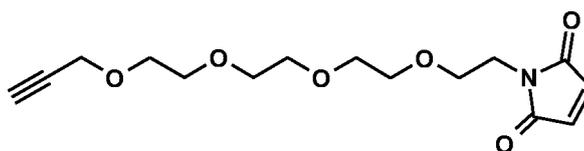
Una solución de 64,5 mg de N-hidroxisuccinimida, 358 mg de ácido N-(2-bromo-2-metilpropionil)-5,5-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-3-oxa-6-aminohexanoico y 26 mg de DPTS se trató con 300 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida y se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano para dar 270 mg del producto deseado en forma de un polvo de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,99 (s, 18H, CH₃), 2,87 (s, 4H, CH₂CO), 3,17 (d, J = 6,6 Hz, 6H, CH₂NH), 3,39 (s, 2H, CCH₂O), 4,51 (s, 2H, OCH₂CO), 7,86 (t, J = 6,6 Hz, 3H, NH).

Ejemplo 76. Preparación de N-(3,7,10,13-tetraoxapentadec-14-inil)-3-metilmaleimida



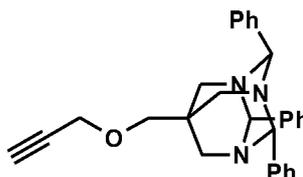
Una alícuota de 346 mg de 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-amina se añadió lentamente a 224 mg de polvo de anhídrido citracónico con agitación en una atmósfera de nitrógeno. Tuvo lugar una reacción exotérmica, produciendo un sólido de color castaño. La mezcla resultante se calentó a 120 °C durante 6 horas, después se dejó enfriar a temperatura ambiente. El producto se aisló por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano, produciendo 160 mg de producto puro en forma de un aceite incoloro y transparente. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2,08 (d, 3H, CH₃), 2,43 (t, 1H, J = 2,4 Hz, CHCCH₂), 3,58-3,72 (m, 18H, CH₂CH₂O), 4,20 (d, J = 2,4 Hz, 2H, CCH₂O), 6,32 (c, J = 1,8 Hz, 1H, CHCO).

Ejemplo 77. Preparación de N-(3,7,10,13-tetraoxapentadec-14-inil) maleimida



Una alícuota de 1,15 g de 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-amina se añadió lentamente a 660 mg de anhídrido maleico en polvo con agitación en una atmósfera de nitrógeno. Después, la mezcla se calentó a 120 °C durante 6 horas, después se dejó enfriar a temperatura ambiente. El producto se aisló por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano.

Ejemplo 78. Preparación de 7-Propargiloximetil-2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo[3,3,1,13,7]decano

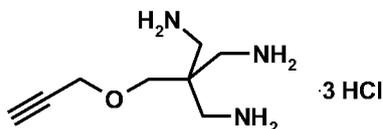


Una solución de 3,0 g de 2,4,9-trifenil-1,3,5-triazatriciclo[3,3,1,13,7] decano-7-metanol (documento WO2000/037658) y 850 mg de hidróxido potásico en 20 ml de dimetilsulfóxido se trató con 1,46 g de solución al 80 % de bromuro de propargilo y la reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se repartió entre 100 ml de

cada uno de agua y éter dietílico y la capa acuosa se extrajo dos veces con 50 ml de éter. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con 20 ml de agua, después se secaron, se filtraron y se concentraron. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice en acetato de etilo al 5 % en hexano para producir 0,9 g del producto deseado.

5

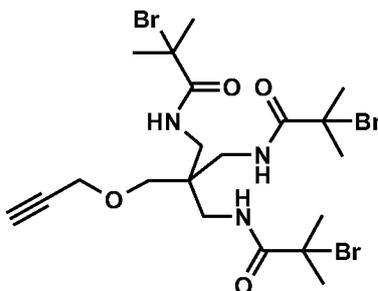
Ejemplo 79. Preparación de triclorhidrato de 2,2-bis(aminometil)-4-oxahept-6-inilamina



10 Una muestra de 900 mg de [el producto de propargil adamantano del procedimiento anterior] en 10 ml de tetrahidrofurano se trató con 10 ml de ácido clorhídrico acuoso 1 N y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, el tetrahidrofurano se retiró por evaporación rotatoria a temperatura ambiente y la solución acuosa resultante se extrajo con 3 x 25 ml de éter. La capa acuosa se concentró cuidadosamente, se disolvió en 20 ml de metanol y se concentró de nuevo para producir 568 mg del producto deseado en forma de un polvo de color pardo oscuro.

15

Ejemplo 80. Preparación de N-(2-Bromo-2-metilisobutiril)-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-4-oxahept-6-inilamina



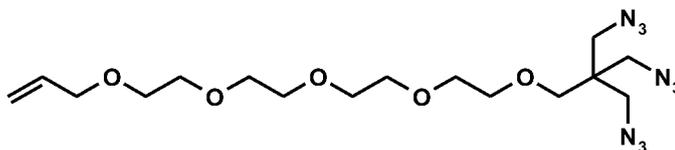
20

Una muestra de 580 mg de [la propargil triamina del procedimiento anterior] se suspendió en 25 ml de diclorometano con 2,5 ml trietilamina y se agitó sobre hielo. Después, se añadieron gota a gota 1,43 g de bromuro de bromoisobutirilo y la reacción se agitó durante 2 horas según se calentaba gradualmente a temperatura ambiente. La mezcla se lavó con 3 x 10 ml de ácido clorhídrico 1 N, 2 x 10 ml de bicarbonato sódico saturado y 10 ml de cloruro sódico saturado. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró, y el residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 5 % en diclorometano para producir 700 mg del producto deseado. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,99 (s, 18H, CH₃), 2,46 (t, 1H, J = 2,4 Hz, CCH), 3,18 (d, J = 6,7 Hz, 6H, CH₂NH), 3,39 (s, 2H, CH₂O), 4,18 (d, J = 2,4 Hz, CHCCH₂O), 7,73 (t, J = 6,7 Hz, 3H, NH).

25

30

Ejemplo 81. Preparación de 1-Azido-2,2-bis(azidometil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadec-18-eno

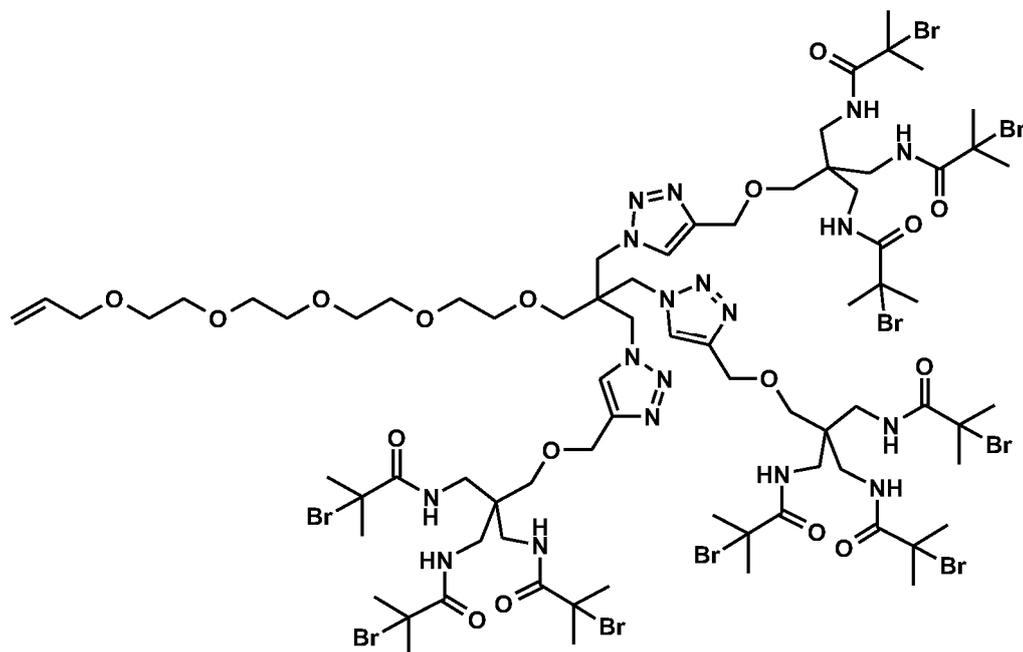


35 Una solución de 530 mg de pentaeritritol triazida en 10 ml de tetrahidrofurano se trató con 380 mg de hidruro sódico (dispersión al 60 %). Cuando se detuvo el burbujeo, se añadieron 1,24 g de 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-en-1-ol, 1-metanosulfonato y la reacción se agitó durante una noche a 70-80 °C. La mezcla se dejó enfriar y se añadieron unas gotas de agua para inactivar cualquier hidruro sódico restante, después la mayoría del THF se retiró por concentración. El residuo se repartió entre 50 ml de cada uno de agua y diclorometano. La fase acuosa se extrajo dos veces con 25 ml de diclorometano y los extractos orgánicos combinados (100 ml) se lavaron dos veces con 25 ml de cloruro sódico saturado. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró, y el residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 10-50 % en hexano para separar dos manchas estrechamente separadas. El rendimiento final fue 260 mg de un aceite incoloro y transparente. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 3,34 (s, 2H, CCH₂O), 3,35 (s, 6H, CH₂N₃), 3,59 - 3,68 (m, 16H, OCH₂CH₂O), 4,03 (d de t, J = 1,4, 5,6 Hz, 2H, CHCH₂O), 5,18 (d de c, J = 1,4, 10,4 Hz, 1H, CH₂=CH), 5,28 (d de c, J = 1,6, 17,3 Hz, 1H, CH₂=CH), 5,92 (m, J = 5,6, 10,4, 17,2 Hz, 1H, CH).

40

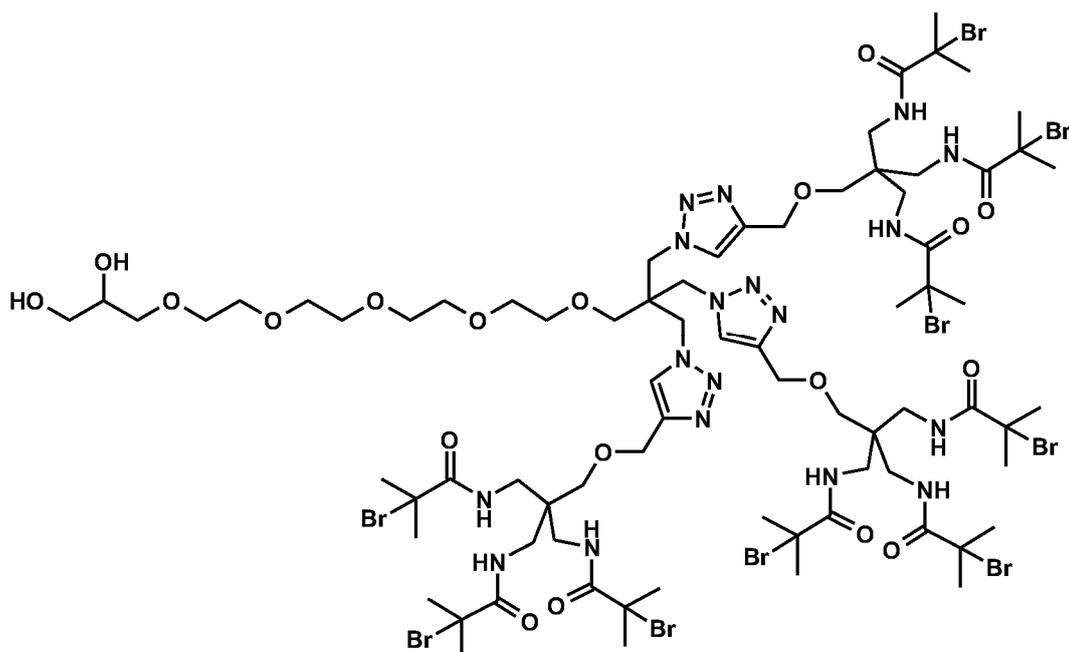
45

Ejemplo 82. Preparación de iniciador basado en clic de 9 brazos de 2,5,8,11,14-pentaoxaheptadec-16-enilo



5 A una solución desgasificada de alil tetraetilenglicol triazida (120 mg, 0,28 mmol) en 3 ml de etanol absoluto se añadieron 253 μ l de una solución de PMDETA en DMF (100 mg/ml) (25,3 mg, 0,146 mmol), seguido de 700 mg del derivado de alquino de 3 brazos (1,1 mmol, 4 equivalentes por mol de iniciador) disueltos en 3 ml de etanol. La mezcla se desgasificó con 3 ciclos rápidos de vacío - nitrógeno. Después se añadieron a la mezcla de reacción 21 mg de CuBr (0,146 mmol, 0,5 equivalentes o 0,17 Cu por azida) a la mezcla de reacción. La reacción se desgasificó rápidamente y se dejó proceder durante una noche en una atmósfera de nitrógeno con agitación a temperatura ambiente. La
10 cromatografía ultrarrápida de gel de sílice produjo el producto deseado.

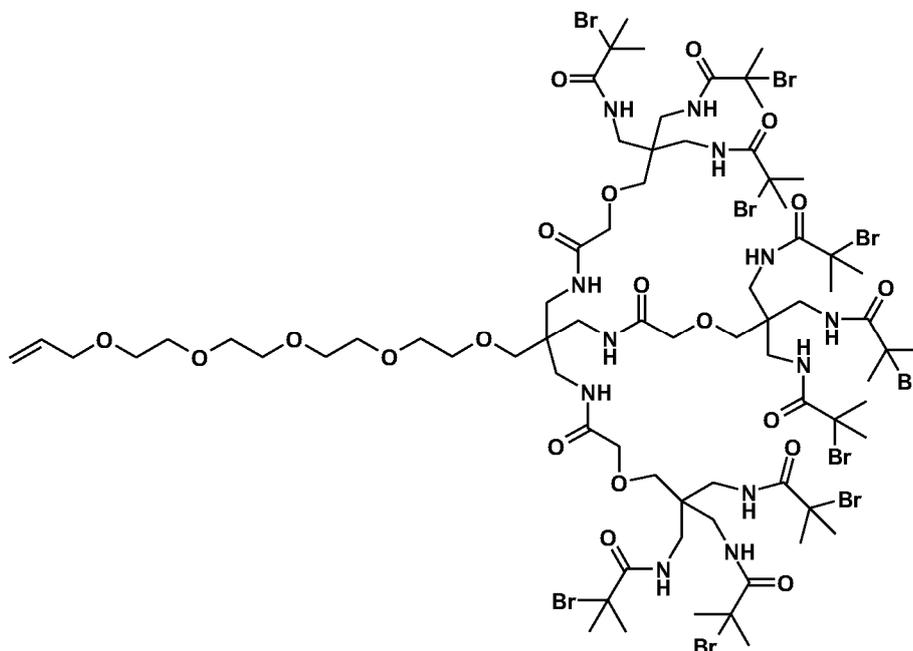
Ejemplo 83. Preparación de iniciador basado en clic de 9 brazos de 16,17-dihidroxi-2,5,8,11,14-pentaoxaheptadecilo



15 Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación se cargó con 15 ml de agua, 15 ml de t-butanol, 456 mg del alil tetraetilenglicol triazol del procedimiento anterior, 198 mg de ferricianuro potásico, 83 mg de carbonato potásico, 19 mg de metanosulfonamida, 1 mg de quinuclidina y 1 mg de osmiato potásico dihidrato y se agitó durante
20 una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se repartió entre 100 ml de cada uno de agua y

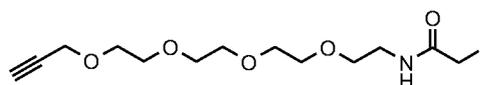
diclorometano. La capa acuosa se extrajo dos veces más con 25 ml de diclorometano y las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice usando metanol al 5 % en diclorometano para dar el producto deseado.

5 **Ejemplo 84. Preparación de iniciador basado en amida de 9 brazos de 2,5,8,11,14-pentaoxaheptadec-16-enilo**



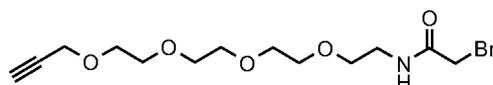
10 Una solución de triclorhidrato de 1-amino-15-aliloxi-2,2-bis(aminometil)-4,7,10,13-tetraoxapentadecano en acetonitrilo, junto con 6 equiv. de trietilamina, se dejó reaccionar con una solución de 3 equiv. de ácido N-(2-bromo-2-metilpropionil)-5,5-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-3-oxa-6-aminohexanoico, N-hidroxisuccinimidil éster en acetonitrilo y la mezcla se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se concentró para dar un residuo, que se recogió en diclorometano y se lavó con HCl 1 N, seguido de cloruro sódico saturado, después se secó sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron un residuo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con mezclas de acetato de etilo en hexano para dar el producto deseado.

15 **Ejemplo 85. Preparación de propargil tetraetilenglicol yodoacetamida**

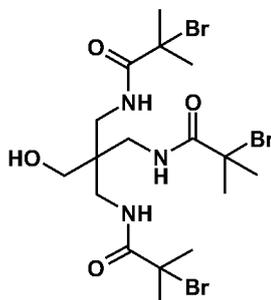


20 Se añadió anhídrido yodoacético (8,8 mmol, 3,11 g) a una solución agitada de propargil tetraetilenglicol amina (8 mmol, 1,85 g) y N,N-diisopropiletilamina (8 mmol, 1,39 g) en acetonitrilo seco (20 ml). Después de 90 minutos, la mezcla se concentró. El residuo se disolvió en 100 ml de acetato de etilo y se lavó tres veces con 100 ml de agua, seguido de 50 ml de cloruro sódico saturado. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron, y el residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 30-40 % en hexano.

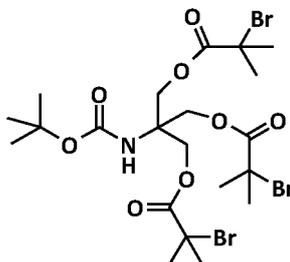
25 **Ejemplo 86. Preparación de propargil tetraetilenglicol bromoacetamida**



30 Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación se cargó con propargil tetraetilenglicol amina (8 mmol, 1,85 g), ácido bromoacético (12 mmol, 1,67 g), dimetilaminopiridina (9,6 mmol, 1,17 g), 4-toluenosulfonato de 4-dimetilaminopiridinio (2,4 mmol, 0,71 g) y diclorometano (20 ml). Se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla de agitación durante 10 minutos, después se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (15,6 mmol, 3,22 g). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla se filtró, se concentró y se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 40 % en hexano.

