

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 868**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2009 PCT/US2009/054595**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO2010022320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2009 E 09791780 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2328619**

54 Título: **Derivados de carbonato de bencilo poliméricos**

30 Prioridad:

22.08.2008 US 189751 P

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

20.06.2017

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark, Opfikon, CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YANG, GUOHAN;
HAI, TON, THAT;
MELNICK, BENNETT;
SANDERS, PAUL;
JIANG, CONG;
QUINN, CATHERINE;
LI, JIE;
AMBROISE, AROUNAGUIRY y
BROWN, LARRY, R.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 617 868 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de carbonato de bencilo poliméricos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 61/189.751, presentada el 22 de agosto de 2008.

Campo de la invención

10 La presente invención proporciona derivados poliméricos, que pueden conjugarse con un fármaco que contiene amino para mejorar sus propiedades *in vivo*. Los derivados poliméricos pueden liberarse posteriormente para producir el fármaco en su forma nativa. Se describen los procedimientos de preparación y uso de estos derivados poliméricos y conjugados farmacológicos.

Antecedentes

La modificación de los fármacos con poli(etilenglicol) es un proceso muy establecido que mejora sus propiedades farmacológicas y biológicas.

15 Los fármacos proteínicos y peptídicos a menudo tienen una corta semivida circulatoria *in vivo*, pueden tener una alta inmunogenicidad, pueden experimentar una degradación proteolítica, y pueden tener una baja solubilidad. Además, el mantenimiento prolongado de los fármacos terapéuticamente activos en la circulación es una característica deseable de evidente importancia clínica.

20 Una estrategia atractiva para mejorar las propiedades clínicas de los fármacos proteínicos o peptídicos es una modificación de los fármacos con polímeros hidrófilos, por ejemplo, óxidos de polialquileno (Roberts et al., Adv. Drug Rev. 54, 459-476 (2002)) o polisacáridos, como ácido polisiálico (Fernandes et al., Biochim. Biophys. Acta, 1341, 26-34 (1997)), dextranos, o almidón de hidroxialquilo. Aunque la modificación de los fármacos proteínicos y peptídicos con poli(etilenglicol) (PEG) mejora la estabilidad y la solubilidad de la proteína o el péptido, a menudo conduce a una reducción de la actividad. Sin embargo, la posterior liberación de restos de PEG de una proteína o péptido PEGilado *in vivo* restaura la actividad de la proteína o el péptido. Por lo tanto, la derivación de proteínas y péptidos con PEG liberables puede convertir una proteína en un profármaco de liberación controlada con una vida circulatoria mejorada. Estas propiedades biológicas mejoradas se han mostrado, por ejemplo, en el caso del interferón α -2 (Peleg-Shulman et al., J Med Chem. 47, 4897-4904 (2004)), exendina-4 (Tsubery et al., J Biol Chem. 37, 38118-38124 (2004)) e interferón-(β -1b (Zhao et al., Bio-conjugate Chem. 17, 341-351 (2006)).

30 Las moléculas farmacológicas diferentes de proteínas y péptidos también se benefician de la PEGilación. La PEGilación de las moléculas farmacológicas aumenta el tamaño aparente de la molécula, reduciendo de este modo la filtración renal y alterando la biodistribución. Además, la PEGilación de ligandos hidrófobos aumenta su solubilidad *in vivo*. Finalmente, la derivación de moléculas farmacológicas diferentes de proteínas y péptidos con PEG liberables proporciona un procedimiento para convertir el fármaco en un profármaco de liberación controlada.

35 Se han sugerido varios enlazadores liberables que comprenden restos de PEG. La Patente de Estados Unidos n.º 6.515.100 describe derivados de PEG y de polímeros relacionados que tienen enlaces débiles, hidrolíticamente inestables a proteínas o péptidos. Sin embargo, la hidrólisis del enlace inestable para liberar PEG de la proteína o el péptido no es capaz de proporcionar la proteína o péptido en su forma nativa. En su lugar, la proteína o el péptido comprenden un fragmento molecular corto adicional, o etiqueta.

40 La Patente de Estados Unidos n.º 7.205.380 describe derivados de PEG, que tienen enlaces impedidos estéricamente, que se acoplan con grupos alcohol o tiol de proteínas o péptidos para dar como resultado enlaces de éster o tioéster con una reactividad hidrolítica disminuida. Esta actividad hidrolítica disminuida es resultado de la conjugación de grupos alquilo o arilo con el carbono adyacente al carbono de carbonilo del enlace éster o tioéster. La patente también desvela que la administración hidrolítica de los fármacos de ésteres de PEG puede controlarse controlando el número de grupos de metileno de unión en un espaciador entre el oxígeno PEG terminal y el grupo carbonilo del ácido carboxílico adjunto o el derivado de ácido carboxílico. El enlazador de PEG de la patente no es óptimo con proteínas que contienen amino porque la amida resultante será más estable a la hidrólisis y menos capaz de liberar PEG de la proteína.

50 Las Patentes de Estados Unidos n.º 6.413.507 y 6.899.867 describen derivados de carbamato hidrolíticamente degradables de poli(etilenglicol). El resto de PEG se conjuga con la proteína a través de un enlazador no hidrolizable unido a un grupo arilo, que está unido a la proteína a través de un carbamato.

Las Publicaciones Internacionales n.º WO 04/089280 y WO 06/138572 describen construcciones de PEG a base de fluoreno hidrolizable.

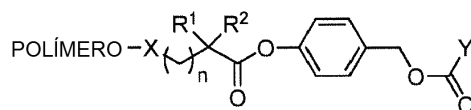
Greenwald et al., (J Med Chem. 42, 3657-3667 (1999)) describen una metodología general para sintetizar profármacos de PEG de compuestos que contienen amino. Se describen los conjugados de PEG, que siguen una

estrategia de doble profármacos que se basa, en primer lugar, en la separación enzimática de PEG, seguido de una rápida reacción de eliminación de 1,4- o 1,6-bencilo, liberando el fármaco que contiene amino conjugado unido en forma de un carbamato.

5 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan compuestos de Fórmula 1 de acuerdo con la reivindicación 1, conjugados farmacológicos de Fórmula II de acuerdo con la reivindicación 8, y compuestos de la estructura C de acuerdo con la reivindicación 15.

10 La presente invención proporciona derivados poliméricos, que pueden conjugarse con fármacos para mejorar sus propiedades *in vivo*, tales como la semivida, la solubilidad y/o la circulación. Los derivados poliméricos pueden liberarse posteriormente para producir el fármaco en su forma nativa. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, la liberación del derivado polimérico del fármaco sigue un mecanismo de liberación de múltiples etapas.

Se desvelan en el presente documento derivados poliméricos de Fórmula general I:



Fórmula I

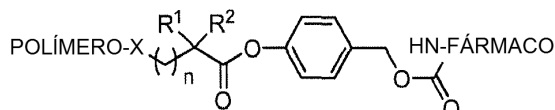
15 en la que Y es un grupo de activación capaz de desplazarse fácilmente por un grupo amino de un fármaco para formar un enlace de carbamato;

n es ≥ 1 ;
X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NR³, en la que R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo;

POLÍMERO es un polímero soluble en agua no peptídico; y

20 R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo.

También se desvelan en el presente documento conjugados farmacológicos o sales, ésteres o solvatos de los mismos de Fórmula II:



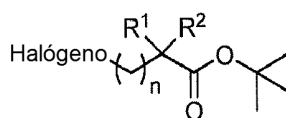
Fórmula II

25 en la que X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NR³; n es ≥ 1 ; POLÍMERO es un polímero soluble en agua no peptídico; R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo; R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo; y FÁRMACO es una molécula, péptido o proteína que contiene amino. El fármaco puede ser una proteína plasmática o un factor de coagulación sanguínea. En realizaciones específicas, el fármaco puede ser eritropoyetina, Factor H, Factor VIII, Factor von Willebrand, Factor VIIa, o Factor IX.

30 Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas de los conjugados farmacológicos desvelados en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la formulación comprende conjugados farmacológicos encapsulados en una micropartícula.

35 Se desvelan en el presente documento procedimientos para tratar una enfermedad en un paciente que comprende administrar al paciente una formulación farmacéutica como se desvela en el presente documento. En algunos casos, la enfermedad es una enfermedad de la coagulación sanguínea y el fármaco del conjugado farmacológico es una proteína plasmática o un factor de coagulación sanguínea.

Se desvelan en el presente documento compuestos de estructura A:



A

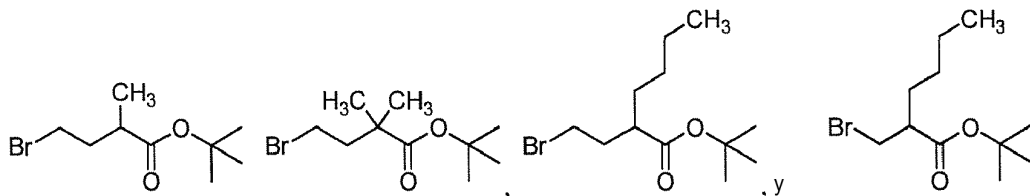
40 en la que n es 1, 2, 3 o 4;

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo; y

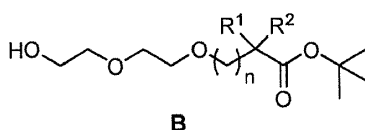
Halógeno es Br, Cl, o I;

con la condición de que al menos uno de R¹ y R² sea diferente de hidrógeno.

En realizaciones específicas, el compuesto de estructura **A** se selecciona del grupo que consiste en:



5 Se desvelan en el presente documento compuestos de estructura **B**:

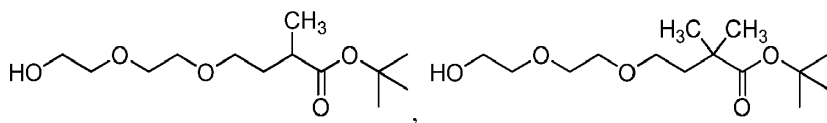


en la que n es 1, 2, 3 o 4; y

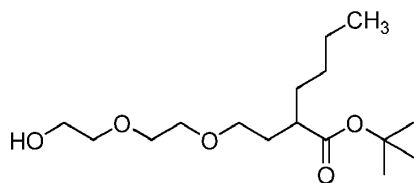
R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo;

10 con la condición de que al menos uno de R¹ y R² sea diferente de hidrógeno.

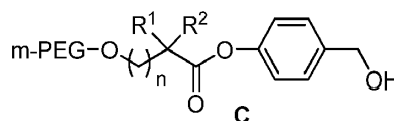
En realizaciones específicas, el compuesto de estructura **B** se selecciona del grupo que consiste en:



y



15 En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos de estructura **C**:



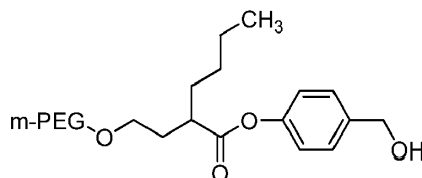
en la que n es 1, 2, 3 o 4;

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo; y

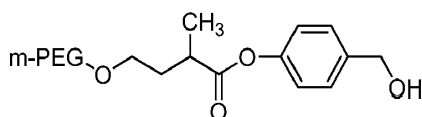
20 m-PEG- es monometoxi poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 500.000;

con la condición de que al menos uno de R¹ y R² sea diferente de hidrógeno.

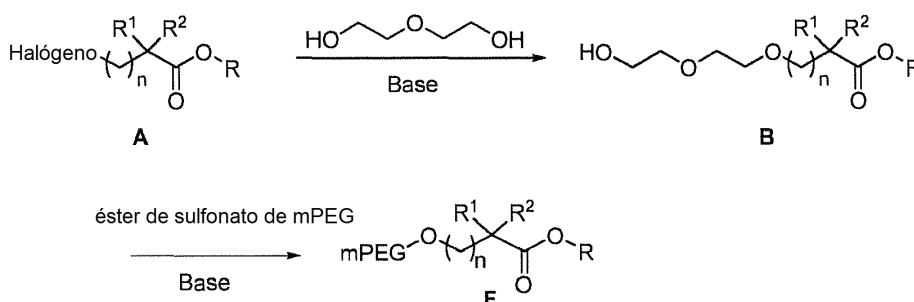
En realizaciones específicas, el compuesto de estructura C se selecciona del grupo que consiste en:



y

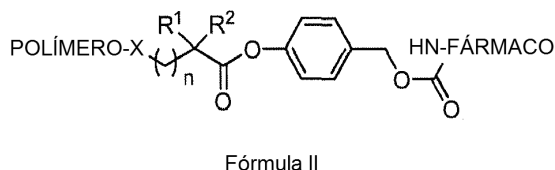


5 También se desvelan en el presente documento procedimientos para preparar un compuesto de fórmula **F**, que comprenden mezclar un compuesto de fórmula **A**, dietilenglicol, y una base para formar un compuesto de fórmula **B**, que después se hace reaccionar con una base y éster de sulfonato de monometoxi poli(etilenglicol), tal como mesilato de mPEG (mPEG-OMs) o fluorofenilsulfonato (mPEG-OTs(F)), para formar el compuesto de fórmula F, como se muestra a continuación:



10 en la que n es 1, 2, 3 o 4; R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo; y R es alquilo (C₁-C₆).

También se desvelan en el presente documento conjugados farmacológicos que tienen la Fórmula general II.



15 en la que el POLÍMERO, X, R¹, R², y n se definen como en la Fórmula I. El FÁRMACO es una molécula, péptido o proteína que contiene amino capaz de desencadenar una respuesta biológica, o es una molécula, péptido o proteína capaz de desencadenar una respuesta biológica que se modifica para comprender un grupo amino.

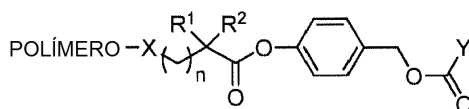
En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para manipular la tasa de liberación del derivado polimérico del fármaco.

Descripción detallada

20 La presente invención proporciona derivados poliméricos, que pueden conjugarse con fármacos que contienen amino para mejorar sus propiedades *in vivo* tales como sus semividas, la solubilidad y/o la circulación *in vivo*. Los derivados poliméricos pueden liberarse posteriormente de los fármacos *in vivo* para producir el fármaco en su forma nativa. Existe la teoría de que la liberación del derivado polimérico del fármaco sigue un mecanismo de liberación de múltiples etapas.

25 La presente invención describe la conjugación de un derivado polimérico liberable con un grupo amino de un fármaco para formar un enlace de carbamato. La conjugación de los derivados poliméricos de la invención con un fármaco aumenta la solubilidad en agua del fármaco, prolonga la semivida en plasma a través, por ejemplo, de una depuración renal reducida y la protección hacia enzimas degradantes, e impide o reduce la agregación, la inmunogenicidad, y la antigenicidad. Ventajosamente, el derivado polimérico puede liberarse *in vivo* para dar como resultado el fármaco en su forma nativa, manteniendo la eficacia del fármaco. Además, ventajosamente, y sin pretender quedar ligado a ninguna teoría particular, el mecanismo de liberación de los derivados poliméricos desvelados se produce a través de un proceso de múltiples etapas, en el que la hidrólisis del enlace de carbamato no es la etapa de determinación de la velocidad del proceso. En cambio, la etapa de determinación de la velocidad de la reacción es la hidrólisis de un resto de éster que puede adaptarse para conseguir una hidrólisis más rápida o más lenta mediante la manipulación de la impedancia estérica y/o los efectos electrónicos cercanos al carbono de carbonilo del éster. Por lo tanto, la velocidad de liberación del fármaco puede adaptarse a un diseño terapéutico específico.