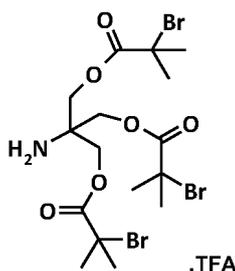
Ejemplo 87. Preparación de N-(2-Bromo-2-metilisobutiril)-2,2-bis[N-(2-bromo-2-metilpropionil)aminometil]-3-amino-1-propanol

5 Una solución de 2,00 gramos de trichlorhidrato de 2,2-aminometil-3-amino-1-propanol (documento WO2000/037658) y 9,33 ml de trietilamina en 200 ml de diclorometano se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo y se añadieron gota a gota 9,33 ml de bromuro de 2-bromoisobutirilo. La mezcla de reacción se dejó en agitación mientras se calentaba a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la solución se lavó con 3 x 50 ml de HCl 1 N, 3 x 50 ml de bicarbonato sódico saturado y 50 ml de cloruro sódico saturado. Después, la solución se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró para dar 4,67 gramos del producto deseado en forma de un sólido de color blanco. Este material podría purificarse adicionalmente por cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30-50 % en hexano. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,91 (s, 18H, CH₃), 3,05 (d, 6H, J = 6,4 Hz, CH₂N), 3,21 (d, 2H, J = 4,4 Hz, CH₂OH), 8,17 (t, J = 6,4 Hz, 3H, NH).

Ejemplo 88. Preparación de N-t-Butiloxicarbonil-2,2-[bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi)metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)-etanolamina

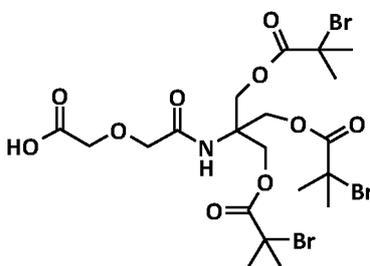
20 Una solución de 3,50 gramos de N-boc tris(hidroximetil)aminometano (J. Fluorine Chem. 2007, 128, 179) en 100 ml de diclorometano, junto con 11 ml (5 equiv.) de trietilamina se enfrió con un baño de hielo-agua y se añadieron gota a gota 6,2 ml (3,2 equiv.) de bromuro de 2-bromoisobutirilo. La reacción se agitó en el frío durante 3 horas, después se examinó por TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 30 % en hexano). La reacción aun no estaba completa, por lo que se añadieron gota a gota 3 gramos de bromuro de 2-bromoisobutirilo. Después de agitar durante otra hora, la reacción se filtró y el precipitado se lavó con una pequeña cantidad de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con 50 ml de bicarbonato sódico saturado, después se secó sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron un residuo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10-30 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se concentraron hasta un volumen de aproximadamente 50 ml y después se añadieron 200 ml más de hexano con refrigeración y agitación. A lo largo de aproximadamente 2 horas, mucho producto sólido cristalizó de la mezcla. Este se recuperó por filtración y se secó al aire para dar 7,1 gramos (67 %) del producto deseado en forma de un sólido cristalino de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,43 (s, 9H, Boc), 1,95 (s, 18H, (CH₃)₂CBr), 4,54 (s, 6H, CH₂O), 4,8 (s a, 1H, NH).

Ejemplo 89. Preparación de trifluoroacetato de 2,2-[bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi)metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)etanolamina



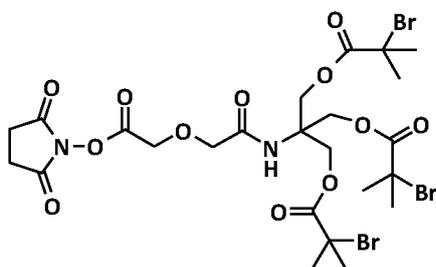
Una solución de 6,0 gramos de N-t-butiloxycarbonyl-2,2-[bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi) metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)-etanolamina en 40 ml de diclorometano se trató con 10 ml de ácido trifluoroacético y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después, la reacción se concentró y se añadieron 20 ml de hexano. La mezcla se concentró de nuevo, después se puso a alto vacío para dar 6,14 gramos del producto deseado en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 90. Preparación de 2,2-[bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi)metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)etanolamina semi amida con anhídrido diglicólico



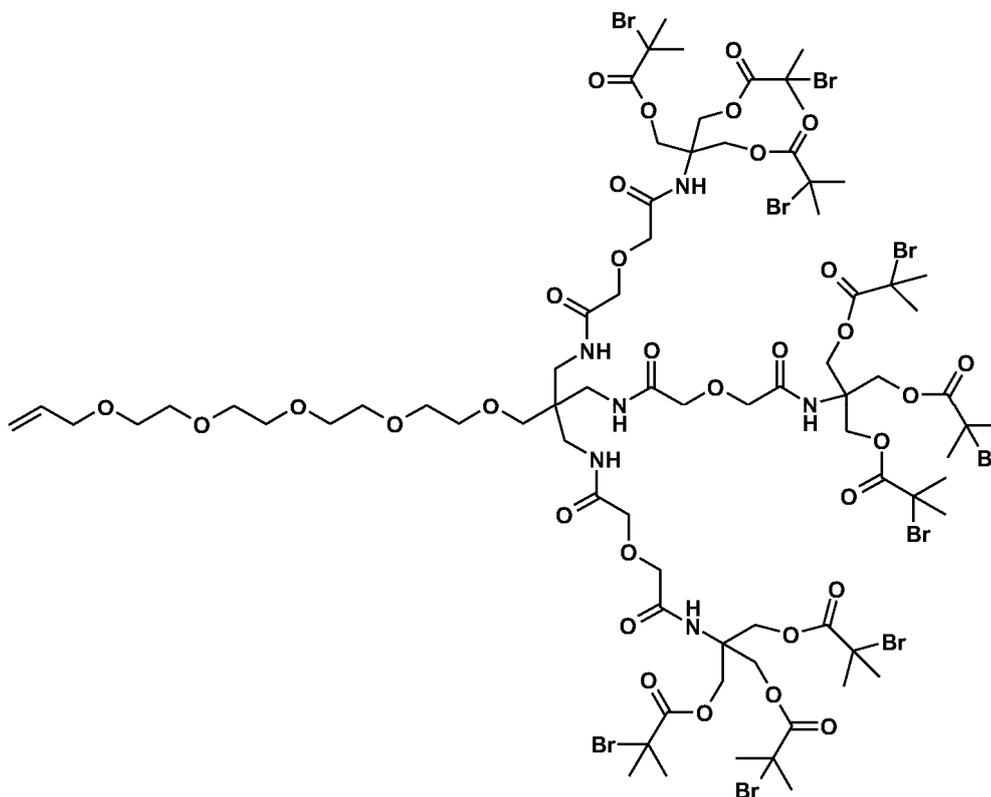
Una mezcla de 5,03 gramos de trifluoroacetato de 2,2-[bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi)metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)etanolamina en 50 ml de acetonitrilo se trató con 2,0 ml (2 equiv.) de trietilamina, tras lo cual la reacción se volvió inmediatamente homogénea. Se añadió una porción de 50 mg de DMAP, seguido de 860 mg (1 equiv.) de anhídrido diglicólico y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después, la reacción se concentró y el residuo se disolvió en 100 ml de diclorometano y se lavó con 2 x 50 ml de HCl 1 N, seguido de 50 ml de cloruro sódico saturado. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar el producto deseado.

Ejemplo 91. Preparación de 2,2-[Bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi)metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)etanolamina semi amida con anhídrido diglicólico, éster de NHS



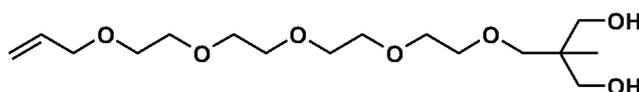
Una solución de 2,5 gramos de 2,2-[bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi)metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)etanolamina, semi amida con anhídrido diglicólico en 30 ml de acetonitrilo anhidro, junto con 500 mg de N-hidroxisuccinimida y 85 mg de DPTS, se trató con 900 mg de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 50 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar el producto deseado.

Ejemplo 92. Preparación de iniciador basado en ácido diglicólico de 9 brazos 2,5,8,11,14-pentaoxaheptadec-16-enilo



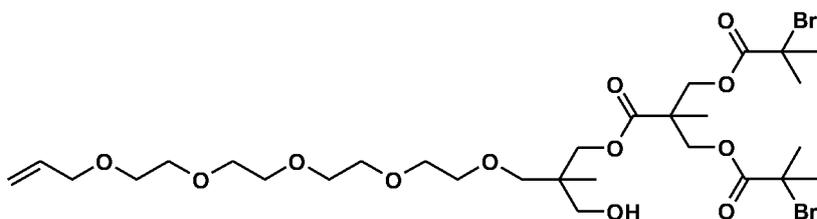
Una solución de triclorhidrato de 1-amino-15-alloxi-2,2-bis(aminometil)-4,7,10,13-tetraoxapentadecano en acetonitrilo, junto con 6 equiv. de trietilamina, se hizo reaccionar con una solución de 2,2-[bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi)metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)etanolamina semi amida con anhídrido diglicólico, éster de NHS y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se disolvió en 100 ml de diclorometano y se lavó con 2 x 50 ml de HCl 1 N, seguido de 50 ml de cloruro sódico saturado. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un residuo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar el producto deseado.

Ejemplo 93. Preparación de 2-metil-2-hidroxi-4,7,10,13,16-pentaoxa-18-enilnonadecanol



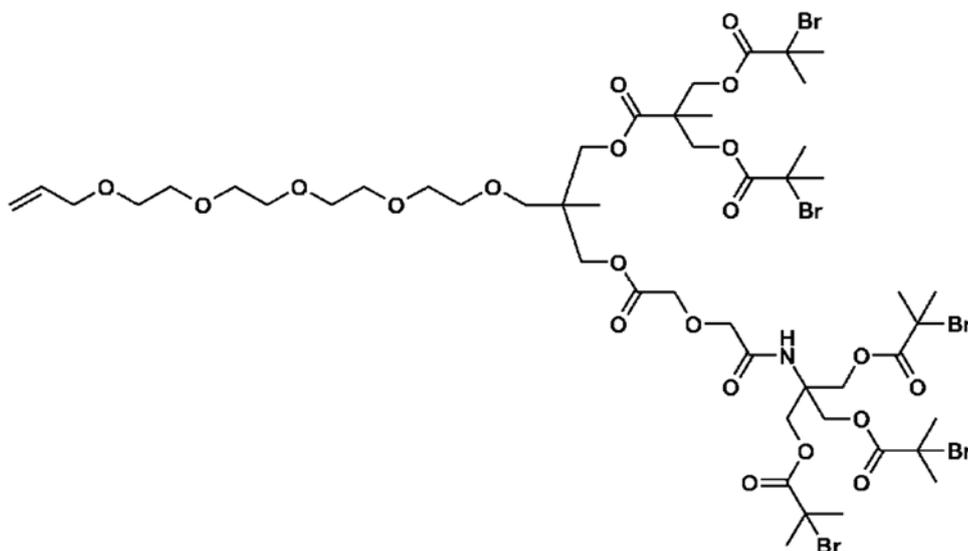
Una solución de 3,6 gramos de 5-hidroxi-2,2,5-trimetil-1,3-dioxano en 100 ml de THF anhidro se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo y se trató con 2,7 gramos de NaH (al 60 % en aceite). Después de detenerse el burbujeo, se añadieron 7,0 gramos de metanosulfonato de 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-en-1-ol y la reacción se agitó a 70 °C durante 2 horas. La reacción se enfrió, se añadieron cuidadosamente 3 ml de agua y la mezcla de reacción se repartió entre 100 ml de agua y 100 ml de éter. La capa acuosa se extrajo con 2 x 50 ml más de éter y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron un aceite de color amarillo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetona al 10-15 % en hexano para dar 5,62 gramos del producto de acetónido deseado en forma de un aceite transparente. Una porción de 4,84 gramos de este aceite se recogió en 50 ml de metanol y se trató con 1,0 gramos de resina Dowex 50Wx8 (forma H⁺) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró para dar 4,30 gramos del producto deseado en forma de un aceite transparente casi incoloro.

Ejemplo 94. Preparación de 2-metil-2-hidroxi-4,7,10,13,16-pentaoxa-18-enilnonadecanol, mono éster con ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiril)hidroximetil] propiónico



Una muestra de 2-metil-2-hidroximetil-4,7,10,13,16-pentaoxa-18-enilnonadecanol en acetonitrilo anhidro se trató con 1 equiv. de ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiril)hidroximetil] propiónico, una cantidad catalítica de DPTS y 1,2 equiv. de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente. La filtración y la concentración dieron un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo en hexano para dar el compuesto deseado.

Ejemplo 95. Preparación de iniciador híbrido de 5 brazos de 2,5,8,11,14-pentaoxaheptadec-16-enilo



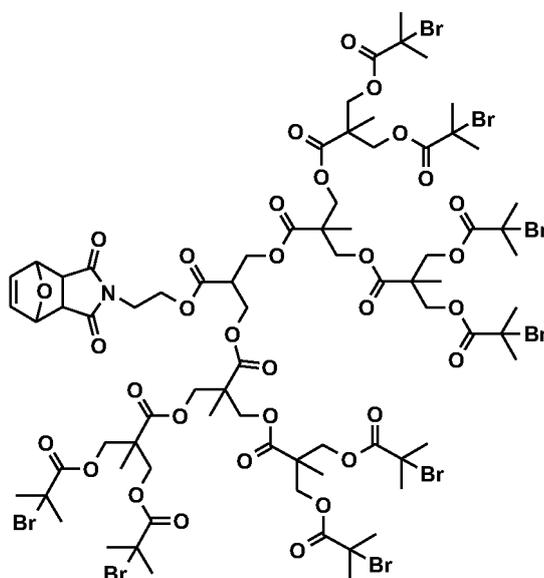
10

Una solución de 2-metil-2-hidroximetil-4,7,10,13,16-pentaoxa-18-enilnonadecanol, mono éster con ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiril)hidroximetil]propiónico en acetonitrilo anhidro se trató con 1 equiv. de 2,2-[bis(2-bromo-2-metilpropioniloxi)metil]-O-(2-bromo-2-metilpropionil)etanolamina semi amida con anhídrido diglicólico, una cantidad catalítica de DPTS y 1,2 equiv. de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente. La filtración y la concentración dieron un aceite, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo en hexano para dar el iniciador de 5 brazos deseado.

15

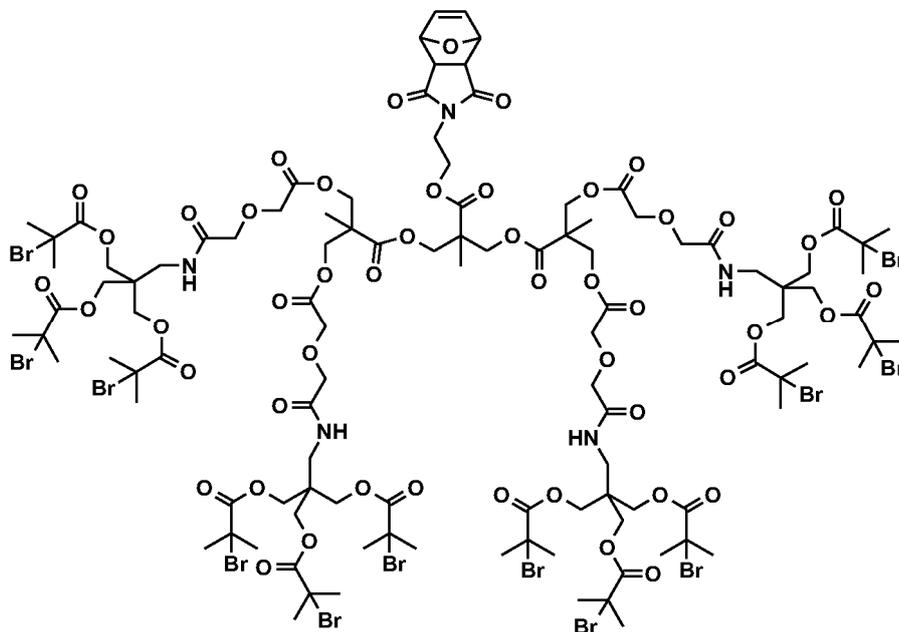
Ejemplo 96. Preparación de iniciador de 8 brazos de maleimida protegida

20



5 Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación se cargó con el tetraol de maleimida protegida (1 mmol, 543 mg), bis(bromo) ácido (4,5 mmol, 1,94 g), dimetilaminopiridina (3,6 mmol, 440 mg), 4-toluenosulfonato de 4-dimetilaminopiridinio (0,9 mmol, 265 mg) y diclorometano (20 ml). Se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla de agitación durante 10 minutos, después se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (5,85 mmol, 1,21 g). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla se filtró, se concentró y se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 40 % en hexano.

10 Ejemplo 97. Preparación de iniciador de 12 brazos de maleimida protegida

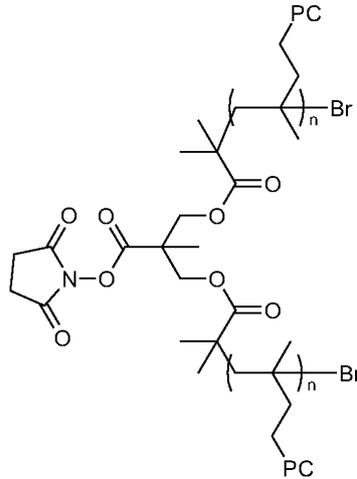


15 Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación se cargó con el tetraol de maleimida protegida (1 mmol, 543 mg), ácido de semi amida de 3 brazos (4,5 mmol, 3,14 g), dimetilaminopiridina (3,6 mmol, 440 mg), 4-toluenosulfonato de 4-dimetilaminopiridinio (0,9 mmol, 265 mg) y diclorometano (20 ml). Se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla de agitación durante 10 minutos, después se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (5,85 mmol, 1,21 g). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla se filtró, se concentró y se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo al 40 % en hexano.

20

Ejemplo 98. Preparación de polímeros zwitteriónicos de alto peso molecular

Un ejemplo de polímero de 2 brazos sintetizado usando el iniciador de NHSM2

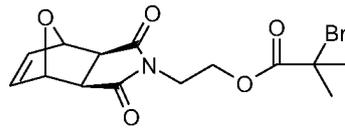


Un protocolo representativo para producir polímeros hidrófilos hechos a medida de alto peso molecular del monómero zwitteriónico, 2-metacrilóiloxietil fosforilcolina (HEMA-PC), usando un proceso de radicales libres controlados "vivos",
 5 polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), es como se indica a continuación.