Se desvelan en el presente documento derivados poliméricos de la Fórmula general I:



Fórmula I

en la que Y es un grupo de activación capaz de desplazarse fácilmente por un grupo amino en un fármaco para formar un enlace de carbamato;

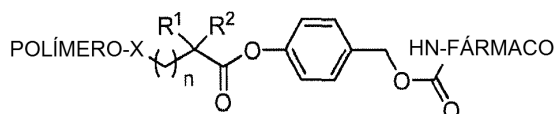
n es ≥ 1 ;

- 5 X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NR³, en la que R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo;

POLÍMERO es un polímero soluble en agua no peptídico; y

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo.

- 10 Los derivados poliméricos pueden usarse para preparar conjugados farmacológicos de Fórmula general II:



Fórmula II

en la que el POLÍMERO, X, R¹, R², y n se definen como en la Fórmula I. El FÁRMACO es una molécula, péptido o proteína que contiene amino capaz de desencadenar una respuesta biológica, o una molécula, péptido o proteína capaz de desencadenar una respuesta biológica que se modifica para comprender un grupo amino. El FÁRMACO

15 contiene uno o más grupos amino para la reacción, por lo tanto, uno o más grupos pueden hacerse reaccionar con los derivados poliméricos.

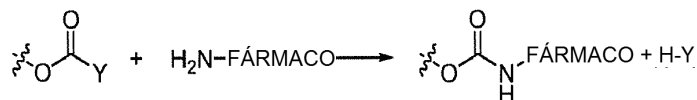
El "fármaco" se refiere a una molécula, péptido o proteína que contiene amino que desencadena una respuesta biológica, o una molécula, péptido o proteína que desencadena una respuesta biológica y se modifica para comprender un grupo amino.

- 20 "Alquilo (C₁-C₆)" se refiere a grupos alquilo monovalentes que tienen de 1 a 6 átomos de carbono. Este término se ilustra por grupos tales como metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo y similares. Se incluyen los alquilos lineales y ramificados. Los grupos alquilo opcionalmente pueden estar sustituidos, por ejemplo, con hidroxilo (OH), halo, arilo y amino.

- 25 Como se usa en el presente documento, el término "alquilenarilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente. Por ejemplo, el término "alquilenarilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo.

- 30 Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un grupo aromático monocíclico o policíclico, preferentemente un grupo aromático monocíclico o bicíclico, por ejemplo, fenilo o naftilo. A menos que se indique otra cosa, un grupo arilo puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más, y en particular, de uno a cuatro grupos independientemente seleccionados, por ejemplo, de entre halo, alquilo, alquilenarilo, OCF₃, NO₂, CN, NC, OH, alcoxi, amino, CO₂H, CO₂alquilo, arilo y heteroarilo. Los grupos arilo ejemplares incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, clorofenilo, metilfenilo, metoxifenilo, trifluorometilfenilo, nitrofenilo, 2,4-metoxiclorofenilo, y similares.

"Grupo de activación" (Y) se refiere a un resto que se desplaza desde un carbonilo como resultado de una reacción de sustitución de acilo. Por ejemplo, un grupo amino de un fármaco puede desplazar un grupo de activación unido a un carbonilo para formar un enlace carbamato, como se muestra a continuación:



- 35 Los grupos de activación son haluro, -N₃, -CN, RO-, NH₂O-, NHRO-, RMN₂O-, RCO₂-, ROCO₂-, ROCO₂-, RS-, RC(S)O-, RCS₂-, RSC(O)S-, RSCS₂-, RSCO₂-, ROC(S)O-, ROCS₂-, RSO₂-, RSO₃-, ROSO₂-, ROSO₃-, RPO₃-, ROPO₃-, imidazolilo, N-triazolilo, N-benzotriazolilo, benzotriazoliloxi, imidazoliloxi, N-imidazolinona, N-imidazolona, N-imidazolinetona, N-succinimidilo, N-ftalimidilo, N-succinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-(5-norbomen-2,3-dicarboxiimidiloxi), 2-tioxotiazolidin-3-ilo, -ON=C(CN)R, 2-piridiloxi, fenoxi, o fenoxi sustituido (por ejemplo, p-clorofenoxi, p-nitrofenoxi, triclorofenoxi, pentaclorofenoxi), en los que R es un grupo alquilo (sin sustituir o sustituido) o un grupo arilo (sin sustituir o sustituido), o otro grupo de activación adecuado evidente para los expertos. En una realización preferida, el grupo de activación se selecciona del grupo que consiste en N-succinimidiloxi, 1-benzotriazoliloxi, N-ftalimidiloxi, N-(5-norbomen-2,3-dicarboxiimidiloxi), p-nitrofenoxi, 2-tioxotiazolidin-3-ilo, e
- 40

imidazolilo.

Un "polímero soluble en agua" se refiere a un homopolímero o copolímero hidrófilo y no peptídico. El término "polímero soluble en agua" incluye polímeros lineales o ramificados tales como poli(alquilenglicol), polifosfazenos solubles en agua o polímeros a base de carbohidrato tales como polisacáridos. El polímero soluble en agua puede estar protegido en su extremo. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua contemplados incluyen polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisialílico (PSA), polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dermatán sulfato, almidón, dextrano, carboximetil-dextrano, óxido de polialquileo (PAO), copolímeros de óxidos de polialquileo, polioxámero (tal como PLURONIC®), polialquilenglicol (PAG), polipropilenglicol (PPG), polioxazolina, poliacriloilmorfolina, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfazeno, anhídrido del ácido polietileno-co-maleico, anhídrido del ácido poliestireno-co-maleico, poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF), y fosfato de 2-metacrililoxi-2'-etiltrimetilamonio (MPC). El polímero soluble en agua puede tener un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 500.000. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 25.000, o de aproximadamente 40.000 a aproximadamente 60.000. En una realización específica, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 10.000.

En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua es un PEG, que puede ser lineal o ramificado. PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 500.000, tal como de aproximadamente 1000 a aproximadamente 25.000, de aproximadamente 2000 a aproximadamente 10.000, o de aproximadamente 40.000 a aproximadamente 60.000. En una realización específica, el PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 2000. Los polímeros de PEG específicos contemplados incluyen PEG 200, PEG 300, PEG 2000, PEG 3350, PEG 8000, PEG 10.000 y PEG 20.000.

En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua es un copolímero de bloques de PEG y otros poli(alquilenglicoles), tales como PLURONIC® F127 o PLURONIC® F68.

En diversas realizaciones, el polímero soluble en agua es un polisacárido, tal como un derivado de PSA. El polisacárido puede comprender entre 2 y 200 unidades de un monosacárido, tal como de 10 a 100 unidades de un monosacárido y/o al menos 3 unidades de un monosacárido.

Derivado polimérico "liberable" se refiere a un derivado polimérico, que está unido a un fármaco que contiene amino para formar un conjugado, en el que el derivado polimérico se libera *in vivo*, produciendo el fármaco en su forma nativa. Los sinónimos para liberable son "degradable" o "hidrolizable".

La variable X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NR³, en el que R³ es hidrógeno o alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo. En una realización, X es O. En otra realización, X es NH.

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo. R¹ y R² pueden ser independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₆). Contemplados específicamente, R¹ y R² incluyen hidrógeno, metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo y *n*-butilo. En una realización específica, R¹ es hidrógeno y R² es alquilo (C₁-C₆). Por ejemplo, R¹ es hidrógeno y R² es metilo.

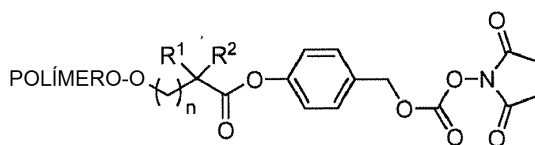
Los ejemplos de FÁRMACO que se contemplan incluyen, pero sin limitación, enzimas naturales, proteínas derivadas de fuentes naturales, proteínas recombinantes, péptidos naturales, péptidos sintéticos, péptidos cíclicos, anticuerpos, agonistas de receptores, agentes citotóxicos, inmunoglobinas, agentes bloqueadores β-adrenérgicos, bloqueadores del canal de calcio, vasodilatadores coronarios, glucósidos cardíacos, antiarítmicos, simpaticomiméticos cardíacos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), diuréticos, inotrópicos, reductores del colesterol y triglicéridos, secuestrantes de ácidos biliares, fibratos, inhibidores de 3-hidroxi-3-metilgluteroil (HMG)-CoA reductasa, derivados de niacina, agentes antiadrenérgicos, agentes bloqueadores α-adrenérgicos, agentes antiadrenérgicos de acción central, vasodilatadores, agentes ahorradores de potasio, tiazidas y agentes relacionados, antagonistas del receptor de angiotensina II, vasodilatadores periféricos, antiandrógenos, estrógenos, antibióticos, retinoides, insulinas y análogos, inhibidores de α-glucosidasa, biguanidas, meglitinidas, sulfonilureas, tiazolidindionas, andrógenos, progestógenos, reguladores de metabolismo óseo, hormonas pituitarias anteriores, hormonas hipotalámicas, hormonas pituitarias posteriores, gonadotropinas, antagonistas de hormonas liberadoras de gonadotropina, estimulantes de la ovulación, moduladores de receptores de estrógeno selectivos, agentes anti-tiroideos, hormonas tiroideas, agentes formadores de volumen, laxantes, antiperistálticos, modificadores de la flora, adsorbentes intestinales, anti-infecciosos intestinales, anti-anoréxicos, anti-caquéticos, anti-bulímicos, supresores de apetito, agentes anti-obesidad, anti-ácidos, agentes del tracto gastrointestinal superior, agentes anticolinérgicos, derivados de ácido aminosalicílico, modificadores de la respuesta biológica, corticosteroides, antiespasmódicos, agonistas parciales de 5-HT₄, antihistaminas, cannabinoides, antagonistas de dopamina, antagonistas de serotonina, citoprotectores, antagonistas del receptor histamina H₂, agente protector mucosal, inhibidores de bomba de protones, terapia de erradicación de *H. pylori*, estimulantes de la eritropoyesis, agentes hematopoyéticos, agentes de anemia, heparinas, antifibrinolíticos, hemostáticos, factores de coagulación en sangre, inhibidores de difosfato de adenosina, inhibidores de receptores de glicoproteínas, inhibidores de la unión de fibrinógeno-plaquetas, inhibidores de tromboxano-A₂, activadores de plasminógeno, agentes antitrombóticos, agentes antitrombóticos, glucocorticoides, mineralocorticoides, corticosteroides, agentes inmunosupresores

selectivos, antifúngicos, medicamentos involucrados en la terapia profiláctica, infecciones asociadas al SIDA, citomegalovirus, inhibidores de transcriptasa inversa no nucleosídicos, inhibidores de transcriptasa inversa de análogo de nucleósido, inhibidores de proteasa, anemia, sarcoma de Kaposi, aminoglucósidos, carbapenemas, cefalosporinas, glucopéptidos, lincosamidas, macrólidos, oxazolidinonas, penicilinas, estreptograminas, sulfonamidas, trimetoprima y derivados, tetraciclinas, antihelmínticos, amibicidas, biguanidas, alcaloides de cinchona, antagonistas de ácido fólico, derivados de quinolina, terapia de *Pneumocystis carinii*, hidrazidas, imidazoles, triazoles, nitroimidazoles, aminos cíclicas, inhibidores de neuraminidasa, nucleósidos, aglutinantes de fosfato, inhibidores de colinesterasa, terapia adyuvante, barbitúricos y derivados, benzodiazepinas, derivados de ácido gamma aminobutírico, derivados de hidantoína, derivados de iminostilbeno, derivados de succinimida, anticonvulsivos, alcaloides de ergot, preparaciones antimigraña, modificadores de la respuesta biológica, comedores de ácido carbámico, derivados tricíclicos, agentes despolarizantes, agentes no despolarizantes, agentes paráliticos neuromusculares, estimulantes del SNC, reactivos dopaminérgicos, inhibidores de la monoamina oxidasa, inhibidores de COMT, sulfonatos de alquilo, etileniminas, imidazotetrazinas, análogos de mostaza de nitrógeno, nitrosoureas, compuestos que contienen platino, antimetabolitos, análogos de purina, análogos de pirimidina, derivados de urea, antraciclinas, actinomicidas, derivados de camptotecina, epipodofilotoxinas, taxanos, alcaloides de vinca y análogos, antiandrógenos, antiestrógenos, inhibidores de aromatasa no esteroideos, antineoplásicos de inhibidores de proteína cinasa, derivados azaespirodecanodiona, ansiolíticos, estimulantes, inhibidores de la recaptación de monoaminas, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, antidepresivos, derivados de bencisooxazol, derivados de butirofenona, derivados de dibenzodiazepina, derivados de dibenzotiazepina, derivados de difenilbutilpiperidina, fenotiazinas, derivados de tienobenzodiazepina, derivados de tioxanteno, extractos alergénicos, agentes no esteroideos, antagonistas del receptor de leucotrienos, xantinas, antagonistas del receptor de endotelina, prostaglandinas, tensioactivos pulmonares, mucolíticos, antimitóticos, uricosúricos, inhibidores de xantina oxidasa, inhibidores de fosfodiesterasa, sales de meteamina, derivados de nitrofurano, quinolonas, relajantes de músculos lisos, agentes parasimpatomiméticos, hidrocarburos halogenados, ésteres de ácido aminobenzoico, amidas (por ejemplo, lidocaína, clorhidrato de articaína, clorhidrato de bupivacaína), antipiréticos, hipnóticos y sedantes, ciclopirrolonas, pirazolopirimidinas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, opiáceos, derivados de para-aminofenol, inhibidor de alcohol deshidrogenasa, antagonistas de heparina, adsorbentes, eméticos, antagonistas opioides, reactivadores de colinesterasa, terapia de reemplazo de nicotina, análogos y antagonistas de vitamina A, análogos y antagonistas de vitamina B, análogos y antagonistas de vitamina C, análogos y antagonistas de vitamina D, análogos y antagonistas de vitamina E, análogos y antagonistas de vitamina K.

En algunas realizaciones, el FÁRMACO es una proteína, anticuerpo o molécula. En algunas realizaciones específicas, el FÁRMACO es neocarzinostatina, zinostatina, adenosina desaminasa, asparaginasa, interferón $\alpha 2b$, interferón $\alpha 2a$, agonista del receptor de la hormona del crecimiento, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), aptámero del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Fab del factor de necrosis antitumoral (TNF), anticuerpo diFab, doxorubicina, doxorubicina-galactosamina, camptotecina, paclitaxel, un platinato, eritropoyetinas, Factor H, Factor VIII (FVIII), Factor von Willebrand (vWF), Factor VIIa (FVIIa), o Factor IX (FIX). (Véase, por ejemplo, Pasut et al. Prog. In Polymer Science, 2007, 32, 933-961).

En realizaciones específicas, el FÁRMACO es una proteína plasmática o un factor de coagulación sanguínea, tal como, por ejemplo, eritropoyetina, Factor H, Factor VIII (FVIII), Factor von Willebrand (vWF), Factor VIIa (FVIIa), Factor IX (FIX) y similares.