Se utilizaron los siguientes iniciadores:

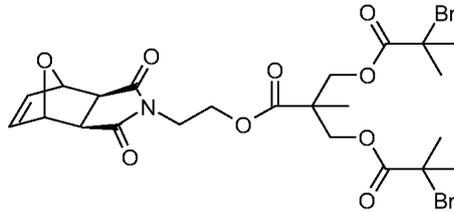
PMC2M1 (del Ejemplo 4)

10



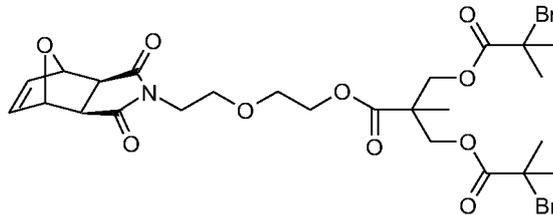
PMC2M2 (del Ejemplo 5)

15



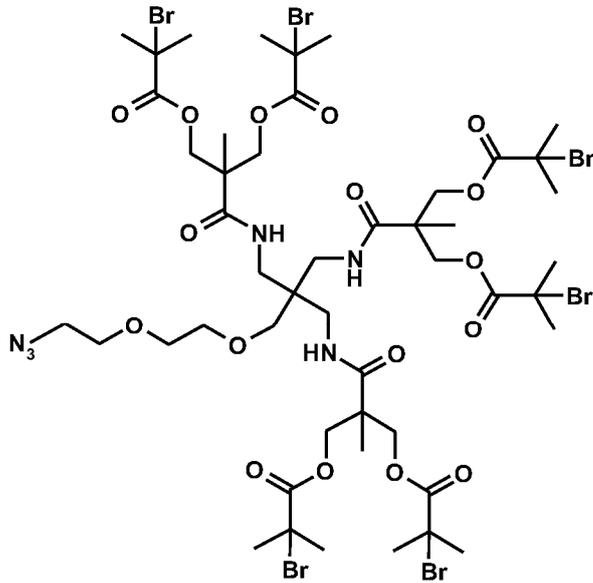
PMC2EOM2 (del Ejemplo 8)

20

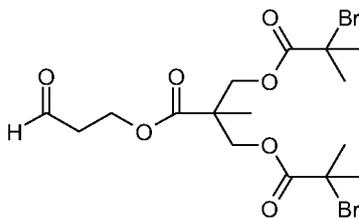


PMC2M4 (del Ejemplo 14)

N3EOM6 (del Ejemplo 74)

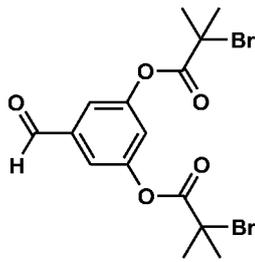


AIC2M2 (from Example 24)



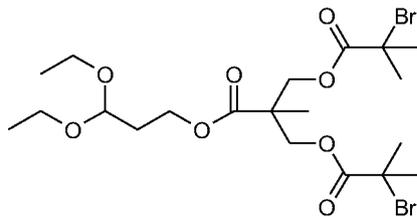
5

BAIM2 (del Ejemplo 50)



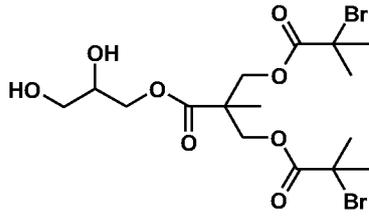
10

AcC2M2 (del Ejemplo 9)

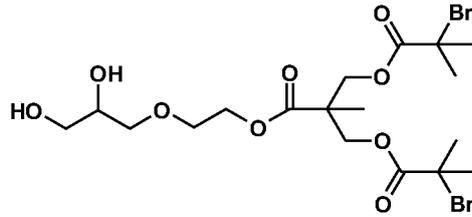


15

DC1M2 (del Ejemplo 40)

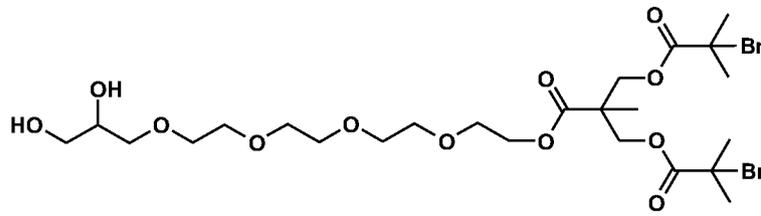


DC1EOM2 (del Ejemplo 41)



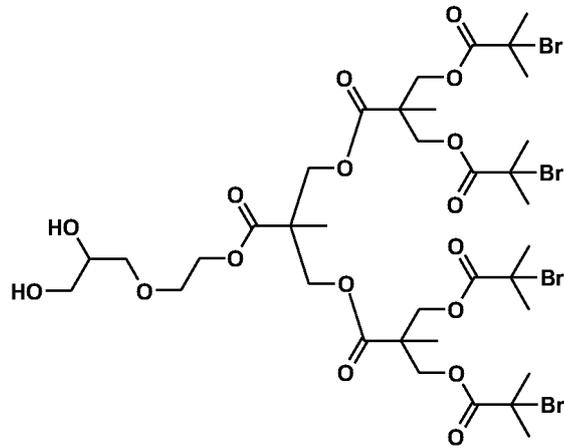
5

DC1EO4M2 (del Ejemplo 43)



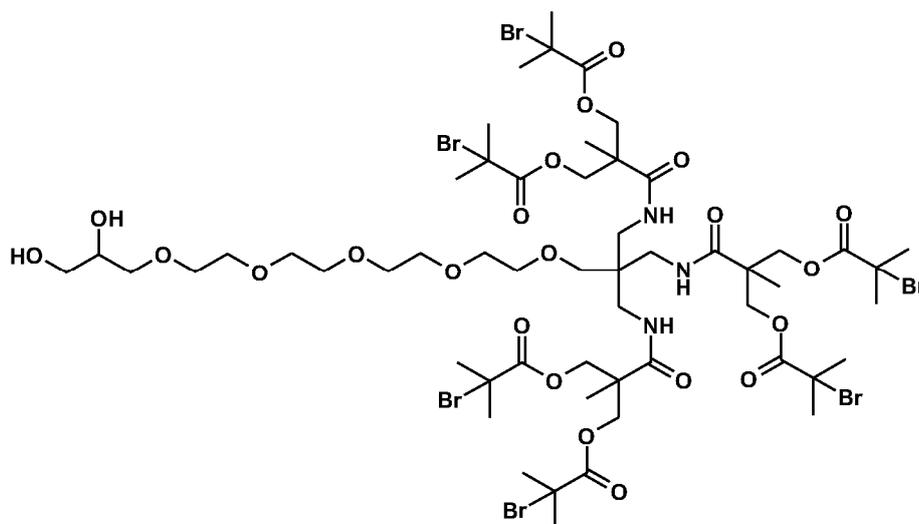
10

DC1EOM4 (del Ejemplo 48)

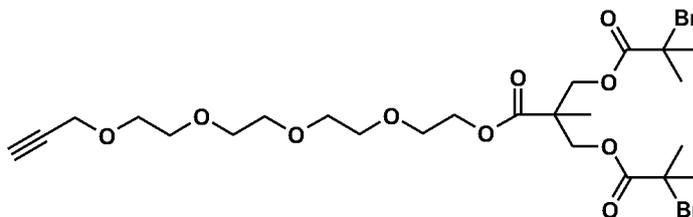


15

DC1EO4M6 (del Ejemplo 59)

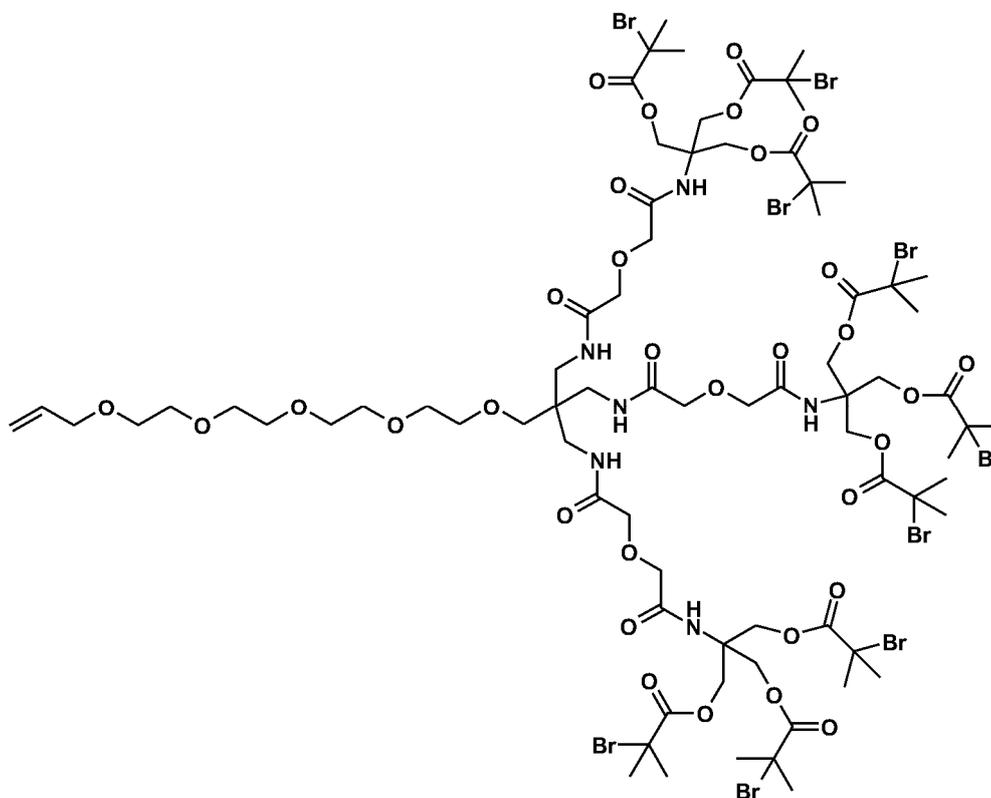


AKC1EO4M2 (del Ejemplo 64)



5

AEC1EO4M9 (del Ejemplo 92)



10

El iniciador y el ligando (2,2'-bipiridilo a menos que se indique otra cosa) se introdujeron en un tubo Schlenk. Se introdujo gota a gota dimetilformamida o dimetilsulfóxido, de modo que el porcentaje en peso total tanto del iniciador

como del ligando no excedió el 20 %. En el caso de que los iniciadores o ligandos fueran aceites, o las cantidades implicadas estuvieran por debajo del límite de precisión del equilibrio, los reactivos se introdujeron como soluciones en dimetil formamida (100 mg/ml). La solución resultante se enfrió a -78 °C usando una mezcla de hielo seco/acetona y se desgasificó al vacío hasta que no se vio más burbujeo. La mezcla permaneció homogénea a esta temperatura.

5 El tubo se cargó de nuevo en una atmósfera de nitrógeno y el catalizador (CuBr a menos que se indique otra cosa), se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno, se introdujo en el tubo Schlenck. La solución se volvió inmediatamente de color pardo oscuro. El tubo Schlenck se cerró herméticamente y se mantuvo a -78 °C y la solución se purgó inmediatamente aplicando vacío. Se tuvo cuidado para asegurar que el monómero, HEMA-PC, se mantenía como un sólido seco en condiciones inertes en todo momento hasta que esté listo para su uso. Se preparó recientemente una

10 solución de HEMA-PC mezclando una cantidad definida de monómero, en nitrógeno, con etanol desgasificado de graduación 100 %. La solución de monómero se añadió gota a gota en el tubo Schlenck y se homogeneizó mediante una ligera agitación. A menos que se indique otra cosa, la proporción de monómero (g)/etanol (ml) fue 0,255. La temperatura se mantuvo a -78 °C. Se aplicó un vacío completo a la mezcla de reacción durante al menos 10 a 15 min hasta que cesó el burbujeo de la solución. La mezcla permaneció homogénea a esta temperatura, es decir, sin precipitación de ninguno de los ingredientes de la reacción (tal como iniciador o ligando), evitando de este modo una

15 polimerización prematura o indeseada. El tubo se cargó de nuevo con nitrógeno y el ciclo de vacío-nitrógeno se repitió dos veces. Después, el tubo se cargó de nuevo con nitrógeno y se calentó a temperatura ambiente (25 °C). Según tenía lugar la polimerización, la solución se volvió viscosa. Después de un poco de tiempo (definido en la tabla posterior), la reacción se interrumpió mediante exposición directa al aire causando que la mezcla se volviera de color

20 azul-verde y se pasó a través de una columna de sílice para retirar el catalizador de cobre. La solución recogida se concentró por evaporación rotatoria y la mezcla resultante se purificó por precipitación cuidadosa en tetrahidrofurano, seguido de lavado completo con éter dietílico, o por diálisis frente a agua. El polímero se recogió en forma de un polvo esponjoso de color blanco (seguido de criodesecado si se dializó frente a agua) y se puso al vacío a temperatura ambiente.

25

Los datos de varias reacciones de polimerización se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Iniciador	Iniciador (10 ⁻⁵ mol)	Monómero (g)	Catalizador (10 ⁻⁵ mol)	Ligando (10 ⁻⁵ mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN ¹ H)
Serie de maleimidas (precursor de maleimida protegida)										
1	PMC2M2	2,05	2,046	4,08	8,20	8	103	121	1,15	95
2	PMC2M2	1,35	2,028	2,70	5,40	8	158	183,2	1,15	93
3	PMC2M2	2,48	2,486	4,97	9,90	8	119,1	135	1,15	97
4	PMC2M1	2,03	1,529	2,03	4,07	8	91,6	93,3	1,15	98
5	PMC2M2	2,00	3,993	3,99	7,97	7½	175,2	202,8	1,15	96
6	PMC2M2	0,33	1,000	0,69	1,32	6½	196,2	240,7	1,2	85
7	PMC2M2	0,55	2,065	1,10	2,20	21	289,9	351,2	1,25	90
8	PMC2M2	0,26	2,095	0,52	1,04	20½	348,6	415,9	1,25	50
9 ³	PMC2M2	2,82	2,829	5,65	11,3	8	110,2	123,3	1,1	95
10 ³	PMC2M2	1,33	4,529	2,66	5,32	19	317,3	372,9	1,15	98
11	PMC2M2	1,33	4,012	2,66	5,32	15½	270,3	314	1,15	96
12 ³	PMC2M2	0,49	3,026	0,97	1,94	16	414,3	517,8	1,25	70
13 ⁴	PMC2M2	0,80	6,016	1,60	3,20	24	531,3	692	1,3	94
14	PMC2M2	1,50	4,280	2,98	5,96	20	248,7	296,6	1,2	90
15	PMC2M2	1,00	1,000	1,99	3,99	8	99,3	117,2	1,15	94
16	PMC2M1	2,00	2,000	2,00	3,99	17	122,5	145,8	1,15	97
17	PMC2M2	2,89	2,893	5,77	11,5	8	99,47	117,6	1,15	97
18	PMC2M1	1,01	2,023	1,00	2,01	26½	190,7	253	1,3	90
19	PMC2M2	2,98	1,493	5,96	11,9	5	76,8	76,1	1,1	96
20	PMC2M4	1,48	1,494	5,94	11,9	5	128,5	130,9	1,1	94
21	PMC2M2	2,05	2,058	4,10	8,22	8	128,8	136,3	1,1	94
22	PMC2M2	0,76	2,202	1,53	3,06	20	292,1	328,8	1,15	95

(continuación)

Muestra	Iniciador	Iniciador (10 ⁻⁵ mol)	Monómero (g)	Catalizador (10 ⁻⁵ mol)	Ligando (10 ⁻⁵ mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN ¹ H)
Serie de maleimidas (precursor de maleimida protegida)										
23 ³	PMC2M4	1,04	2,094	4,16	8,34	6	198,5	214,9	1,1	91
24	PMC2EOM2	1,07	1,076	2,14	4,29	7	148	155,4	1,1	93
25	PMC2M2	1,46	1,468	2,92	5,85	8	148	157,4	1,1	93
26 ¹	PMC2M2	1,70	1,704	3,39	6,8	8	94,8	100,7	1,1	98
27	PMC2M2	0,90	0,897	1,78	3,58	8	104,5	115,2	1,1	93
28	PMC2M2	1,06	1,060	2,16	4,23	8	53,4	55,4	1,1	85
29	PMC2M4	0,26	2,180	1,03	2,04	41	300	340	1,1	35
30 ²	PMC2M2	0,99	0,994	1,98	3,96	8	520	830	1,7	70
31 ⁴	PMC2M2	0,40	2,370	0,78	1,58	39	350	429	1,15	56
32	PMC2M4	0,50	2,020	2,01	4,03	18	402	445	1,15	98
33 ⁴	PMC2M4	0,37	2,203	1,46	2,93	38	550	640	1,15	96
34 ⁴	PMC2M4	0,38	2,256	1,49	3,00	38	625	670	1,15	98
35 ⁴	PMC2M4	0,54	2,181	2,17	4,35	16	400	465	1,2	98
36 ⁴	PMC2M4	0,67	2,336	2,66	5,33	16	404	445	1,15	98
Serie de aldehídos										
37	AIC2M2	1,00	1,500	1,99	3,99	6½	117,3	145	1,2	90
38	AIC2M2	10,0	1,000	20,0	39,9	2	18,99	19,54	1,1	95
39	AIC2M2	10,0	1,000	20,0	39,9	2	18,64	18,96	1,1	> 99
40	AIC2M2	1,00	1,000	2,00	3,99	4½	132,3	157	1,15	> 99
41	AIC2M2	2,17	1,300	4,35	8,70	7	52,32	58,57	1,15	99
42	AIC2M2	1,51	1,517	3,02	6,05	7½	89,43	104,7	1,1	96
43	AIC2M2	1,90	1,142	3,80	7,61	7	78	81,1	1,1	97

(continuación)

Muestra	Iniciador	Iniciador (10 ⁻⁵ mol)	Monómero (g)	Catalizador (10 ⁻⁵ mol)	Ligando (10 ⁻⁵ mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN ¹ H)
44	AIC2M2	4,17	1,045	8,36	16,7	15	33,3	36,2	1,1	> 99
45	BAIM2	20,0	1,000	40,0	80,0	1½	10,32	10,2	1,1	> 99
46	BAIM2	2,17	1,300	4,35	8,70	8	60	62,0	1,1	98
Serie de aldehídos										
47	BAIM2	1,51	1,517	3,02	6,05	8	94	98,9	1,1	91
48	BAIM2	1,89	1,133	3,79	7,58	7	86,2	82,4	1,1	95
49	BAIM2	4,13	1,035	8,27	16,5	15	32,9	30,7	1,1	> 99
Serie de NHS										
50	NHSM2	0,50	1,500	1,00	1,99	22	159,3	204	1,2	93
51	NHSM2	1,00	1,500	1,99	3,99	6½	117,7	144,7	1,15	85
52	NHSM2	2,97	1,487	5,93	11,8	5	59,9	58	1,1	90
53	NHSM2	0,50	1,000	1,00	1,99	21	160,3	186,6	1,1	80
54	NHSE04M2	1,31	1,320	2,62	5,27	8	110	118	1,1	94
Serie de aldehídos (precursor de diol)										
55	DC1M2	1,75	1,049	3,50	7,01	7	89,5	87,7	1,1	95
56	DC1EOM2	2,92	1,752	5,85	11,7	7	79,3	85,6	1,1	95
57	DC1EOM2	0,73	1,467	1,46	2,92	7½	148,1	162,9	1,1	92
58	DC1E04M2	1,55	1,550	3,10	6,20	8	112,9	121,8	1,1	> 99
59	DC1EOM2	0,94	2,071	1,88	3,76	24	240	260	1,1	-
60	DC1EOM2	0,38	3,050	0,76	1,51	23	330	390	1,2	70
61 ⁴	DC1EOM2	1,03	2,07	2,06	4,12	19	135	155	1,1	> 99
62 ⁴	DC1EOM2	0,34	2,096	0,69	1,34	24	244	300	1,2	56
63	DC1EOM2	1,05	2,099	2,09	4,19	19	185	213	1,1	90