Los derivados poliméricos de Fórmula general IA pueden ser aquellos que se enumeran en la Tabla 1.



Fórmula IA

Tabla 1

Compuesto IA	N	R ¹	R ²
i	2	Me	H
ii	2	Me	Me
iii	3	Me	Me
iv	4	Me	Me
v	3	Et	H

(continuación)

Compuesto IA	N	R ¹	R ²
vi	3	<i>n</i> -Pr	H
vii	2	<i>n</i> -Bu	H
viii	1	Me	Me
ix	1	Me	Et
x	1	Et	Et
xi	1	Me	<i>n</i> -Pr
xii	1	<i>n</i> -Pr	<i>n</i> -Pr
xiii	1	iso-Pr	H
xiv	1	<i>n</i> -Bu	H
xv	1	H	Me

Las abreviaturas usadas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones se definen en la Tabla 2. Se encuentran abreviaturas adicionales a lo largo de toda la memoria descriptiva.

Tabla 2

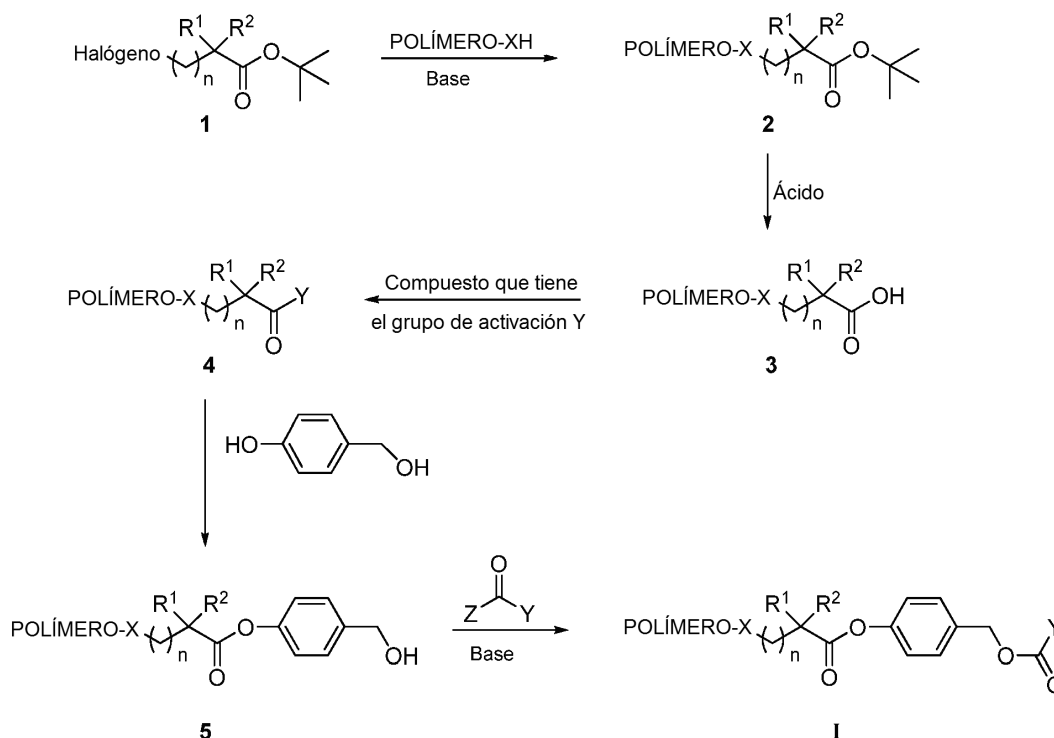
Abreviatura	Nombre
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
<i>t</i> BuOH	<i>terc</i> -Butanol
TBME	<i>terc</i> -Butil metil éter
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	<i>N,N</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
DIPA	Diisopropilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DSC	Carbonato de <i>N,N</i> -disuccinimidilo
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
FVIIa	Factor VIIa
FVIII	Factor VIII
FIX	Factor IX
HCl	Ácido clorhídrico
HES	Almidón hidroxietilo
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
MsCl	Cloruro de metanosulfonilo

(continuación)

Abreviatura	Nombre
OMs	Metilsulfonilo (Mesilo)
PM	Peso molecular
mPEG	Monometoxi polietilenglicol
PBr ₃	Tribromuro de fósforo
PEG	Polietilenglicol
PSA	Ácido polisiálico
PVP	Polivinilpirrolidona
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
NaHCO ₃	Bicarbonato sódico
NaCl	Cloruro sódico
NaH	Hidruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
Na ₂ SO ₄	Sulfato sódico
TLC	Cromatografía de capa fina
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
vWF	Factor von Willebrand

5 En otro aspecto, la invención se refiere a la preparación de derivados poliméricos de Fórmula I. Se muestra un protocolo sintético para la preparación de estos derivados en el Esquema 1, en el que "Halógeno" se selecciona del grupo que consiste en I, Br, y Cl, y las variables n, R¹, R² y POLÍMERO-XH son como se describen en el presente documento.

Esquema 1



En la primera etapa de la síntesis, el compuesto **1** reacciona con POLÍMERO-XH en presencia de una base para formar el compuesto **2**. Las bases adecuadas incluyen bases inorgánicas (por ejemplo, carbonato de cesio y similares), hidruros de metales alcalinos (por ejemplo, hidruro sódico y similares), alcóxidos (por ejemplo, terc-butóxido potásico), y similares.

En la segunda etapa de la síntesis, el compuesto **2** se desprotege en presencia de un ácido para formar el compuesto **3**. Los ácidos adecuados incluyen ácido trifluoroacético (TFA), ácido clorhídrico (HCl) y similares. En la tercera etapa de la síntesis, el compuesto de ácido carboxílico **3** se hace reaccionar con un compuesto que tiene un grupo de activación (Y) para formar el compuesto **4**. Los compuestos adecuados que tienen grupos de activación incluyen tioxotazolidinas y ésteres de succinimidilo, y otros compuestos que tienen "grupos de activación" como se define a continuación. El grupo de activación Y se desplaza con 4-hidroxibencil alcohol en la cuarta etapa de la síntesis para formar el compuesto **5**. En la etapa final de la síntesis, el compuesto **5** se somete a una reacción de acoplamiento con un compuesto de carbonilo diactivado en condiciones básicas para producir el derivado polimérico **I**.

El grupo de activación Y y Z e Y en el compuesto de carbonilo diactivado son grupos de activación seleccionados independientemente del grupo que consiste en haluro, $-N_3$, $-CN$, $RO-$, NH_2O- , $NHRO-$, NR_2O- , RCO_2- , $ROCO_2-$, $RNCO_2-$, $RS-$, $RC(S)O-$, RCS_2- , $RSC(O)S-$, $RSCS_2-$, $RSCO_2-$, $ROC(S)O-$, $ROCS_2-$, RSO_2- , RSO_3- , $ROSO_2-$, $ROSO_3-$, RPO_3- , $ROPO_3-$, imidazolilo, *N*-triazolilo, *N*-benzotriazolilo, benzotiazolilo, imidazolilo, *N*-imidazolinona, *N*-imidazolona, *N*-imidazolinetiona, *N*-succinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-succinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-5-norbornen-2,3-dicarboximidilo, 2-tioxotiazolidin-3-ilo, $-ON=C(CN)R$, 2-piridilo, fenoxi, o fenoxi sustituido (por ejemplo, *p*-clorofenoxi, *p*-nitrofenoxi, triclorofenoxi, pentaclorofenoxi), en los que R es un grupo alquilo (sin sustituir o sustituido) o un grupo arilo (sin sustituir o sustituido), u otros grupos de activación adecuados evidentes para los expertos.

La base en la etapa final de la síntesis es cualquier base que sea capaz de catalizar la reacción. Preferentemente, la base es una base orgánica. Los ejemplos no limitantes de bases orgánicas incluyen, por ejemplo, trietilaminas y heterociclos de nitrógeno seleccionados. Las bases orgánicas específicas contempladas son trietilamina (TEA), dimetilaminopiridina (DMAP), piridina, *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU).

En algunas realizaciones, Z e Y son como se describen en la Tabla 3.

Tabla 3

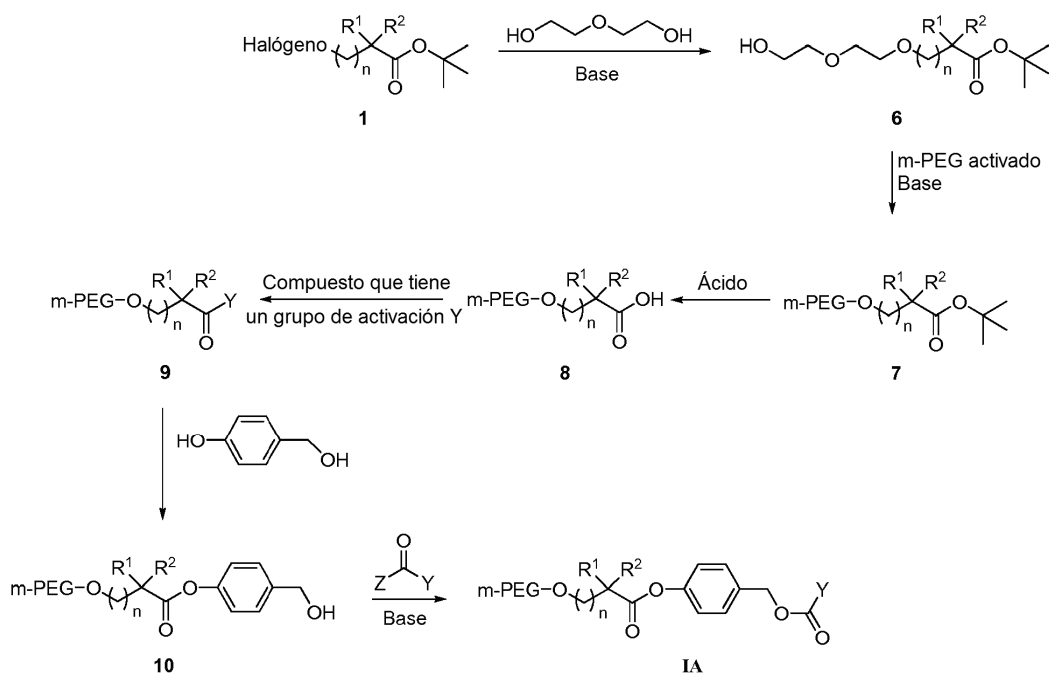
	Z	Y
a	<i>N</i> -Succinimidilo	<i>N</i> -Succinimidilo

(continuación)

	Z	Y
b	1-Benzotriazoliloxi	1-Benzotriazoliloxi
c	<i>N</i> -Ftalimidiloxi	<i>N</i> -Ftalimidiloxi
d	<i>N</i> -(5-Norbornen-2,3-dicarboxiimidiloxi)	<i>N</i> -(5-Norbornen-2,3-dicarboxiimidiloxi)
e	Cl	<i>p</i> -Nitrofenoxi
f	Cl	2-Tioxotiazolidin-3-ilo
g	Cl	Imidazolilo

En algunas realizaciones, el derivado polimérico de Fórmula I puede prepararse de acuerdo con el Esquema 2, en el que "Halógeno" se selecciona del grupo que consiste en I, Br, y Cl, y las variables n, R¹, R², Y y Z son como se definen en el presente documento.

Esquema 2



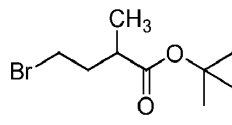
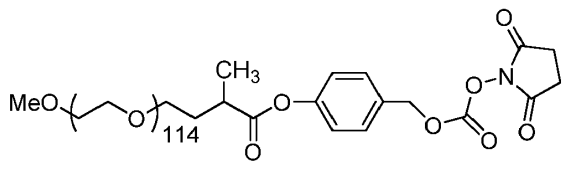
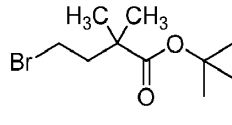
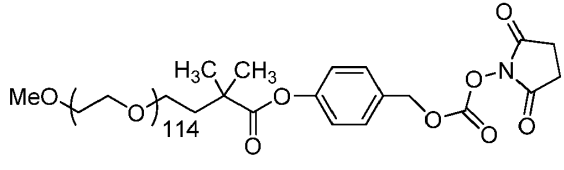
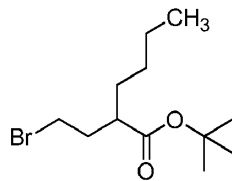
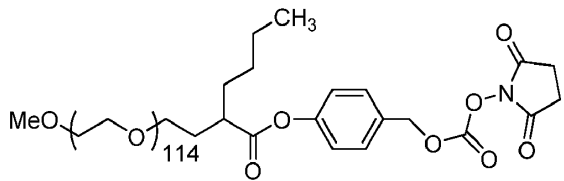
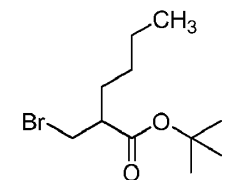
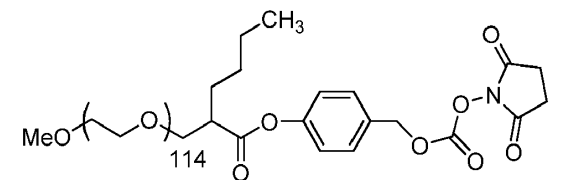
En la primera etapa de la síntesis, el compuesto 1 se hace reaccionar con dietilenglicol en presencia de una base para formar el compuesto 6. Las bases adecuadas incluyen hidruros de metales alcalinos (tal como hidruro sódico, hidruro potásico, y similares), amidas voluminosas (tal como diisopropilamida de litio (LDA) y similares), trialkilaminas (tal como DIPEA, TEA, y similares), alcóxidos (tal como terc-butóxido potásico y similares), y bases inorgánicas (tal como hidróxido de cesio, carbonato de cesio, y similares).

En la segunda etapa de la síntesis, el resto de dietilenglicol del compuesto 6 se alarga a través de una reacción de sustitución nucleófila con un monometoxi poli(etilenglicol) activado por éster de sulfonato para formar el compuesto 7 (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional n.º WO 2006/099794). Los grupos de activación de éster de sulfonato adecuados son, por ejemplo, sulfonato de metilo (mPEG-OMs), fluorofenilsulfonato (mPEG-OTs), triflato, tosilato, y similares. En la tercera etapa de la síntesis, el compuesto 7 se desprotege en presencia de un ácido para formar el compuesto de ácido carboxílico 8. Los ácidos adecuados incluyen ácido trifluoroacético (TFA), ácido clorhídrico (HCl), y similares. En la cuarta etapa de la síntesis, el compuesto 8 se hace reaccionar con un compuesto que tiene un grupo de activación (Y) para formar el compuesto 9. Los compuestos adecuados son aquellos que tienen grupos de activación como se describe en el presente documento, tales como, por ejemplo, *N*-succinimidiloxi, 1-benzotriazoliloxi, *N*-ftalimidiloxi, *N*-(5-norbornen-2,3-dicarboxiimidiloxi), *p*-nitrofenoxi, 2-tioxotiazolidin-3-ilo e imidazolilo. El grupo de activación Y en el compuesto 9 se desplaza con 4-hidroxibencil alcohol en la quinta etapa de la síntesis para formar el compuesto 10. En la etapa final de la síntesis, el compuesto 10 se somete a una reacción

5 de acoplamiento con un carbonilo diactivado, tal como cualquier compuesto de carbonilo diactivado descrito en el presente documento o enumerado en la Tabla 3 (por ejemplo, carbonato de *N,N*-discuccinimidilo (DSC), los compuestos b, c y d en la Tabla 3) y una base para producir el derivado polimérico **IA**. Las bases adecuadas incluyen cualquier base que sea capaz de catalizar la reacción, tales como trietilaminas y heterociclos de nitrógeno seleccionados (por ejemplo, trietilamina (TEA), dimetilaminopiridina (DMAP), piridina, *N,N*-diisopropiletamina (DIPEA), y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), y similares).

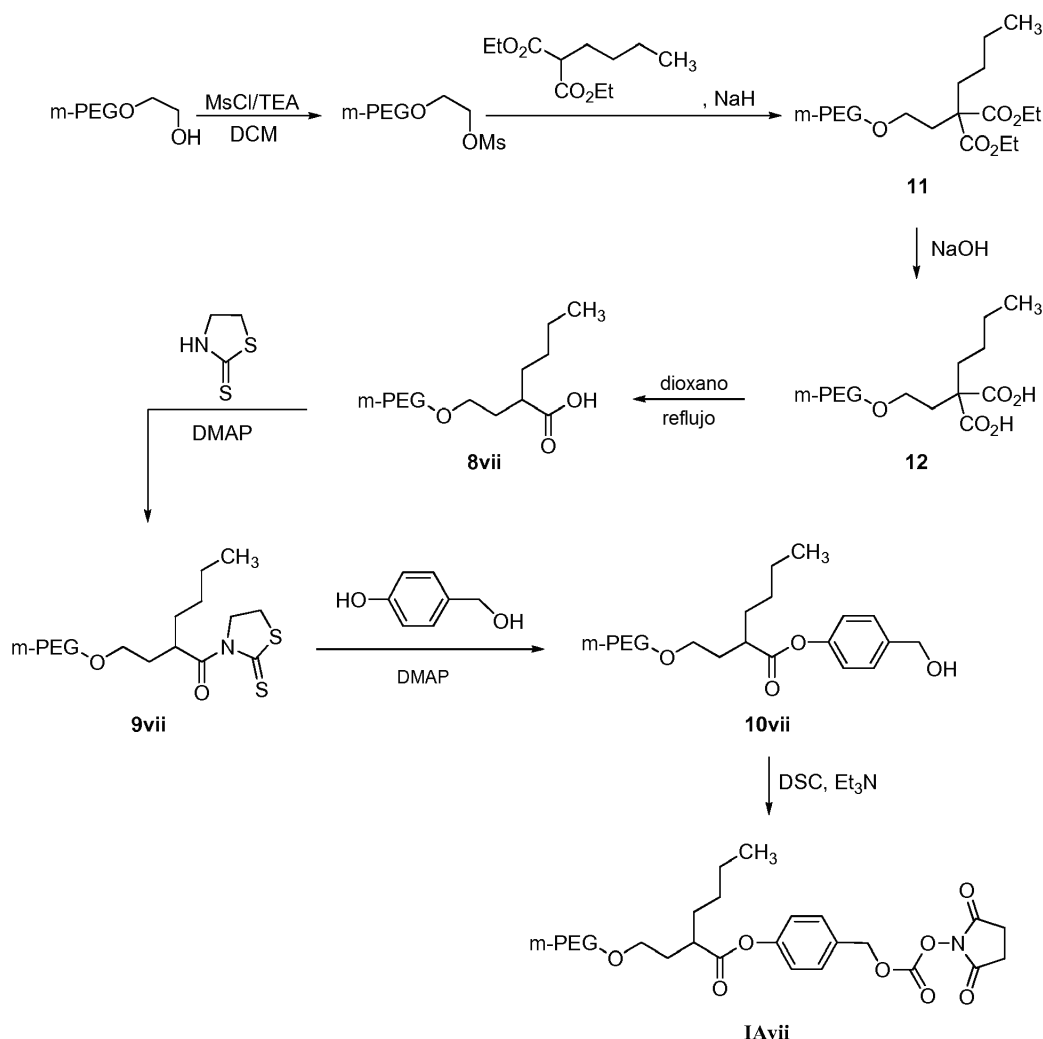
Los ejemplos de Compuestos **1** e **IA** del Esquema 2 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

	Compuesto 1	Compuesto IA
i		
ii		
vii		
xiv		

10 En una realización específica, un protocolo sintético para la formación del derivado polimérico **IAvii** de la Tabla 4 se muestra en el Esquema 3,

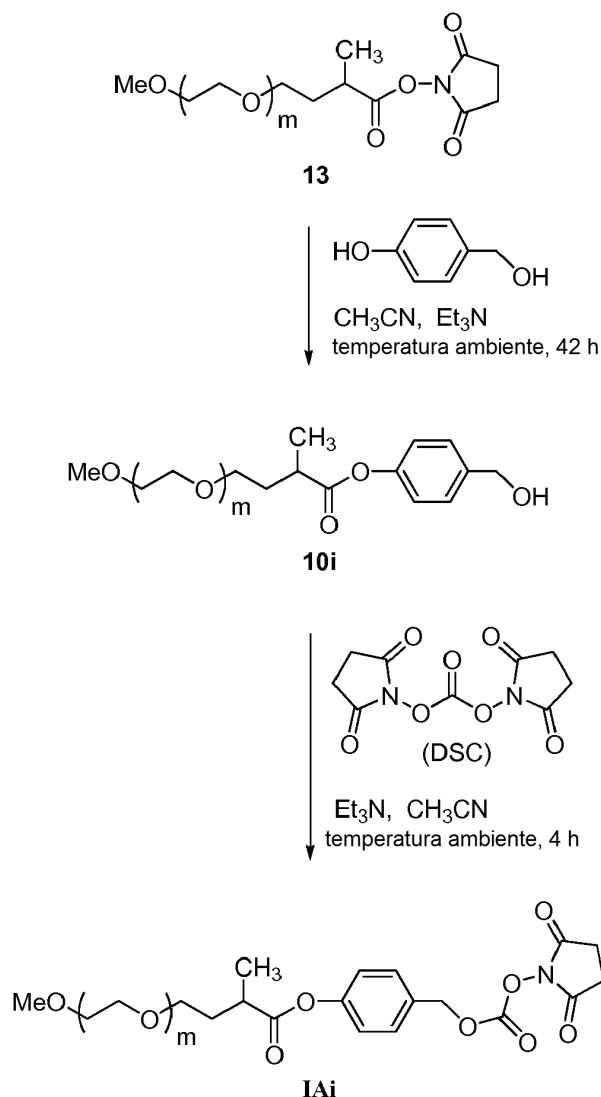
Esquema 3



En la primera etapa de la síntesis, metoxi PEG se activa con cloruro de metanosulfonilo para formar metanosulfonato de monometoxi poli(etilenglicol) (mPEG-OMs). En la segunda etapa de la síntesis, mPEG-OMs se trata con butilmalonato de dietilo y una base. Las bases adecuadas incluyen hidruros de metales alcalinos (tal como hidruro sódico, hidruro potásico, y similares), amidas voluminosas (tal como diisopropilamida de litio (LDA) y similares), trialkilaminas (tal como DIPEA, TEA, y similares), alcóxidos (tal como terc-butóxido potásico, y similares), y bases inorgánicas (tal como hidróxido de cesio, carbonato de cesio, y similares) para formar el compuesto **11**, que se hidroliza en presencia de una base, tal como hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico) en la etapa 3 para formar el compuesto **12**. El compuesto **12** se somete a descarboxilación en condiciones de reflujo en la etapa 4 para formar el compuesto **8 VII**, que se activa con un resto de 2-tioxotiazolidin-3-ilo en la etapa 5 para formar **9 VII**. El resto de tiazolidina en **9 VII** se desplaza con 4-hidroxibencil alcohol en la sexta etapa de la síntesis para formar el compuesto **10 VII**. En la etapa final de la síntesis, el compuesto **10 VII** se somete a una reacción de acoplamiento con un carbonilo diactivado, tal como carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (DSC) o los compuestos enumerados en la Tabla 3 (por ejemplo, b, c y d) en presencia de una base para proporcionar el derivado polimérico **IA VII**. Las bases adecuadas incluyen cualquier base que sea capaz de catalizar la reacción, tal como trialkilaminas y heterociclos de nitrógeno seleccionados (por ejemplo, trietilamina (TEA), dimetilaminopiridina (DMAP), piridina, *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA), y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) y similares), tal como una trialkil amina (tal como DIPEA, TEA, o similares).

En otra realización específica, se muestra un protocolo sintético para la preparación del derivado polimérico **IAi** de la Tabla 4 en el Esquema 4.

Esquema 4



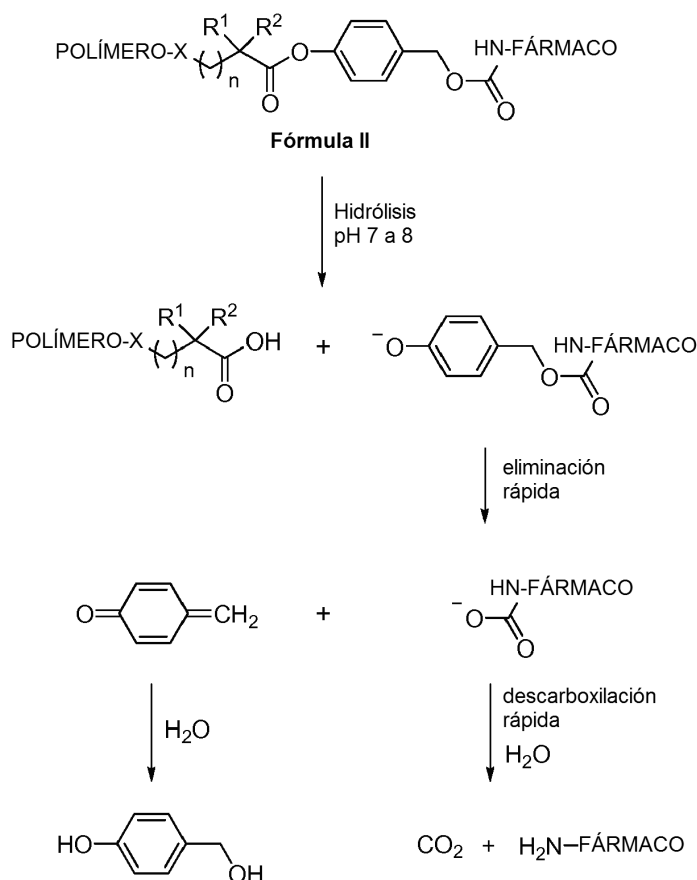
En el Esquema 4, m se define como el número de unidades monoméricas y tiene un intervalo de valores consistente con la distribución del peso molecular, tal como un número entero de 4 a 11.000, o de 20 a 500.

- 5 Un derivado polimérico (**IAi**), con m aproximadamente 40, se sintetiza de acuerdo con el Esquema 4 como se indica a continuación. El *N*-succinimidilo éster, **13**, se transesterifica con 4-hidroximetilfenil alcohol en condiciones básicas para producir el 4-hidroximetilfenil éster, **10i**. El compuesto **10i** se trata con carbonato de *N,N*-disuccinimidilo (DSC) en condiciones básicas de acuerdo con el procedimiento de Ghosh et al. (Tetrahedron Lett. 33, 2781-2784 (1992)).
- 10 Un tratamiento de bicarbonato acuoso, seguido de dos recristalizaciones de cloroformo/éter, produce **IAi** en forma de un sólido de color blanco. Los detalles de los procedimientos sintéticos y la caracterización de compuestos se describen adicionalmente en el Ejemplo 5.

En otro aspecto de la invención, se desvelan los procedimientos para la preparación de compuestos de Fórmula II. Los compuestos de Fórmula II pueden prepararse haciendo reaccionar los compuestos de Fórmula I con un fármaco.

- 15 Los fármacos conjugados con el derivado polimérico como se muestra en la Fórmula II tienen un aumento significativo de la semivida, una mejor solubilidad, y una reducción de la degradación por enzimas proteolíticas. La liberación posterior del derivado polimérico del conjugado farmacológico permite recuperar la actividad del fármaco, produciendo el fármaco en su forma nativa. Existe la teoría de que la liberación del derivado polimérico del conjugado farmacológico sigue un mecanismo de liberación de múltiples etapas como se muestra en el Esquema 5, en el que las variables R¹, R², POLÍMERO, X y FÁRMACO son como se definen en la Fórmula II.

Esquema 5



La primera etapa de hidrólisis del Esquema 5 es la etapa de determinación de la velocidad de la reacción. Por lo tanto, la velocidad de escisión del derivado polimérico del conjugado farmacológico puede adecuarse manipulando los efectos electrónicos y la impedancia estérica cerca del carbono electrófilo del éster.

- 5 La velocidad de escisión del derivado polimérico del conjugado farmacológico puede aumentarse disminuyendo la densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster a través de efectos inductores. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede disminuirse situando el átomo electronegativo X más cerca del carbono de carbonilo del éster. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más rápida cuando $n = 1$ que cuando $n = 2$. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede disminuirse, adicionalmente o como alternativa, aumentando la electronegatividad del átomo X. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más alta cuando X es oxígeno que cuando X es nitrógeno.
- 10

La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede disminuirse, adicionalmente o como alternativa, aumentando la electronegatividad de R^1 y/o R^2 . Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más rápida cuando R^1 es arilo que cuando R^1 es alquilo. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede disminuirse, adicionalmente o como alternativa, cuando R^1 y/o R^2 están sustituidos con uno o más restos aceptores de electrones. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más rápida cuando R^1 es $-\text{CH}_2\text{F}$ que cuando R^1 es $-\text{CH}_3$. Algunos ejemplos de sustituyentes en R^1 y/o R^2 que pueden aumentar la velocidad de hidrólisis incluyen flúor, cloro, bromo, hidroxilo, alcoxilo, amino, alqueno, alquino, nitro, ciano, carbonilo y arilo. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede disminuirse, adicionalmente o como alternativa, aumentando el número de sustituyentes aceptores de electrones en R^1 y/o R^2 . Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más rápida cuando R^1 es $-\text{CF}_3$ que cuando R^1 es $-\text{CHF}_2$. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede disminuirse, adicionalmente o como alternativa, moviendo un resto aceptor de electrones en R^1 y/o R^2 más cerca del carbono de carbonilo del éster. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más rápida cuando R^1 es 1-fluoroetilo que cuando R^1 es 2-fluoroetilo.

15

20

- 25 La velocidad de escisión del derivado polimérico del conjugado farmacológico puede disminuirse aumentando la densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster a través de efectos inductores. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede disminuirse posicionando el átomo electronegativo X más lejos del carbono de carbonilo del éster. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más lenta cuando $n = 2$ que cuando $n = 1$. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede aumentarse, adicionalmente o como alternativa, disminuyendo la electronegatividad del átomo X. Por ejemplo, se produce una
- 30

reacción de hidrólisis más lenta cuando X es nitrógeno que cuando X es oxígeno.