(continuación)

Muestra	Iniciador	Iniciador (10 ⁻⁵ mol)	Monómero (g)	Catalizador (10 ⁻⁵ mol)	Ligando (10 ⁻⁵ mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN ¹ H)
64	DC1EOM2	0,98	2,052	1,95	3,9	19	230	258	1,1	94
65 ³	DC1EOM2	0,38	3,074	0,76	1,53	23	420	498	1,2	91
66 ³	DC1EOM2	0,396	1,970	0,78	1,57	22	330	380	1,15	63
67 ³	DC1EOM2	0,38	2,146	0,76	1,52	21	435	510	1,15	82
68 ⁴	DC1EOM4	0,54	2,173	2,16	4,33	18	435	470	1,1	98
69 ⁴	DC1EOM4	0,26	1,584	1,05	2,10	20	580	660	1,15	96
Serie de NHS										
70 ⁴	DC1EOM4	0,59	2,126	2,35	4,71	18	405	433	1,15	99
71 ⁴	DC1EOM4	0,40	2,168	1,60	3,20	20	516	570	1,15	96
72	DC1E04M2	0,41	2,033	0,80	1,46	116	337	378	1,15	80
73	DC1EOM4	1,14	4,101	4,53	9,00	18	395	435	1,15	99
74	DC1EOM4	0,75	4,066	3,00	5,99	20	533	617	1,2	97
75	DC1EOM2	1,04	2,085	2,07	4,16	19	200	227	1,1	93
76	DC1E04M6	0,52	1,036	3,10	6,21	21	232,5	243,2	1,1	99
77	DC1E04M2	3,97	0,994	7,94	15,8	15½	34,4	36,4	1,1	99
78	DC1EOM2	4,00	1,009	8,06	16,1	16	38	38,8	1,1	> 99
79	DC1M2	4,00	1,011	8,08	16,1	16	33,5	33,5	1,1	98
80	DC1E04M6	1,95	3,904	11,6	23,4	21	241	254	1,1	99
81	DC1E04M6	0,26	1,021	1,52	3,06	90	410,7	467,4	1,15	> 99
82	DC1E04M6	0,95	3,662	5,70	11,4	20	452	470	1,1	99
83	DC1E04M6	1,70	2,033	10,2	20,4	21	151	152	1,1	> 99
Serie de azido										
84	N3C2EOM2	4,21	1,055	8,43	16,8	15	35,8	35,9	1,1	> 99

(continuación)

Muestra	Iniciador	Iniciador (10 ⁻⁵ mol)	Monómero (g)	Catalizador (10 ⁻⁵ mol)	Ligando (10 ⁻⁵ mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN ¹ H)
85 ⁵	N3EO2M6	0,78	1,947	4,67	9,34	15	336	336	1,12	99
86 ⁵	N3EO2M6	1,00	1,997	6,30	12,6	16½	226,9	240,6	1,1	> 99
87	N3EO2M6	1,73	2,000	10,1	20,1	21	149,4	156,9	1,1	> 99
88 ⁵	N3EO2M6	0,56	2,006	3,30	6,50	20	477,4	480	1,2	> 99
89	N3C2EOM2	2,05	2,049	4,09	8,18	7½	114,5	125,9	1,1	91
Serie de aldehído (precursor de acetal)										
90	AcC2M2	1,81	1,082	3,61	7,24	7	88,6	92,6	1,05	96
Serie de alquino										
91	AKC1E04M2	4,19	1,048	8,36	16,7	15	48,9	50,8	1,06	> 99
Serie de alqueno (reactivo de tío)										
92	AEC1E04M9	1,73	2,000	15,57	31,14	21	150	160	1,1	> 99
93	AEC1E04M9	0,56	2,006	5,04	10,08	20	470	480	1,2	99

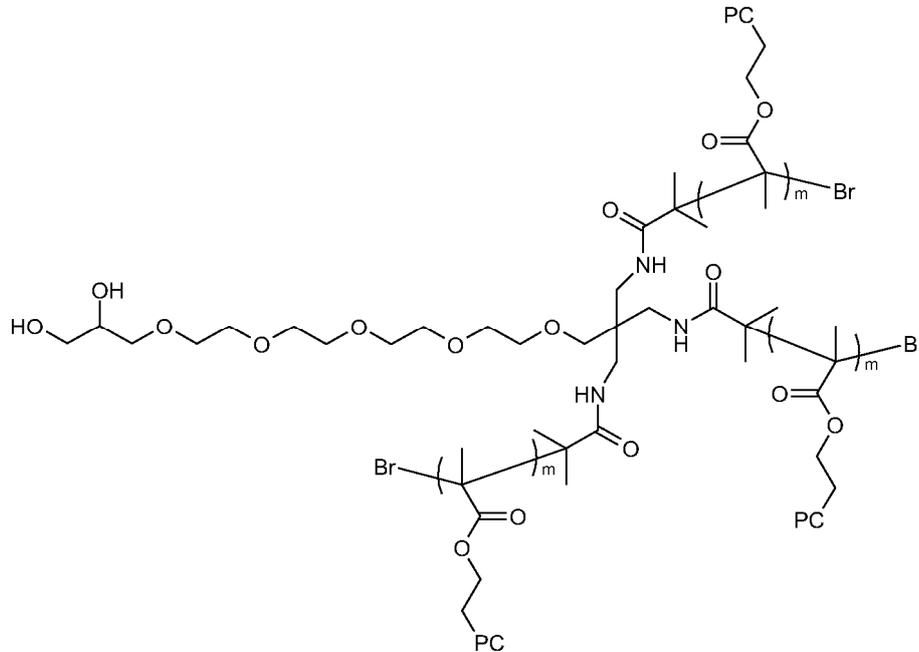
¹Disolvente de metanol/agua (75/25) v/v²Disolvente de etanol/glicerol (50/50) v/v³Monómero (g)/disolvente (ml) 0,33⁴Monómero (g)/disolvente (ml) 0,40⁵Monómero (g)/disolvente (ml) 0,50

El peso molecular máximo (Mp), peso molecular en número (Mn) y polidispersidad (IPD) se determinaron/derivados por dispersión de luz de múltiples ángulos.

Ejemplo 99. Preparaciones adicionales de polímeros zwitteriónicos de alto peso molecular

5

Un ejemplo de polímero de 3 brazos sintetizado usando el iniciador de DC1EO4NM3

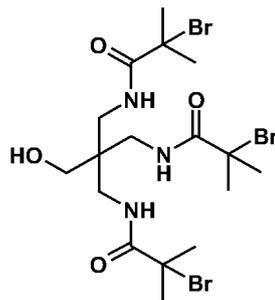


10 Un protocolo representativo alternativo para producir polímeros hidrófilos hechos a medida de alto peso molecular del monómero zwitteriónico, 2-metacrililoixietil fosforilcolina (HEMA-PC), usando un proceso de radicales libres controlados "vivos", polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), es como se indica a continuación.

Se utilizaron los siguientes iniciadores:

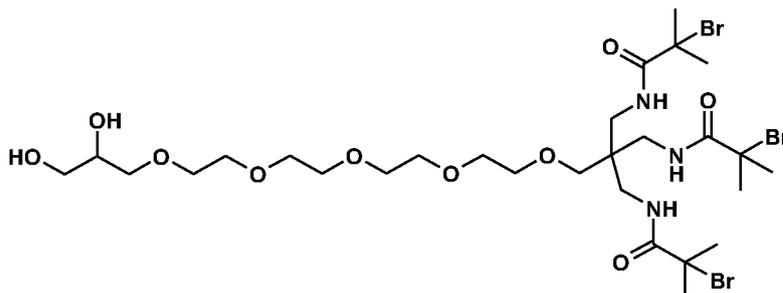
15

HOC1NM3 (del Ejemplo 87)

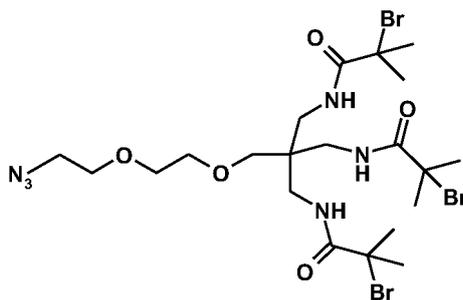


20

DC1EO4NM3 (del Ejemplo 54)



N3EO2NM3 (del Ejemplo 57)



El iniciador y el ligando (2,2'-bipiridilo a menos que se indique otra cosa) se introdujeron en un tubo Schlenk. Se introdujo gota a gota dimetilformamida o dimetilsulfóxido, de modo que el porcentaje en peso total tanto del iniciador como del ligando no excedió el 20 %. En el caso de que los iniciadores o ligandos fueran aceites, o las cantidades implicadas estuvieran por debajo del límite de precisión del equilibrio, los reactivos se introdujeron como soluciones en dimetil formamida (100 mg/ml). La solución resultante se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando una mezcla de hielo seco/acetona y se desgasificó al vacío hasta que no se vio más burbujeo. La mezcla permaneció homogénea a esta temperatura. El tubo se cargó de nuevo en una atmósfera de nitrógeno y el catalizador (CuBr a menos que se indique otra cosa), se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno, se introdujo en el tubo Schlenck. La solución se volvió inmediatamente de color pardo oscuro. El tubo Schlenk se cerró herméticamente y se mantuvo a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la solución se purgó inmediatamente aplicando vacío. Se tuvo cuidado para asegurar que el monómero, HEMA-PC, se mantenía como un sólido seco en condiciones inertes en todo momento hasta que esté listo para su uso. Se preparó recientemente una solución de HEMA-PC mezclando una cantidad definida de monómero, se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno, con etanol desgasificado de graduación 100 %. Una solución desgasificada de CuBr_2 en dimetil formamida (100 mg/ml) se añadió a la solución de HEMA-PC en una atmósfera de nitrógeno en la proporción de haluro/CuBr/CuBr₂ de 1/0,9/0,1 durante tiempos de reacción de hasta 24 horas y 1/0,75/0,25 durante tiempos de reacción más largos de 24 horas. La solución de resultante se añadió gota a gota en el tubo Schlenk y se homogeneizó mediante una ligera agitación. A menos que se indique otra cosa, la proporción de monómero (g)/etanol (ml) fue 0,50. La temperatura se mantuvo a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se aplicó un vacío completo a la mezcla de reacción durante al menos 10 a 15 min hasta que cesó el burbujeo de la solución. La mezcla permaneció homogénea a esta temperatura, es decir, sin precipitación de ninguno de los ingredientes de la reacción (tal como iniciador o ligando), evitando de este modo una polimerización prematura o indeseada. El tubo se cargó de nuevo con nitrógeno y el ciclo de vacío-nitrógeno se repitió dos veces. Después, el tubo se cargó de nuevo con nitrógeno y se calentó a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Según tenía lugar la polimerización, la solución se volvió viscosa. Después de un poco de tiempo (definido en la tabla posterior), la reacción se interrumpió mediante exposición directa al aire causando que la mezcla se volviera de color azul-verde y se pasó a través de una columna de sílice para retirar el catalizador de cobre. La solución recogida se concentró por evaporación rotatoria y la mezcla resultante se purificó por precipitación cuidadosa en tetrahidrofurano, seguido de lavado completo con éter dietílico, o por diálisis frente a agua. El polímero se recogió en forma de un polvo esponjoso de color blanco (seguido de criodesecado si se dializó frente a agua) y se puso al vacío a temperatura ambiente.

Los datos de varias reacciones de polimerización se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Iniciador	Iniciador (10 ⁻⁵ mol)	Monómero (g)	CuBr (10 ⁻⁵ mol)	Ligando (10 ⁻⁵ mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN ¹ H)
Serie de aldehidos (precursor de diol)										
1	DC1EO4NM3	0,32	1,931	0,49	1,92	137	366,7	432	1,15	57
2	DC1EO4NM3	0,98	1,966	1,47	5,89	62	156	180	1,15	60
3	DC1EO4NM3	0,34	2,065	0,77	2,06	63	547	624	1,15	95
4	DC1EO4NM3	0,61	2,136	1,36	3,66	40	359	406	1,15	99
5	DC1EO4NM3	0,99	1,975	2,21	5,91	50	292	329	1,15	96
6	DC1EO4NM3	0,34	2,021	1,00	2,01	50	498	585	1,15	96
7	DC1EO4NM3	1,15	4,040	2,57	6,92	40	331	367	1,15	> 99
8	DC1EO4NM3	1,53	2,027	3,45	9,22	48	175,7	186	1,1	99
9'	DC1EO4NM3	1,17	2,072	3,17	7,05	24	254	274	1,1	99
10'	DC1EO4NM3	1,58	2,084	3,55	9,47	62	269,7	286,5	1,15	99
11'	DC1EO4NM3	1,16	4,088	2,60	6,99	62	434,8	511,1	1,2	97
12	DC1EO4NM3	0,93	3,585	1,98	5,4	92	393	452	1,2	93
13'	DC1EO4NM3	1,44	3,619	6,04	8,64	48	265	322	1,2	81
Serie de hidroxilo										
14	HOC1NM3	0,28	1,122	0,42	1,67	20	134	140	1,15	25
15	HOC1NM3	0,53	2,141	0,79	3,18	133	387	415	1,15	93
16	HOC1NM3	0,40	1,123	0,89	2,39	20	124,9	127,1	1,15	40
17	HOC1NM3	0,40	1,034	0,89	2,39	20	194,1	209	1,1	55
18	HOC1NM3	0,40	1,021	1,08	2,39	20	279,3	312,7	1,2	95
Serie de azido										
19	N3E02NM3	0,88	3,099	1,97	5,30	64	393,7	422,6	1,1	94
20	N3E02NM3	0,48	1,192	1,28	2,86	20	115	116	1,1	65

(continuación)

Muestra	Iniciador	Iniciador (10^{-5} mol)	Monómero (g)	CuBr (10^{-5} mol)	Ligando (10^{-5} mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN 1 H)
21	N3E02NM3	0,41	1,013	0,85	2,42	64	169,7	178	1,1	41
22	N3E02NM3	0,40	0,994	1,07	2,38	64	323,8	374,5	1,18	94
Serie de azido										
23	N3E02NM3	0,79	1,989	1,78	4,76	46	56	52	1,1	12
24	N3E02NM3	0,82	2,048	2,20	4,90	46	146	154	1,15	37
25	N3E02NM3	0,80	2,006	2,16	4,80	22	324,9	349,7	1,15	91
26	N3E02NM3	0,80	1,994	2,15	4,77	46	342,1	379,2	1,15	99
27	N3E02NM3	0,80	2,007	2,45	4,80	15	315,1	379,5	1,25	90
28	N3E02NM3	0,80	2,002	2,15	4,79	22	333,7	358	1,11	94
29	N3E02NM3	0,80	2,002	2,30	4,80	22	323	360	1,15	95
30	N3E02NM3	1,09	2,029	2,95	6,57	22	277	292	1,15	99
31	N3E02NM3	1,00	2,005	2,70	6,01	22	286,5	306,3	1,1	97
32	N3E02NM3	1,23	2,045	3,53	7,42	22	242,4	267,6	1,15	94
33	N3E02NM3	1,24	1,926	3,54	7,45	22	233	289	1,25	99

1 Monómero (g)/disolvente (ml) 0,33
La proporción de haluro/CuBr/CuBr₂ fue 1/0,9/0,1 para tiempos de reacción de hasta 24 horas y 1/0,75/0,25 para tiempos de reacción más largos de 24 horas

El peso molecular máximo (Mp), peso molecular en número (Mn) y polidispersidad (IPD) se determinaron/derivados por dispersión de luz de múltiples ángulos.

Ejemplo 100. Preparación de polímeros PEG de alto peso molecular

5

Un protocolo representativo para producir polímeros hidrófilos hechos a medida de alto peso molecular del monómero hidrófilo, metacrilato de metil éter de poli(etilenglicol), El MW 475 (HEMA-PEG475), usando un proceso de radicales libres "vivos" controlado, polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), es esencialmente el mismo protocolo indicado en el Ejemplo 98 con las siguientes diferencias. El monómero (HEMA-PEG 475) se disolvió en una graduación del 100 % y la solución se desgasificó usando la técnica de congelación-bombeo-descongelación (3 ciclos). La mezcla desgasificada resultante se introdujo en una atmósfera de nitrógeno a -78 °C en una solución desgasificada de iniciador, ligando y CuBr. La mezcla resultante se desgasificó a -78 °C, se dejó descongelar y se puso en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente.

10

Muestra	Iniciador	Iniciador (10 ⁻⁵ mol)	Monómero (g)	CuBr (10 ⁻⁵ mol)	Ligando (10 ⁻⁵ mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN ¹ H)
Serie de aldehídos (precursor de diol)										
1	DC1EO4M6	0,52	1,036	3,10	3,31	116	384,4	383,2	1,54 ²	100
2 ¹	DC1EO4M6	1,05	1,997	6,30	12,6	16½	192	190	1,1 ³	80
3 ¹	DC1EO4M6	0,56	1,997	3,34	6,69	20	916	700	1,64 ²	90
4	DC1EO4M2	1,05	2,052	2,00	4,20	43	119	121,7	1,02 ³	53
Serie de azido										
5 ¹	N3EO2M6	1,05	1,997	6,30	12,6	16½	261,6	244,3	1,2 ³	95
6	N3EO2M6	3,32	0,998	19,9	39,9	7	42,4	38	1,07 ³	91
P	N3EO2M6	1,05	1,833	6,30	12,6	16½	231	211	1,28 ³	> 99

¹Monómero (g)/disolvente (ml) 0,50

²Mayor IPD debido a una polimerización heterogénea debida a la congelación de la mezcla a -78 °C

³Menor IPD debido a la adición de codisolvente de etilenglicol (previene la congelación a -78 °C)

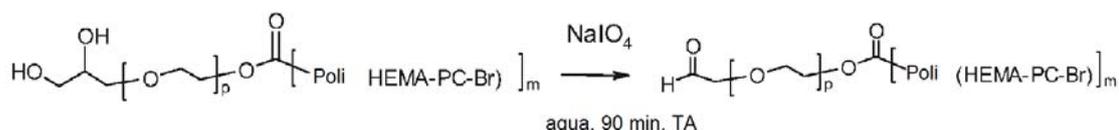
Ejemplo 101. Preparación de polímeros de acrilamida de alto peso molecular

Un protocolo representativo para producir polímeros hidrófilos hechos a medida de alto peso molecular de los monómeros hidrófilos, N,N-dimetilacrilamida (DMA), acrilamida (AM) o N-isopropilacrilamida (NIPAM), usando un proceso de radicales libres controlados "vivos", polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP), es esencialmente el mismo protocolo indicado en el Ejemplo 99 con las siguientes diferencias. El ligando utilizado fue tris[2-dimetilamino]etilamina (Me6TREN) y se añadieron $3,3 \text{ mol} \times 10^{-5}$ en las Muestras 1 y 2, y $1,5 \text{ mol} \times 10^{-5}$ a todas las otras Muestras y el disolvente fue agua. La proporción de haluro/CuBr/CuBr₂/Me6TREN fue 1/0,75/0,25/1 en cada caso. Tras la adición del catalizador, el recipiente se cerró herméticamente y se puso a 0 °C. Una solución acuosa de derivado de acrilamida, DMA, AM o NIPAM, se desgasificó usando la técnica de congelación-bombeo-descongelación (3 ciclos) y se introdujo en el tubo Schlenk que contenía el iniciador, el ligando y el catalizador a través de una cánula en una atmósfera de nitrógeno. El recipiente se cerró herméticamente y la reacción se dejó proceder a 4 °C. Después de un poco de tiempo, la reacción se interrumpió mediante exposición directa al aire. La mezcla de reacción de color azul-verde se pasó a través de un lecho corto de gel de sílice para retirar el catalizador de cobre. La solución recogida se concentró mediante liofilización.

Muestra	Iniciador	Iniciador (10 ⁻⁵ mol)	Monómero (g)	CuBr (10 ⁻⁵ mol)	Ligando (10 ⁻⁵ mol)	Tiempo (h)	MALS (Mn kDa)	MALS (Mp kDa)	MALS (IPD)	Conversión de monómero (% de RMN ¹ H)
Serie de aldehidos (precursor de diol)										
1	DC1E04M6	0,52	1,036 ¹	3,10	3,30	0	644,9	622	1,35	98
2	DC1E04M6	0,52	1,036 ²	3,10	3,30	2	548,6	620,8	1,45	98
Serie de hidroxilo										
3	HOC1NM3	0,52	1,036 ²	1,39	1,50	2	321,2	388,6	1,25	55
4	HOC1NM3	0,52	1,036 ²	1,24	1,50	2	294,5	340,7	1,2	60
5	HOC1NM3	0,52	1,036 ¹	1,16	1,50	1	302,6	318,5	1,1	77
6	HOC1NM3	0,52	1,036 ²	1,16	1,50	2	186,7	211,2	1,15	50
7	HOC1NM3	0,52	1,036 ³	1,16	1,50	6	300	320	1,2	81
¹ monómero de AM ² monómero de DMA ³ monómero de NIPAM La proporción de haluro/CuBr/CuBr ₂ /Me6TREN fue 1/0,75/0,25/1 en cada caso										

Ejemplo 102. Generación de grupos funcionales de aldehído a partir de precursores de diol tras polimerización de iniciadores funcionalizados con diol

5 Se añadió un gran exceso de peryodato sódico disuelto en agua destilada a una solución de polímero funcionalizado con diol en agua destilada (10 % en peso). La reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 90 minutos en la oscuridad.

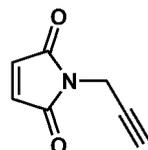


10 La reacción se interrumpió con una solución acuosa de glicerol (1,5x frente a NaIO_4) para retirar cualquier peryodato sódico sin reaccionar. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se puso en una bolsa de diálisis (MWCO 14 a 25 kDa) y se purificó por diálisis a temperatura ambiente durante un día. Después, se retiró el agua mediante liofilización y el polímero se recogió en forma de un polvo seco. La cuantificación de la funcionalidad aldehído se realizó mediante la unión de colorante fluorescente de hidrazida Cy5.5 (GE Healthcare).

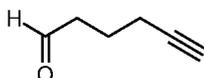
15 **Ejemplo 103. Unión de N-propargil maleimida y 5-hexin-1-al a polímeros funcionalizados con azido**

Los siguientes reactivos se unieron a polímeros funcionalizados con azido:

20 N-propargil maleimida (del Ejemplo 62)



25 5-hexin-1-al (del Ejemplo 63)



30 A una solución desgasificada de polímero funcionalizado con azido en etanol de graduación 100 % se añadió un exceso de derivado de alquino (1,2 equivalentes por grupo azido), seguido del ligando N,N,N',N'',N'''-pentametildietilenoetriamina (PMDE-TA), que se introdujo como una solución madre en DMF (100 mg/ml). La mezcla se desgasificó con 3 ciclos de vacío/nitrógeno. Se añadió bromuro de cobre (I) a la mezcla de reacción, típicamente en una proporción de 0,2 a 1 frente al grupo azido. La proporción de $\text{CuBr}/\text{PMDETA}$ fue 1/1. La reacción se desgasificó de nuevo y se agitó durante una noche a temperatura ambiente.

35 Se utilizaron los siguientes polímeros (Muestras 1, 2, 8, 9 y 10 del Ejemplo 98; Muestra 4 del Ejemplo 100; y Muestras 3, 5, 6 y 7 del Ejemplo 99):

Muestra	Iniciador de polímero	Monómero	Alquino	Mp (kDa)	IPD
1	N3C2EOM2	HEMA-PC	5-hexin-1-al	35,9	1,1
2	N3C2EOM2	HEMA-PC	5-hexin-1-al	126	1,1
3	N3EONM3	HEMA-PC	5-hexin-1-al	430	1,1
4	N3EO2M6	HEMA-PEG475	5-hexin-1-al	244	1,2
5	N3EO2NM3	HEMA-PC	N-propargil maleimida	154	1,1
6	N3EO2NM3	HEMA-PC	N-propargil maleimida	263	1,15
7	N3EO2NM3	HEMA-PC	N-propargil maleimida	422	1,1
8	N3EO2M6	HEMA-PC	N-propargil maleimida	150	1,15

(continuación)

Muestra	Iniciador de polímero	Monómero	Alquino	Mp (kDa)	IPD
9	N3EO2M6	HEMA-PC	N-propargil maleimida	242	1,15
10	N3EO2M6	HEMA-PC	N-propargil maleimida	465	1,2

Ejemplo 104. Conjugación de Fab monoclonal humano recombinante a polímeros funcionalizados con maleimida

- 5 Se usaron los siguientes polímeros funcionalizados con maleimida (del ejemplo 98 siguiendo la desprotección de acuerdo con el ejemplo 16):

Muestra	N.º de brazos	Polímero		Conjugado	
		Mp (kDa)	PDI	Mp (kDa)	PDI
1	2	126,5	1,133	177	1,17
2	2	293	1,22	412	1,15
3	2	643	1,35	964	1,20
4	4	446	1,22	723	1,19
5	4	661	1,23	1079	1,16

- 10 La conjugación de Fab' humano recombinante (peso molecular de 50 kDa) se llevó a cabo en acetato de sodio 10 mM a pH 5 que contenía EDTA 2 mM con un exceso molar 10x de TCEP y un exceso molar 5-10 veces de polímero funcionalizado con maleimida. La concentración final de Fab' en la mezcla de reacción fue de 1-2 mg/ml y la reacción se llevó a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 5 horas, seguido de una noche a 4 °C con una mezcla suave utilizando una mesa oscilante. Los conjugados de Fab'-polímero resultantes se purificaron utilizando cromatografía de intercambio iónico en una columna MacroCap SP (MSP) de GE Healthcare utilizando Tris 20 mM pH 7,4 como tampón de unión. En general, La reacción de conjugación (que contiene aproximadamente 5 mg de proteína) se diluyó 4 veces en un tampón de unión y se cargó en una columna MSP de 2 ml por flujo de gravedad. La columna se lavó con al menos 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de unión. La elución del conjugado se logró eluyendo la columna con un tampón de unión que contenía NaCl 40-50 mM durante al menos 10 CV. Las fracciones recogidas se concentraron con un concentrador de Amicon Ultrafree con una membrana de corte de PM de 10 kDa y el tampón se intercambió en un tampón de unión que contenía NaCl 0,5 M y se concentró adicionalmente hasta una concentración final de proteína de al menos 1 mg/ml. El conjugado final se filtró de forma estéril con un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenó a 4 °C antes de su uso. La concentración final de proteína se determinó utilizando la DO280nm con un coeficiente de extinción de Fab' de 1,46 (1 mg/ml de solución en una cubeta de 10 mm de longitud de trayectoria). La concentración de conjugado se calculó luego incluyendo el PM del polímero además del Fab'.

- 25 El PM del conjugado se analizó utilizando una columna Shodex 806MHQ con un sistema de HPLC Waters 2695 equipado con un Detector de matriz de fotodiodos 2996 y un detector de dispersión de luz de múltiples ángulos Treatt de Wyatt miniDAWN. El PDI y el Mp se calcularon utilizando el software ASTRA que se asoció con el detector Wyatt MALS y los datos se presentan en la tabla anterior. Además, en todos los casos se demostró que la estequiometría de los conjugados era de 1 a 1 entre Fab' y polímero.

Ejemplo 105. Conjugación de citocinas humanas recombinantes a polímeros funcionalizados con aldehído

- 35 Se usaron los siguientes polímeros funcionalizados con aldehído (de los ejemplos 98 y 99 después de la oxidación de acuerdo con el ejemplo 102, excepto que se indique lo contrario):

Muestra	N.º de brazos de polímero	Polímero		Conjugado	
		Mp (kDa)	PDI	Mp (kDa)	PDI
1 ¹	2	36	1,102	NA	NA
2 ¹	2	130	1,055	NA	NA

(continuación)

Muestra	N.º de brazos de polímero	Polímero		Conjugado	
		Mp (kDa)	PDI	Mp (kDa)	PDI
3 ²	2	78	1,05	109	1,04
4 ³	2	84	1,05	113	1,04
5	2	220	1,11	260	1,05
6	2	357	1,16	389	1,05
7	3	160	1,15	194	1,12
8	3	274	1,16	298	1,12
9	4	434	1,12	392	1,18
10	4	606	1,18	503	1,10
11	6	152	1,06	173	1,08
12	6	249	1,08	255	1,07
13	6	456	1,1	422	1,10

¹Polímeros del ejemplo 103 (aldehído unido mediante química click)
²Iniciador DC1M2 (es decir, sin espaciador)
³Iniciador DC1EOM2 (es decir, espaciador de óxido de etileno)

5 La conjugación de una citocina humana recombinante de 22 kDa con un pl de 5,02 se realizó en un tampón Hepes 10 mM a pH 7 que contenía cianoborohidruro de sodio 40 mM. La concentración final de proteína fue de 1-1,5 mg/ml en presencia de un exceso molar de 6-7 veces del polímero disuelto en el tampón de conjugación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente o 4 °C durante la noche en la oscuridad con mezcla suave utilizando una mesa oscilante.

10 La eficacia de la conjugación se controló utilizando dos métodos: (i) un método semicuantitativo que utiliza el análisis SDS-PAGE y (ii) un método cuantitativo que utiliza cromatografía analítica de exclusión por tamaños (SEC) con una columna ProPac SEC-10, 4x300 mm de Dionex Corporation.

15 La purificación de los conjugados de citocina-polímero resultantes se llevó a cabo utilizando una columna de Q Sepharose HP (QHP) de intercambio aniónico de GE Healthcare. En general, la reacción de conjugación (que contiene aproximadamente 1 mg de proteína) se diluyó al menos 4 veces con tampón de lavado QHP que contenía Tris 20 mM pH 7,5 y se cargó en una columna de 2 ml de QHP por flujo de gravedad. La columna se lavó con al menos 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de lavado. La elución del conjugado se logró eluyendo la columna con tampón de lavado que contenía NaCl 40-50 mM durante al menos 5 CV. Las fracciones recogidas se concentraron con un concentrador Amicon Ultrafree con una membrana de corte de PM de 10 kDa, el tampón se intercambió en 1xPBS a pH 7,4 y se concentró adicionalmente hasta una concentración de proteína final de al menos 1 mg/ml. Los conjugados finales se filtraron de forma estéril con un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenaron a 4 °C antes de su uso. La concentración final de proteína se determinó utilizando la DO277nm con un coeficiente de extinción de la citocina de 0,81 (1 mg/ml de solución en una cubeta de 10 mm de longitud de trayectoria). La concentración de conjugado se calculó luego incluyendo el PM del polímero además de la proteína.

25 La caracterización de los conjugados citocina-polímero se realizó con los siguientes ensayos: (i) El PM del conjugado se analizó utilizando una columna Shodex 806MHQ con un sistema de HPLC Waters 2695 equipado con un Detector de matriz de fotodiodos 2996 y un detector de dispersión de luz de múltiples ángulos Treatt de Wyatt miniDAWN. El PDI y el Mp se calcularon utilizando el software ASTRA que se asoció con el detector Wyatt MALS y los datos se presentan en la tabla anterior. Además, en todos los casos se demostró que la estequiometría de los conjugados era de 1 a 1 entre proteína y polímero; (ii) Análisis de SDS-PAGE utilizando la tinción con azul de Coomassie. La presencia del conjugado de alto PM y la falta de proteína libre en condiciones tanto no reductoras como reductoras proporcionaron una buena indicación de que la proteína estaba conjugada covalentemente a los polímeros. Además, no hubo signos de asociación no covalente entre la proteína y los polímeros, ni la presencia de agregación de proteínas mediada por enlace disulfuro intermolecular en las preparaciones de conjugado de proteína-polímero purificado.

35 Se observó una diferencia muy importante entre las Muestras 3 y 4. La muestra 3 se construyó a partir de un polímero que se preparó utilizando el iniciador DC1M2 que no tiene espaciador entre el grupo funcional terminal y el núcleo iniciador. La muestra 4 se construyó a partir de un polímero que se hizo utilizando el iniciador DC1EOM2 que tiene un único espaciador de óxido de etileno entre el grupo funcional terminal y el núcleo iniciador. La eficacia de la conjugación

para la muestra 4 fue 5 veces mayor que para la muestra 3, lo que indica la importancia de la química del espaciador para influir en la reactividad del grupo funcional.

Ejemplo 106. Conjugación de proteína recombinante humana de múltiples dominios a polímeros funcionalizados con aldehído

Se usaron los siguientes polímeros funcionalizados con aldehído (de los ejemplos 98 y 99 después de la oxidación de acuerdo con el ejemplo 102):

Muestra	N.º de brazos	Polímero		Conjugado	
		Mp (kDa)	PDI	Mp (kDa)	PDI
1	3	278,3	1,154	313,6	1,083
2	6	240,2	1,059	261,2	1,065

La conjugación de una proteína de múltiples dominios humana recombinante de 21 kDa con un pl de 4,77 se realizó en un tampón Hepes 10 mM a pH 7 que contenía cianoborohidruro de sodio 40 mM. La concentración final de proteína fue de 1-1,5 mg/ml en presencia de un exceso molar de 6-7 veces del polímero disuelto en el tampón de conjugación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente o 4 °C durante la noche en la oscuridad con mezcla suave utilizando una mesa oscilante.

La eficacia de la conjugación se controló utilizando dos métodos: (i) un método semicuantitativo que utiliza el análisis SDS-PAGE y (ii) un método cuantitativo que utiliza cromatografía analítica de exclusión por tamaños (SEC) con una columna ProPac SEC-10, 4x300 mm de Dionex Corporation.

La purificación de los conjugados de proteína-polímero resultantes se llevó a cabo utilizando una columna de Q Sepharose HP (QHP) de intercambio aniónico de GE Healthcare. En general, la reacción de conjugación (que contiene aproximadamente 1 mg de proteína) se diluyó al menos 4 veces con tampón de lavado QHP que contenía Tris 20 mM pH 7,5 y se cargó en una columna de 2 ml de QHP por flujo de gravedad. La columna se lavó con al menos 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de lavado. La elución del conjugado se logró eluyendo la columna con tampón de lavado que contenía NaCl 40-50 mM durante al menos 5 CV. Las fracciones recogidas se concentraron con un concentrador Amicon Ultrafree con una membrana de corte de PM de 10 kDa, el tampón se intercambió en 1xPBS a pH 7,4 y se concentró adicionalmente hasta una concentración de proteína final de al menos 1 mg/ml. Los conjugados finales se filtraron de forma estéril con un filtro de 0,22 micrómetros y se almacenaron a 4 °C antes de su uso. La concentración final de proteína se determinó utilizando la DO280nm con un coeficiente de extinción de la proteína de dominio de 1,08 (1 mg/ml de solución en una cubeta de 10 mm de longitud de trayectoria). La concentración de conjugado se calculó luego incluyendo el PM del polímero además de la proteína.

La caracterización de los conjugados proteína-polímero se realizó con los siguientes ensayos: (i) El PM del conjugado se analizó utilizando una columna Shodex 806MHQ con un sistema de HPLC Waters 2695 equipado con un Detector de matriz de fotodiodos 2996 y un detector de dispersión de luz de múltiples ángulos Treatt de Wyatt miniDAWN. El PDI y el Mp se calcularon utilizando el software ASTRA que se asoció con el detector Wyatt MALS y los datos se presentan en la tabla anterior. Además, en todos los casos se demostró que la estequiometría de los conjugados era de 1 a 1 entre proteína y polímero; (ii) Análisis de SDS-PAGE utilizando la tinción con azul de Coomassie. La presencia del conjugado de alto PM y la falta de proteína libre en condiciones tanto no reductoras como reductoras proporcionaron una buena indicación de que la proteína estaba conjugada covalentemente a los polímeros. Además, no hubo signos de asociación no covalente entre la proteína y los polímeros, ni la presencia de agregación de proteínas mediada por enlace disulfuro intermolecular en las preparaciones de conjugado de proteína-polímero purificado.

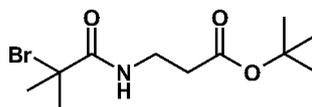
Ejemplo 107. Conjugación de citocina humana recombinante y proteína recombinante humana de múltiples dominios a polímeros HEMA-PEG funcionalizados con aldehído

Se elaboró un polímero HEMA-PEG475 funcionalizado con azido de 6 brazos con un peso molecular de 312,9 kDa de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 100. El grupo funcional aldehído se introdujo uniendo 5-hexin-1-al al grupo funcional azido de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 103. Este polímero se conjugó con la citocina recombinante de 22 kDa y la proteína humana de múltiples dominios recombinante de 21 kDa en general de acuerdo con los procedimientos de los Ejemplos 105 y 106, respectivamente, con las siguientes diferencias. Después de la incubación durante la noche a temperatura ambiente en condiciones inertes en la oscuridad, las reacciones se inactivaron mediante la adición de Tris 20 mM, pH 7,5 y las muestras se cromatografiaron usando cromatografía de intercambio aniónico débil (columna Shodex DEAE-825) utilizando un sistema de HPLC de Waters equipado con un módulo de suministro de solvente capaz de formación de gradiente y un detector de UV para detección de trazas de cromatograma. Se aplicaron 15 µl de cada muestra a la columna a un caudal de 1 ml/min seguido de un lavado isocrático de 5 min en tampón A (Tris 20 mM, pH 7,4), seguido de un gradiente lineal de 80% de tampón (tampón A que contiene NaCl 0,5 M) durante un curso de 9 min. El gradiente de sal se mantuvo al 80% durante 2 minutos antes

de volver al 100% de tampón A para la regeneración de la columna. En el transcurso de la separación cromatográfica, las fracciones de pico de proteína, detectadas por la DO220nm, se recogieron manualmente para su análisis posterior mediante SDS-PAGE. Se recogieron tres picos principales. El primer pico eluyó a los 1,8-3 min durante el lavado isocrático inicial, esta fracción es equivalente al polímero libre no conjugado debido al hecho de que el polímero que es neutro en su carga fluyó a través de la columna; el segundo pico fue la fracción de conjugado débilmente unida que eluyó temprano en el gradiente de sal; y la última fracción que eluyó más tarde en el gradiente correspondió a la proteína libre no conjugada. Las 3 fracciones se recolectaron y se concentraron con un Amicon Ultrafree 4 con un concentrador de 10K MWCO. Las fracciones concentradas se analizaron adicionalmente con SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie y con SEC-MALS como se describe en los ejemplos de referencia anteriores y los datos se muestran en la siguiente tabla:

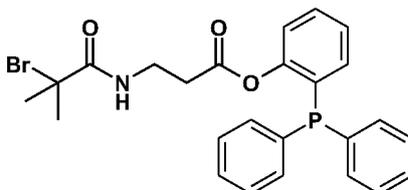
Muestra	N.º de brazos	Polímero		Conjugado		Proteína usada
		Mp (kDa)	PDI	Mp (kDa)	PDI	
1	6	312,9	1,396	337,2	1,256	Citocina
2	6	312,9	1,396	334,4	1,289	Proteína de dominio

Ejemplo 108. Preparación de éster t-butílico de N-2-bromoisobutil-β-alanina



Una mezcla de 1,92 gramos de clorhidrato de t-butil-β-alaninato en 25 ml de diclorometano se enfrió con un baño de agua enfriada con hielo y se añadieron 25 ml de NaOH 1 N, seguido de 2,53 gramos de bromuro de 2-bromoisobutililo. La reacción se agitó en el frío durante 15 minutos, después las capas se separaron y los materiales orgánicos se secaron sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron un aceite, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 40 % en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron para dar 2,78 gramos del producto deseado en forma de un aceite transparente. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,47 (s, 9H, Boc), 1,94 (s, 6H, (CH₃)₂CBr), 2,48 (t, 6H, J = 6, CH₂C=O), 3,50 (c app, 2H, J = 6, CH₂NH).

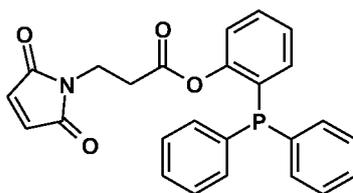
Ejemplo 109. Preparación de 2-(difenilfosfino)fenil éster de N-2-bromoisobutil-β-alanina



Una solución de 2,78 gramos de éster t-butílico de N-2-bromoisobutil-β-alanina en 5 ml de ácido fórmico se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la reacción se concentró para dar un aceite, que se repartió entre 50 ml de éter y 50 ml de agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró para dar 1,66 gramos de un sólido de color blanco. Este sólido se recogió en 20 ml de acetonitrilo anhidro y se añadieron 1,94 gramos de (2-hidroxifenil)difenilfosfina, seguido de 200 mg de DPTS y 1,88 gramos de DCC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, momento en el cual la reacción parecía estar completa según la TLC (gel de sílice, diclorometano al 50 % en hexano). La reacción se filtró y se concentró para dar un aceite, que se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetona al 10-20 % en hexano para dar el producto deseado en forma de un aceite viscoso. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,95 (s, 6H, (CH₃)₂CBr), 2,55 (t, 2H, J = 6, CH₂C=O), 3,44 (c app, 2H, J = 6, CH₂NH), 6,85 (m, 1H, PhH), 7,15 (m, 2H, PhH), 7,25-7,42 (m, 12H, PhH).

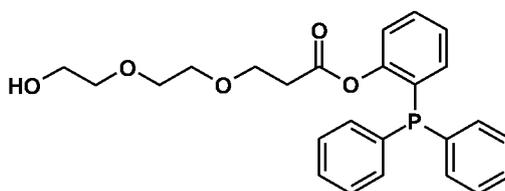
Los compuestos de este tipo pueden utilizarse para introducir grupos funcionales en las ligaduras de Staudinger "sin trazas" (J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 8820) con polímeros de azido.

Ejemplo 110. Preparación de ácido 3-maleimidopropiónico, (2-difenilfosfino)fenil éster



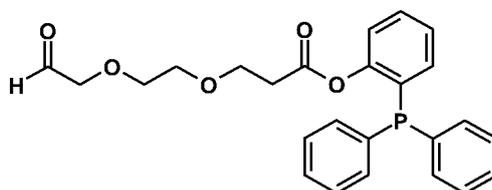
Una solución de ácido 3-maleimidopropiónico (J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 2966), junto con 1 equiv. de 2-(hidroxifenil)difenilfosfina (Catalysis Today 1998, 42, 413) en acetonitrilo anhidro se trató con una cantidad catalítica de DPTS, seguido de 1,2 equiv. de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó. La reacción se filtró y el filtrado se concentró para dar un residuo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo en hexano para dar el producto deseado.

Ejemplo 111. Preparación de ácido 9-hidroxi-4,7-dioxananoico, 2-(hidroxifenil)difenilfosfino éster



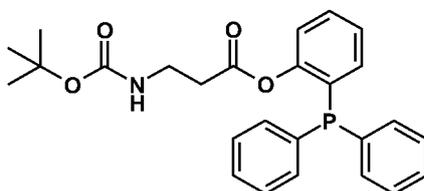
Una solución de ácido 9-t-butildifenilsiloxi-4,7-dioxananoico, 2-(hidroxifenil)difenilfosfino éster en THF se trató con fluoruro de tetrabutilamonio y la reacción se agitó a temperatura ambiente. La concentración dio un residuo, que se repartió entre acetato de etilo y agua. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico y se usaron en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Ejemplo 112. Preparación de ácido 9-oxo-4,7-dioxananoico, 2-(hidroxifenil)difenilfosfino éster



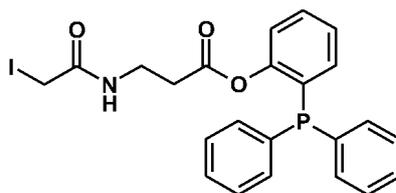
Una muestra de ácido 9-hidroxi-4,7-dioxananoico, 2-(hidroxifenil)difenilfosfino éster se oxidó con peryodinano de Dess-Martin para proporcionar el aldehído correspondiente, que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo en hexano.

Ejemplo 113. Preparación de N-Boc-β-alanina, 2-(hidroxifenil)difenilfosfino éster



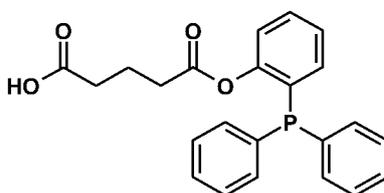
Una solución de N-boc-β-alanina en acetonitrilo anhidro, junto con 1 equiv. de 2-(hidroxifenil)difenilfosfina se trató con una cantidad catalítica de DPTS, seguido de 1,2 equiv. de DCC y la reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó. La reacción se filtró y el filtrado se concentró para dar un residuo, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo en hexano para dar el producto deseado.

Ejemplo 114. Preparación de N-Yodoacetil-β-alanina, 2-(hidroxifenil)difenilfosfino éster



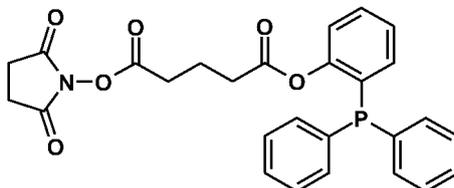
Una solución de N-Boc-β-alanina, 2-(hidroxifenil)difenilfosfino éster en diclorometano se trató con ácido trifluoroacético y una vez se completó, la reacción se concentró para dar un residuo, que se concentró de nuevo con hexano para retirar tanto TFA como fue posible. Este residuo se recogió en diclorometano, se trató con 6 equiv. de trietilamina y se añadió anhídrido yodoacético. La mezcla de reacción se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico y se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida con acetato de etilo en hexano para dar el producto deseado.

10 **Ejemplo 115. Preparación de ácido pentanodioico, mono 2-(hidroxifenil) difenilfosfino éster**



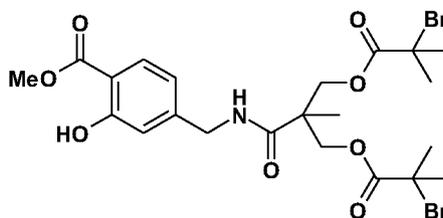
Una solución de 2-(hidroxifenil)difenilfosfina en diclorometano se trató con 0,1 equiv. de DMAP y 2 equiv. de trietilamina, seguido de 1,0 equiv. de anhídrido glutárico. La reacción se calentó a reflujo cuidadoso durante una noche, después se lavó con HCl 1 N y cloruro sódico saturado, y se secó sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron el ácido en bruto, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

20 **Ejemplo 116. Preparación de ácido pentanodioico, semi 2-(hidroxifenil) difenilfosfino éster, semi N-hidroxisuccinimida éster**



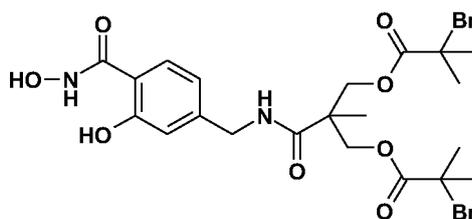
Una solución de ácido pentanodioico, mono 2-(hidroxifenil)difenilfosfino éster en acetonitrilo seco se trató con una cantidad catalítica de DPTS, seguido de 1,2 equiv. de DCC. La reacción se filtró y se concentró para dar un residuo, que se sometió a cromatografía ultrarrápida con acetato de etilo en hexano para dar el producto deseado.

30 **Ejemplo 117. Preparación de N-(3-Hidroxi-4-carbometoxi)bencil-bis,2,2-[(2-bromoisobutiril)hidroximetil]propionamida**



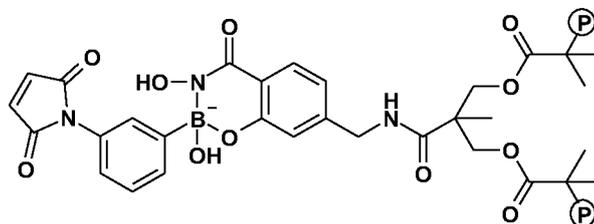
Una muestra de ácido bis 2,2-[(2-bromoisobutiriloxi)metil]propiónico, N-hidroxisuccinimida éster se dejó reaccionar con 4-(aminometil)-2-hidroxibenzoato de metilo (documento US 6.156.884) en presencia de trietilamina y el producto se aisló por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo en hexano.

35 **Ejemplo 118. Preparación de N-(3-Hidroxi-4-hidroxiaminocarbonil)bencil-bis 2,2-[(2-bromoisobutiril)hidroximetil]propionamida**

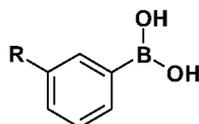


El producto de la etapa previa se trató con clorhidrato de hidroxilamina en condiciones básicas para proporcionar el ácido hidroxámico correspondiente.

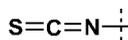
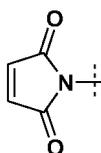
- 5 Los polímeros preparados usando este iniciador pueden usarse en reacciones de acoplamiento con reactivos de conjugación que contienen ácido fenilborónico, tales como restos de ácido 3-maleimidofenilborónico (véase documento US 6.156.884 y las referencias del mismo, cada uno de los cuales se incorpora en presente documento en su totalidad). Más adelante se representa la estructura del producto formado a partir de la reacción de conjugación
- 10 entre el polímero del iniciador que contiene ácido hidroxámico y ácido 3-maleimidofenilborónico. Ahora este polímero está preparado para conjugarse con biomoléculas que contienen un tiol libre.



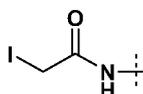
- 15 Esencialmente, puede incorporarse cualquier grupo funcional, y otros grupos de bioconjugación de ejemplo que pueden emplearse en esta estrategia, además de la maleimida, son bromoacetamida, yodoacetamida, hidrazida, ácido carboxílico, ditiopiridilo, N-hidroxisuccinimidil éster, imido éster, restos amino y tiol (véase la tabla, documento US 6.156.884).

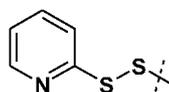
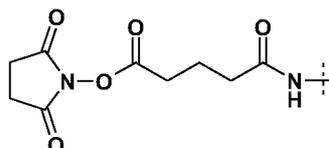
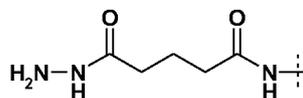
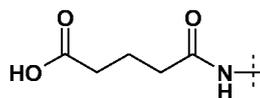


- 20 Donde R=



- 25
-





5 Ejemplo 119. Conjugación de aptámero de Macugen a polímeros funcionalizados con aldehído

Macugen es un medicamento antiangiogénico para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda). Es un conjugado covalente de un oligonucleótido de veintiocho nucleótidos de longitud (aptámero) que termina en un enlazador pentilamino, a los cuales se unen covalentemente dos unidades monometoxi polietilenglicol (PEG) de 20 kDa a través de los dos grupos amino en un resto de lisina. En la realización actual, el aptámero de Macugen con grupo amino libre se usó para la conjugación con polímeros funcionalizados con aldehído usando el protocolo descrito en el ejemplo 105 con las siguientes diferencias. La conjugación de un aptámero con los polímeros de esta invención crea conjugados con alta estabilidad, baja viscosidad y propiedades *in vivo* beneficiosas como el tiempo de residencia prolongado, además de ser una base para explorar la administración de microARN y ARNi.

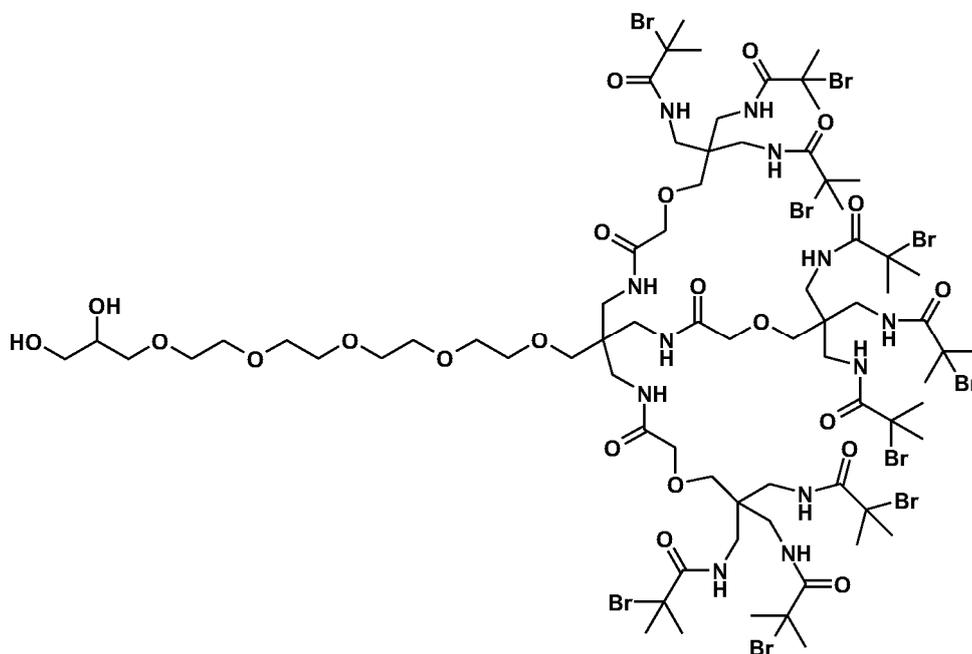
Se prepararon 20 mg/ml de solución madre de aptámero en tampón Hepes a pH 7 y luego se mezclaron con un agente reductor de cianoborohidruro de sodio para obtener una concentración final de 33 mM. Esta solución se usó luego para disolver las siguientes series de polímeros funcionalizados con aldehído (también utilizados en el ejemplo 105):

	N.º de brazos	PM (kDa)
1	3 brazos	160
2	3 brazos	274
3	3 brazos	460
4	6 brazos	250
5	2 brazos	450

La relación de exceso molar final de polímero a aptámero fue de 2 a 2,5 veces y la concentración final de aptámero fue de 4,4-8,9 mg/ml. La mezcla de conjugación se incubó en un baño de agua a 22-23 °C durante la noche, las

muestras se analizaron utilizando una columna de intercambio aniónico Shodex DEAE-825 conectada a un sistema de administración de solvente Waters 2695 equipado con un PDA 2669 para el monitoreo de la longitud de onda del perfil de elución. Para analizar la reacción de conjugación, 2 μ l de la mezcla de reacción se diluyeron 10 veces con Tris 20 mM pH 7,5 (tampón A), después se aplicó a la columna y se hizo un seguimiento a un caudal de 1 ml/min, seguido de un lavado isocrático de 5 min en tampón A seguido de un gradiente lineal de tampón al 80 % (tampón A que contiene NaCl 0,5 M) durante un transcurso de 9 min. El gradiente de sal se mantuvo al 80 % durante 2 minutos antes de volver al 100 % de tampón A para la regeneración de la columna. La DO220nm detectó tres picos principales: el primer pico eluyó a los 2,2 minutos durante el lavado isocrático inicial, esta fracción es equivalente al polímero libre no conjugado (el polímero que tiene una carga neutra permanece sin unir a la columna); el segundo pico fue una fracción de conjugado débilmente unida a los 5,4 minutos que eluyó temprano en el gradiente de sal; y el último pico eluyó más tarde en el gradiente a los 13,6 minutos y correspondió al aptámero libre no conjugado. Tanto el pico conjugado como el pico de aptámero libre muestran una absorbancia de DO254nm, indicando la presencia de oligonucleótido. El pico de 5,4 minutos se detectó en todas las reacciones que contenían polímeros a una traza de 254 nm y 220 nm, pero no en la reacción de control donde no se añadió polímero, lo que además apoya que esto es de hecho el pico de conjugado.

Ejemplo 120. Preparación de iniciador basado en amida de 9 brazos de 2,5,8,11,14-pentaoxa-15,16-dihidroxiheutadecenoilo



Una solución del producto de la etapa previa en 15 ml de agua, 15 ml de t-butanol, 3 equiv. de ferricianuro potásico, 3 equiv. de carbonato potásico, 1 equiv. de metanosulfonamida, 10 mg de quinuclidina y 7 mg de osmiato potásico dihidrato se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se repartió entre 100 ml de cada uno de agua y diclorometano. La capa acuosa se extrajo dos veces más con 25 ml de diclorometano y las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice usando metanol en diclorometano para dar el producto deseado.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende:

5 (a) al menos un polímero que comprende:

al menos dos brazos de polímero, comprendiendo cada uno una pluralidad de monómeros seleccionados cada uno independientemente entre el grupo que consiste en metacrilato, acrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinil-piridina, vinil-pirrolidona y vinil-éster, en el que cada monómero comprende un resto fosforilcolina, un fragmento iniciador unido a un extremo proximal de cada brazo del polímero, en el que el resto iniciador es adecuado para la polimerización de radicales, y un grupo terminal unido a un extremo distal de cada brazo del polímero, en el que el al menos un polímero tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.500 kDa y un índice de polidispersidad de menos de 2; y

(b) al menos un agente funcional que comprende un agente bioactivo o un agente de diagnóstico, unido al fragmento iniciador o el grupo terminal, en el que el agente bioactivo se selecciona entre el grupo que consiste en una proteína, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de dominio único, un avímero, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido y un ácido nucleico, y el agente de diagnóstico se selecciona entre el grupo que consiste en un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo y un colorante.

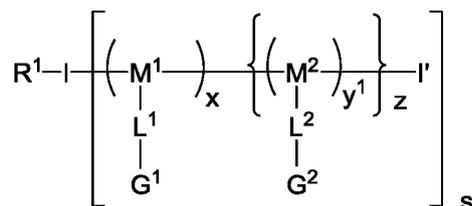
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que al menos un polímero tiene un índice de polidispersidad de menos de 1,2.

3. El conjugado de la reivindicación 1, en el que al menos un polímero tiene 9 o 12 brazos de polímero.

4. El conjugado de la reivindicación 1, en el que al menos un polímero tiene un peso molecular de 750 kDa.

5. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el monómero comprende 2-(metacrililoiloxietil)-2'-(trimetilamonioetil) fosfato (HEMA-PC) o 2-(acrililoiloxietil)-2'-(trimetilamonioetil) fosfato.

6. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el conjugado se representa mediante la siguiente fórmula:

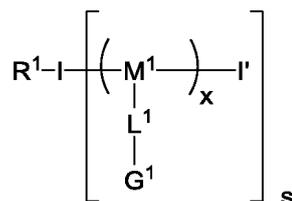


en la que

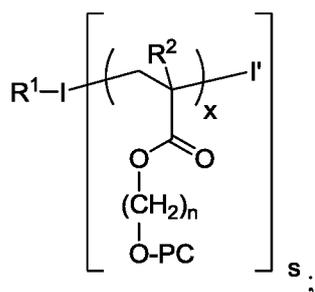
R¹ es L³-A¹;
 cada M¹ y M² se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en metacrilato, acrilato, acrilamida, metacrilamida, estireno, vinil-piridina, vinil-pirrolidona y vinil-éster;
 cada uno de G¹ y G² es un resto fosforilcolina;
 cada I y I' es independientemente un fragmento iniciador, de modo que la combinación de I-I' es un iniciador, I¹, para la polimerización de al menos un polímero mediante polimerización de radicales;
 como alternativa, cada I' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halógeno, nitrilo, -SCN y -NCS y alquilo C₁₋₆;
 cada uno de L¹, L² y L³ es independientemente un enlace o un enlazador;
 cada A¹ es un agente funcional seleccionado entre un grupo que consiste en una proteína, un fármaco, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de dominio único, un avímero, una adnectina, diacuerpos, una vitamina, un cofactor, un polisacárido, un carbohidrato, un esteroide, un lípido, una grasa, un péptido, un polipéptido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico, un radiomarcador, un agente de contraste, un fluoróforo y un colorante;
 los subíndices x e y¹ son cada uno independientemente un número entero de 1 a 1000;
 cada subíndice z es independientemente un número entero de 0 a 10; y el subíndice s es un número entero de 2 a 100.

7. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el subíndice s es 9 o 12.

8. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el conjugado tiene la fórmula:

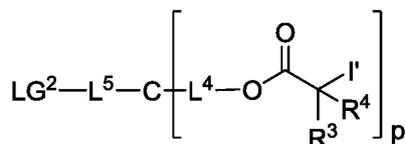


5 9. El conjugado de la reivindicación 8, en el que el conjugado tiene la fórmula



en la que O-PC es fosforilcolina, R² se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₆, y n es un número entero de 1 a 12.

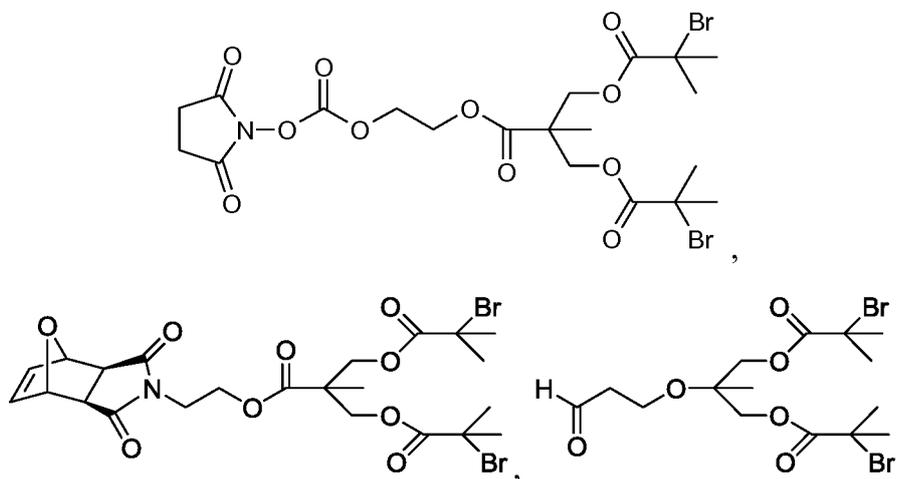
10 10. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el iniciador I¹ tiene la fórmula:



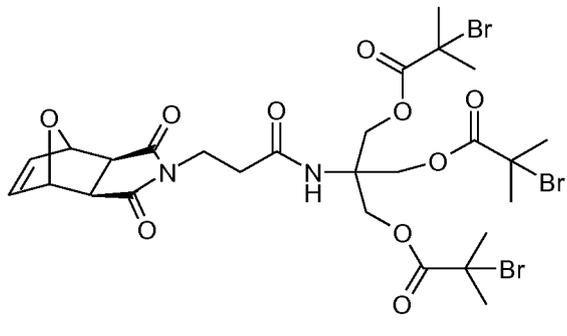
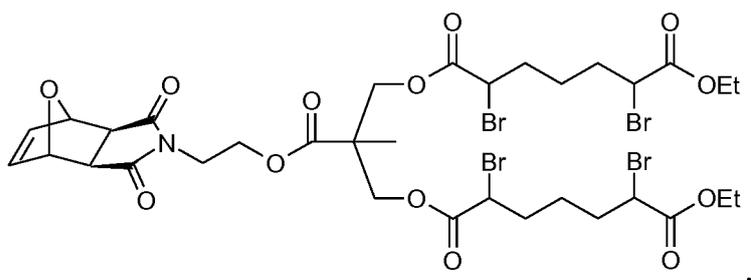
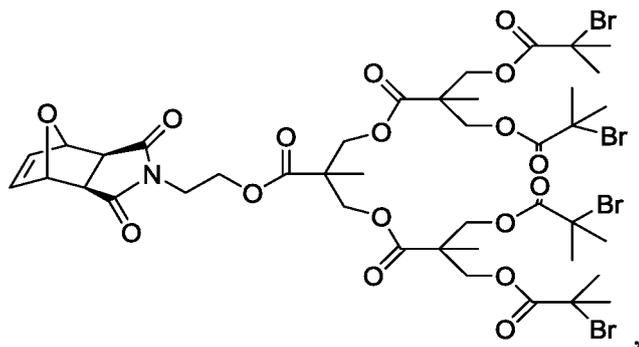
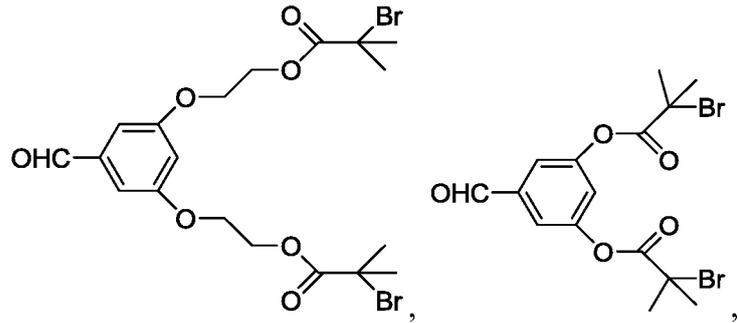
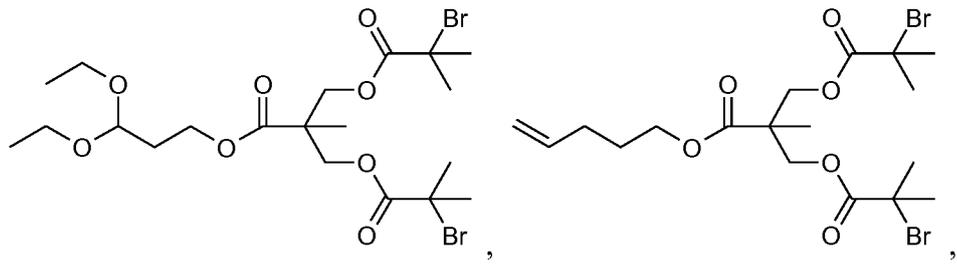
15 en la que

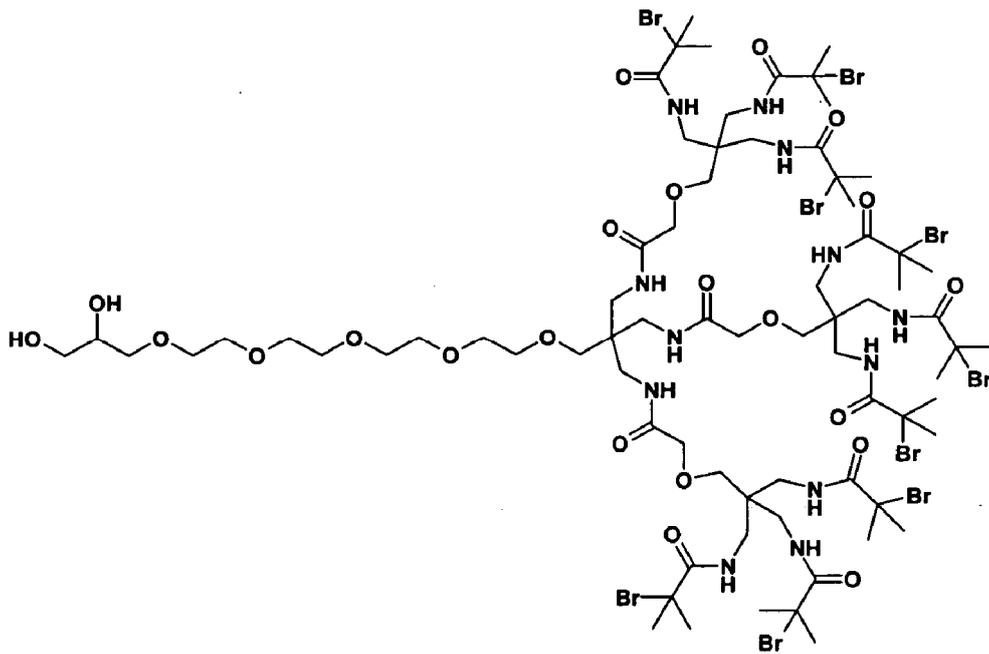
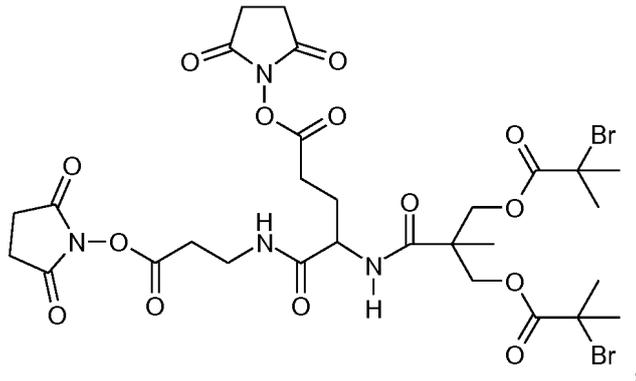
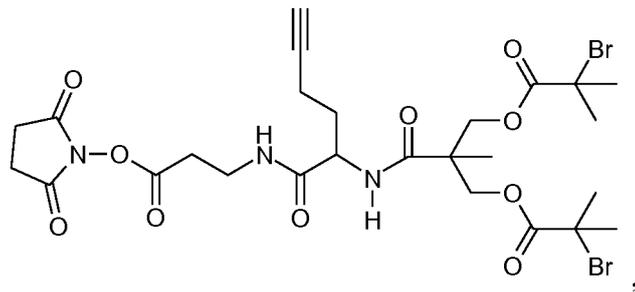
20 cada I' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, -SCN y -NCS;
 L⁴ y L⁵ son cada uno independientemente un enlace o un enlazador, de modo que uno de L⁴ y L⁵ es un enlazador;
 C es un grupo del núcleo seleccionado el grupo que consiste en una estructura ramificada, una estructura reticulada que incluye heteroátomos y un polímero de cadena corta lineal con múltiples grupos funcionales pendientes;
 LG² es un grupo enlazador;
 en el que cada R³ y R⁴ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, CN y alquilo C₁₋₆; y el subíndice p es de 2 a 20.

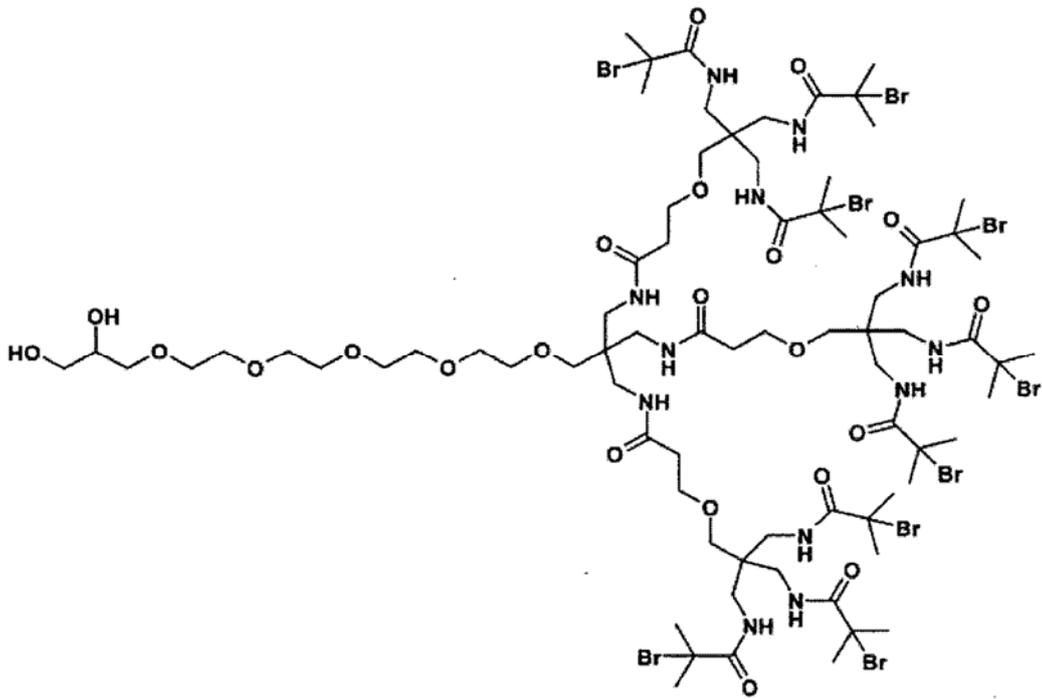
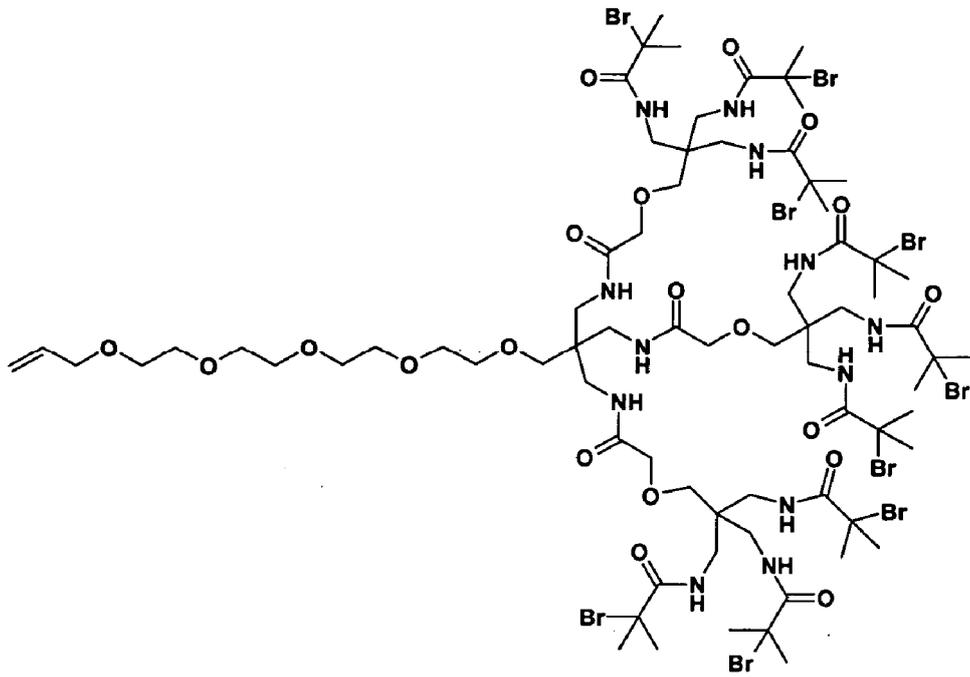
25 11. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el iniciador I¹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

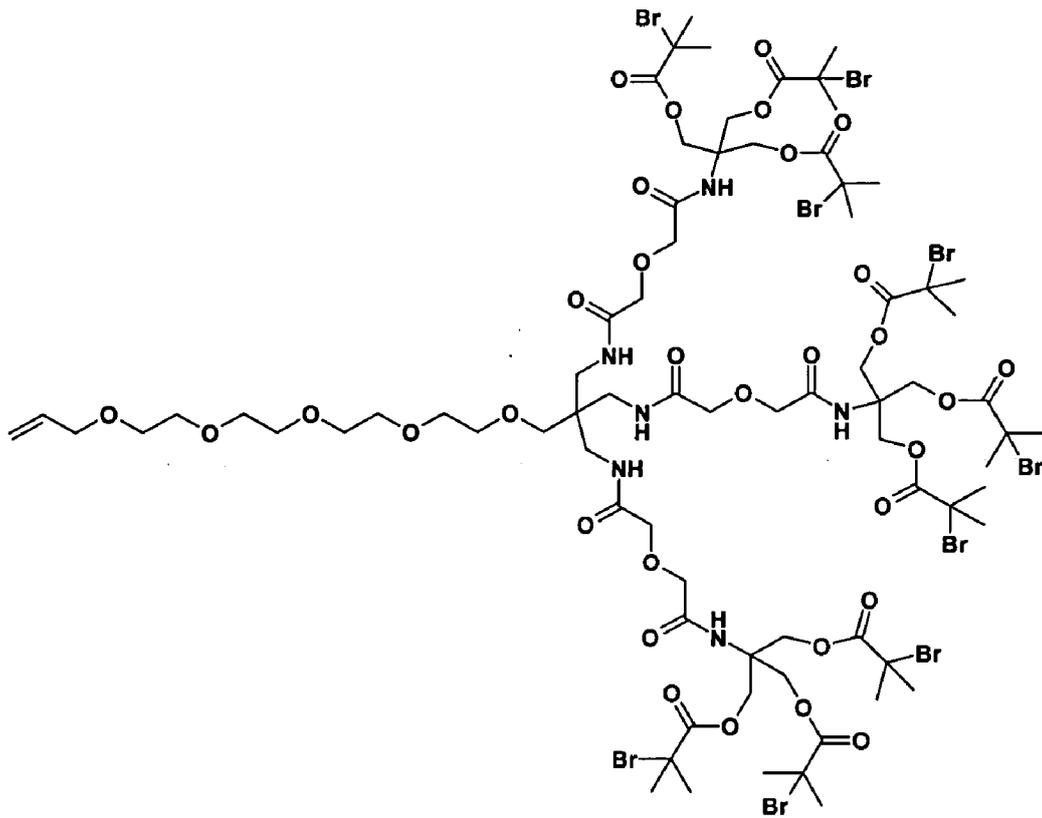


30

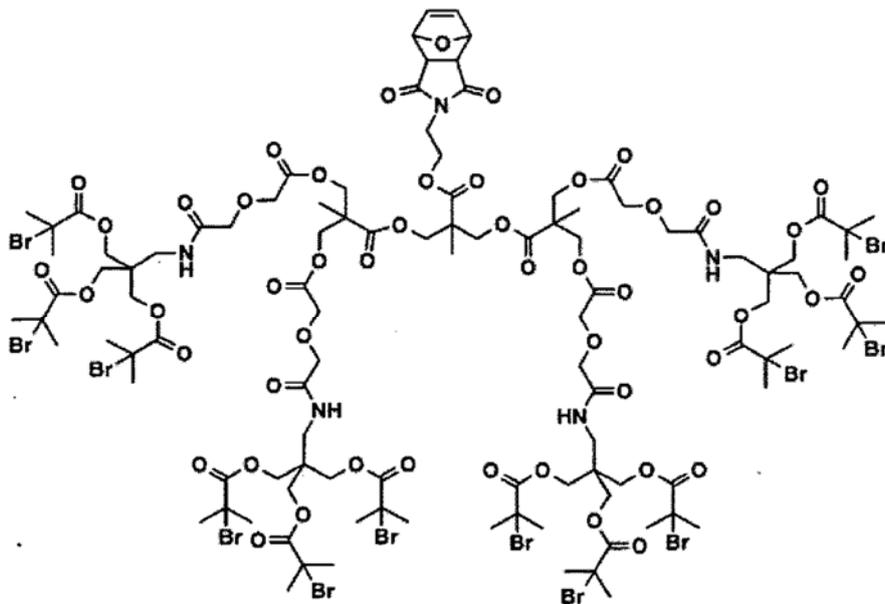






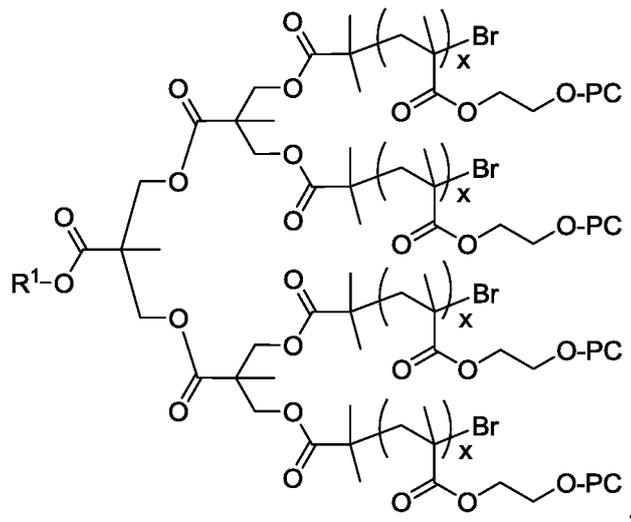
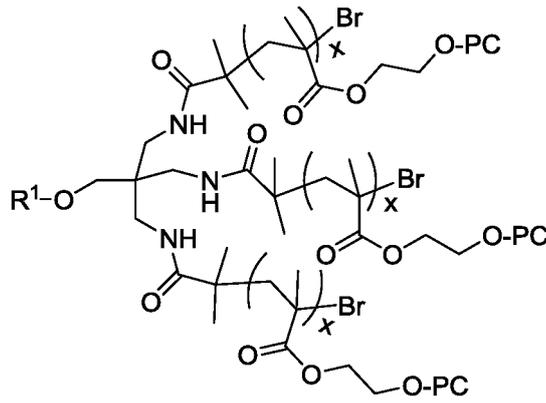
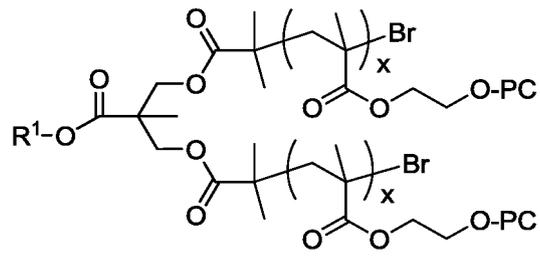


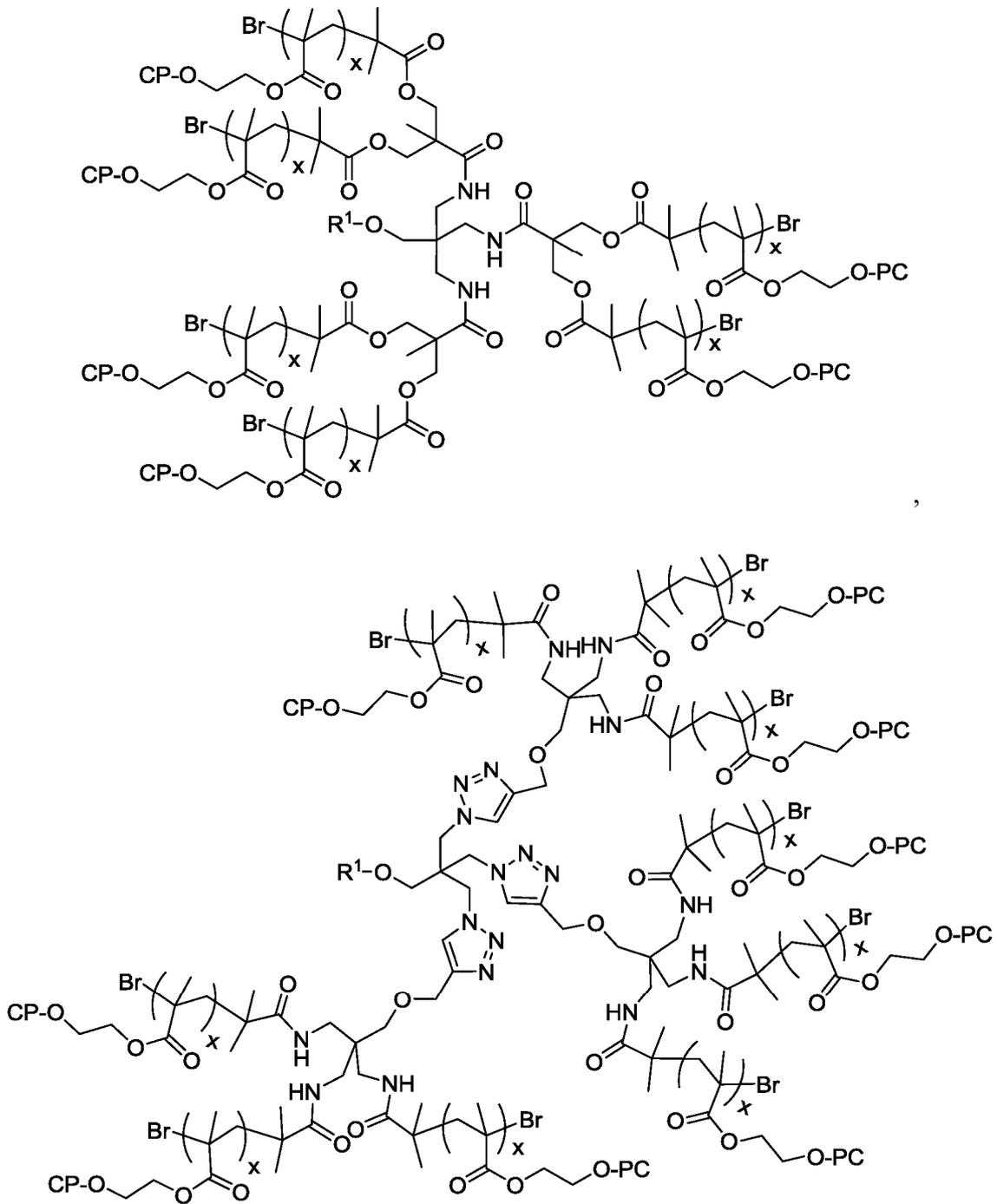
y



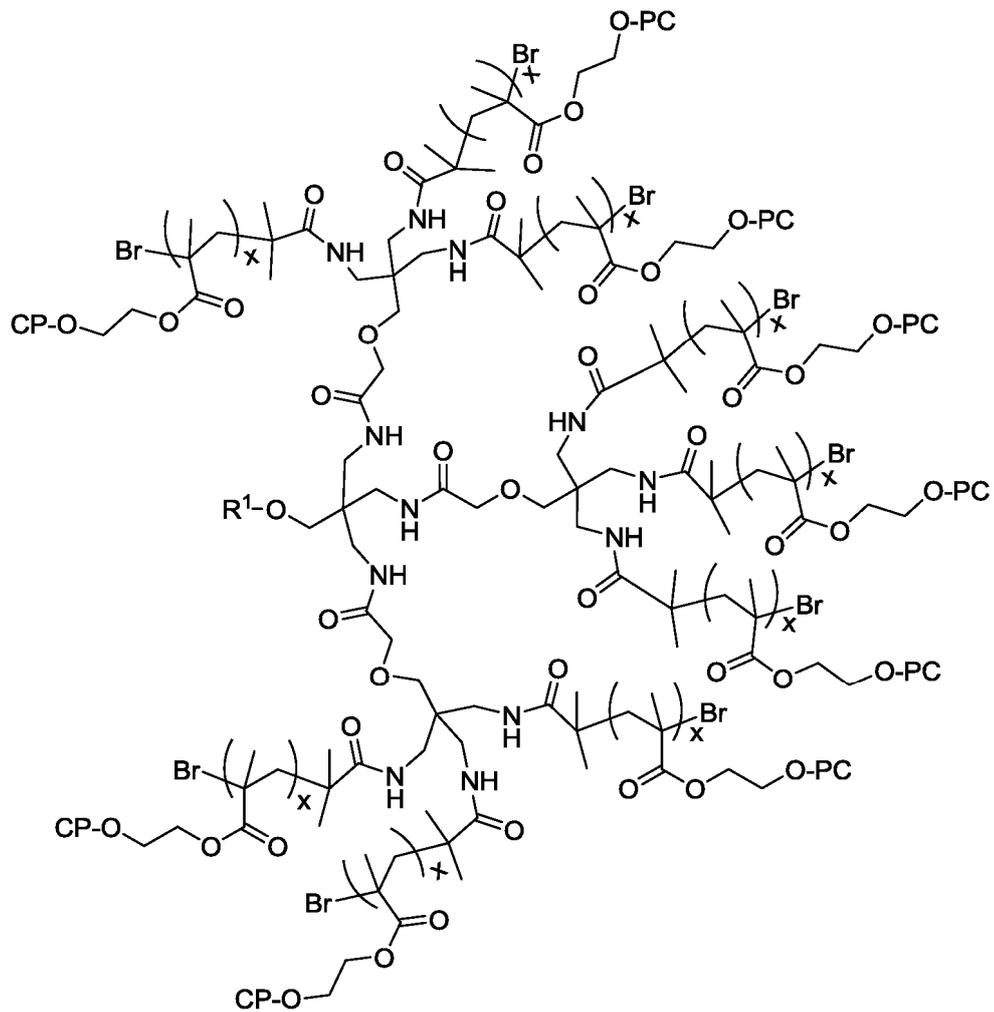
5

12. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el conjugado tiene una fórmula seleccionada entre el grupo que consiste en:





y



en el que O-PC es fosforilcolina.

5 13. El conjugado de la reivindicación 12, en el que:

A¹ es una proteína, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de dominio único; y
L³ es $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-10}$.

10

Figura 1.

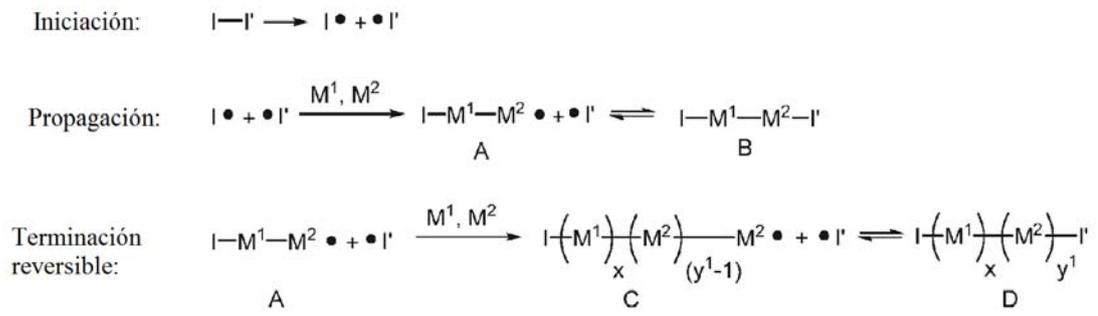


Figura 2

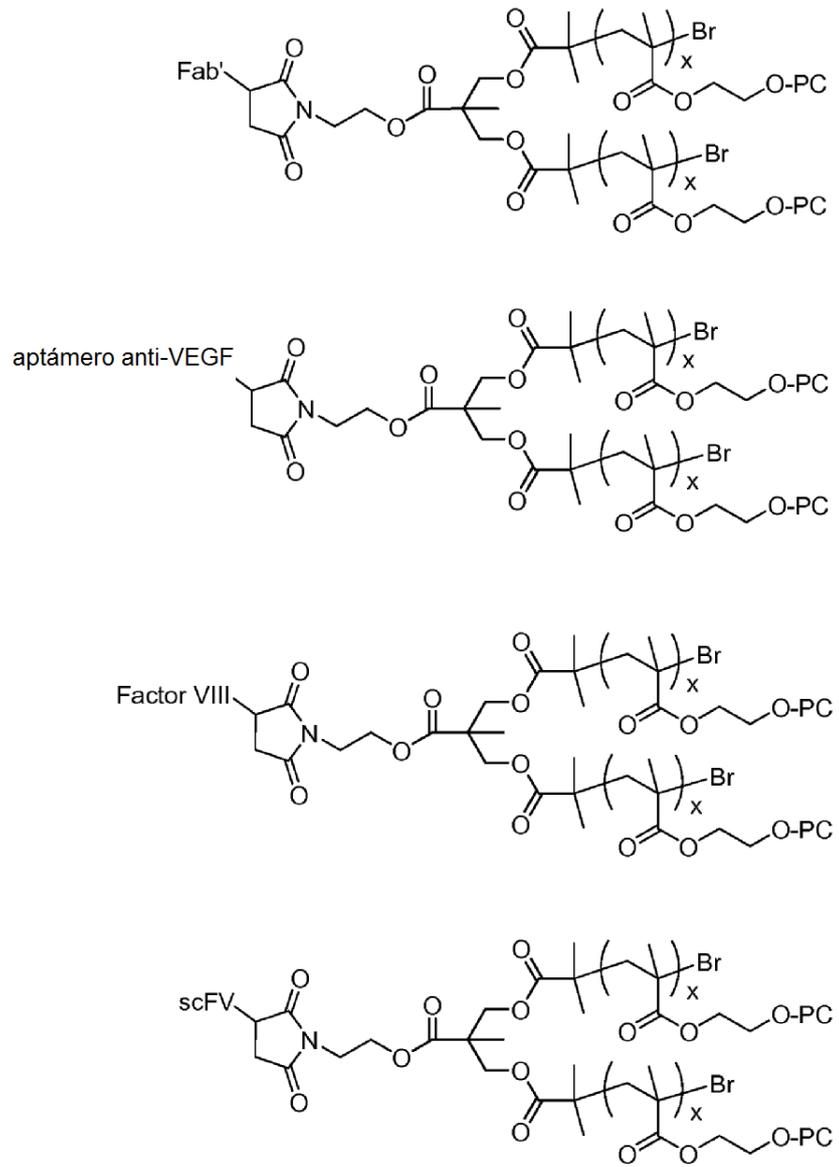


Figura 2 continuación

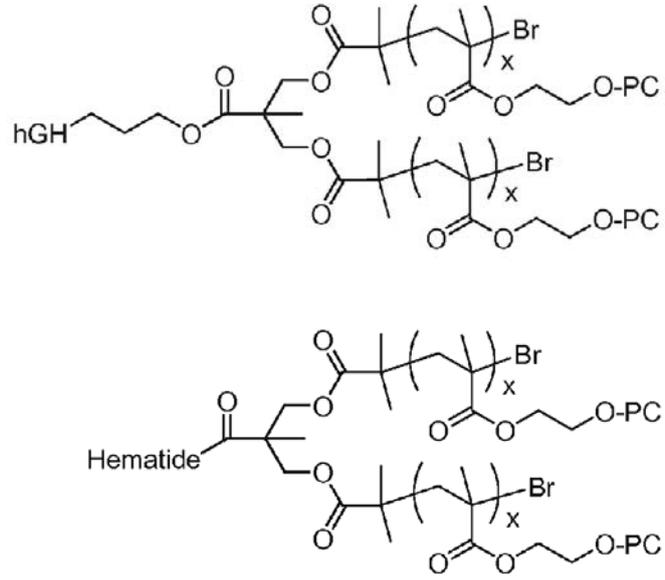


Figura 3.