La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede aumentarse, adicionalmente o como alternativa, aumentando la capacidad de donación de electrones de R¹ y/o R². Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más lenta cuando R¹ es -CH₃ que cuando R¹ es -H. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede aumentarse, adicionalmente o como alternativa, cuando R¹ y/o R² están sustituidos con uno o más restos de donación de electrones. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más lenta cuando R¹ está sustituido con -CH₃ que con -CF₃, y cuando R¹ está sustituido con -CH₃ que con -H. Un grupo alquilo (por ejemplo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *s*-butilo, y *t*-butilo) es un ejemplo de un tipo de sustituyente en R¹ y/o R² que puede disminuir la velocidad de hidrólisis en comparación con el hidrógeno. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede aumentarse, adicionalmente o como alternativa, cuando el número de sustituyentes donadores de electrones en R¹ y/o R² se aumenta. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más lenta cuando R¹ está sustituido con dos grupos metilo que cuando R¹ está sustituido con un grupo metilo. La densidad de electrones en el carbono de carbonilo del éster puede aumentarse, adicionalmente o como alternativa, moviendo un resto aceptor de electrones en R¹ y/o R² más lejos del carbono de carbonilo del éster. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más lenta cuando R¹ es 2-fluoroetilo que cuando R¹ es 1-fluoroetilo.

La velocidad de escisión del derivado polimérico del conjugado farmacológico puede disminuirse aumentando la impedancia estérica en el carbono de carbonilo del éster a través del aumento de la voluminosidad de R¹ y/o R² en el carbono alfa con respecto al éster. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más lenta cuando R¹ es -CH₃ y R² es H, que cuando R¹=R²=H. También se produce una hidrólisis más lenta cuando R¹ es *n*-butilo y R² es H, que cuando R¹ es *n*-propilo y R² es H. La impedancia estérica en el carbono de carbonilo del éster puede aumentarse, adicionalmente o como alternativa, aumentando el número de sustituyentes en el carbono alfa con respecto al éster. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más lenta cuando el carbono alfa con respecto al éster está sustituido con dos grupos metilo (por ejemplo, R¹=R²=CH₃) que con un grupo metilo (R¹=CH₃, R² = H).

La velocidad de escisión del derivado polimérico del conjugado farmacológico puede aumentarse disminuyendo la impedancia estérica en el carbono de carbonilo del éster a través de la disminución de la voluminosidad de R¹ y/o R² en el carbono alfa con respecto al éster. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más rápida cuando R¹=R²=H, que cuando R¹ es -CH₃ y R² es H. También se produce una hidrólisis más rápida cuando R¹ es *n*-propilo y R² es H, que cuando R¹ es *n*-butilo y R² es H. La impedancia estérica en el carbono de carbonilo del éster puede disminuirse, adicionalmente o como alternativa, disminuyendo el número de sustituyentes en el carbono alfa al éster. Por ejemplo, se produce una reacción de hidrólisis más alta cuando el carbono alfa con respecto al éster está sustituido con un grupo metilo (R¹=CH₃, R² = H) que con dos grupos metilo (por ejemplo, R¹=R²=CH₃).

Además, o como alternativa, la liberación de los derivados poliméricos del conjugado farmacológico también puede adecuarse ajustando el pH de la solución de escisión. Por ejemplo, la velocidad de hidrólisis del derivado polimérico del conjugado farmacológico es más rápida a un pH de 8,5 que a un pH de 7,5.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un conjugado farmacológico de la presente invención, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente o vehículo. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas en las que el conjugado farmacológico puede administrarse en una cantidad eficaz para conseguir su fin previsto. La administración del conjugado farmacológico puede ser a través de cualquier vía, tal como oral, inyección, inhalación, y subcutánea. La formulación puede ser un líquido, suspensión, comprimido, cápsula, microcápsula, y similares.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas pueden determinarse por el experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1435-712 (18^a ed., Mack Publishing Co, Easton, Pennsylvania, 1990). Las formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de depuración *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, se puede calcular una dosis adecuada de acuerdo con el peso corporal, el área de superficie corporal o el tamaño de los órganos. El perfeccionamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosis de tratamiento apropiada se realiza rutinariamente por los expertos en la técnica sin demasiada experimentación, especialmente a la luz de los datos farmacocinéticos que pueden obtenerse a través de los ensayos clínicos en animales o humanos.

Los conjugados farmacológicos desvelados en el presente documento pueden encapsularse en forma de una micropartícula que comprende un núcleo y un revestimiento asociado al núcleo de la micropartícula, en el que el núcleo está compuesto por el conjugado farmacológico, y el revestimiento está compuesto por un tensioactivo, anticuerpo, y/o cualquier otro material de revestimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica. Las partículas pueden ser amorfas, semicristalinas, cristalinas, o una combinación de las mismas según se determina por procedimientos analíticos adecuados tales como calorimetría diferencial de barrido (CDB) o difracción de rayos X. Antes de la administración, las partículas pueden homogeneizarse a través de un proceso de homogeneización y/o un proceso de microprecipitación/homogeneización.

Las micropartículas revestidas pueden tener un tamaño de partícula eficaz medio de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 2 µm según se mide por procedimientos de dispersión de luz dinámica (por ejemplo,

espectroscopia de fotocorrelación, difracción láser, dispersión de luz láser de ángulo bajo (LALLS), dispersión de luz láser de ángulo medio (MALLS)), procedimientos de oscurecimiento de la luz (método Coulter, por ejemplo), reología, o microscopía (luz o electrón). El tamaño de partícula eficaz medio preferido depende de factores tales como la vía de administración prevista, la formulación, la solubilidad, la toxicidad y la biodisponibilidad del compuesto. Otros tamaños de partícula adecuados incluyen, pero sin limitación, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1 µm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm, y/o de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 250 nm.

Las micropartículas revestidas pueden ser partículas sólidas o semisólidas que comprenden el conjugado farmacológico desvelado en el presente documento. Las partículas revestidas generalmente consisten en al menos el 5 % (p/p) del conjugado farmacológico, por ejemplo, al menos el 10 % (p/p), al menos el 25 % (p/p), al menos el 50 % (p/p), y/o al menos el 75 % (p/p) o más del conjugado farmacológico.

Los procesos para preparar el núcleo del conjugado farmacológico de las micropartículas descritas en el presente documento pueden realizarse a través de numerosas técnicas. Una lista representativa, pero no exclusiva, de técnicas para preparar el núcleo del conjugado farmacológico de las micropartículas incluye técnicas de adición de energía (por ejemplo, cavitación, cizalladura, fuerzas de impacto), procedimientos de precipitación (por ejemplo, microprecipitación, precipitación por emulsión, precipitación por disolvente-antidisolvente, precipitación por inversión de fase, precipitación por desplazamiento de pH, precipitación por infusión, precipitación por cambio de temperatura, precipitación por evaporación de disolvente, precipitación por reacción, precipitación de fluido comprimido, pulverización en fluidos criogénicos, precipitación de nanoesferas/microesferas de proteínas), y procedimientos adicionales para preparar dispersiones de partículas de composiciones farmacéuticas, cada una de las cuales se describen en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos n.º 12/398.894 y 12/467.230, presentadas el 5 de marzo de 2009 y el 15 de mayo de 2009, respectivamente.

Los procesos para revestir las micropartículas de esta realización de la presente invención pueden realizarse a través de diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica. El revestimiento puede asociarse a la partícula a través de diversas asociaciones, incluyendo asociaciones covalentes y/o no covalentes (por ejemplo, unión covalente, interacciones iónicas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, unión de hidrógeno, fuerzas de van der Waal, interacciones del dominio hidrófobo/hidrófobo, reticulación, y/o cualquier otra interacciones).

El revestimiento puede incluir un único tensioactivo, o una combinación de tensioactivos. El tensioactivo puede seleccionarse de una diversidad de tensioactivos aniónicos conocidos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos zwitteriónicos, tensioactivos no iónicos y modificadores biológicos de superficie activa. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, poloxámeros, fosfolípidos, fosfolípidos conjugados con polietilenglicol, y polisorbatos. Como alternativa, el revestimiento puede estar sustancialmente libre de tensioactivo (por ejemplo, menos del 2 por ciento en peso de tensioactivo, menos del 1 por ciento en peso de tensioactivo, o menos del 0,5 por ciento en peso de tensioactivo).

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" y "farmacológicamente aceptable" se refieren a compuestos y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas, u otras reacciones desfavorables al administrarse a un animal o un ser humano. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. El uso de tales excipientes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las composiciones terapéuticas, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los principios activos complementarios pueden incorporarse en las composiciones.

Como se usa en el presente documento, las "sales farmacéuticamente aceptables" incluyen, por ejemplo sales de adición de bases y sales de adición de ácidos.

Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden formarse con metales o aminas, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos también pueden prepararse con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente aceptables adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio y de amonio cuaternario. También son posibles carbonatos o carbonatos ácidos.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de sales de ácidos adecuados incluyen los clorhidratos, acetatos, citratos, salicilatos, nitratos, fosfatos.

La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

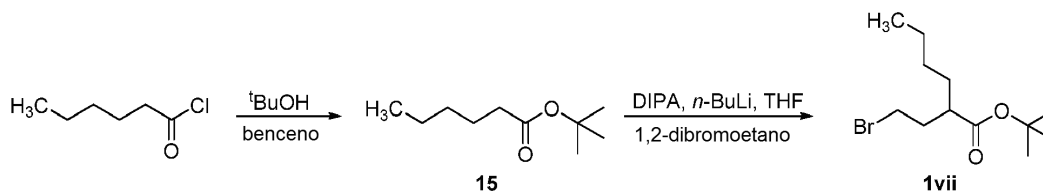
Ejemplos

Procedimientos experimentales generales

La cromatografía de capa fina (TLC) se realizó en placas de gel de sílice 60 F₂₅₄, 2,5 x 7,5 cm x 250 µm (capa) (EMD

se aplicó a una columna de gel de sílice y se eluyó con diclorometano (0 al 25 %) en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron, proporcionando 1ii en forma de un aceite transparente (29,5 g, rendimiento total del 45 % para las dos etapas). En el proceso, también se recuperaron 17 g del material de partida, α,α -dimetilbutiro- γ -lactona. Los datos espectrales para 1ii se enumeran a continuación. El espectro de masa se obtuvo a partir de una solución metanólica fresca. RMN ^1H (CDCl_3 , δ): 1,12 (s), 1,41 (s), 2,06 (m) y 3,30 (m) ppm; RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ): 25,4, 28,3, 28,8, 43,8, 44,2, 80,8 y 176,2 ppm; EM (TOF) IEN+: $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 273,04, 275,03 Da.

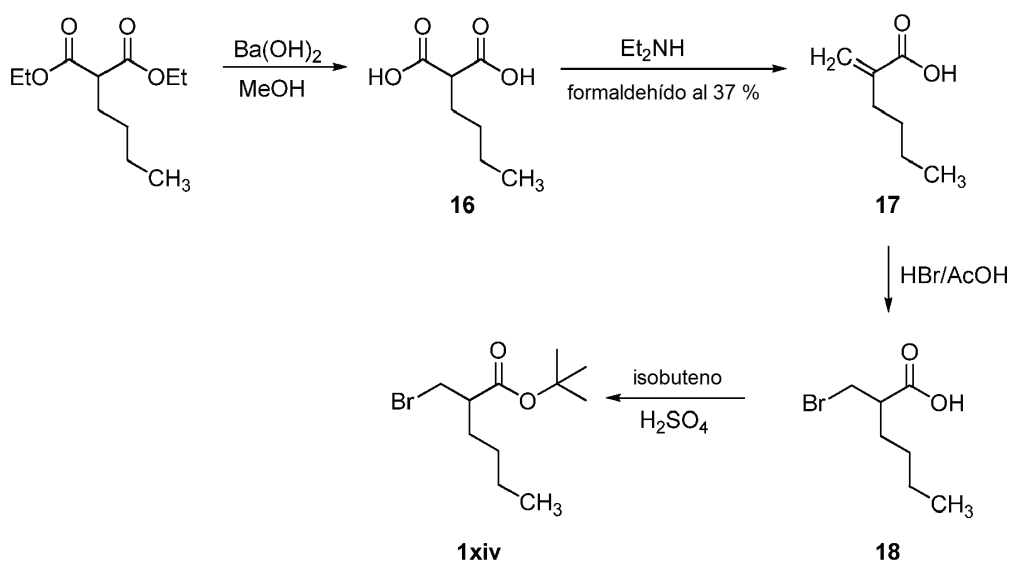
Síntesis de 2-(2-bromoetil)hexanoato de *tert*-butilo (1vii)



Se añadió rápidamente cloruro de hexanoilo (160 ml, 1,16 mol) a *t*-butanol (626 g, 8,44 mol) a temperatura ambiente, en una atmósfera de argón, mientras se agitaba. La temperatura de reacción se redujo inicialmente, pero después comenzó a elevarse según continuó la adición de cloruro de hexanoilo. Después, el recipiente de reacción se puso en un baño de agua a temperatura ambiente para mantener la temperatura de aproximadamente 25 a 35 °C. Después de la finalización de la adición, el baño de agua se retiró, y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se vertió en una mezcla de hexano y hielo-agua. La fase orgánica se separó, se lavó con una solución que comprendía Na_2CO_3 acuoso al 10 % y NaOH al 10 % (1:1), se lavó dos veces con salmuera, y se secó sobre sulfato sódico. La fase orgánica seca se concentró a sequedad, proporcionando **15** en forma de un aceite transparente (173 g, rendimiento del 86,5 %) que se usó sin purificación adicional.

Se añadió gota a gota *n*-butil litio (2,5 M en hexanos, 106 ml, 265 mmol) a una solución de diisopropilamina (37 ml, 264 mmol) en THF (0,8 l) durante un periodo de 30 minutos, a -78 °C, y en una atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 20 minutos más a -78 °C, y se añadió el compuesto **15** (39 g, 226 mmol). La mezcla se dejó calentar a -20 °C durante 30 minutos antes de añadir en una porción a la mezcla 1,2-dibromoetano (47 ml, 545 mmol). Después de la adición del 1,2-dibromoetano, la mezcla de reacción se dejó calentar a 0 °C durante 1,5 horas, y después se vertió en una mezcla de *tert*-butil metil éter (2 l) y NH_4SO_4 acuoso enfriado con hielo (1 M, 400 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con una solución de NaHSO_4 acuoso (1 M, 100 ml) y agua (300 ml), y después se lavó múltiples veces con NaHCO_3 acuoso saturado hasta que el pH de la fase acuosa fue de 8 a 9. Después, la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad, dando **1vii** en bruto. El producto en bruto se destiló a alto vacío (1 mm de Hg) y se recogió una fracción de aproximadamente 88 °C a 105 °C. El producto (13,5 g) se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice) usando 1:1 de diclorometano/hexano como eluyente. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron, proporcionando el compuesto puro **1vii** en forma de un aceite transparente (8,2 g, rendimiento del 13 %). RMN ^1H (CDCl_3 , δ): 0,88 (t), 1,29 (m), 1,45 (m), 1,45 (s), 1,59 (m), 1,91 (m), 2,15 (m), 2,45 (m), 3,35 (m) y 3,40 (m) ppm; RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ): 13,9, 22,5, 28,1, 29,2, 31,1, 31,8, 35,2, 44,9, 80,5 y 174,5 ppm; EM (TOF) IEN+: $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 301,12, 303,12 Da.

Síntesis de 2-(bromometil)hexanoato de *tert*-butilo (1xiv)



Se añadió hidróxido de bario (32,8 g, 191 mmol) en metanol (150 ml) a una solución de butilmalonato de dietilo en metanol (150 ml) mientras se agitaba. Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se convirtió en una suspensión espesa y la agitación se detuvo. La mezcla de reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas, y después se concentró, dando un pequeño volumen a presión reducida. El residuo resultante se suspendió en *tert*-butil metil éter, y el sólido se recogió por filtración. El sólido recogido se suspendió en una mezcla de *tert*-butil metil éter (400 ml) y HCl 1 M (400 ml) y se agitó durante 3 horas. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con *tert*-butil metil éter. Las fases de *tert*-butil metil éter se agruparon, y la fase combinada se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad, proporcionando **16** en forma de un sólido de color blanco (18 g, rendimiento del 78 %) que se usó sin purificación adicional.

Una mezcla de **16** (155 g, 0,969 mol), formaldehído al 37 % (300 ml, 4,03 mol) y dietilamina (190 ml, 1,83 mol) se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos, se calentó a reflujo durante 2 horas, y después se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró, dando un pequeño volumen a presión reducida. El residuo se repartió entre *tert*-butil metil éter y HCl 1 M. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad, proporcionando **17** en forma de un aceite transparente (103,4 g, rendimiento del 83 %).

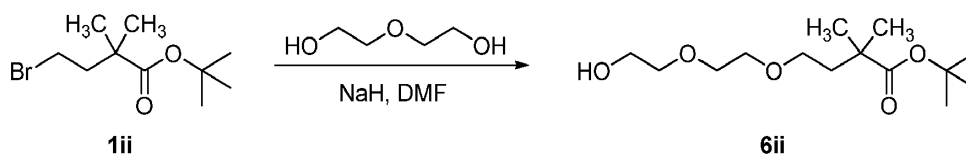
Una mezcla de **17** (103,4 g, 0,815 mol) y HBr (31 % en ácido acético, 0,4 l, 2,14 mol) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de *tert*-butil metil éter y hielo-agua. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl 1 M, se lavó con salmuera y después se secó sobre sulfato sódico. La fase orgánica seca se concentró a sequedad, proporcionando el compuesto **18** en forma de un aceite de color amarillo (157 g, rendimiento del 92 %).

Una mezcla de **18** (27 g, 0,129 mol) y ácido sulfúrico al 95 % (3,2 g, 0,031 mol) se agitó en un recipiente de liofilización que se había colocado en un recipiente a presión de acero inoxidable. El recipiente de liofilización sirvió como un revestimiento de vidrio. El conjunto se mantuvo a aproximadamente -50 °C. Se añadió isobuteno (45 g, 0,804 mol), y el recipiente a presión se cerró herméticamente y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente. La agitación continuó a temperatura ambiente durante 2 días. Después de ese momento, la presión se liberó cuidadosamente, y la mezcla de reacción se diluyó con *tert*-butil metil éter. La fase orgánica se separó y se lavó múltiples veces con bicarbonato sódico acuoso enfriado con hielo hasta que el pH de la fase acuosa fue de 8 a 9. Después, la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad. El residuo resultante se aplicó a una columna de gel de sílice y se eluyó con diclorometano (0 al 25 %) en hexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron, proporcionando el compuesto puro **1xiv** en forma de un aceite transparente (18 g, rendimiento del 52 %). RMN ¹H (CDCl₃, δ): 0,94 (t), 1,35 (m), 1,52 (s), 1,60 (m), 1,68 (m), 2,70 (m), 3,45 (m) y 3,56 (m) ppm; RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 13,9, 22,5, 28,1, 29,0, 31,0, 33,1, 48,9, 81,1 y 172,4 ppm; EM (TOF) IEN+: [M+Na]⁺, 287,08, 289,09 Da.

Ejemplo 2

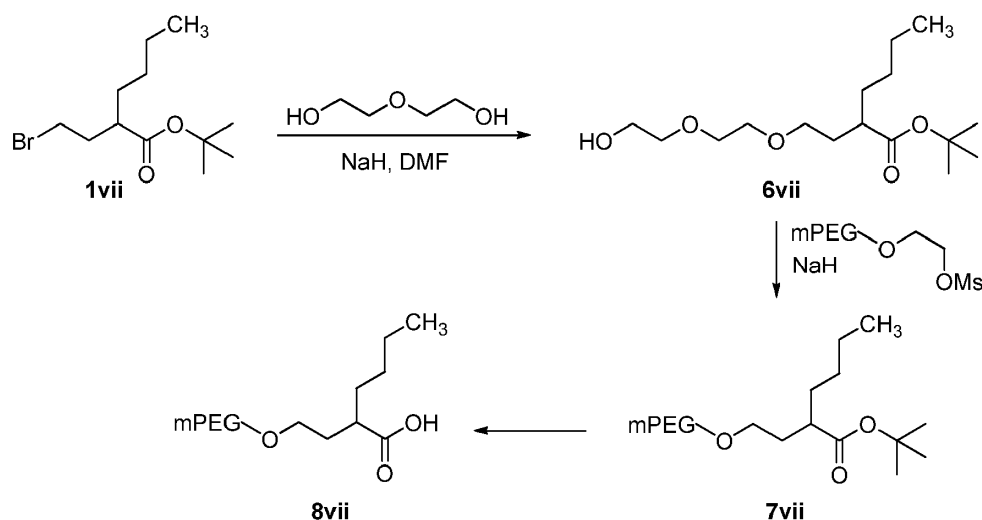
Síntesis de los intermedios del Esquema 2

Síntesis de 4-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)-2,2-dimetilbutanoato de *tert*-butilo (**6ii**)



El siguiente procedimiento se realizó en una atmósfera de argón. Una mezcla de dietilenglicol (18 ml, 0,19 mol) y tolueno (50 ml) se secó por destilación azeotrópica usando un condensador Dean-Stark. El residuo se enfrió a temperatura ambiente y se añadió DMF anhidra (40 ml). Después, la solución se enfrió a 0 °C usando un baño de hielo y se añadió NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 823 mg, 21 mmol). Después de 5 minutos, el baño de hielo se retiró y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 1 hora y 50 minutos, a la mezcla se le añadió 4-bromo-2,2-dimetilbutirato de *t*-butilo (3,046 g, 12,1 mmol), **1ii**, con DMF (2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se añadió a agua y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:4 a 4:1 de acetato de etilo/hexanos) proporcionó **6ii** en forma de un aceite transparente (240 mg, rendimiento del 7,2 %) que era puro por TLC. Se obtuvieron 142 mg más (aceite transparente) de material, pero incluía una impureza que se visualizó como un punto de mayor F_r por TLC. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 1,13 (s), 1,41 (s), 1,81 (t), 2,62 (s a), 3,47 (t), 3,55 (m), 3,58 (m), 3,62 (m) y 3,70 (m) ppm; RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 25,6, 28,1, 39,8, 41,4, 61,9, 68,4, 70,3, 70,5, 72,6, 80,1 y 177,0 ppm; ESI(+) EM: [M+Na]⁺ = 299,16; [M+K]⁺ = 315,17 daltons.

Síntesis de ácido 2-(2-metoxipolietoxi)etil)hexanoico (**8vii**)



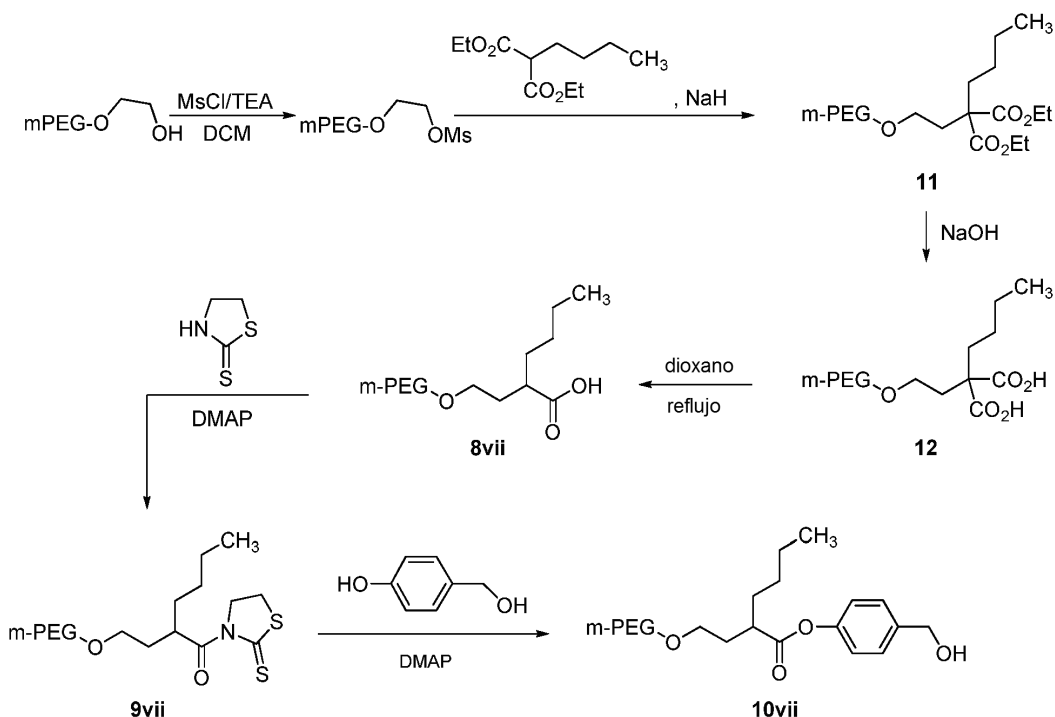
Una mezcla de dietilenglicol (33 g, 0,32 mol) y tolueno (120 ml) se secó por destilación azeotrópica usando un condensador Dean-Stark y el residuo resultante se enfrió a temperatura ambiente. Al residuo se le añadió dimetilformamida anhidra (DMF, 50 ml) y la mezcla se enfrió a 0 °C. Después, se añadió hidruro sódico (NaH, 1080 mg, 60 % en aceite mineral, 27 mmol), y la mezcla se agitó durante 1 hora. Se añadió el compuesto 1vii (5,0 g, 18 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a sequedad. El residuo resultante se aplicó a una columna de cromatografía ultrarrápida (gel de sílice) y se eluyó con metanol (5 % al 10 %) en diclorometano. Las fracciones apropiadas se agruparon y se concentraron, produciendo el compuesto **6vii** en forma de un aceite transparente (3,0 g, rendimiento del 55 %). RMN ¹H (CDCl₃, δ): 0,82 (m), 1,22 (m), 1,38 (s), 1,38 (m, sin resolver), 1,52 (m), 1,63 (m), 1,81 (m), 2,29 (m), 3,41(m), 3,53 (m), 3,59 (m) y 3,66 (m) ppm; RMN ¹³C (CDCl₃): 14,0, 22,6, 28,2, 29,4, 32,3, 32,4, 43,4, 61,8, 69,4, 70,3, 70,4, 72,6, 80,1 y 175,4 ppm; EM (TOF) IEN+: [M+Na]⁺, 327,19 Da.

Una solución de mPEG-OMs (aproximadamente 5000 Da, 4,1 g, 0,82 mmol) en tolueno (110 ml) se secó por destilación azeotrópica usando un purgador Dean-Stark, y se retiró una porción de 70 ml del tolueno. En otro matraz, el Compuesto 6vii (2,5 g, 8,23 mmol) se disolvió en tolueno (100 ml), la mezcla se secó por destilación azeotrópica, y se retiró una porción de 60 ml de tolueno. El residuo resultante se enfrió a 0 °C y se añadió NaH (500 mg, 12,4 mmol) para formar una mezcla. Esta mezcla se agitó a 0 °C durante 0,5 horas. A la mezcla se le añadió la solución seca de mPEG-OMs a temperatura ambiente, y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche. Después, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró, dando un residuo, y se disolvió de nuevo en una cantidad mínima de diclorometano (DCM). A la solución se le añadió TBME y el precipitado resultante se recogió por filtración. El precipitado se disolvió en diclorometano (200 ml), se lavó con agua y después con salmuera. La solución se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Al residuo se le añadió TBME, proporcionando el producto **7vii** en forma de un sólido de color amarillo claro (3,6 g, rendimiento de aproximadamente el 82 %, véase, por ejemplo, la Publicación Internacional n.º WO 2006/099794). El análisis por TLC (10/90/1 de MeOH/CHCl₃/NH₄OH) indicó la presencia del **7vii**, junto con una pequeña cantidad de impurezas. El compuesto 7vii se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

El compuesto **7vii** (3,6 g) se disolvió en DCM/ácido trifluoroacético (20 ml, 1:1), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo resultante se disolvió de nuevo en DCM, se lavó con agua y después se lavó con salmuera. La solución se secó sobre sulfato sódico, se concentró hasta un pequeño volumen y se diluyó con TBME. El precipitado se recogió por filtración y se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice), eluyendo con metanol (7 % al 10 %) en DCM que contenía NH₄OH del 1 al 2 %. Las fracciones apropiadas se agruparon y se concentraron, proporcionando **8vii** puro (1,6 g, rendimiento del 31 % para las últimas dos etapas).

35 Ejemplo 3

Síntesis de 2-(2-metoxipolietoxi)etil)hexanoato de 4-(hidroximetil)fenilo (10vii)



Etapa 1: Preparación de metanosulfonato de mPEG (5000) (mPEG-OMs)

Se preparó metanosulfonato de monometoxi poli(etilenglicol) (aproximadamente 5000 Da) como se describe en la Publicación Internacional n.º WO 2004/063250. Específicamente, se hizo reaccionar mPEG-OH (aproximadamente 5000 daltons, 30 gramos) con cloruro de metanosulfonilo (MsCl, 4,3 equivalentes) y trietilamina (TEA, 4,8 equivalentes) en diclorometano/tolueno, produciendo 30 gramos de mPEG-OMs.

Etapa 2: Preparación de mPEG(5000)-CH₂CH₂C(n-C₄H₉)(CO₂Et)₂ (11)

El compuesto, mPEG-OMs, se trató con butilmalonato de dietilo (40 equivalentes) y NaH (40 equivalentes) en tolueno/1,4-dioxano (1:1, 800 ml) de acuerdo con el procedimiento descrito en la Publicación Internacional n.º WO 2004/063250, modificado por un mayor exceso de malonato y NaH para obligar a la reacción a completarse. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante una noche y después se concentró hasta un pequeño volumen. A la mezcla de reacción se le añadieron diclorometano y hielo-agua para dar como resultado un sistema bifásico. La fase acuosa se ajustó a pH 1,0 con HCl concentrado, las fases se agitaron, y la fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró hasta un pequeño volumen. A la fase orgánica se le añadió *t*-butil metil éter y el precipitado resultante se recogió por filtración, proporcionando mPEG(5000)-CH₂CH₂C(n-C₄H₉)(CO₂Et)₂ (11, 40 g).

Etapa 3: Preparación de mPEG(5000)-CH₂CH₂C(n-C₄H₉)(CO₂H)₂ (12)

El compuesto 11 se combinó con una solución acuosa de NaOH (8,1 g) y NaCl (1,3 g) en agua (100 ml), y se calentó a 80 °C durante una noche. Después, la solución se enfrió a temperatura ambiente, se añadió diclorometano para formar un sistema bifásico, y la fase acuosa se ajustó a pH de 1,8 a 2,0 con HCl concentrado. Las fases del sistema bifásico se agitaron, y la fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo de nuevo con diclorometano, y las fases orgánicas se agruparon, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron hasta un pequeño volumen. Al pequeño volumen de la fase orgánica se le añadió *t*-butil metil éter, y el precipitado resultante se recogió por filtración, proporcionando 12 (29 g) en forma de un sólido de color blanco.

Etapa 4: Preparación de mPEG(5000)-CH₂CH₂C(n-C₄H₉)(C(=O)tz) (8vii)

El compuesto 12 (29 g) en dioxano (150 ml) se trató como se describe en la Publicación Internacional n.º WO 2004/063250. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante una noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a sequedad. El residuo resultante se disolvió en una pequeña cantidad de diclorometano, se añadió *t*-butil metil éter, y el precipitado resultante se recogió por filtración, proporcionando 8vii (27,4 g) en forma de un sólido de color blanco. El análisis por TLC se realizó en una placa de gel de sílice activado usando CHCl₃:MeOH:NH₄OH (90:10:1) como el disolvente de desarrollo. El compuesto 8vii apareció como un compuesto básicamente puro (F_r aproximadamente 0,45) con una contaminación muy ligera de un componente de mayor F_r (aproximadamente 0,50) que se co-eluyó con mPEG-OH.

Etapa 5: Preparación de mPEG(5000)-CH₂CH₂C(n-C₄H₉)(C(=O)tz) (9vii) (tz= tiazolidin-2-tion-3-ilo)

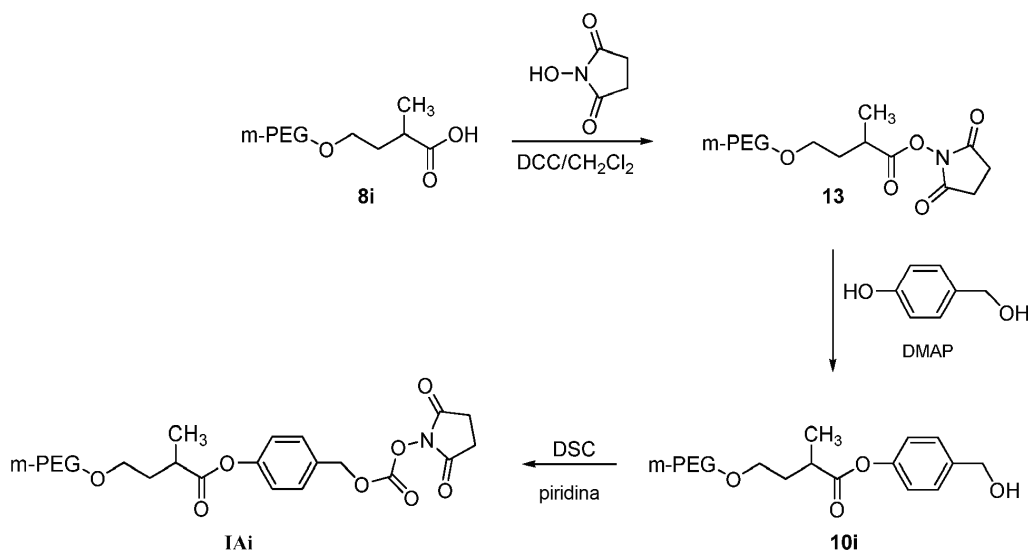
El compuesto **8vii** (2,0 g, 0,4 mmol), dimetilaminopiridina (DMAP, 98 mg, 0,8 mmol) y 2-mercaptotiazolina (95 mg, 0,8 mmol) se disolvieron en diclorometano anhidro (5 ml), y la solución se enfrió a 0 °C. Después de agitar durante 15 minutos, se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC-HCl, 153 mg, 0,8 mmol). La agitación continuó a 0 °C a temperatura ambiente durante una noche. El análisis por TLC (90:10:1 de CHCl₃:MeOH:NH₄OH) mostró el consumo completo de mPEG(5000)-CH₂CH₂C(n-C₄H₉)(CO₂H) de la Etapa 4. Al producto en bruto se le añadió *t*-butil metil éter, y el precipitado resultante se recogió por filtración y se secó, proporcionando **9vii** en forma de un sólido de color amarillo (2 g).

Etapa 6: Preparación de 2-(2-(2-metoxipolietoxi)etil)-hexanoato de 4-(hidroximetil)fenilo. (10vii).

El compuesto **9vii** (1,0 g, 0,2 mmol), 4-hidroxibencil alcohol (98 mg, 0,8 mmol) y DMAP (98 mg, 0,8 mmol) se disolvieron en diclorometano anhidro (10 ml) y se calentaron a reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, a ésta se le añadió *t*-butil metil éter, y el precipitado resultante se recogió por filtración. El precipitado se disolvió en diclorometano, la solución se lavó con HCl 0,5 N, y después con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad, produciendo un sólido de color blanco. El sólido se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice), eluyendo con CHCl₃:MeOH:NH₄OH (95:5:0,5 a 90:10:1). Las fracciones apropiadas se agruparon y se concentraron, proporcionando **10vii** (600 mg) en forma de un sólido de color blanco. Fue evidente DMAP en trazas en el espectro de RMN ¹H. RMN ¹H (DMSO-d₆, δ): 0,91 (m), 1,35 (m), 1,60 (m), 1,68 (m), 1,78 (m), 1,94 (m), 2,67 (m), 3,32 (s), 3,41 (m), 3,52 (m), 4,51 (d), 5,21 (t), 7,04 (d) y 7,36 (d) ppm; RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ): 13,8, 22,0, 28,9, 31,5, 31,8, 42,1, 58,0, 62,3, 68,3, 69,6-70,0 (múltiples señales sin resolver), 71,2, 121,2, 127,4, 140,0, 149,1 y 174,1 ppm.

20 Ejemplo 4

Síntesis de 4-(2-metoxipolietoxi)-2-metilbutanoato de 4-((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)-metil)fenilo (IAi)



Etapa 1: Síntesis de 4-(2-metoxipolietoxi)-2-metilbutanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (13)

Los compuestos **8i** y **13** se prepararon mediante modificaciones de los procedimientos indicados en la Patente de Estados Unidos n.º 6.992.168. Específicamente, el compuesto **8i** se obtuvo únicamente por cristalización en la patente, pero se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice) usando CHCl₃:MeOH:NH₄OH (95:5:0,5 y 90:10:1) como eluyente en la presente invención. Las fracciones apropiadas se agruparon y se concentraron, proporcionando **8i** puro.

El compuesto **8i** (6,0 g, 1,2 mmol) se disolvió en 60 ml de cloruro de metileno. A la solución se le añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 180 mg, 1,6 mmol) y *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 330 mg, 1,60 mmol) en 1,6 ml de cloruro de metileno. Después de agitar la mezcla durante una noche, se filtró y el producto se cristalizó mediante la adición de éter etílico (280 ml). La mezcla se enfrió de 0 a 5 °C durante 2 horas, el precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío a 40 °C durante 3 horas, proporcionando el compuesto **13** (5,58 g, rendimiento del 93 %) en forma de un polvo de color blanco. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 1,31(d), 1,79 (m), 2,05 (m), 2,80 (s), 2,97 (m), 3,40 (s) y 3,51 (m a) ppm; RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 17,34, 25,95, 33,80, 34,40, 59,35, 68,40-72,31(PEG), 169,42 y 172,05 ppm.

Etapa 2: Síntesis de 4-(2-metoxipolietoxi)-2-metilbutanoato de 4-(hidroximetil)fenilo (10i)

La conversión de **13** en **10i** se realizó por la modificación de un procedimiento indicado en Greenwald, et. al., J. Med. Chem., 1999, 42(18), 3657-3667. A una solución de **13** (5,5 g, 1,1 mmol) en 55 ml de cloruro de metileno, se le

añadieron dimetilaminopiridina (DMAP, 550 mg, 4,4 mmol) y 4-hidroxibencil alcohol (550 mg, 4,4 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se agitó durante 40 horas más y se filtró. El filtrado se evaporó a sequedad y el residuo resultante se disolvió en 2-propanol caliente (100 ml). La solución se enfrió de 0 a 5 °C durante 3 horas y se formó un precipitado. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con 2-propanol (30 ml) y éter etílico (50 ml), y se secó al vacío a 45 °C durante 2,5 horas, proporcionando **10i** (4,93 g, 90 %) en forma de un sólido de color blanco. Los espectros de masas por Maldi TOF se obtuvieron tanto para **13** como para **10i**. Las diferencias másicas teóricas y observadas se compararon para el mismo homólogo como se ha descrito previamente. Por lo tanto, para el homólogo 105, las masas observadas para **13** y **10i** fueron 4890,0 y 4899,2 daltons, respectivamente. La diferencia observada es de 9,2 daltons. La diferencia teórica para las unidades de no repetición es un aumento de 9,03 daltons. Por lo tanto, los datos espectrales de masa apoyan la afirmación de que se ha producido la reacción esperada. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 1,35(d), 1,84 (m), 2,15 (m), 2,89 (m), 3,35 (s), 3,51 (m a), 4,71(s), 7,10 (d) y 7,42 (d) ppm; RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 17,12, 33,44, 36,79, 59,06, 68,84-72,00 (PEG), 121,60, 127,98, 138,64, 150,21 y 175,00 ppm.

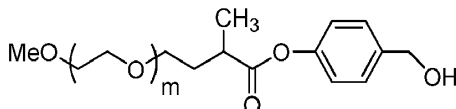
Etapa 3: Síntesis de 4-(2-metoxipolietoxi)-2-metilbutanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)-metil)fenilo (IAi, PM aproximadamente 5000 daltons)

El compuesto **10i** se convirtió en **IAi** por una modificación del procedimiento de Greenwald et al. A una solución de **10i** (1,25 g, 0,25 mmol) en 20 ml de cloruro de metileno se le añadieron carbonato de disuccinimidilo (DSC, 128 mg, 0,5 mmol) y piridina (79 mg, 1,0 mmol). La mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente para formar una solución transparente. La solución se evaporó a sequedad, y el residuo se disolvió en cloruro de metileno (60 ml). La solución de cloruro de metileno se lavó secuencialmente con HCl acuoso (0,1 N, 20 ml), NaHCO₃ saturado (25 ml), y NaCl saturado (25 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (10 ml), y se añadió éter etílico (40 ml). La mezcla se enfrió de 0 a 5 °C durante 2 horas. El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con éter etílico (40 ml) y se secó al vacío a 40 °C durante 2 horas, proporcionando **IAi** (890 mg, 71 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 1,36(d), 1,84 (m), 2,15(m), 2,87 (s), 2,89(m, sin resolver), 3,47 (s), 3,51 (m a), 5,33(s), 7,14(d) y 7,44 (d) ppm; RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 17,01, 25,49, 33,39, 36,79, 59,06, 68,80-72,15 (PEG), 122,06, 129,91, 130,68, 138,64, 151,59, 168,55 y 174,74 ppm.

Ejemplo 5

Síntesis de 4-(2-metoxipolietoxi)-2-metilbutanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)-metil)fenilo (IAi, Esquema 4, PM aproximadamente 2000 daltons)

Etapa 1: Síntesis de 4-(2-metoxipolietoxi)-2-metilbutanoato de 4-(hidroximetil)fenilo (10i)



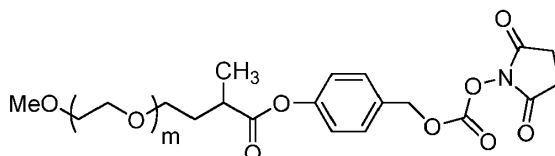
A 4-hidroxibencil alcohol (1,1235 g, 9,05 mmol, 12 equiv.) en un matraz con forma de pera de 200 ml se le añadieron 30 ml de acetonitrilo. El recipiente se tapó y la mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente hasta que la mayor parte del alcohol se disolvió. Al recipiente se le añadió trietilamina (1,270 ml, 9,07 mmol, 12 equiv.) y se formó un precipitado de color blanco. La mezcla se agitó durante 30 min más, y se añadió **13** del esquema 4 (1,5066 g, 0,7533 mmol, 1 equivalente). El compuesto **13** es un derivado de mPEG (PM aproximadamente 2000 Da), en el que m es aproximadamente 40. La agitación continuó a temperatura ambiente, y la reacción se controló por TLC. Después de 42 horas, la mezcla apareció como una suspensión turbia de color gris/blanco. Casi la totalidad del material de partida se había consumido. La mezcla se concentró a alto vacío, dando un aceite de color castaño y se añadió cloruro de metileno (30 ml). La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 45 minutos, formando una suspensión de color castaño claro. La suspensión se dejó en reposo durante 2 horas, después de lo cual se transfirió a tubos de centrifuga de TEFLON® con tapón de rosca. El recipiente de reacción se aclaró con dos porciones de 6 ml de cloruro de metileno, y un único aclarado se transfirió a cada uno de los dos tubos de centrifuga. Finalmente, el recipiente de reacción se aclaró con dos porciones de 10 ml de agua enfriada con hielo para disolver cualquier material sólido restante, y un único aclarado se transfirió a cada uno de los dos tubos de centrifuga. Los tubos se agitaron de forma intermitente, con ventilación, durante 30 s, y después se centrifugaron. La fase acuosa (superior) se retiró de cada tubo. Esta extracción acuosa eliminó el 4-hidroxibencil alcohol sin reaccionar y las sales de trietilamonio. La extracción con agua enfriada con hielo se repitió de la misma manera cinco veces más con cada uno de los dos tubos.

Las fases orgánicas se combinaron y se observó que estaban turbias. Esta solución turbia se llevó a 110 ml con cloruro de metileno y se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado (fino). El filtrado, aún algo turbio, se concentró por evaporación rotatoria a alto vacío usando un baño de agua a 24 °C, produciendo un semisólido de color blanco. Se añadió éter etílico (50 ml), y la mezcla se agitó vigorosamente durante 2 horas, convirtiendo así el producto en una suspensión de un sólido granular de color blanco. La suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado de porosidad media, y el precipitado se secó a alto vacío a 24 °C durante 12 h, produciendo **10i** en

forma de un sólido de color blanco, 1,15 g (rendimiento de aproximadamente el 80 %). RMN ¹H (CDCl₃, δ): 1,31 (d), 1,80 (m), 2,12 (m), 2,84 (m), 3,37 (s), 3,54 (m), 3,63, 4,67 (s), 7,05 (d) y 7,37 (d) ppm.

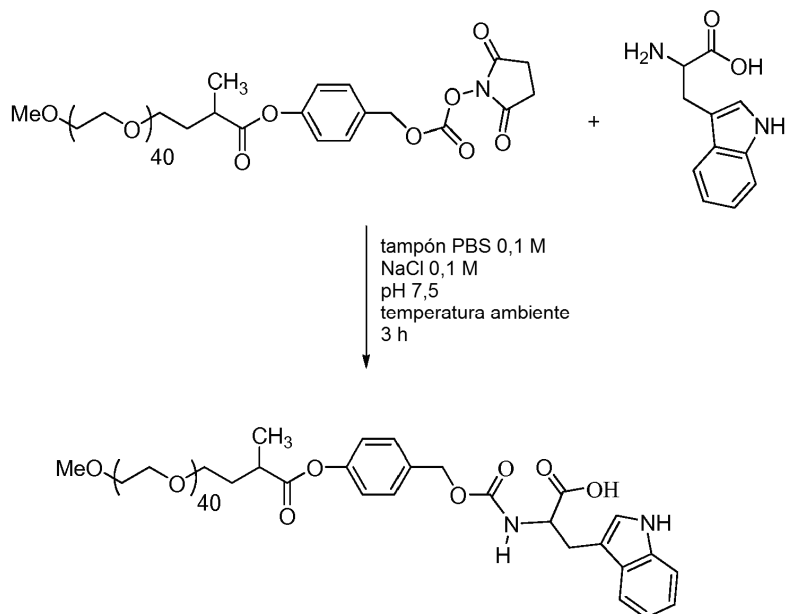
La espectrometría de masas se usó para verificar que la diferencia de peso molecular entre los compuestos **13** y **10i** era como se esperaba. Estos espectros consistían en una envolvente ya resuelta de picos debido a los homólogos del polímero. Cada homólogo estaba a 44 daltons de diferencia, como se esperaba. Para un homólogo determinado, la masa total de las unidades de óxido de etileno de repetición (-CH₂CH₂O-) es la misma en ambas moléculas. Por lo tanto, la diferencia de masa se deberá a la diferencia en las unidades de grupo terminal de no repetición. Las masas exactas de las unidades de grupo terminal de no repetición para **13** y **10i** son 229,10 daltons y 238,12 daltons, respectivamente, y la diferencia en el peso molecular entre el material de partida y el producto es un aumento de 9,02 daltons. El homólogo debido a 42 unidades de repetición se identificó tanto para **13** como para **10i**. Las masas observadas fueron 2101,50 daltons y 2110,12 daltons para **13** y **10i**, respectivamente, y la diferencia fue un aumento de 8,62 daltons. Este valor se comparó favorablemente con la diferencia esperada de 9,02 daltons y, por lo tanto, los datos espectrales de masa apoyan la afirmación de que se ha producido la reacción esperada. El número de unidades de repetición en un homólogo particular se determinó restando la masa total de las unidades de no repetición, incluyendo sodio, de la masa observada y dividiendo el resto por la masa de óxido de etileno, 44,03 daltons. Se obtuvieron valores enteros. Los números enteros fueron el número de unidades de repetición en el homólogo.

Etapa 2: Síntesis de 4-(2-metoxipolietoxi)-2-metilbutanoato de 4-(((2,5-dioxipirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)-metil)fenilo (IAi)



El compuesto **IAi** se preparó adaptando el procedimiento de Ghosh et al. (Tetrahedron Lett. 33, 2781-2784 (1992)). El compuesto **10i** (1,0012 g, 0,500 mmol, 1 equiv.) se añadió a 15 ml de acetonitrilo y se agitó en una atmósfera de argón. A la solución se le añadió carbonato de *N,N*-disuccinimidilo (DSC) (0,2582 g, 1,01 mmol, 2 equiv.) seguido de 5 ml más de acetonitrilo. A la solución en agitación rápida se le añadió trietilamina (282 µl, 2,02 mmol, 4 equiv.) y la agitación continuó durante 4 horas. En ese momento, la mezcla parecía turbia y de color gris/blanco, y la evaluación por TLC indicó que **10i** se había convertido completamente en **IAi**. La solución algo turbia se concentró a sequedad por evaporación rotatoria a alto vacío usando un baño de agua a 24 °C. El residuo semisólido (de color ligeramente amarillo) se disolvió en cloruro de metileno, 40 ml, y se distribuyó entre dos tubos de centrifuga de TEFLON® con tapón de rosca. La solución en cada tubo se extrajo con 10 ml de bicarbonato sódico acuoso, pH 8,26, agitando el tubo vigorosamente durante 30 segundos, centrifugando la emulsión, y eliminando la fase acuosa. La extracción se repitió tres veces más. La fase orgánica resultante en cada tubo se lavó con 10 ml de agua cuatro veces y se usó la centrifugación para descomponer la emulsión. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron, dando un residuo semisólido de color blanco. Al residuo se le añadió éter etílico (50 ml), y la mezcla se agitó vigorosamente durante 5 horas a temperatura ambiente para convertir el semisólido en un sólido granular de color blanco. La suspensión resultante se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado (medio) y se secó a alto vacío a 24 °C durante cuatro horas, produciendo una muestra en bruto de **IAi** (0,895 g, rendimiento de aproximadamente el 89 %), que contenía únicamente impurezas menores por TLC y RMN. Una porción del compuesto **IAi** (0,3198 g) se recristalizó disolviéndolo en 12,5 ml de cloroformo y después añadiendo éter etílico (42 ml). La solución se refrigeró durante una noche. El precipitado granular de color blanco resultante se recogió por filtración a través de un embudo de vidrio sinterizado (medio), produciendo 0,23 g de producto recristalizado. Este producto se recristalizó una segunda vez usando 8 ml de cloroformo y 27 ml de éter etílico. El precipitado resultante se secó a alto vacío a 24 °C durante 10 horas hasta un peso constante, produciendo 0,16 g de **IAi** purificado. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 1,28 (d), 1,77 (m), 2,08 (m), 2,80 (s), 2,83 (m, sin resolver), 3,34 (s), 3,51 (m), 3,60, 5,26 (s), 7,08 (d) y 7,38 (d) ppm.

Se usó espectrometría de masas para verificar que la diferencia de peso molecular entre **10i** e **IAi** era como se esperaba. Como en el caso de la diferencia de masa entre **13** y **10i**, la diferencia de masa entre los homólogos equivalentes de **10i** e **IAi** debe depender de la diferencia entre las unidades de grupo terminal de no repetición. Las masas exactas de las unidades de no repetición para **10i** e **IAi** son 238,12 daltons y 379,13 daltons, respectivamente, y la diferencia en el peso molecular entre el intermedio **10i** y el producto **IAi** es un aumento de 141,01 daltons. El homólogo debido a 42 unidades de repetición se identificó tanto para **10i** como para **IAi**. Las masas observadas fueron 2110,12 daltons y 2251,38 daltons para **10i** e **IAi**, respectivamente, y la diferencia fue un aumento de 141,26 daltons. Este valor se comparó favorablemente con la diferencia esperada de 141,01 daltons y, por lo tanto, los datos espectrales de masa apoyan la afirmación de que se ha producido la reacción esperada. El número de unidades de repetición en un homólogo particular se determinó de la misma manera que para **10i**, anteriormente. El hecho de que se obtuvieran números enteros para este cálculo apoyó la afirmación de que el peso asumido de las unidades de no repetición era correcto.

Ejemplo 6**Preparación de triptófano PEGilado**

5 Se disolvió triptófano (1,7 mg, 8,3 μ M) en 1 ml de tampón PBS (0,10 M, NaCl 0,10 M, pH 7,5) y se agitó. A la solución en agitación se le añadieron 28,5 mg del derivado de PEG **IAi** (PM aproximadamente 2300, aproximadamente 12,4 μ M), y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadió más cantidad de derivado de PEG (7,5 mg) a 0,7 ml de esta mezcla de reacción y se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante dos horas más. Se mezcló una alícuota de 0,10 ml de la mezcla de reacción con 8 μ l de HCl (1,0 N) y se diluyó a aproximadamente 1 ml usando acetonitrilo al 20 % que contenía ácido trifluoroacético al 0,01 %. Se usó una alícuota de 0,050 ml de la solución resultante para el análisis por HPLC (Ejemplo 8).

Ejemplo 7**Liberación de triptófano de PEG-triptófano**

15 Una alícuota de 0,10 ml de la solución de reacción de triptófano PEGilado del Ejemplo 7 se diluyó con 0,60 ml de tampón PBS (0,10 M, NaCl, 0,10 M, Glicina 0,10 M, pH 7,5) y se incubó a 37 °C en una estufa. Las alícuotas de 0,10 ml se extrajeron a intervalos de incubación de 2, 7, 32 y 102 horas, y se inactivaron con 10 μ l de HCl (1,0 N diluido con 0,4 ml de acetonitrilo al 20 % que contenía ácido trifluoroacético al 0,01 %) para el análisis por HPLC (0,10 ml de inyección).

El procedimiento anterior se repitió usando una solución de escisión con un pH de 8,5 e intervalos de incubación de 1, 6, 24 y 32 horas.

20 Análisis por HPLC:

Tanto el PEG-triptófano (Ejemplo 7) como las muestras de escisión se analizaron por HPLC de fase inversa C-18 con detección a 280 nm. Las condiciones de HPLC son las siguientes: columna C-18 (Waters Symmetry, 4,6 x 250 mm), caudal de 1,0 ml/min, gradiente de acetonitrilo del 20 % al 80 % durante 15 minutos seguido de 10 minutos de lavado en acetonitrilo al 80 % (todos contienen ácido trifluoroacético al 0,01 %).

25 Resultados:

El contenido de triptófano y PEG-triptófano (área de integración) de las reacciones de escisión a pH 7,5 se analizó en HPLC y se enumera a continuación.

Tiempo de incubación (horas)	2	7	32	102
Triptófano	596	647	1329	2955
PEG-Triptófano	6314	5538	5039	2546

ES 2 617 868 T3

Se observó un aumento de triptófano y un descenso de PEG-triptófano durante el periodo de tiempo de 102 horas. La semivida del PEG-triptófano a pH 7,5 es de aproximadamente 85 horas.

El contenido de triptófano y PEG-triptófano (área de integración) de las reacciones de escisión a pH 8,5 se analizó en HPLC y se enumera a continuación.

Tiempo de incubación (horas)	1	6	24	32
Triptófano	735	1183	2442	2498
PEG-triptófano	7967	6235	2754	1642

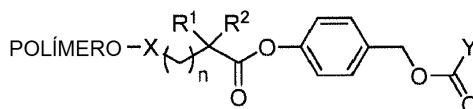
5

Se observó un aumento del triptófano y un descenso del PEG-triptófano durante el periodo de tiempo de 32 horas. La semivida del PEG-triptófano a pH 8,5 es de aproximadamente 17 horas.

10 La incubación del triptófano PEGilado a pH 7,5 más glicina o a pH 8,5 muestra claramente la tendencia de aumento del triptófano y la disminución del triptófano PEGilado. La semivida del triptófano PEGilado se determinó que era de 17 horas a pH 8,5 y 85 horas a pH 7,5 en presencia de glicina. La suma total de triptófano más triptófano PEGilado disminuyó con el tiempo, muy probablemente debido a las reacciones secundarias del triptófano, cuyos productos se muestran en los espectros de HPLC.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:



Fórmula I

5 en la que Y se selecciona del grupo que consiste en haluro, N3, -CN, RO-, NH₂O-, NHRO-, NR₂O-, RCO₂-, ROCO₂-, RNCO₂-, RS-, RC(S)O-, RCS₂-, RSC(O)S-, RSCS₂-, RSCO₂-, ROC(S)O-, ROCS₂-, RSO₂-, RSO₃-, ROSO₂-, ROSO₃-, RPO₃-, ROPO₃-, imidazolilo, N-triazolilo, N-benzotriazolilo, benzotriazolilo, imidazolilo, N-imidazolinona, N-imidazolona, N-imidazolinetona, N-succinimidilo, N-ftalimidilo, N-succinimidiloxi, N-ftalimidiloxi, N-(5-norbornen-2,3-dicarboxiimidiloxi), 2-tioxotiazolidin-3-ilo, -ON=C(CN)R, 2-piridiloxi, fenoxi, p-clorofenoxi, p-nitrofenoxi, triclorofenoxi y pentaclorofenoxi;

10 R es un grupo alquilo o un grupo arilo;

X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NR³;

n es 1, 2 o 3;

EL POLÍMERO es un polímero soluble en agua no peptídico;

15 R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo, con la condición de que al menos uno de R¹ y R² sea diferente de hidrógeno; y

R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que POLÍMERO se selecciona del grupo que consiste en poli(alquilenglicol), polivinilpirrolidona, poloxámero, polisacárido, ácido polisialico, almidón de hidroxietilo, icodextrina, sulfato de condroitina, dermatán sulfato, heparina, quitosano, ácido hialurónico, dextrano, dextrano sulfato y pentosán polisulfato.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R² se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y n-butilo.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X se selecciona del grupo que consiste en O y NH.

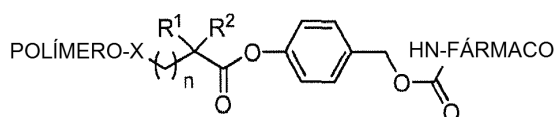
5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 1 o 2.

25 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en

4-(2-metoxipolietoxi)-2-metilbutanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 4-(2-metoxipolietoxi)-2,2-dimetilbutanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 5-(2-metoxipolietoxi)-2,2-dimetilpentanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 30 6-(2-metoxipolietoxi)-2,2-dimetilhexanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 2-etil-5-(2-metoxipolietoxi)pentanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 5-(2-metoxipolietoxi)-2-propilpentanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 2-(2-(2-metoxietoxi)etil)hexanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 35 3-(2-metoxipolietoxi)-2,2-dimetilpropanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 2-((2-metoxipolietoxi)metil)-2-metilbutanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 2-etil-2-((2-metoxipolietoxi)metil)butanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 2-((2-metoxipolietoxi)metil)-2-metilpentanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 2-((2-metoxipolietoxi)metil)-2-propilpentanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 2-((2-metoxipolietoxi)metil)-3-metilbutanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo;
 40 2-((2-metoxipolietoxi)metil)hexanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo; y
 3-(2-metoxietoxi)-2-metilpropanoato de 4-(((2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)carboniloxi)metil)fenilo.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n es 3.

8. Un conjugado farmacológico de Fórmula II:



Fórmula II

45 en la que X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NR³;

n es 1, 2 o 3;

POLÍMERO es un polímero soluble en agua no peptídico;

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo, con la condición de que al menos uno de R¹ y R² sea diferente de hidrógeno;

5 R³ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo; y

FÁRMACO es una molécula, péptido o proteína que contiene amino,

o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. El conjugado farmacológico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que FÁRMACO es una proteína plasmática o un factor de coagulación sanguínea.

10 10. El conjugado farmacológico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que n es 1.

11. El conjugado farmacológico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que n es 2.

12. El conjugado farmacológico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que n es 3.

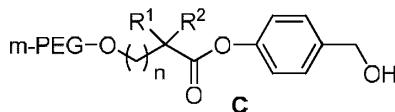
13. Una formulación farmacéutica que comprende el conjugado farmacológico de la reivindicación 8 o la reivindicación 9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 14. La formulación farmacéutica de la reivindicación 13, en la que la formulación se encapsula en una micropartícula.

15. Una formulación farmacéutica de la reivindicación 13 o la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente.

16. La formulación farmacéutica de la reivindicación 15, en la que la enfermedad es una enfermedad de la coagulación sanguínea y el FÁRMACO es una proteína plasmática o un factor de coagulación sanguínea.

20 17. Un compuesto que tiene una estructura C:



en la que n es 1, 2, 3 o 4;

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquilenarilo (C₁-C₆) y arilo; y

25 m-PEG- es monometoxi poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 500.000;

con la condición de que al menos uno de R¹ y R² sea diferente de hidrógeno.

18. El compuesto de la reivindicación 17 seleccionado del grupo que consiste en:

