



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-21298

54. TITULO

Alcanales Poliméricos Solubles en agua.

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K31/075 // A61L31/11

71. SOLICITANTE

VERTALZ THERAPEUTICS AL CORPORATION.

DOMICILIO

440 DISCOVERY DRIVE Huntsville, AL 35806-2902
Estados Unidos de America.

74. APODERADO

CARLOS R. DIARTE.

22. BOGOTA, D.C.,

MARZO 8, 2005.

SS

OLARTE RAISBECK


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 85821298 00000000

Folios: 199

Fecha (AÑO): 2005-03-08 14:50:14

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 8920 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

09-04-2005

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: NEKTAR THERAPEUTICS AL,
CORPORATION

Dirección: 490 Discovery Drive Huntsville,
AL 35806-2902. Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Alabama, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Wold Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: Antoni Kozlowski.

Dirección: 2209 Fairfax Street Huntsville, Alabama 35811. Estados Unidos de
América.

Nacionalidad o Domicilio: Polaco

3

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2003/028221

Fecha Septiembre 9, 2003

Publicación Internacional No.

WO 2004/022630

Fecha Marzo 18, 2004

4

Título (54) ALCANALES POLIMÉRICOS SOLUBLES EN AGUA.

Clasificación Internacional (51) C08G 65/329.

A61K31/075 // A61K31/11

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Septiembre 9, 2002

Marzo 19, 2003

(31) Número de Solicitud

60/409,251

60/456,580

5

Comprobante de pago No. 17,124

Fecha

Marzo 8, 2005

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del Interventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: [Signature]
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 17.124
FECHA : MARZO 8 DE 2005

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05021290 00000000
Fecha (Año): 2005-03-08 14:58:14 Folios: 199
Tramite : 034 PCT-PATENT 379 FASE NCT 411 PRESENTA
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	37969065	08/03/2005	625.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 March 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/022630 A2(51) International Patent Classification: C08G 65/329.
C07C 47/198, C07K 1/107(74) Agents: EVANS, Susan, T. et al.: Nektar Therapeutics,
150 Industrial Road, San Carlos, CA 94070 (US).(21) International Application Number:
PCT/US2003/028221(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(22) International Filing Date:
9 September 2003 (09.09.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
604409.251 9 September 2002 (09.09.2002) US
604456.580 19 March 2003 (19.03.2003) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): NEKTAR
THERAPEUTICS ALA CORPORATION [US/US]; 490
Discovery Drive, Huntsville, AL 35896-2903 (US).

(72) Inventor: and

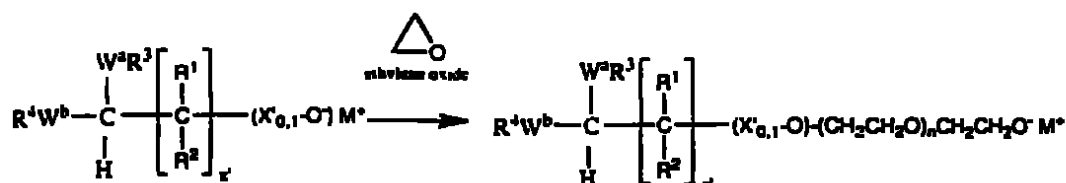
(75) Inventor/Applicant (for US only): KOZLOWSKI, An-
toni [PL/US]; 2209 Fairfax Drive, Huntsville, AL 35811
(US).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

[Continued on next page]

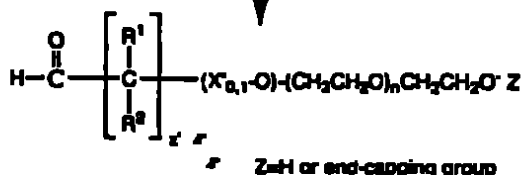
(54) Title: WATER-SOLUBLE POLYMER ALKANALS



Acetal precursor having an anionic site, where M* is a metal counterion, and (X_{0.1}-O-) indicates a linker terminating in an alkoxide, where X_{0.1}-O when taken together may be simply "O", or the portion X may comprise any of the herein described linkers or combinations of linkers.

terminate H⁺/HOH
optionally and cap

hydrolyze to polymer alkanal



(57) Abstract: The present invention is directed to alkanal derivatives of water-soluble polymers such as poly(ethylene glycol), their corresponding hydrates and acetals, and to methods for preparing and using such polymer alkanals. The polymer alkanals of the invention are prepared in high purity and exhibit storage stability.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WATER-SOLUBLE POLYMER ALKANALS

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to particular aldehyde derivatives of water-soluble polymers, and to methods for preparing and using such polymer aldehyde derivatives.

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

In recent years, human therapeutics have expanded past traditional small molecule drugs and into the realm of biopharmaceuticals. The discovery of novel proteins and peptides has led to the development of numerous protein and polypeptide biopharmaceuticals. Unfortunately, proteins and polypeptides, when utilized as therapeutics, often exhibit properties that make them extremely difficult to formulate or administer, such as short circulating half lives, immunogenicity, proteolytic degradation, and low solubility. One approach for improving the pharmacokinetic or pharmacodynamic properties of biopharmaceuticals is the conjugation to natural or synthetic polymers, such as polyethylene glycol (PEG). The covalent attachment of PEG to a therapeutic protein can provide a number of advantages, such as (i) shielding antigenic epitopes of the protein, thus reducing its reticuloendothelial clearance and recognition by the immune system, (ii) reducing degradation by proteolytic enzymes, and (iii) reducing renal filtration.

Much effort has been spent on the development of polymer derivatives for coupling to biopharmaceuticals such as peptides, and in particular, on the development of polymer derivatives for coupling to reactive amino groups of proteins. Such polymer derivatives are referred to as 'electrophilically activated', since they bear electrophilic groups suitable for reaction with nucleophiles such as amines. Examples of such PEG derivatives include PEG dichlorotriazine, PEG tresylate, PEG succinimidyl carbonate, PEG carbonylimidazole, and PEG succinimidyl succinate. Unfortunately, use of these particular reagents can result in one or more of the following: undesirable side reactions under the reaction

conditions necessary to effect coupling, lack of selectivity, and/or the formation of weak (i.e., unstable) linkages between the biopharmaceutical and the PEG.

In an effort to overcome some of these problems, many new or "second generation" electrophilically activated PEGs have been developed, such as PEG propionaldehyde and PEG acetaldehyde (see, for Example, U.S. Patent Nos. 5,252,714 and 5,990,237, respectively). Aldehyde derivatives are particularly attractive reagents for coupling to proteins and other biomolecules, since aldehydes react only with amines (i.e., are selective in their attachment chemistry). The above-mentioned reagents offer many advantages: they can be prepared to avoid the problems of PEG diol contamination, are not restricted to low molecular weight mPEG, form stable amine linkages upon coupling, and are selective. Although the above noted derivatives offer many advantages over first-generation PEG reagents, the Applicants have noted some particular drawbacks of these aldehyde reagents, making them less than ideal in certain instances.

More specifically, the Applicants have recognized, in their extensive work with these reagents, that PEG acetaldehyde is very unstable, particularly in basic media, and is difficult to isolate due to excessive salt formation resulting from neutralization of the reaction mixture. In particular, PEG acetaldehyde is very susceptible to dimerization via aldol condensation. PEG propionaldehyde, while a much better reagent in terms of its stability, possesses some disadvantages due to side reactions that can occur during its preparation, making it difficult to obtain the PEG propionaldehyde product in high purity.

More specifically, the Applicants have found that when preparing PEG propionaldehyde *in situ* from its precursor PEG aldehyde hydrate, product yields are generally only about 50%, due to an elimination reaction that consumes a significant portion of the acetal reagent. Although an improved synthetic route for the synthesis of PEG propionaldehyde can be employed, i.e., via base-catalyzed reaction of 3-hydroxypropionaldehyde diethyl acetal with PEG mesylate, the Applicants have discovered that this reaction route also leads to an elimination side reaction that produces significant amounts of PEG vinyl ether, which is unstable and produces difficult-to-remove the parent dihydroxy PEG (also referred to as PEG diol). Consequently, the yield of this reaction is generally less than about 85

to 90%. Moreover, using either of the above-described PEG propionaldehyde syntheses requires hydrolysis of the acetal intermediate at very low pHs, e.g., at pHs of 2 or lower. Hydrolysis at such low pHs is undesirable due to the large amounts of base necessary to neutralize the reaction mixture to pHs suitable for conjugation. Additionally, coupling PEG propionaldehyde to a protein at basic pHs can be problematic due to formation of significant amounts of acrolein (resulting from a retro-Michael type side reaction), which is quite difficult to remove. Formation of such undesirable side products necessitates extensive purification to obtain a pharmaceutical grade product.

Thus, there exists a need for improved electrophilically activated polymer derivatives for conjugating to biologically active molecules and surfaces, particularly polymer derivatives that (i) are selective in their coupling chemistry, (ii) can be prepared in high yields and in few reaction steps, (iii) are stable over a wide range of pHs, (iv) can be readily isolated, (iv) can be prepared in high purity (i.e., substantially absent polymer-derived impurities and side-products, and (v) overcome at least some of the drawbacks of known polymer derivatives such as those described above.

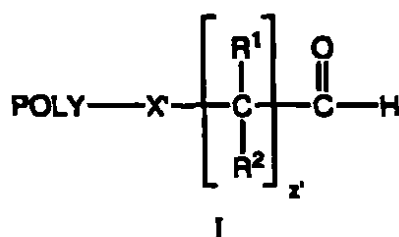
SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a unique family of polymer alkanals – i.e., polymers comprising at least one aldehyde functionality coupled to a polymer segment by one or more interposing carbon atoms.

The polymer alkanals of the invention are, for the most part, less reactive than prior art aldehyde derivatives and, thus, more selective. Further, the polymer alkanals of the invention are prepared in high yield, and certain structures can be prepared in a straightforward one step process. Certain of the polymer aldehydes described herein are more stable at basic pHs than prior known aldehyde derivatives, and are formed without significant or even detectable amounts of retro-Michael type reaction side products. Moreover, the polymer alkanals of the invention are formed from the corresponding acetal precursors by hydrolysis under mild acidic conditions, i.e., under much less harsh acidic conditions than required for either PEG acetaldehyde or PEG propionaldehyde. Such mild conditions allow

direct *in situ* conjugation of the polymer derivatives of the invention with proteins, peptides, or other molecular targets without requiring an intervening isolation step. The polymer alkanals of the invention are also prepared in high purity, making them particularly advantageous for coupling to drugs and biopharmaceuticals to provide polymer conjugate compositions having a purity sufficient for administration to a mammalian subject.

More particularly, in one aspect, the present invention is directed to a water-soluble polymer having the structure:



In the above structure, POLY represents a water-soluble polymer segment; X' is a linker moiety; z' is an integer from 1 to about 21; R¹, in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl; and R², in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl.

In some instances, the polymer alkanals of the invention will possess certain features. For example, according to one embodiment of the invention, when POLY is linear: (a) the total number of carbonyls (excluding/not counting the aldehyde carbonyl carbon) present in the polymer is 0 or 2 or greater except when X' comprises one or more contiguous (-CH₂CH₂O-) or (-CH₂CH₂NH-) segments. When X' comprises one or more contiguous (-CH₂CH₂O-) or (-CH₂CH₂NH-) segments, then the total number of carbonyls present in the polymer is 0, 1, 2, or greater.

In yet another example, according to a further embodiment, when X' is oxygen or comprises at least one (-CH₂CH₂O-) segment and z' is from 2 to 12, then at least one of R¹ or R² in at least one occurrence is an organic radical as defined

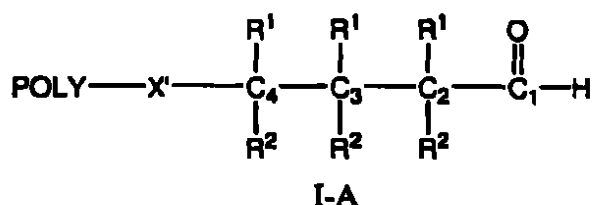
X

above or the polymer is heterobifunctional, where POLY comprises a reactive group at one terminus that is not hydroxyl.

The polymer alkanals provided herein may possess any of a number of overall geometries or structures, to be described in greater detail herein. Preferably, when POLY is branched, then either (i) at least one of R^1 or R^2 in at least one occurrence is an organic radical as defined above or (ii) X' includes $-(CH_2CH_2O)_b-$ where b is from 1 to about 20 in the instance where POLY comprises a lysine residue. Alternatively, when POLY is branched and possesses two polymer arms, then neither polymer arm comprises oxygen as the only heteroatom in the instance where POLY comprises "C-H" as a branch point.

Generally speaking, the polymer alkanals of the invention possess a structure where z' falls within one of the following ranges: z' is from about 2 to 21, from about 3 to 12, from about 3 to 8, or from 3 to about 6.

In one particular embodiment of the invention, the polymer has the structure:



where POLY, X' , each R^1 , each R^2 and R^3 are as defined above. In the preceding structure, C_1 indicates the aldehyde carbonyl carbon; C_2 indicates the carbon adjacent to or α (alpha) to the carbonyl carbon or C_1 ; C_3 indicates the carbon atom once removed from the carbonyl carbon or in the β (beta) position; and C_4 indicates the carbon atom in the γ position. Polymer alkanals having the overall structure depicted by I-A are generally referred to herein as polymer butanals. In preferred variations of formula I-A above, R^1 attached to C_2 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H. Preferably, the R^1 attached to C_2 is lower alkyl. Alternatively, the polymer alkanal corresponds to structure I-A above, where the R^1 attached to C_3 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H. In yet another preferred embodiment, the polymer alkanal is described by structure I-A where the R^1 attached to C_4 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

In yet another particular embodiment, a polymer alkanal of the invention corresponds to formula I, and possesses an additional carbon atom in the alkylene chain when compared to structure I-A. In this embodiment (see structure I-B herein), z' is 4, the R^1 attached to C_2 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H. Alternatively, either the R^1 attached to C_3 or C_4 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

In yet another particular embodiment falling within formula I, z' is 5, the R^1 attached to C_2 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H (see structure I-C herein). Alternatively, one of the R^1 variables attached to C_3 or C_4 or C_5 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

The polymer alkanal in accordance with formula I, in certain embodiments, possesses a linker moiety described generally by the formula: $-(CH_2)_c-D_e-(CH_2)_f-$ or $-(CH_2)_p-M_r-C(O)-K_s-(CH_2)_q-$, where c ranges from zero to 8; D is O, NH, or S; e is 0 or 1; f ranges from zero to 8; p ranges from zero to 8; M is $-NH$ or O; K is NH or O; q ranges from zero to 8, and r and s are each independently 0 or 1. Specific linkers falling within this general formula are described in greater detail below.

The linker moiety may optionally include an oligomeric segment corresponding to the structure $-(CH_2CH_2O)_b-$ or $-(CH_2CH_2NH)_g-$, where b and g are each independently 1 to 20. Preferably, b and g each independently range from about 1 to 10, and even more preferably range from about 1 to about 6. These oligomeric linkers provide additional stability to the alkanals of the invention, and also provide advantages in the synthetic methodology for preparing the polymers, to be described in more detail below.

More particularly, in certain embodiments, X' comprises a moiety corresponding to the structure: $-(CH_2)_c-D_e-(CH_2)_f-P-$ or $-(CH_2)_p-M_r-C(O)-K_s-(CH_2)_q-T-$, where P and T are each independently $-(CH_2CH_2O)_b-$ or $-(CH_2CH_2NH)_g-$ and b and g each independently range from 1 to about 20. In a specific embodiment of a polymer alkanal in accordance with formula I, X' comprises $-C(O)NH-(CH_2)_1-6NH-C(O)-$ or $-NHC(O)NH-(CH_2)_1-6NH-C(O)-$.

Preferably, the water-soluble polymer segment of a polymer alkanal of the invention is a poly(alkylene oxide), a poly(vinyl pyrrolidone), a poly(vinyl alcohol), a polyoxazoline, a poly(acryloylmorpholine), or a poly(oxyethylated polyol). In a

8

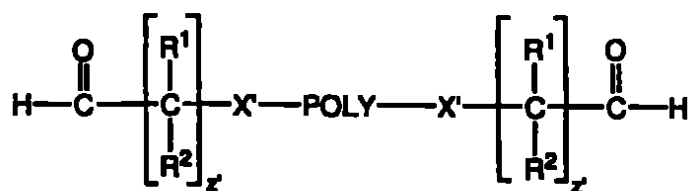
preferred embodiment, the polymer segment is a poly(alkylene oxide), preferably poly(ethylene glycol).

According to one embodiment, the poly(ethylene glycol) segment comprises the structure: $Z-(CH_2CH_2O)_n-$ or $Z-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$, where n ranges from about 10 to about 4000 and Z is a moiety comprising a functional group selected from the group consisting of hydroxy, amino, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, isothiocyanate, hydrazide, maleimide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodoacetamide, alkoxy, benzyloxy, silane, lipid, phospholipid, biotin, and fluorescein.

Alternatively, POLY may be terminally capped with an end-capping moiety such as alkoxy, substituted alkoxy, alkenyloxy, substituted alkenyloxy, alkynyloxy, substituted alkynyloxy, aryloxy, and substituted aryloxy. Preferred end-capping groups include methoxy, ethoxy, and benzyloxy.

Generally, POLY possesses a nominal average molecular mass falling within one of the following ranges: from about 100 daltons to about 100,000 daltons, from about 1,000 daltons to about 50,000 daltons, or from about 2,000 daltons to about 30,000 daltons. Preferred molecular masses for POLY include 250 daltons, 500 daltons, 750 daltons, 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, and 50 kDa, or even greater.

In yet another particular embodiment, the polymer alkanal of the invention comprises the structure:



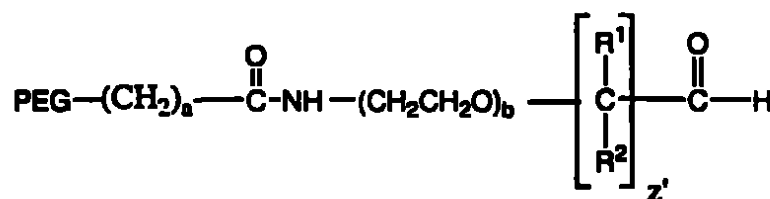
II

wherein POLY, each X' , each (z') , each R^1 , each R^2 , and each R^3 are as previously defined. In a specific embodiment, POLY is linear and the polymer is homobifunctional.

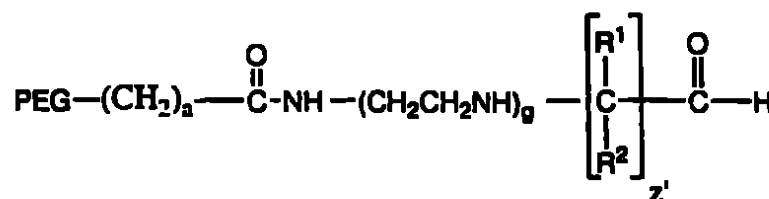
As stated above, the polymer segment within the polymer alkanal may possess any of a number of geometries, such as linear, branched, forked, multi-armed, or dendritic, to be described in greater detail below.

Specific embodiments of the invention include polymer alkanals

5 corresponding to the following structures:



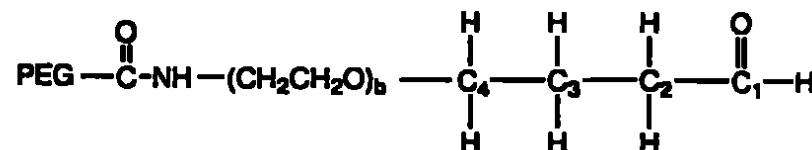
III-A



IV-A

10 In the above structures, PEG is poly(ethylene glycol), and b and g are each independently 0 to 20, a is 0 to 6. For generalized structures provided in this section, variables correspond to ranges/values previously provided unless otherwise noted.

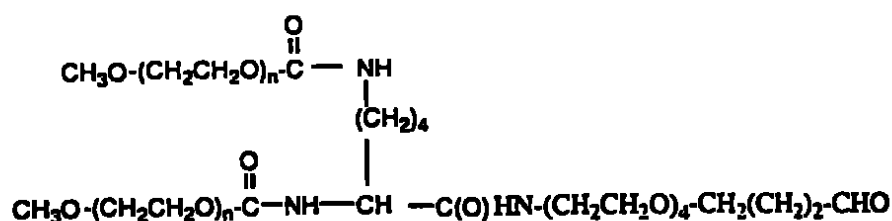
15 In a specific embodiment, a polymer alkanal in accordance with the invention corresponds to the structure:



III-D

20 One particularly preferred polymer alkanal falling within the generalized structure III-D possesses the structure:

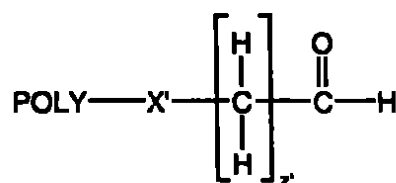
9



III-E

According to another aspect, the invention is directed to a composition

- 5 comprising a water-soluble polymer having the structure:

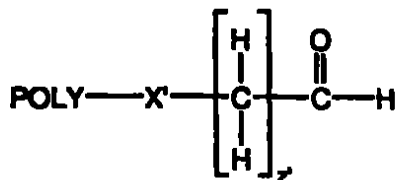


VII

- where the composition is absent detectable amounts of iodine-containing species or retro-Michael type reaction products. This is particularly advantageous, since iodine-containing species can lead to degradation of poly(ethylene glycol) chains due to chain cleavage, resulting in a polymer product having a high polydispersity value, e.g., greater than around 1.2. Preferably, a polymer alkanal of the invention will possess a polydispersity value of less than about 1.2, preferably less than about 1.1, and even more preferably less than about 1.05. Even more preferred are polymer alkanals such as those described herein characterized by a polydispersity of 1.04, 1.03 or less.

In accordance with yet another aspect, the invention relates to a composition comprising a water-soluble polymer having the structure:

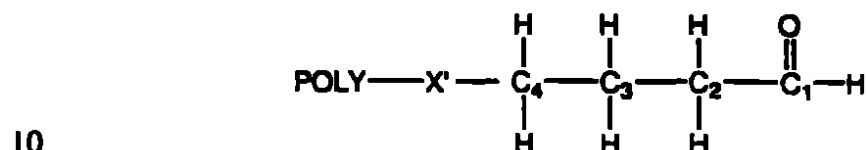
20



where POLY is a linear, terminally end-capped water-soluble polymer segment and the composition is absent detectable amounts of dialdehyde polymer derivative.

One additional feature of the polymer alkanals of the invention is their stability, e.g., storage stability, in comparison to other known polymer aldehyde compositions. For example, provided herein is a polymer alkanal composition that exhibits 10% or less degradation of the polymer aldehyde group when stored at 40° C for 15 days, as determined by NMR.

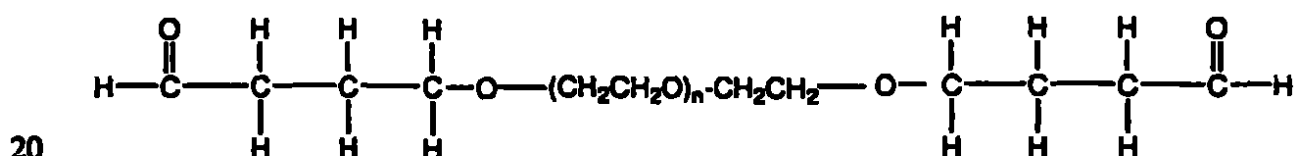
In a preferred embodiment, the composition of the invention comprises a polymer alkanal corresponding to the following structure:



VII-A.

In an even more preferred embodiment, in accordance with structure VII-A, POLY possesses the structure $\text{Z}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, where X is O, n ranges from about 10 to about 4000, and Z comprises a functional group, targeting moiety, reporter, capping group, or the like.

Another composition of the invention comprises a polymer in accordance with the structure:

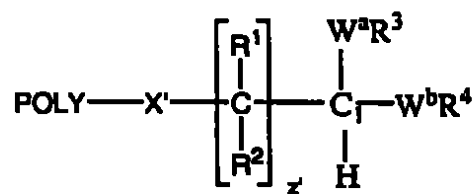


VIII

In yet another aspect of the invention, provided are hydrate or acetal forms of the above-described polymer alkanals.

Acetals of the invention include dimethyl acetal, diethyl acetal, di-isopropyl acetal, dibenzyl acetal, 2,2,2-trichloroethyl acetal, bis(2-nitrobenzyl) acetal, S,S'-dimethyl acetal, S,S'-diethyl acetal, and dioxolanes.

More particularly, an acetal or hydrate form of a polymer alkanal of the invention may be described generally by the following structure:



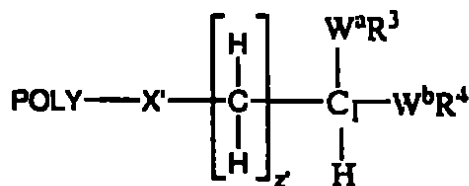
5

IX

where W^a and W^b are each independently O or S, and R^3 and R^4 are each independently H, or an organic radical selected from the group consisting of methyl, ethyl, isopropyl, benzyl, 1,1,1-trichloroethyl, and nitrobenzyl, or when taken together, are $-(\text{CH}_2)_2-$ or $-(\text{CH}_2)_3-$, forming a 5 or 6 membered ring when considered together with W^a , C_1 , and W^b . The polymer acetals are useful precursors of the alkanals of the invention, and can be hydrolyzed to yield a polymer alkanal.

10

In one particular embodiment, provided is a water-soluble polymer having the structure:



15

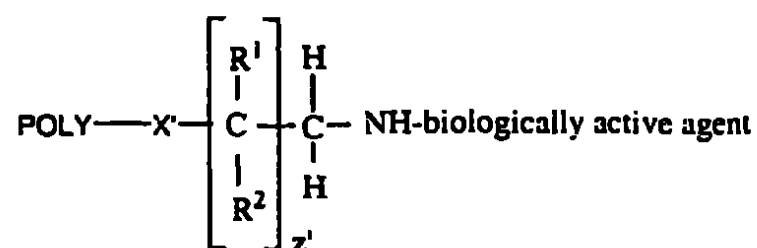
IX-A

In structure IX-A, the alkanal is one having only methylene or $-(\text{CH}_2)-$ carbons separating the acetal or aldehyde hydrate portion of the molecule from the linker, X' .

20

Further, the invention is directed to conjugates formed by reaction of a biologically active agent with the herein described polymer alkanals, their hydrates and/or the corresponding alkanals.

Preferably, the conjugate corresponds to the following structure:

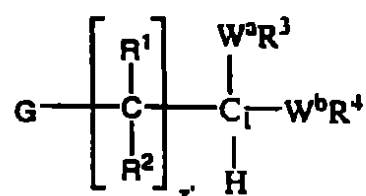


where "NH-biologically active agent" represents a biologically active agent comprising an amino group.

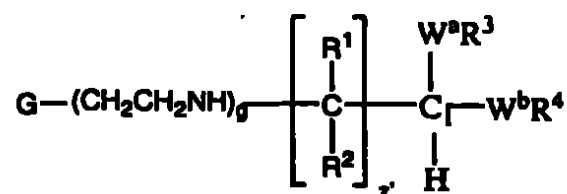
5 Also forming part of the present invention are hydrogels formed from the herein described polymer alkanals or their precursors.

In accordance with yet another aspect, the invention provides protected aldehydes reagents. These protected aldehyde reagents are particularly useful for forming the polymer alkanals of the invention, and correspond generally to the

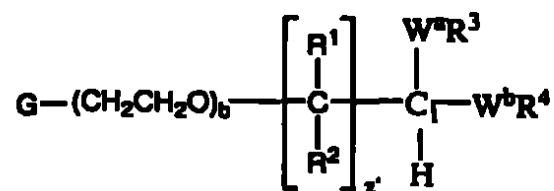
10 following structures:



XI-A



XI-B



XI-C

15

20

where G is a functional group, and the remaining variables have the values set forth above.

In preferred embodiments of structures XI-A, B, and C, G is a leaving group such as chloride, bromide, para-tolylsulfonate ester, methylsulfonyl ester,

5 trifluorosulfonyl ester, and trifluoroethylsulfonyl ester.

Alternatively, G is a functional group selected from the group consisting of -OH, -NH₂, -SH, and protected forms thereof.

Another aspect of the invention is directed to a method for preparing a water-soluble polymer alkanal, optionally in protected form. Briefly, the method
10 includes the steps of reacting a water soluble polymer comprising at least one reactive group, Y, with a protected alkanal reagent comprising from about 2 to 20 carbon atoms and a reactive group, K, suitable for displacement by or alternatively, reaction with Y, under conditions effective to form a water soluble polymer alkanal in protected form. In this method, an activated polymer is coupled to a reagent
15 bearing the alkanal portion of the final product, or a precursor thereto.

Preferably, the reaction is carried out under an inert atmosphere.

In one specific embodiment, POLY-Y, is prepared by direct polymerization.

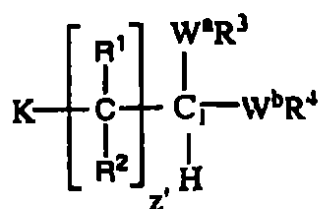
The method may also include the additional step of hydrolyzing the protected water soluble polymer alkanal, e.g., under acidic conditions, to form the
20 corresponding water soluble polymer alkanal.

In a preferred embodiment, the hydrolyzing step is carried out at a pH of no lower than about 3.

Protected forms of the alkanal reagent for carrying out the method include acetals such as dimethyl acetal, diethyl acetal, di-isopropyl acetal, dibenzyl acetal,
25 2,2,2-trichloroethyl acetal, bis(2-nitrobenzyl) acetal, S,S'-dimethyl acetal, and S,S'-diethyl acetal, cyclic acetals and cyclic thioacetals.

In yet a further embodiment, the polymer alkanal thus produced is recovered by raising the pH of the reaction mixture to from about 6.0 to 7.5, extracting the polymer alkanal into an organic solvent, and removing the solvent.

30 In a preferred embodiment of the method, the water soluble polymer corresponds to the structure, "POLY-Y", and the protected alkanal reagent corresponds to the structure:



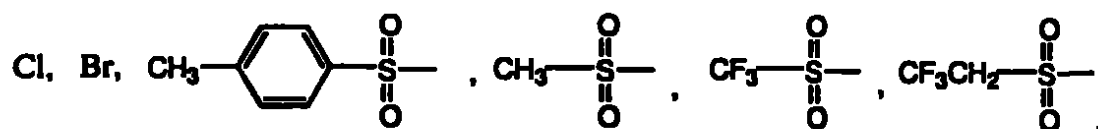
XI-D

Preferably, POLY comprises a poly(ethylene glycol) that may or may not be terminally end-capped.

5 In one particular embodiment of the method, POLY-Y comprises the structure $\text{Z}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, wherein n is from about 10 to about 4000, and Z is selected from the group consisting of $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, and $-\text{OCH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$. In a further embodiment, POLY-Y comprises the structure $\text{Z}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}^- \text{M}^+$, where POLY-Y is prepared by anionic ring-opening polymerization of ethylene
10 oxide onto an end-capped alcoholate salt such as $\text{Z}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}^- \text{M}^+$, prepared by metallation of the terminal $-\text{OH}$ group of $\text{Z}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ with a strong base. M^+ represents a metal counterion such as Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Rb^+ . POLY-Y thus prepared is then suitable for reaction with a protected alkanal reagent as described above.

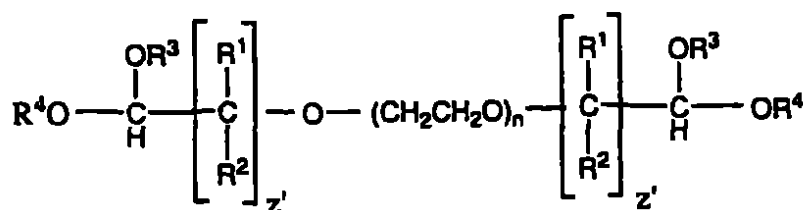
15 In yet a further particularly preferred embodiment, the recovered alkanal is absent detectable amounts of unreacted POLY Y (e.g., $\text{Z}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$) and retro-Michael type reaction products.

In yet another embodiment of the method, POLY-Y corresponds to PEG-diol, that is to say, POLY-Y possesses the structure $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, wherein n
20 is from about 10 to about 4000, K is selected from the group consisting of:



and the method results in formation of a protected polymer alkanal having the
25 structure:

12



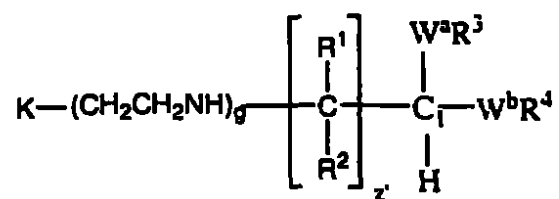
XII

5 In yet another embodiment of the method, POLY-Y comprises the structure $Z-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, wherein n is from about 10 to about 4000, and Z is protected hydroxyl. In this instance, a preferred embodiment of the method includes deprotecting the protected hydroxyl after the reacting step, optionally followed by converting the terminal hydroxyl of the poly(ethylene glycol) to a functional group
 10 other than hydroxyl.

Exemplary functional groups include amino, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, isothiocyanate, maleimide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodouacetamide, and silane. Preferably, the functional group is selected from the
 15 group consisting of N-hydroxysuccinimidyl ester, benzotriazolyl carbonate, amine, protected amine, vinylsulfone, and maleimide.

In accordance with yet another embodiment of the invention, "Y" in POLY-Y is an ionizable group or is a derivative of an ionizable group such as a carboxylic acid, active ester, or amine. Preferably, POLY-Y has been chromatographically
 20 purified prior to use in the reacting step. In one particular embodiment, POLY-Y is purified prior to use by ion exchange chromatography. Ideally, such chromatographically purified POLY-Y for use in the reacting step is essentially absent detectable amounts of polymeric impurities. In one such embodiment of this method, POLY-Y is end-capped, and is essentially absent detectable amounts of
 25 PEG-diol or difunctional PEG impurities.

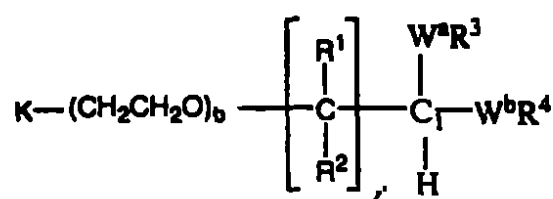
Alternatively, in practicing the method of the invention, the alkanal reagent comprises the structure:



XI-F

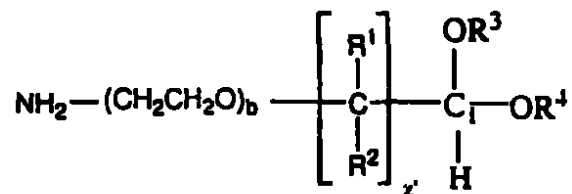
or

5



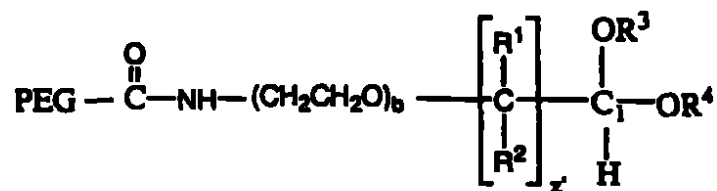
XI-G

where g and b each independently range from about 1 to about 20. As an
 10 example, a preferred alkanal reagent corresponds to the structure:



XI-H

15 and the product of the reacting step possesses the generalized structure:



IX-B

20 In yet another approach for preparing a polymer alkanal of the invention, a polymer alkanal as described herein is prepared by building the polymer segment

13

directly onto an acetal precursor, e.g., by direct polymerization. More specifically, this method comprises the steps of:

(i) providing an acetal precursor comprising at least one active anionic site suitable for initiating polymerization.

5 (ii) contacting the anionic site of the acetal precursor with a reactive monomer capable of polymerizing, to thereby initiate polymerization of the reactive monomer onto the acetal precursor.

(iii) as a result of said contacting step, adding additional reactive monomers to the acetal precursor to form a polymer chain.

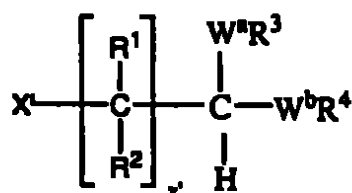
10 (iv) allowing said contacting to continue until a desired length of the polymer chain is reached, and

(v) terminating the reaction to achieve a polymer aldehyde precursor of the invention.

15 The resulting polymer aldehyde precursor can be further hydrolyzed to the corresponding alkanal as set forth above, if desired.

In one particular embodiment of the above method, the reactive monomer is ethylene oxide and the reactive anionic site contained within the acetal precursor is an alkoxide anion (O⁻), preferably accompanied by an alkali metal or other suitable counterion. The alkoxide end group present in the acetal precursor is active for
20 anionic ring opening polymerization of ethylene oxide to form a polymer alkanal of the invention.

The acetal precursor will generally possess a structure corresponding to:



25

where the variables possess the values described above, with the exception that X' terminates in an oxygen anion, or O⁻ (e.g., in its neutral form, X' typically terminates in a hydroxyl group or -OH, that in the presence of a strong base, is converted to the corresponding alkoxide salt). Suitable counterions include Na⁺.

K^+ , Li^+ , and Cs^+ . The terminating step generally comprises neutralizing the reaction, e.g., by addition of acid. Optionally, the polymer segment may be capped by addition of an alkylating reagent or other reagent suitable for providing a non-reactive terminus.

5

These and other objects and features of the invention will become more fully apparent when read in conjunction with the following detailed description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURE

10 FIG. 1 is a general reaction scheme for preparing a polymer alkanal of the invention by anionic ring opening polymerization of ethylene oxide (EO) on an acetal precursor having an anionic site.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

15 Before describing the present invention in detail, it is to be understood that this invention is not limited to the particular polymers, synthetic techniques, active agents, and the like as such may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting.

20 It must be noted that, as used in this specification, the singular forms "a," "an," and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to a "polymer" includes a single polymer as well as two or more of the same or different polymers, reference to a "conjugate" refers to a single conjugate as well as two or more of the same or different conjugates,
25 reference to an "excipient" includes a single excipient as well as two or more of the same or different excipients, and the like.

In describing and claiming the present invention, the following terminology will be used in accordance with the definitions described below.

30 DEFINITIONS

The following terms as used herein have the meanings indicated.

124

As used in the specification, and in the appended claims, the singular forms "a", "an", "the", include plural referents unless the context clearly dictates otherwise.

"PEG" or "poly(ethylene glycol)" as used herein, is meant to encompass any water-soluble poly(ethylene oxide). Typically, PEGs for use in the present invention will comprise one of the two following structures: $-(CH_2CH_2O)_n-$ or $-(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2-$, depending upon whether or not the terminal oxygen(s) has been displaced, e.g., during a synthetic transformation. The variable (n) is 3 to 3000, and the terminal groups and architecture of the overall PEG may vary. When PEG further comprises a linker moiety (to be described in greater detail below), the atoms comprising the linker (X'), when covalently attached to a PEG segment, do not result in formation of (i) an oxygen-oxygen bond (-O-O-, a peroxide linkage), or (ii) a nitrogen-oxygen bond (N-O, O-N). "PEG" means a polymer that contains a majority, that is to say, greater than 50%, of subunits that are $-CH_2CH_2O-$. PEGs for use in the invention include PEGs having a variety of molecular weights, structures or geometries (e.g., branched, linear, forked PEGs, dendritic, and the like), to be described in greater detail below.

"Water-soluble", in the context of a polymer of the invention or a "water-soluble polymer segment" is any segment or polymer that is soluble in water at room temperature. Typically, a water-soluble polymer or segment will transmit at least about 75%, more preferably at least about 95% of light, transmitted by the same solution after filtering. On a weight basis, a water-soluble polymer or segment thereof will preferably be at least about 35% (by weight) soluble in water, more preferably at least about 50% (by weight) soluble in water, still more preferably about 70% (by weight) soluble in water, and still more preferably about 85% (by weight) soluble in water. It is most preferred, however, that the water-soluble polymer or segment is about 95% (by weight) soluble in water or completely soluble in water.

An "end-capping" or "end-capped" group is an inert group present on a terminus of a polymer such as PEG. An end-capping group is one that does not readily undergo chemical transformation under typical synthetic reaction conditions. An end capping group is generally an alkoxy group, -OR, where R is an

organic radical comprised of 1-20 carbons and is preferably lower alkyl (e.g., methyl, ethyl) or benzyl. "R" may be saturated or unsaturated, and includes aryl, heteroaryl, cyclo, heterocyclo, and substituted forms of any of the foregoing. For instance, an end capped PEG will typically comprise the structure "RO-
5 (CH₂CH₂O)_n-" , where R is as defined above. Alternatively, the end-capping group can also advantageously comprise a detectable label. When the polymer has an end-capping group comprising a detectable label, the amount or location of the polymer and/or the moiety (e.g., active agent) to which the polymer is coupled, can be determined by using a suitable detector. Such labels include, without limitation,
10 fluorescers, chemiluminescers, moieties used in enzyme labeling, colorimetric (e.g., dyes), metal ions, radioactive moieties, and the like.

"Non-naturally occurring" with respect to a polymer of the invention means a polymer that in its entirety is not found in nature. A non-naturally occurring polymer of the invention may however contain one or more subunits or segments of
15 subunits that are naturally occurring, so long as the overall polymer structure is not found in nature.

"Molecular mass" in the context of a water-soluble polymer of the invention such as PEG, refers to the nominal average molecular mass of a polymer, typically determined by size exclusion chromatography, light scattering techniques, or
20 intrinsic velocity determination in 1,2,4-trichlorobenzene. The polymers of the invention are typically polydisperse, possessing low polydispersity values of less than about 1.20.

The term "reactive" or "activated" when used in conjunction with a particular functional group, refers to a functional group that reacts readily with an
25 electrophile or a nucleophile, typically present on another molecule, to undergo a transformation. This is in contrast to those groups that require strong catalysts or harsh reaction conditions in order to react (i.e., a "nonreactive" or "inert" group).

The term "protected" or "protecting group" or "protective group" refers to the presence of a moiety (i.e., the protecting group) that prevents or blocks reaction
30 of a particular chemically reactive functional group in a molecule under certain reaction conditions. The protecting group will vary depending upon the type of chemically reactive group being protected as well as the reaction conditions to be

18

employed and the presence of additional reactive or protecting groups in the molecule, if any. Protecting groups known in the art can be found in Greene, T.W., *et al.*, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1999).

5 As used herein, the term "functional group" or any synonym thereof is meant to encompass protected forms thereof.

The term "linker moiety" is used herein to refer to an atom or a collection of atoms optionally used to link interconnecting moieties, such as a polymer segment and an alkanal. The linker moieties of the invention may be hydrolytically stable or
10 may include a physiologically hydrolyzable or enzymatically degradable linkage.

A "physiologically cleavable" or "hydrolyzable" or "degradable" bond is a relatively weak bond that reacts with water (i.e., is hydrolyzed) under physiological conditions. The tendency of a bond to hydrolyze in water will depend not only on the general type of linkage connecting two central atoms but also on the
15 substituents attached to these central atoms. Appropriate hydrolytically unstable or weak linkages include but are not limited to carboxylate ester, phosphate ester, anhydrides, acetals, ketals, acyloxyalkyl ether, imines, orthoesters, peptides and oligonucleotides.

An "enzymatically degradable linkage" means a linkage that is subject to
20 degradation by one or more enzymes.

A "hydrolytically stable" linkage or bond refers to a chemical bond, typically a covalent bond, that is substantially stable in water, that is to say, does not undergo hydrolysis under physiological conditions to any appreciable extent over an extended period of time. Examples of hydrolytically stable linkages
25 include but are not limited to the following: carbon-carbon bonds (e.g., in aliphatic chains), ethers, amides, urethanes, and the like. Generally, a hydrolytically stable linkage is one that exhibits a rate of hydrolysis of less than about 1-2% per day under physiological conditions. Hydrolysis rates of representative chemical bonds can be found in most standard chemistry textbooks.

30 "Alkanal" refers to the aldehyde portion of a water soluble polymer of the invention (CHO), including the carbonyl carbon and any additional methylenes or substituted methylenes (-C(R¹)(R²)- up to the linker moiety connecting the alkanal

portion of the polymer to the polymer segment. In naming an alkanal segment, C1 corresponds to the carbonyl carbon. The term "alkanal" as used herein is meant to encompass hydrate and protected forms of the aldehyde group, as well as chalcogen analogs. One particularly preferred protected form of an alkanal of the invention is an acetal.

"Total number of carbonyls", in reference to certain polymer alkanals of the invention, is the total number of carbonyl groups contained in the polymer alkanal, not counting the aldehyde carbon(s).

"Branched" in reference to the geometry or overall structure of a polymer refers to polymer having 2 or more polymer "arms". A branched polymer may possess 2 polymer arms, 3 polymer arms, 4 polymer arms, 6 polymer arms, 8 polymer arms or more. One particular type of highly branched polymer is a dendritic polymer or dendrimer, that for the purposes of the invention, is considered to possess a structure distinct from that of a branched polymer.

"Branch point" refers to a bifurcation point comprising one or more atoms at which a polymer splits or branches from a linear structure into one or more additional polymer arms.

A "dendrimer" is a globular, size monodisperse polymer in which all bonds emerge radially from a central focal point or core with a regular branching pattern and with repeat units that each contribute a branch point. Dendrimers exhibit certain dendritic state properties such as core encapsulation, making them unique from other types of polymers.

"Substantially" or "essentially" means nearly totally or completely, for instance, 95% or greater of some given quantity.

A "retro-Michael type product" refers to a product arising from the reverse of a Michael-type addition reaction. A Michael addition reaction (forward direction) refers to the addition of a nucleophilic carbon species to an electrophilic double bond. Typically, but not necessarily, the nucleophile is an enolate or an enamine although the nucleophile can also be an alkoxide or an amine or other species. The electrophile is typically an alpha, beta-unsaturated ketone, ester, or nitrile, although other electron-withdrawing groups can also activate a carbon-carbon double bond to nucleophilic attack. A product arising from the reverse (or

16

backwards direction) of a Michael-type addition as described above, that is to say, an elimination reaction resulting in the loss of a nucleophilic carbon species (that may be but is not necessarily an enolate or enamine) and formation of an electrophilic double bond such as an alpha, beta unsaturated ketone or the like as described above is considered a retro-Michael type product. For example, a retro-Michael-type reaction of mPEG-propionaldehyde results in the retro-Michael type products, mPEG-OH and acrolein ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$).

"Alkyl" refers to a hydrocarbon chain, typically ranging from about 1 to 20 atoms in length. Such hydrocarbon chains are preferably but not necessarily saturated and may be branched or straight chain, although typically straight chain is preferred. Exemplary alkyl groups include methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, 1-methylbutyl, 1-ethylpropyl, 3-methylpentyl, and the like. As used herein, "alkyl" includes cycloalkyl when three or more carbon atoms are referenced.

"Lower alkyl" refers to an alkyl group containing from 1 to 6 carbon atoms, and may be straight chain or branched, as exemplified by methyl, ethyl, n-butyl, i-butyl, t-butyl.

"Cycloalkyl" refers to a saturated or unsaturated cyclic hydrocarbon chain, including bridged, fused, or spiro cyclic compounds, preferably made up of 3 to about 12 carbon atoms, more preferably 3 to about 8.

"Non-interfering substituents" are those groups that, when present in a molecule, are typically non-reactive with other functional groups contained within the molecule.

The term "substituted" as in, for example, "substituted alkyl," refers to a moiety (e.g., an alkyl group) substituted with one or more non-interfering substituents, such as, but not limited to: C_3 - C_8 cycloalkyl, e.g., cyclopropyl, cyclobutyl, and the like; halo, e.g., fluoro, chloro, bromo, and iodo; cyano; alkoxy, lower phenyl; substituted phenyl; and the like. For substitutions on a phenyl ring, the substituents may be in any orientation (i.e., ortho, meta, or para).

"Alkoxy" refers to an -O-R group, wherein R is alkyl or substituted alkyl, preferably C_1 - C_{20} alkyl (e.g., methoxy, ethoxy, propyloxy, benzyl, etc.), preferably C_1 - C_7 .

As used herein, "alkenyl" refers to a branched or unbranched hydrocarbon group of 1 to 15 atoms in length, containing at least one double bond, such as ethenyl, n-propenyl, isopropenyl, n-butenyl, isobutenyl, octenyl, decenyl, tetradecenyl, and the like.

5 The term "alkynyl" as used herein refers to a branched or unbranched hydrocarbon group of 2 to 15 atoms in length, containing at least one triple bond, ethynyl, n-propynyl, isopropynyl, n-butylnyl, isobutylnyl, octynyl, decynyl, and so forth.

 "Aryl" means one or more aromatic rings, each of 5 or 6 core carbon atoms.
10 Aryl includes multiple aryl rings that may be fused, as in naphthyl or unfused, as in biphenyl. Aryl rings may also be fused or unfused with one or more cyclic hydrocarbon, heteroaryl, or heterocyclic rings. As used herein, "aryl" includes heteroaryl.

 "Heteroaryl" is an aryl group containing from one to four heteroatoms,
15 preferably N, O, or S, or a combination thereof. Heteroaryl rings may also be fused with one or more cyclic hydrocarbon, heterocyclic, aryl, or heteroaryl rings.

 "Heterocycle" or "heterocyclic" means one or more rings of 5-12 atoms, preferably 5-7 atoms, with or without unsaturation or aromatic character and having at least one ring atom which is not a carbon. Preferred heteroatoms include sulfur,
20 oxygen, and nitrogen.

 "Substituted heteroaryl" is heteroaryl having one or more non-interfering groups as substituents.

 "Substituted heterocycle" is a heterocycle having one or more side chains formed from non-interfering substituents.

25 "Electrophile" refers to an ion, atom, or collection of atoms that may be ionic, having an electrophilic center, i.e., a center that is electron seeking, capable of reacting with a nucleophile.

 "Nucleophile" refers to an ion or atom or collection of atoms that may be ionic, having a nucleophilic center, i.e., a center that is seeking an electrophilic
30 center, and capable of reacting with an electrophile.

 "Active agent" as used herein includes any agent, drug, compound, composition of matter or mixture which provides some pharmacologic, often

beneficial, effect that can be demonstrated *in-vivo* or *in vitro*. This includes foods, food supplements, nutrients, nutraceuticals, drugs, vaccines, antibodies, vitamins, and other beneficial agents. As used herein, these terms further include any physiologically or pharmacologically active substance that produces a localized or systemic effect in a patient.

"Pharmaceutically acceptable excipient" or "pharmaceutically acceptable carrier" refers to an excipient that can be included in the compositions of the invention and that causes no significant adverse toxicological effects to the patient.

"Pharmacologically effective amount," "physiologically effective amount," and "therapeutically effective amount" are used interchangeably herein to mean the amount of a PEG-active agent conjugate present in a pharmaceutical preparation that is needed to provide a desired level of active agent and/or conjugate in the bloodstream or in the target tissue. The precise amount will depend upon numerous factors, e.g., the particular active agent, the components and physical characteristics of pharmaceutical preparation, intended patient population, patient considerations, and the like, and can readily be determined by one skilled in the art, based upon the information provided herein and available in the relevant literature.

"Multi-functional" in the context of a polymer of the invention means a polymer backbone having 3 or more functional groups contained therein, where the functional groups may be the same or different, and are typically present on the polymer termini. Multi-functional polymers of the invention will typically contain from about 3-100 functional groups, or from 3-50 functional groups, or from 3-25 functional groups, or from 3-15 functional groups, or from 3 to 10 functional groups, or will contain 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10 functional groups within the polymer backbone.

A "difunctional" polymer means a polymer having two functional groups contained therein, typically at the polymer termini. When the functional groups are the same, the polymer is said to be homodifunctional. When the functional groups are different, the polymer is said to be heterobifunctional.

A basic or acidic reactant described herein includes neutral, charged, and any corresponding salt forms thereof.

"Polyolefinic alcohol" refers to a polymer comprising an olefin polymer backbone, such as polyethylene, having multiple pendant hydroxyl groups attached to the polymer backbone. An exemplary polyolefinic alcohol is polyvinyl alcohol.

As used herein, "non-peptidic" refers to a polymer backbone substantially
5 free of peptide linkages. However, the polymer may include a minor number of peptide linkages spaced along the repeat monomer subunits, such as, for example, no more than about 1 peptide linkage per about 50 monomer units.

As used herein, "hydrate" refers to a hydrated aldehyde resulting from addition of a water molecule to the aldehyde group, which replaces the carbonyl
10 functionality with two hydroxyl groups. Aldehydes reach equilibrium with the corresponding hydrate in water.

The term "chalcogen analog" refers to aldehyde analogs wherein the oxygen atom is replaced with another heteroatom, generally sulfur, selenium, or tellurium.

The term "patient," refers to a living organism suffering from or prone to a
15 condition that can be prevented or treated by administration of a polymer of the invention, typically but not necessarily in the form of a polymer-active agent conjugate, and includes both humans and animals.

"Optional" or "optionally" means that the subsequently described circumstance may or may not occur, so that the description includes instances
20 where the circumstance occurs and instances where it does not.

THE POLYMER

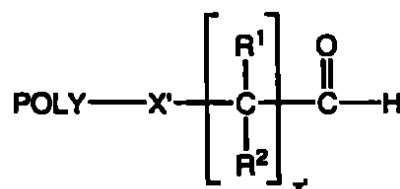
In a first aspect, the invention provides a water-soluble polymer having a reactive aldehyde group. The polymers of the invention are unique in many
25 respects. They are prepared not only in high yield, but are also storage stable due to the absence of deleterious reaction side-products that can lead to polymer chain degradation and poor polymer polydispersity. The polymers, in particular end-capped polymers, are additionally prepared in high purity, e.g., absent detectable amounts of PEG-diol derived and other polymeric impurities. This feature is
30 particularly advantageous for preparing high molecular weight end-capped PEG polymers, e.g., having a molecular weight of about 30 kDa or greater, where the amount of PEG diol impurity in raw material such as mPEG can range from about

2% by weight to 30% by weight or greater, depending upon the supplier.

Moreover, in certain embodiments, the polymers of the invention are less reactive than other known polymer aldehydes, making them more discriminatory in conjugation reactions and more stable during transformation, handling, and reaction work-up.

GENERAL STRUCTURAL FEATURES AND ALKANAL PORTION

Generally speaking, the polymer of the invention possesses a polymer segment connected to from about 1 to about 21 contiguous methylenes or substituted methylenes terminating in an aldehyde function (i.e., the alkanal portion) via an interposing linker moiety. A generalized structure corresponding to the polymer of the invention is provided below as Structure I.



Structure I.

In reference to the description above when viewed in conjunction with structure I, the polymer segment is represented by POLY, the linker moiety is represented by X', and the contiguous methylenes (forming an alkylene chain) or substituted methylenes (forming a substituted alkylene chain) are represented by -C(R¹)(R²)-. More specifically, in Structure I, POLY is a water-soluble polymer segment; X' is a linker moiety; and z' is an integer from 1 to about 21. R¹, in each occurrence, is independently H or an organic radical such as alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl. R², in each occurrence, is also independently H or an organic radical such as from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl. Although many of the structures explicitly provided herein are aldehydes, it is to be understood that these same structures and indeed the invention as a whole is meant to extend to the corresponding aldehyde hydrates, aldehydes in protected form, and chalcogen

analogues, where the carbonyl oxygen in structure I is replaced by a sulfur, selenium, or tellurium.

The present invention provides considerable flexibility with regard to the size of the alkylene chain connected to the aldehyde group. The carbon chain length is considered as the carbonyl carbon (C1) plus the number of intervening carbon atoms, (e.g., the total number of Cs comprising the $[-\underline{C}(R^1)(R^2)]_{z'}$ portion of the polymer), connecting the carbonyl carbon to the linker. The carbon chain length is typically 3 to about 22 carbon atoms, or more typically from about 4 to about 13 carbon atoms. In reference to structure I above, this means that the value of z' typically ranges from 2 to about 21, or more typically from about 3 to 12. More explicitly, the value of z' is most typically one of the following: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, or greater. Most preferred are z' values in the range from 2 to about 8. One particularly preferred polymer alkanal of the invention is one where z' is 3.

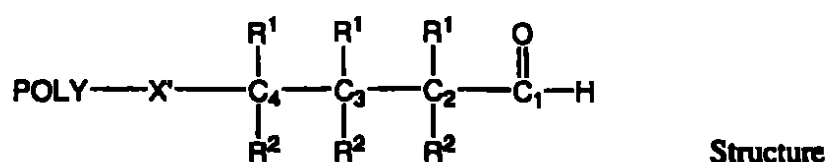
In referring to structure I above, certain types of alkanals are particularly preferred. Such compounds include alkanals as described above having at least one organic radical positioned on at least one "C" in the carbon chain. The organic radical may be any of the organic radicals mentioned above, e.g., alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl, with alkyl being preferred. Typically, the alkyl group is straight chain lower alkyl or branched lower alkyl such as methyl, ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, pentyl, etc., with straight chain being generally preferred. One particularly preferred alkyl substituent is methyl.

Although the alkanal portion of the polymer may possess more than one organic radical positioned on one or more "C"s in the carbon chain, one type of preferred alkanal is one in which only one "C" in the carbon chain is substituted with an organic radical and all other R^1 and R^2 are H. For example, regardless of the length of the alkylene chain, preferred are alkanals where all the R^1 and R^2 variables are H, with the exception that: (i) one of R^1 or R^2 positioned at C-2 is alkyl, or (ii) one of R^1 or R^2 positioned at C-3 is alkyl; or (iii) one of R^1 or R^2 positioned at C-4 is alkyl; or (iv) one of R^1 or R^2 positioned at C-5 is alkyl, and so on. One particularly preferred type of substituent in this regard is lower alkyl such

29

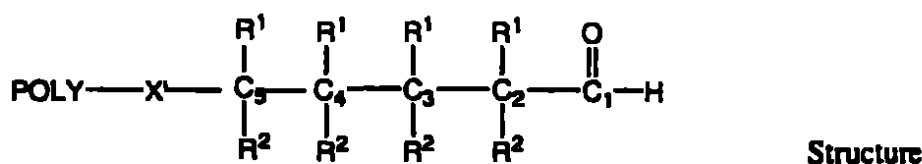
as methyl, ethyl, or propyl. The synthesis of an illustrative 2-methyl substituted alkanal of the invention, mPEG-2-methylbutyraldehyde, is described in Example 17.

In focusing at present on the alkanal portion of the polymer, certain preferred alkanals are shown below.



I-A.

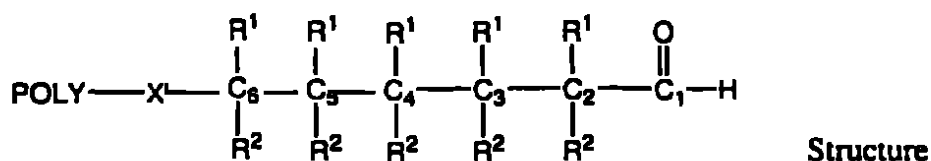
- Structure I-A is one where the value of z' from structure I is 3. This structure, regardless of whether any one or more of C2, C3, or C4 is substituted with an alkyl or other organic radical as described above, is referred to herein as a "butyraldehyde" or as a "butanal". Illustrative polymer butyraldehydes of the invention include those where the alkanal portion of the polymer is 2-methylbutyraldehyde, 3-methylbutyraldehyde, or 4-methylbutyraldehyde, 2-ethylbutyraldehyde, 3-ethylbutyraldehyde, or 4-ethylbutyraldehyde..



I-B.

- Structure I-B is one where the value of z' from structure I is 4. This structure, regardless of whether any one or more of C2, C3, C4, or C5 is substituted with an alkyl or other organic radical as described above, is referred to herein as a "pentanal" or as a "valeraldehyde". Illustrative polymer pentanals of the invention include those where the alkanal portion of the polymer is 2-methylpentanal, 3-methylpentanal, 4-methylpentanal, or 5-methylpentanal. Additional polymer

pentanals include those where the alkanal portion of the polymer is 2-ethylpentanal, 3-ethylpentanal, 4-ethylpentanal, or 5-ethylpentanal.



5 I-C.

Structure I-C is one where the value of z' in structure I is 5. This structure, regardless of whether any one or more of C2, C3, C4, C5 or C6 is substituted with an alkyl or other organic radical as described above, is referred to herein as a "hexanal". Illustrative polymer hexanals of the invention include those where the alkanal portion of the polymer is 2-methylhexanal, 3-methylhexanal, 4-methylhexanal, 5-methylhexanal, 6-methylhexanal, 2-ethylpentanal, 3-ethylpentanal, 4-ethylpentanal, or 5-ethylpentanal.

Additional alkanal components of a polymer of the invention include heptanals, octanals, nonanals, and the like.

THE LINKER MOIETY

In turning now to the linker moiety, a linker moiety or simply "linker" of the invention is represented generally by the variable, X' . The linker moiety is the portion of the overall polymer that links the alkanal portion of the polymer with the polymer segment (to be described in greater detail below). A linker of the invention may be a single atom, such as an oxygen or a sulfur, two atoms, or a number of atoms. A linker is typically but is not necessarily linear in nature. The overall length of the linker will typically range between 1 to about 40 atoms, where by length is meant the number of atoms in a single chain, not counting substituents. For instance, $-\text{CH}_2-$ counts as one atom with respect to overall linker length, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ counts as 3 atoms in length. Preferably, a linker will have a length of about 1 to about 20 atoms, or from about 2 to about 15 atoms.

A linker of the invention can be a single functional group such as an amide, an ester, a urethane, or a urea, or may contain methylene or other alkylene groups flanking either side of the single functional group. Alternatively, a linker may contain a combination of functional groups that can be the same or different.

- 5 Additionally, a linker of the invention can be an alkylene chain, optionally containing one or more oxygen or sulfur atoms (i.e., an ether or thioether). Preferred linkers are those that are hydrolytically stable. When viewed in the context of structure I, a linker is one that when considered as part of the overall polymer, does not result in an overall structure containing a peroxide bond (-O-O-) or an -N-O- or -O-N- bond.

Illustrative linkers, X' , are those corresponding to either of the following structures:



15

In referring to the linker structures above, the variable "c" ranges from zero to 8; "D" is O, NH, or S; the variable "e" is 0 or 1; the variable "f" ranges from zero to 8; the variable "p" ranges from zero to 8; "M" is -NH or O; "K" is NH or O; the variable "q" ranges from zero to 8, and the variables "r" and "s" are each

20 independently 0 or 1.

- In the context of structure I, a linker of the invention, X' , may be any of the following: -O-, -NH-, -S-, -C(O)-, C(O)-NH, NH-C(O)-NH, O-C(O)-NH, -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-, -CH₂-O-,
- 25 -O-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-,
- 30 -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-,

- CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-,
 -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH₂-, -CH₂-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-
 C(O)-O-CH₂-, -C(O)-O-CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-,
 -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂,
 5 -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-,
 -O-C(O)-NH-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -NH-CH₂-, -NH-CH₂-CH₂-,
 -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-, -C(O)-CH₂-, -C(O)-CH₂-CH₂-,
 -CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-,
 -CH₂-CH₂-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-,
 10 -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-,
 -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, bivalent cycloalkyl group,
 -N(R⁶)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-
 [CH₂]_h-(OCH₂CH₂)_j-, and combinations of two or more of any of the foregoing,
 wherein (h) is 0 to 6, (j) is 0 to 20, R⁶ is H or an organic radical selected from the
 15 group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl,
 substituted alkynyl, aryl and substituted aryl. Other specific linkers have the
 structures: -C(O)NH-(CH₂)₁₋₆NH-C(O)-, or -NHC(O)NH-(CH₂)₁₋₆NH-C(O)- or -
 OC(O)NH-(CH₂)₁₋₆NH-C(O)-, where the subscript values following each methylene
 indicate the possible number of methylenes contained in the linker structure, e.g.,
 20 (CH₂)₁₋₆ means that the linker may contain 1, 2, 3, 4, 5, or 6 methylenes.

For purposes of the present disclosure, however, a series of atoms is not
 considered as a linker moiety when the series of atoms is immediately adjacent to a
 polymer segment, POLY, and the series of atoms is but another monomer such that
 the proposed linker moiety would represent a mere extension of the polymer chain.
 25 For example, given the partial structure "POLY-X'-," where POLY in this instance
 is defined as "CH₃O(CH₂CH₂O)_n-", the linker moiety would not be "-CH₂CH₂O-"
 since such a definition would merely represent an extension of the polymer. That is
 not to say, however, that a linker of the invention cannot possess one or more
 contiguous -CH₂CH₂O- portions. For example, a linker may contain one or more (-
 30 CH₂CH₂O-) subunits flanked on one or both sides by one or a combination of
 illustrative linkers as provided above.

That is to say, a linker as described above can also include an oligomer such as $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$ or $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, where b and g each independently range from 1 to about 20. The applicants have found that the inclusion of such oligomers within the linker can lend stability to the ultimate polymer alkanal product by extending the distance between the aldehyde functionality and any reactive groups contained within the linker. In this way, intramolecular interactions are disfavored, leading to increased yields during preparation and improved stability of the polymer alkanal product. Preferably, the variables b and g range from about 1 to 10, or in certain instances, range between about 1 to 6. The synthesis of an illustrative polymer alkanal having four contiguous $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$ units in the linker is described in Example 5.

Additional examples of specific linkers containing $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$ or $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$ oligomeric segments are shown below, where X' includes or is defined by the following:



In the illustrative structures above, P and T are each independently $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$ or $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, b and g are each independently 1 to 20, and the remaining variables are as defined above. Examples of preferred linkers of this sort are $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$, $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, and $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$.

In certain instances, for example, when POLY represents a linear polymer segment, then preferably the total number of carbonyls present in the polymer alkanal is 0 or 2 or greater, where the total number of carbonyls does not include the aldehyde carbonyl(s). However, when the linker, X' includes one or more contiguous $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$ segments, then preferably the total number of carbonyls present in the polymer alkanal is 0, or 1, or 2, or 3, or greater.

Referring back to structure I, in another preferred embodiment of the invention, when X' is oxygen or includes at least one $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$ segment, and z' ranges from 2 to 12, then at least one of R^1 or R^2 in at least one occurrence is an organic radical as defined above or alternatively, the polymer is heterobifunctional.

In such an instance where the polymer is heterobifunctional, the polymer segment, POLY, preferably possesses a reactive group at one terminus that is not hydroxy.

Preferably, the linker is hydrolytically stable, and may contain one or more of the following functional groups: amide, urethane, ether, thioether, or urea.

5 However, hydrolytically degradable linkages, such as carboxylate ester, phosphate ester, orthoester, anhydride, imine, acetal, ketal, oligonucleotide, or peptide, may also be present in a linker of the invention. Heteroatom linkers such as O or S, are particularly preferred, as are linkers containing oligomeric $-(CH_2CH_2O)_n-$ or $-(CH_2CH_2NH)_n$ segments as described above.

10

THE POLYMER SEGMENT/POLYMERS FOR PREPARING A POLYMER ALKANAL

As shown in the illustrative structures above, a polymer alkanal of the invention contains a water-soluble polymer segment. Representative POLYs include poly(alkylene glycols) such as poly(ethylene glycol), poly(propylene glycol) ("PPG"), copolymers of ethylene glycol and propylene glycol, poly(olefinic alcohol), poly(vinylpyrrolidone), poly(hydroxyalkylmethacrylamide),
15 poly(hydroxyalkylmethacrylate), poly(saccharides), poly(α -hydroxy acid), poly(vinyl alcohol), polyphosphazene, polyoxazoline, poly(N-acryloylmorpholine). POLY can be a homopolymer, an alternating copolymer, a random copolymer, a block copolymer, an alternating tripolymer, a random tripolymer, or a block tripolymer of any of the above. The water-soluble polymer segment is preferably, although not necessarily, a poly(ethylene glycol) or "PEG" or a derivative thereof.

The polymer segment can have any of a number of different geometries, for example, POLY can be linear, branched, or forked. Most typically, POLY is linear
25 or is branched, for example, having 2 polymer arms. Although much of the discussion herein is focused upon PEG as an illustrative POLY, the discussion and structures presented herein can be readily extended to encompass any of the water-soluble polymer segments described above.

Any water-soluble polymer having at least one reactive terminus can be
30 used to prepare a polymer alkanal in accordance with the invention and the invention is not limited in this regard. Although water-soluble polymers bearing only a single reactive terminus can be used, polymers bearing two, three, four, five,

92

six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve or more reactive termini suitable for conversion to a polymer alkanal as set forth herein can be used. Advantageously, as the number of hydroxyl or other reactive moieties on the water-polymer segment increases, the number of available sites for introducing an alkanal group increases.

- 5 Nonlimiting examples of the upper limit of the number of hydroxyl and/or reactive moieties associated with the water-soluble polymer segment include 500, 100, 80, 40, 20, and 10.

In turning now to the preferred POLY, PEG, "PEG" includes poly(ethylene glycol) in any of its linear, branched or multi-arm forms, including end-capped
10 PEG, forked PEG, branched PEG, pendant PEG, and PEG containing one or more degradable linkage separating the monomer subunits, to be more fully described below.

To prepare a polymer alkanal of the invention, one commonly used PEG starting material is free PEG, a linear polymer terminated at each end with hydroxyl
15 groups:



The above polymer, alpha-omega-dihydroxypoly(ethylene glycol), can be represented in brief form as HO-PEG-OH, and is also referred to herein as PEG-diol, where "-PEG-" in "HO-PEG-OH" corresponds to:



and (n) typically ranges from about 3 to about 4,000, or from about 3 to about 3,000, or more preferably from about 20 to about 1,000. In reference to structure I, POLY may for example, be a hydroxy-terminated PEG such as HO-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_{n-1}-CH₂CH₂-.

25 Another type of PEG useful for preparing the polymer alkanals of the invention is end-capped PEG, where PEG is terminally capped with an inert end-capping group. Preferred end-capped PEGs are those having as an end-capping moiety a group such as

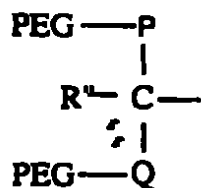
alkoxy, substituted alkoxy, alkenyloxy, substituted alkenyloxy, alkynyloxy, substituted alkynyloxy, aryloxy, substituted aryloxy. Preferred are end-capping groups such as methoxy, ethoxy, and benzyloxy.

Referring now to structures I and I-A through I-C, POLY, in certain
 5 embodiments, either is or comprises a poly(ethylene glycol) corresponding to the structure:



10 where n ranges from about 3 to about 4000, or from about 10 to about 4000, and Z is or includes a functional group such as hydroxy, amino, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, isothiocyanate, hydrazide, maleimide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodoacetamide, alkoxy, benzyloxy, silane, lipid,
 15 phospholipid, biotin, and fluorescein. Again, the POLY structures shown immediately above may represent linear polymer segments, or may form part of a branched or forked polymer segment. In an instance where the polymer segment is branched, the POLY structures immediately above may, for example, correspond to the polymer arms forming part of the overall POLY structure. Alternatively, in an
 20 instance where POLY possesses a forked structure, the above POLY structure may, for example, correspond to the linear portion of the polymer segment prior to the branch point.

POLY may also correspond to a branched PEG molecule having 2 arms, 3 arms, 4 arms, 5 arms, 6 arms, 7 arms, 8 arms or more. Branched polymers used to
 25 prepare the polymer alkanals of the invention may possess anywhere from 2 to 300 or so reactive termini. Preferred are branched polymer segments having 2 or 3 polymer arms. An illustrative branched POLY, as described in U.S. Patent No. 5,932,462, corresponds to the structure:



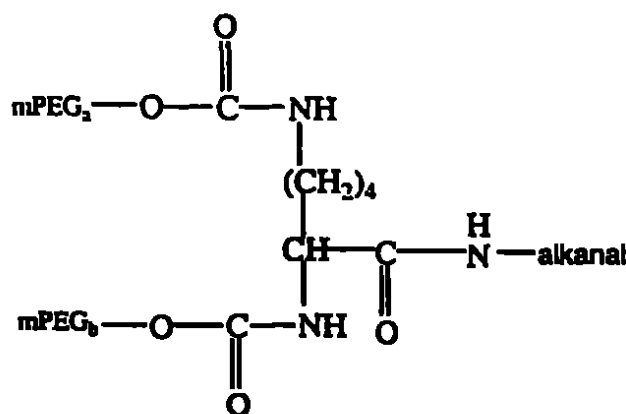
23

In this representation, R" is a nonreactive moiety, such as H, methyl or a PEG, and P and Q are nonreactive linkages. In a preferred embodiment, the branched PEG polymer segment is methoxy poly(ethylene glycol) disubstituted lysine.

In the above particular branched configuration, the branched polymer segment possesses a single reactive site extending from the "C" branch point for positioning of the reactive alkanal group via a linker. Branched PEGs such as these for use in the present invention will typically have fewer than 4 PEG arms, and more preferably, will have 2 or 3 PEG arms. Such branched PEGs offer the advantage of having a single reactive site, coupled with a larger, more dense polymer cloud than their linear PEG counterparts.

One particular type of branched PEG alkanal corresponds to the structure: (MeO-PEG-)_iG-X'-alkanal, where i equals 2 or 3, and G is a lysine or other suitable amino acid residue.

An illustrative branched polymer alkanal of the invention has the structure shown below:

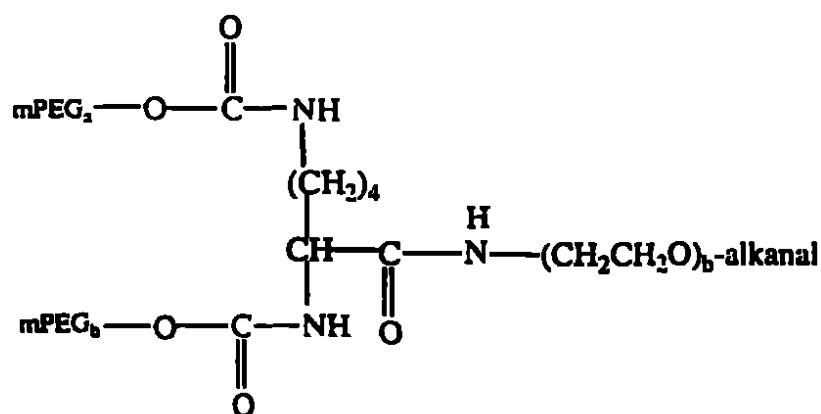


Structure V-A.

20

In this instance, the linker corresponds to C(O)-NH, optionally containing an oligomeric -(CH₂CH₂O)_b- or -(CH₂CH₂NH)_g- segment positioned between the amide nitrogen and the alkanal portion of the polymer as shown in Structure V-B below. Exemplary oligomeric segments will possess b or g values ranging from

about 1 to about 40, or from about 1 to about 30. Preferably b or g possess values of around 20 or less. Preferably, b or g will have one of the following values: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or greater. In a particularly preferred embodiment, b or g ranges from 2 to 6, and mPEG₃ and mPEG₆ are the same or are different.



5

Structure V-B.

Certain embodiments are preferred for polymer alkanals having a branched structure. For example, in one particular embodiment, for example when POLY in Structure I is branched, then at least one of R¹ or R² in at least one occurrence is an organic radical as defined above. In alternative preferred embodiment, for example, when POLY in Structure I is branched, then X' includes -(CH₂CH₂O)_b- where b is from 1 to about 20, in the instance where POLY comprises a lysine residue. On occasions when POLY has 2 polymer arms, it is preferable that neither polymer arm comprises oxygen as the only heteroatom in the instance where POLY comprises "C-H" as a branch point.

Branched PEGs for use in preparing a polymer alkanal of the invention additionally include those represented more generally by the formula G(PEG)_n, where G is a central or core molecule from which extends 2 or more PEG arms. The variable n represents the number of PEG arms, where each of the polymer arms can independently be end-capped or alternatively, possess a reactive functional group at its terminus, such as an alkanal or other reactive functional group. Branched PEGs such as those represented generally by the formula, G(PEG)_n, above possess 2 polymer arms to about 300 polymer arms (i.e., n ranges from 2 to about 300). Branched PEGs such as these preferably possess from 2 to about 25

25

polymer arms, more preferably from 2 to about 20 polymer arms, and even more preferably from 2 to about 15 polymer arms or fewer. Most preferred are multi-armed polymers having 3, 4, 5, 6, 7 or 8 arms.

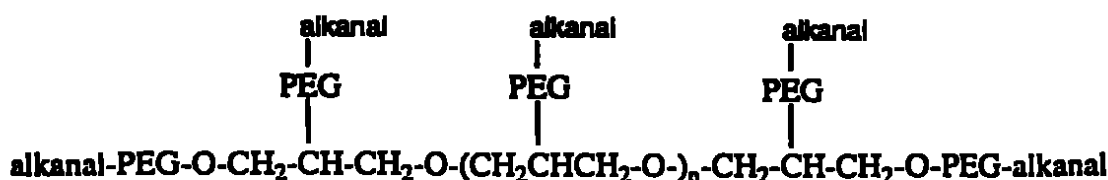
Preferred core molecules in branched PEGs as described above are polyols.

- 5 Such polyols include aliphatic polyols having from 1 to 10 carbon atoms and from 1 to 10 hydroxyl groups, including ethylene glycol, alkane diols, alkyl glycols, alkylidene alkyl diols, alkyl cycloalkane diols, 1,5-decalindiol, 4,8-bis(hydroxymethyl)tricyclodecane, cycloalkylidene diols, dihydroxyalkanes, trihydroxyalkanes, and the like. Cycloaliphatic polyols may also be employed,
- 10 including straight chained or closed-ring sugars and sugar alcohols, such as mannitol, sorbitol, inositol, xylitol, quebrachitol, threitol, arabitol, erythritol, adonitol, dulcitol, facose, ribose, arabinose, xylose, lyxose, rhamnose, galactose, glucose, fructose, sorbose, mannose, pyranose, altrose, talose, tagitose, pyranosides, sucrose, lactose, maltose, and the like. Additional aliphatic polyols include
- 15 derivatives of glyceraldehyde, glucose, ribose, mannose, galactose, and related stereoisomers. Other core polyols that may be used include crown ether, cyclodextrins, dextrans and other carbohydrates such as starches and amylose. Preferred polyols include glycerol, pentaerythritol, sorbitol, and trimethylolpropane.

Multi-armed PEGs for use in preparing a polymer alkanal of the invention

20 include multi-arm PEGs available from Nektar, Huntsville, Alabama. In a preferred embodiment, a multi-armed polymer alkanal of the invention corresponds to the following, where the specifics of the alkanal portion of the molecule are provided elsewhere herein.

25

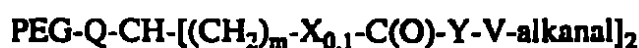


$n=0$ to 4

Structure XIII-A.

Alternatively, the polymer alkanal may possess an overall forked structure. An example of a forked PEG corresponds to the structure: PEG-Y-CH-(X'-[C(R¹)(R²)]_x-CHO)₂, where PEG is any of the forms of PEG described herein. Y is a linking group, preferably a hydrolytically stable linkage, and the other variables corresponding to the linker and the alkanal portion are as defined above.

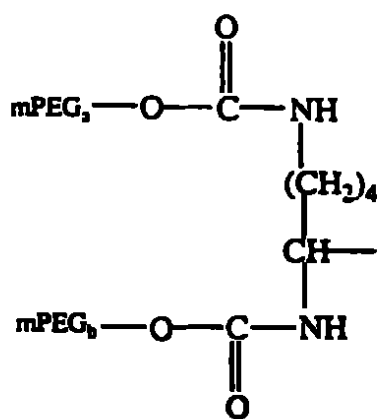
Additional illustrative forked PEG alkanals derivatives correspond to the following:



Structure XIII-

B.

where PEG is any of the forms of PEG described herein. Q is a hydrolytically stable linkage, such as oxygen, sulfur, or -C(O)-NH-; m ranges from 1 to 10, (that is, m can equal 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10) but is preferably m is 1, 2, 3, or 4; X is an optional atom, and when present, is O or N; Y is NH or O; and V is an optional oligomeric segment such as -(CH₂CH₂O)_b- or (CH₂CH₂NH)_b- as described previously. An exemplary branched PEG corresponding to "PEG" in the above formula is mPEG disubstituted lysine, where "PEG" corresponds to:



Alternatively, the PEG polymer segment for use in preparing a polymer alkanal of the invention may be a PEG molecule having pendant reactive groups along the length of the PEG chain rather than at the end(s), to yield a polymer

25

alkanal having one or more pendant alkanal groups attached to the PEG chain by a linker, X'.

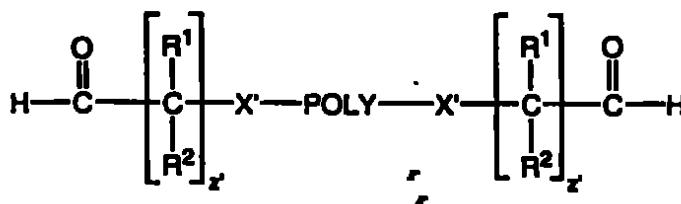
Further, the polymer segment may possess one or more weak or degradable linkages, such as ester linkages that are subject to hydrolysis. Other hydrolytically degradable linkages that may be contained in POLY include carbonate, imine, phosphate ester, and hydrazone.

Generally, the nominal average molecular mass of the water-soluble polymer segment, POLY will vary. The nominal average molecular mass of POLY typically falls in one or more of the following ranges: about 100 daltons to about 100,000 daltons; from about 500 daltons to about 80,000 daltons; from about 1,000 daltons to about 50,000 daltons; from about 2,000 daltons to about 25,000 daltons; from about 5,000 daltons to about 20,000 daltons. Exemplary nominal average molecular masses for the water-soluble polymer segment POLY include about 1,000 daltons, about 5,000 daltons, about 10,000 daltons, about 15,000 daltons, about 20,000 daltons, about 25,000 daltons, about 30,000 daltons, and about 40,000 daltons. Low molecular weight POLYs possess molecular masses of about 250, 500, 750, 1000, 2000, or 5000 daltons.

REPRESENTATIVE POLYMER ALKANALS

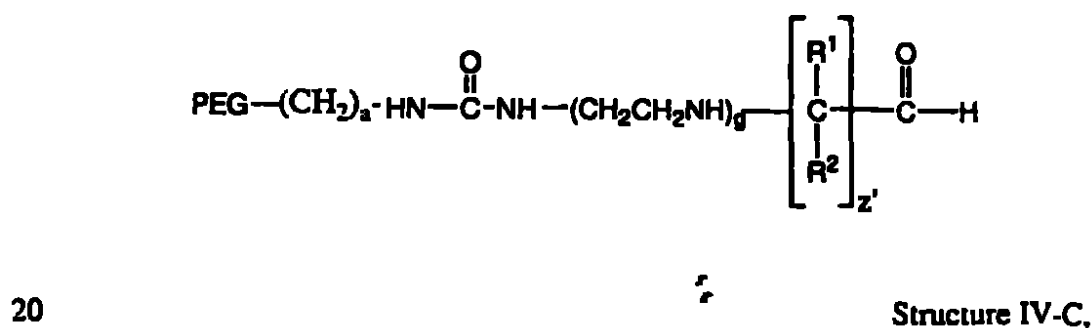
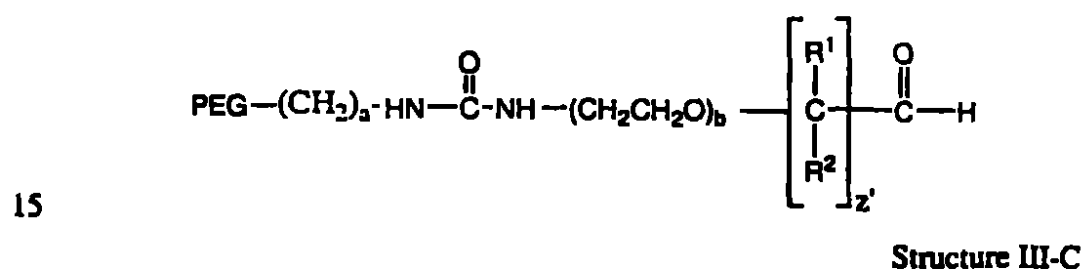
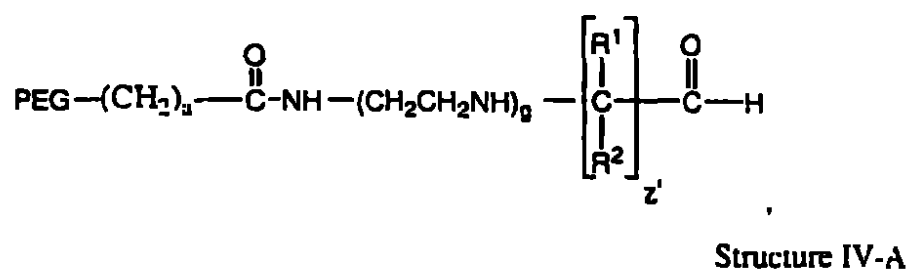
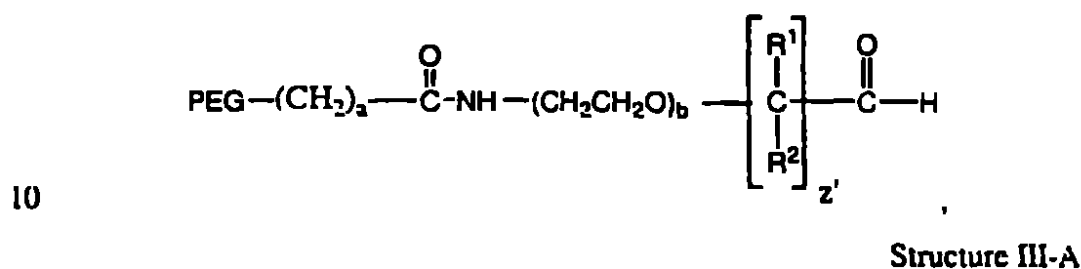
Following the general description above, the following are some illustrative structures demonstrating preferred polymer alkanals in accordance with the invention.

For example, the polymer alkanal of the invention, when linear, may possess a homobifunctional or heterobifunctional structure according to structure II below. A homobifunctional structure according to the structure below is one where both termini are the same.



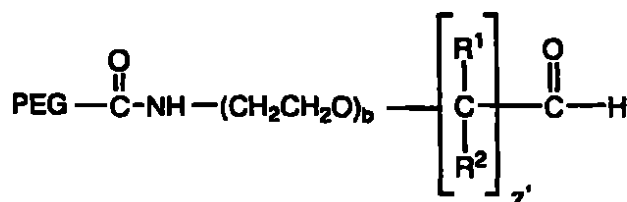
Structure II.

Preferred values for X' and $-CR^1R^2-$ are as set forth above. Particularly preferred structures in accordance with structure II are those in which POLY is poly(ethylene glycol), and X' is $-O-C(O)-NH-$, $-C(O)-NH-$, $-NH-C(O)-NH-$, $-O-C(O)-NH-(CH_2CH_2O)_b-$, $-C(O)-NH-(CH_2CH_2O)_b-$, or $-NH-C(O)-NH-(CH_2CH_2O)_b-$, and z' ranges from 2 to about 12, and is more preferably 2, 3, 4, 5, or 6. More specifically, representative polymer alkanals of the invention include the following:



wherein PEG is poly(ethylene glycol), b and g are each independently 0 to 20, a is 0 to 6, and the remaining variables are as defined previously. Preferred are structures in which b and g range from 1 to 8 or alternatively range from 1 to about 6. Although z' ranges from 1 to about 21, preferred are structures in which z' ranges from 2 to 6, e.g., is 3 or 4.

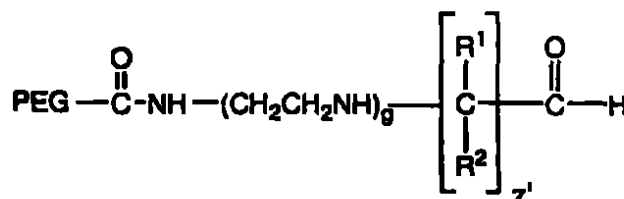
Structural representations of two polymer alkanals where the variable "a" (as shown in the structures immediately above) is zero are provided below.



10

Structure III-B.

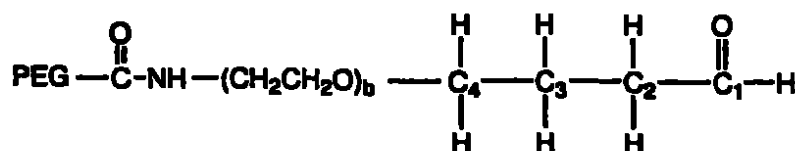
or



15

Structure IV-B.

An illustrative polymer butanal possesses the structure:

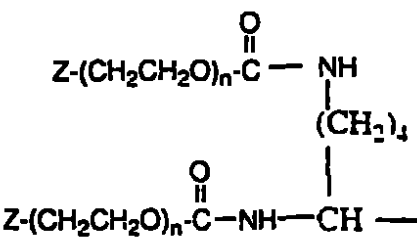


20

Structure III-D.

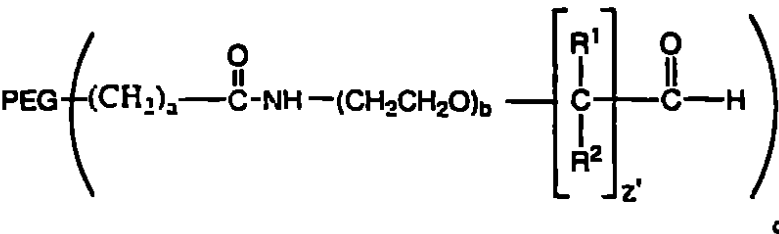
Particularly preferred PEGs corresponding to Structure III-D above include Z-(CH₂CH₂O)_n- or

r



Additional branched structures in accordance with the invention are as follows, where b is typically 0 to 20, s is typically 0 to 6, and d is 1, 2 or 3.

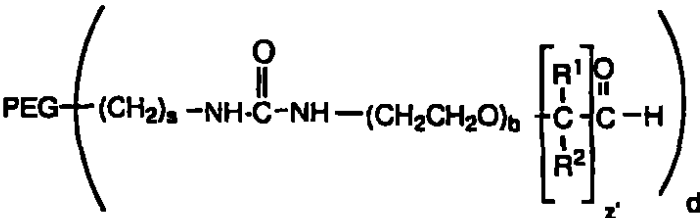
5



Structure VI-A

or

10

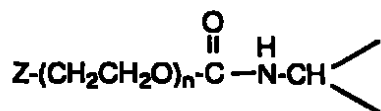


Structure VI-B

In Structures VI-A and B above, PEG can be linear or branched. Preferably, R¹ and R² in each occurrence are H, and z' ranges from 3 to 12, and is even more preferably 3, 4, 5, or 6. As one example, a polymer in accordance with Structure VI-B is one where

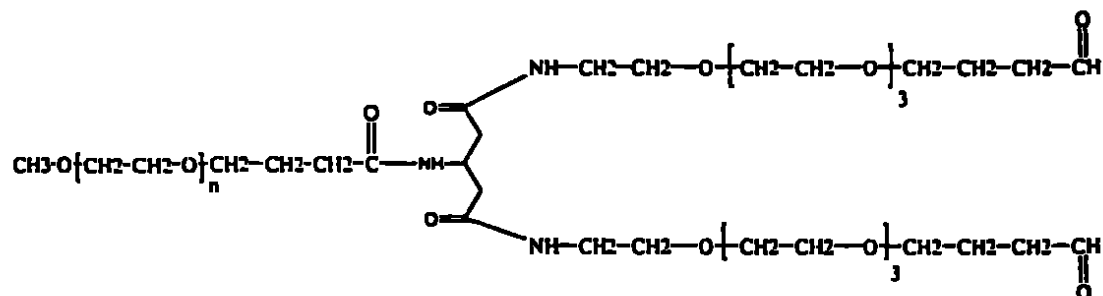
27

PEG corresponds to the structure:



5 where Z is an end-capping or functional group as described previously.

Another illustrative polymer alkanal of the invention possesses the structure shown below:

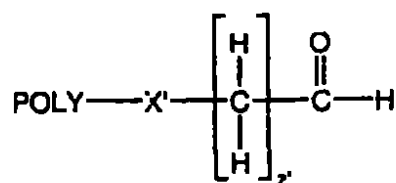


10

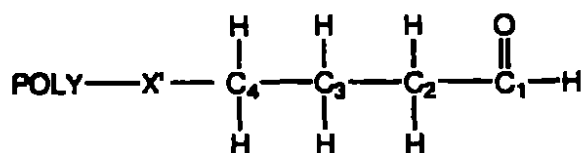
Structure XIV

In the above embodiment, the polymer alkanal also has a forked structure and is suitable for covalent attachment to two biologically active agents. The above structure contains, in the portions extending from the -CH-branch point, a linker containing oligomeric $-(CH_2CH_2O)-$ segments, where the number of such segments in each portion is 3. The number of such oligomeric segments in the above structure can be varied in accordance with the generalized description provided above.

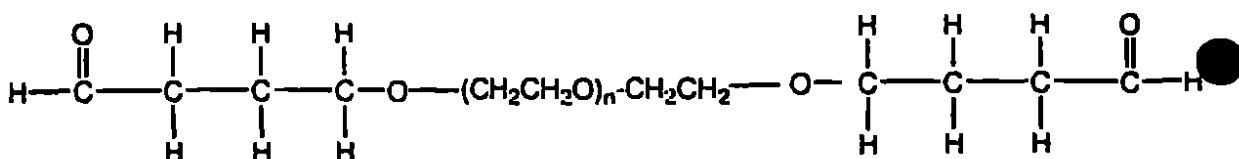
20 Further exemplary polymer alkanal structures include the following, where the variables have been previously defined:



Structure VII



Structure VII-A



Structure VIII.

Preferably, any one of the above structures is provided as a composition having one or more of the unique composition features described in greater detail below.

FEATURES OF THE POLYMER ALKANAL COMPOSITIONS FORMED AND METHODS OF PREPARATION

The polymer alkanals of the invention possess several advantages over previously prepared polymer aldehydes. First, the polymer alkanals are prepared in very high yields, in part due to the simplicity of the synthetic approach employed, particularly for the alkanals having oxygen as the linker moiety. Moreover, in examining the stability of the butanals of the invention, it was discovered that these types of alkanals are more stable at basic pHs than prior known polymer aldehyde derivatives (e.g., propionaldehydes, acetaldehydes), and are formed without significant or even detectable amounts of retro-Michael type reaction side products. For instance, as demonstrated in Example 3, under basic conditions, mPEG

28

propionaldehyde undergoes a retro-Michael type reaction, producing mPEG-OH and the elimination product, acrolein, in significant quantities (after 24 hours at room temperature and pH 8, nearly 40% of the PEG-propionaldehyde had decomposed). In contrast, mPEG butyraldehyde is significantly more stable under basic conditions, demonstrating essentially no decomposition of this sort under the conditions employed.

Further, the butanal polymer derivative of the invention reaches equilibrium in water with its corresponding hydrate at about 50% hydrate, far lower than the 70% hydrate equilibrium exhibited by propionaldehyde and the 100% hydrate exhibited by acetaldehyde. The lower reactivity of the polymer derivatives of the invention is also evidenced by the markedly greater stability of the derivatives of the invention under basic conditions (see Example 3 below). No acrolein byproduct is observed during conjugation reactions between the aldehyde derivatives of the invention and proteins or other molecules at basic pH. The lower reactivity of the aldehyde derivatives of the invention suggests that the derivatives of the invention are more selective, meaning the inventive derivatives are capable of reacting with greater selectivity or specificity with specific amino groups, particularly N-terminal amino groups, on proteins or peptides, as opposed to non-selective or random reaction with any number of amino groups on a protein or peptide molecule. In many applications, selective N-terminal attachment of the polymer backbone is preferred to better preserve protein conformation and biological activity.

Moreover, the polymer alkanals of the invention are formed from the corresponding acetal precursors by hydrolysis under mild acidic conditions, i.e., under much less harsh acidic conditions than required for either PEG acetaldehyde or PEG propionaldehyde. If desired, such mild conditions allow direct *in situ* conjugation of the polymer derivatives of the invention with proteins, peptides, or other molecular targets without requiring an intervening isolation step. Further, due to the synthetic approaches employed, the polymer alkanals of the invention are also provided in high purity, often absent iodine-containing species or that can promote decomposition of the polymer segment.

Due to the mildness of the synthetic approach employed, and further due to the stable nature of the structures provided herein, the polymer alkanals of the

invention are additionally provided as compositions that are essentially absent retro-Michael type reaction products. Thus, the polymer alkanal compositions provided herein are particularly storage stable, exhibiting very limited amounts if any of polymer decomposition. As an example, based on stability data collected over
5 time, the polymer alkanals of the invention were found to exhibit less than about 10% degradation of the polymer aldehyde group when stored at 40°C for 15 days. This percent degradation was determined by NMR analysis. Additionally, provided are linear mPEG polymer alkanals of the invention that are substantially free of the corresponding PEG-dialkanal (i.e., a homobifunctional PEG impurity arising from
10 the presence of an amount of PEG-diol in the mPEG-OH raw material).

In turning now more specifically to the method for making a polymer alkanal of the invention, a polymer alkanal is generally prepared by reacting a water soluble polymer having at least one reactive group, Y, with a protected alkanal reagent containing a reactive group, K, suitable for displacement by or alternatively,
15 reaction with Y, under conditions effective to form a water soluble polymer alkanal in protected form. Generally, a protected alkanal reagent will possess from about 2 to about 20 carbon atoms. The water soluble polymer alkanal in protected form thus formed is then typically hydrolyzed, for example, under acidic conditions to form the desired water soluble polymer alkanal.

Typically, the coupling reaction (i.e., the coupling of the reactive polymer and the protected alkanal reagent) is carried out in an organic solvent such as toluene, chloroform, methylene chloride, acetonitrile, acetone, dioxane, methanol, and ethanol. The reaction is preferably carried out under an inert atmosphere, at
20 temperatures ranging from about 20°C to about 150°C. Hydrolysis to form the desired alkanal is typically acid-promoted, and is conducted at pHs below 7.0, with preferred pHs ranging from about 3 to about 6.5. Hydrolysis can be carried out at a pH of about 3, 4, 5, or 6, with lower pHs around 3 being preferred.

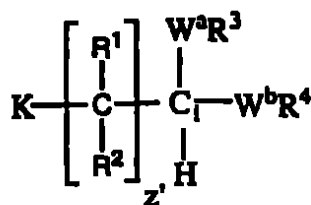
Detailed examples of the synthetic approach outlined above are provided in Examples 1, 2, 5, and 17.

30 Most typically, the coupling of the polymer segment to the protected alkanal reagent proceeds via a Williamson ether synthesis. More specifically, the reactive group Y of the polymer is hydroxyl (which in the presence of a strong base is

converted to its corresponding anionic or alkoxy form), and the reactive group K on the protected alkanal reagent acetal is a good leaving group, such as a halide (preferably Cl⁻ or Br⁻) or methyl sulfate (a sulfonate ester), that can be readily displaced by the oxygen anion positioned at the polymer terminus. The resulting preferred linkage is an ether linkage (O-) connecting POLY to the alkanal.

Following attachment to POLY, the protected alkanal is hydrolyzed at an acidic pH to form the corresponding aldehyde or alkanal functional group. As noted above, the alkanal acetals such as butanal acetal are hydrolyzed under milder conditions than the corresponding propanal or ethanal acetals. For example, when z' is 3 or greater, an alkanal acetal of the invention can be hydrolyzed at a pH of about 3 or 4 or higher, particularly when R¹ and R² in all instances are H. As noted in Examples 2 and 4, the butanal acetal group described therein is hydrolyzed in about 3 hours at a pH of 3. The ability to form this alkanal functional group under mild acidic conditions is advantageous since it enables the *in situ* use of the aldehyde-functionalized polymer for conjugation to a protein or other biologically active molecule following neutralization of the solution containing the polymer alkanal to a suitable pH for conjugation (typically a pH of about 5 to about 10). In contrast, linear polymer propionaldehydes require isolation prior to conjugation due to the quantity of base required to neutralize the low pH solution and the correspondingly greater amount of salts generated during such a neutralization step.

In the method employed, the protected alkanal reagent is typically an acetal such as dimethyl acetal, diethyl acetal, di-isopropyl acetal, dibenzyl acetal, 2,2,2-trichloroethyl acetal, bis(2-nitrobenzyl) acetal, S,S'-dimethyl acetal, and S,S'-diethyl acetal. Alternatively, the acetal may be a cyclic acetal or a cyclic thioacetal. More specifically, the protected alkanal will usually possess a structure as follows:

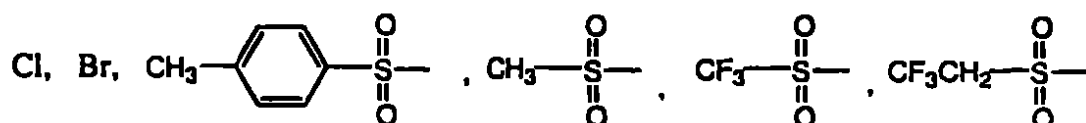


Structure XI-D.

In this structure, z' is an integer from 1 to about 21. As for the polymer aldehydes provided above, R^1 , in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl; and R^2 , in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl. W^a and W^b are each independently O or S, and R^3 and R^4 are each independently H or an organic radical selected from the group consisting of methyl, ethyl, isopropyl, benzyl, 1,1,1-trichloroethyl, and nitrobenzyl, or when taken together, are $-(CH_2)_2-$ or $-(CH_2)_3-$, forming a 5 or 6 membered ring when considered together with W^a , C_1 , and W^b .

Preferably, K is one of the following reactive groups:

15



20

In this method, the polymer alkanal in protected form is typically formed in greater than about 85% yield, and even more preferably in greater than about 90 to 95% yield.

25

Following hydrolysis to obtain the desired aldehyde-functionalized polymer, the product may be isolated if desired by neutralizing the reaction mixture, e.g., raising the pH to from about 6.0 to about 7.5, followed by extraction of the polymer alkanal into an organic solvent, and removing the solvent, e.g., by rotary evaporation, lyophilization, or distillation.

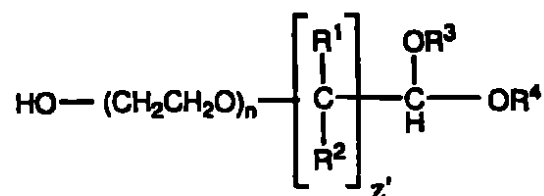
30

Due to the simplicity of this approach that uses neither direct oxidative methods nor iodine-containing species to provide the desired aldehyde function, the products thus formed are highly pure, demonstrate enhanced storage stability in comparison to other known polymer aldehydes, and possess low polydispersity values (less than about 1.5, preferably less than about 1.2, and typically

polydispersities less than about 1.1, 1.08, 1.05, 1.04, and 1.3). Polymers having polydispersities as low as 1.03, 1.02 and 1.01 have been thus prepared.

An isolated polymer alkanal of the invention will preferably have a purity of at least about 95%, based upon polymeric contaminants.

- 5 Examples 1 and 2 illustrate the formation of mPEG polymer alkanals. In instances in which the polymer starting material is PEG-diol, one of the PEG hydroxyl groups is generally protected prior to reaction with the protected alkanal reagent, followed by deprotection subsequent to coupling. All illustrative polymer protected alkanal thus formed is shown by Structure XI-E below.



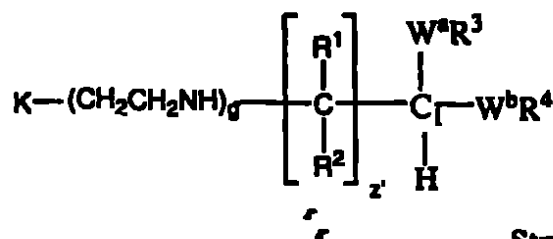
10

Structure XI-E.

- The hydroxy terminus of the PEG can then, if desired, be converted to a functional group to provide either a homobifunctional or a heterobifunctional protected alkanal. Suitable functional groups include amino, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, hydrazide, isothiocyanate, maleimide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodoacetamide, and silane. Preferred are functional groups such as N-hydroxysuccinimidyl ester, benzotriazolyl carbonate, amine, vinylsulfone, and maleimide, N-succinimidyl carbonate, hydrazide, succinimidyl propionate, succinimidyl butanoate, succinimidyl succinate, succinimidyl ester, glycidyl ether, oxycarbonylimidazole, p-nitrophenyl carbonate, aldehyde, orthopyridyl-disulfide, and acryloyl.

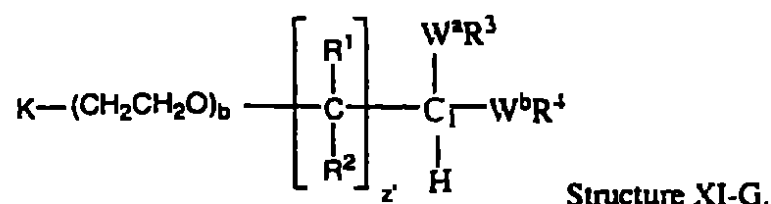
20

Other representative alkanal reagents are described by the structures:



25

Structure XI-F



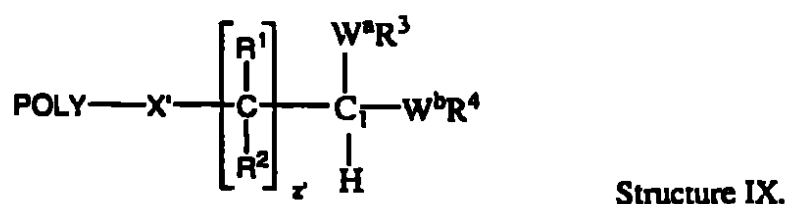
5 In yet another approach, a polymer alkanal of the invention is advantageously prepared from a chromatographically purified POLY-Y. In this way, polymer impurities, if present, and in particular difunctional impurities arising from PEG-diol, are removed to enable formation of an extremely pure polymer alkanal product as previously described. This approach is exemplified in Example

10 5. A summary of the overall synthetic approach employed, its advantages, its applicability to the general methods described herein, as well as specific details of the reactions carried out is provided in Example 5.

Although any chromatographic separation method may used, particularly preferred is ion-exchange chromatography, where the Y in POLY-Y is an ionizable

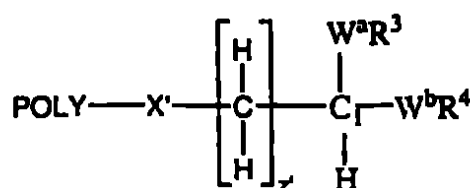
15 group or is a derivative of an ionizable group such as a carboxylic acid, active ester, amine or the like.

Illustrative polymer alkanal acetals of the invention may possess any of the following structures, where the variables have been previously described:



or

or

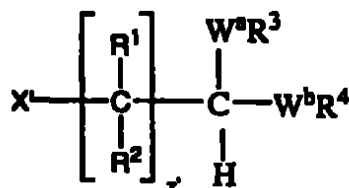


Structure IX-A

In yet another approach for preparing a polymer alkanal of the invention, a polymer alkanal can be prepared by building the polymer segment, POLY, directly onto an acetal precursor, e.g., by direct polymerization. More specifically, in this method, an acetal precursor having at least one active anionic site suitable for initiating polymerization is first provided. The anionic site of the acetal precursor is then contacted with a reactive monomer capable of polymerizing, to thereby initiate polymerization of the reactive monomer onto the acetal precursor. As a result of the contacting step, additional reactive monomers are added to the acetal precursor to form a polymer chain. The contacting is allowed to continue until a desired length of the polymer chain is reached, followed by terminating the reaction to achieve a polymer aldehyde precursor of the invention.

The resulting polymer aldehyde precursor can be further hydrolyzed to the corresponding alkanal as set forth above, if desired. Most preferably, the reactive monomer is ethylene oxide and the reactive anionic site contained within the acetal precursor is an alkoxide anion (O-), preferably accompanied by an alkali metal or other suitable counterion. The alkoxide end group present in the acetal precursor is active for anionic ring opening polymerization of ethylene oxide to form a polymer alkanal of the invention.

More particularly, the acetal precursor will generally possess a structure corresponding to:



where the variables possess the values described above, with the exception that X' terminates in an oxygen anion, or O⁻ (e.g., in its neutral form, X' typically terminates in a hydroxyl group or -OH, that in the presence of a strong base, is converted to the corresponding alkoxide salt). Suitable counterions include Na⁺, K⁺, Li⁺, and Cs⁺. The terminating step generally comprises neutralizing the reaction, e.g., by addition of acid. Optionally, the polymer segment may be capped by addition of an alkylating reagent or other reagent suitable for providing a non-reactive terminus.

In one particular embodiment of the above method, POLY-Y corresponds to the structure Z-(CH₂CH₂O)_nH, wherein n is from about 10 to about 4000, and Z is selected from the group consisting of -OCH₃, -OCH₂CH₃, and -OCH₂(C₆H₅). In a further embodiment, POLY-Y corresponds to the structure Z-(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂O⁻ M⁺, where POLY-Y is prepared by anionic ring-opening polymerization of ethylene oxide onto an end-capped alcoholate salt such as Z-CH₂CH₂O⁻ M⁺, prepared by metallation of the terminal -OH group of Z-CH₂CH₂OH with a strong base. M⁺ represents a metal counterion such as Na⁺, K⁺, Li⁺, Cs⁺, Rb⁺. POLY-Y thus prepared is then suitable for reaction with a protected alkanal reagent as described above.

A generalized scheme outlining this approach is provided herein as FIG. 1, and the conditions for carrying out such a reaction or series of reactions are provided in Example 15.

STORAGE OF POLYMER ALKANAL REAGENTS

Preferably, the polymer alkanals of the invention are stored under an inert atmosphere, such as under argon or under nitrogen, since the aldehyde functionality can react with atmospheric oxygen to produce the corresponding carboxylic acid. Due to the potential for reaction of the aldehyde portion of the molecule with water (e.g., by exposure to moisture to form the corresponding hydrate), it is also preferable to minimize exposure of the polymer alkanals of the invention to moisture. Thus, preferred storage conditions are under dry argon or another dry inert gas at temperatures below about -15 °C. Storage under low temperature conditions reduces the rate of hydrolysis of the polymer aldehyde to the

32

corresponding hydrate form. Additionally, in instances where the polymer segment of the polymer alkanal is PEG, the PEG portion of the alkanal can react slowly with oxygen to form peroxides along the PEG portion of the molecule. Formation of peroxides can ultimately lead to chain cleavage, thus increasing the polydispersity of the PEG alkanal reagent. In view of the above, it is additionally preferred to store the PEG alkanals of the invention in the dark.

BIOLOGICALLY ACTIVE CONJUGATES

10 COUPLING CHEMISTRY CONJUGATION TO PROTEINS - RANDOM AND N-TERMINAL SELECTIVE

The above-described polymer alkanals are useful for conjugation to biologically active agents or surfaces bearing at least one amino group available for reaction. Typically, a PEG aldehyde of the invention is coupled to an amino group by reductive amination, resulting in formation of a secondary amine linkage between the polymer segment and the surface or biologically active agent. In conjugating a polymer alkanal of the invention with an amino-bearing biologically active agent or surface, the polymer alkanal is reacted with the target amino-bearing molecule in a suitable solvent to form the corresponding imine-linked intermediate, which is then reduced to form a secondary amine linkage between the polymer and the biologically active agent or surface. Reduction of the imine to the corresponding amine is accomplished by addition of a reducing agent. Exemplary reducing agents include sodium cyanoborohydride, sodium borohydride, lithium aluminum hydride, and the like.

25 Generally, the polymer aldehydes of the invention can be used to selectively target the modification of the N-terminus under conditions that differentiate the reactivity of the alpha amine at the N-terminal amino acid. Certain polymer alkanals of the invention appear to demonstrate a greater selectivity than previously known aldehyde derivatives and, thus, are more suitable for applications where selective N-terminus protein modification is desired. Reaction conditions for preparing an N-terminally modified protein or peptide include (i) dissolving the protein or peptide to be modified in a non-amine-containing buffer (e.g., at a pH

range from about 4 to about 6.5, preferably from about 5 to 6.5, most preferably at a pH of about 5 to 5.5). (ii) adding to the protein or peptide solution a polymer alkanal of the invention, (iii) allowing the protein or peptide and polymer alkanal to react to form the imine-coupled polymer conjugate, followed by (iv) addition of a
5 reducing agent to form the corresponding secondary amine coupled polymer conjugate. Reaction conditions for random attachment of a polymer alkanal are essentially identical to those described above, with the exception that the pH is somewhat higher (to be discussed in greater detail below).

To favor N-terminus modification, a pH of about 5 to 5.5 is most preferred
10 since it is believed to facilitate selective N-terminus modification due to differences in the pKa value of the amino group of an N-terminal amino acid and the amino group of lysines. Generally speaking, conditions favoring N-terminal selectivity include pHs below 7, and typically not lower than about 4. The most favorable pH for promoting N-terminal selectivity can be determined by one skilled in the art,
15 and will depend upon the particular protein to be modified. Suitable buffers for conducting conjugation include sodium phosphate, sodium acetate, sodium carbonate, and phosphate buffered saline (PBS). Typically, the polymer alkanal is added to the protein-containing solution at an equimolar amount or at a molar excess relative to target protein. The polymer alkanal is added to the target protein
20 at a molar ratio of about 1:1 (polymer alkanal:protein), 1.5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1, or 10:1. Molar excesses of PEG-alkanal relative to target protein are typically in the range of about 2 to 5. The reductive amination reaction is typically carried out at temperatures at or below about room temperature (25°C), although temperatures may range from about -15° C to about 100° C, more preferably from
25 about 4° C to 37° C, for approximately one to twenty four hours. The reducing agent is also typically added in excess, that is to say, in amounts ranging from about a 2-fold to a 30-fold molar excess relative to polymer-protein conjugate. Preferred is to add the reducing agent in a 10-fold to 20-fold molar excess relative to polymer-protein conjugate. The exact reaction time is determined by monitoring
30 the progress of the reaction over time. Progress of the reaction is typically monitored by withdrawing aliquots from the reaction mixture at various time points and analyzing the reaction mixture by SDS-PAGE or MALDI-TOF mass

spectrometry or any other suitable analytical method. The resulting pegylated conjugates are further characterized using analytical methods such as MALDI, capillary electrophoresis, gel electrophoresis, and/or chromatography.

More specifically, to couple an aldehyde polymer derivative to a protein or peptide, a number of different approaches may be employed. One approach (i.e., a random pegylation approach) is to covalently attach PEG to any number of lysine residues that are surface accessible. To conduct such a reaction, a protein or peptide (such as those exemplary biomolecules provided below) is typically reacted with a polymer alkanal of the invention in a non amine-containing buffer at mild pHs generally ranging from about 5 to 8. (Non-amine containing buffers are preferred since the amino-groups in the buffer can compete with protein amino groups for coupling to the polymer alkanal). A suitable non-amine containing buffer is selected having an appropriate pK for the desired pH range for conducting the conjugation chemistry. The coupling reaction generally takes anywhere from minutes to several hours (e.g., from 5 minutes to 24 hours or more), and on average, coupling is achieved between about 0.2 and 4 hours to form the imine-coupled conjugate. To the reaction mixture is then added any one of a number of suitable reducing agents as described above (e.g., sodium cyanoborohydride). The resulting mixture is then generally allowed to react under low to ambient temperature conditions, e.g., 4° C to 37° C for about one hour to 48 hrs. Preferably, the reduction reaction is complete in less than about 24 hours. Random coupling is favored at pHs around 7 to 7.5 or so, while coupling at the N-terminal is favored at low pHs (e.g., around 5.5 or so).

To increase the degree of modification, that is, to promote an increase in the number of PEGs that are covalently attached at available sites on the target molecule, any one or more of the above described conditions (e.g., molar ratio of polymer alkanal to protein or peptide, temperature, reaction time, pH, etc.) can be increased, either independently or simultaneously. Regardless of the molecular weight of the PEG alkanal employed, the resulting product mixture is preferably but not necessarily purified to separate out excess reagents, unpegylated protein (or any target molecule), multi-pegylated conjugates, and free or unreacted PEG alkanal.

The random pegylation of illustrative proteins is provided in Examples 4 and 6. Site selective pegylation of illustrative proteins is described in Examples 7 to 13.

5 CHARACTERIZATION/OPTIONAL SEPARATION OF PEG-MERS

Optionally, conjugates produced by reacting a PEG aldehyde of the invention with a biologically active agent are purified to obtain/isolate different PEGylated species. Alternatively, and more preferably for lower molecular weight PEGs, e.g., having molecular weights less than about 20 kilodaltons, preferably less
10 than or equal to about 10 kilodaltons, the product mixture can be purified to obtain a distribution around a certain number of PEGs per protein molecule. For example, the product mixture can be purified to obtain an average of anywhere from one to five PEGs per protein, typically an average of about 3 PEGs per protein. The strategy for purification of the final conjugate reaction mixture will depend upon a
15 number of factors - the molecular weight of the polymer employed, the particular protein, the desired dosing regimen, and the residual activity and in vivo properties of the individual conjugate(s) species.

If desired, PEG conjugates having different molecular weights can be isolated using gel filtration chromatography. That is to say, gel filtration
20 chromatography is used to fractionate different PEG-mers (1-mer, 2-mer, 3-mer, etc.) on the basis of their differing molecular weights (where the difference corresponds essentially to the average molecular weight of the PEG chains). For example, in an exemplary reaction where a 100 kDa protein is randomly conjugated to a PEG alkanal having a molecular weight of about 20 kDa, the resulting reaction
25 mixture will likely contain unmodified protein (MW 100 kDa), mono-pegylated protein (MW 120 kDa), di-pegylated protein (MW 140 kDa), etc. While this approach can be used to separate PEG conjugates having different molecular weights, this approach is generally ineffective for separating positional isomers having different pegylation sites within the protein. For example, gel filtration
30 chromatography can be used to separate from each other mixtures of PEG 1-mers, 2-mers, 3-mers, etc., although each of the recovered PEG-mer compositions may

34

contain PEGs attached to different reactive amino groups (e.g., lysine residues) within the protein.

Gel filtration columns suitable for carrying out this type of separation include Superdex™ and Sephadex™ columns available from Amersham Biosciences. Selection of a particular column will depend upon the desired fractionation range desired. Elution is generally carried out using a non-amine based buffer, such as phosphate, acetate, or the like. The collected fractions may be analysed by a number of different methods, for example, (i) OD at 280 nm for protein content, (ii) BSA protein analysis, (iii) iodine testing for PEG content (Sims G. E. C., *et al.*, *Anal. Biochem*, 107, 60-63, 1980), or alternatively, (iv) by running an SDS PAGE gel, followed by staining with barium iodide.

Separation of positional isomers is carried out by reverse phase chromatography using an RP-HPLC C18 column (Amersham Biosciences or Vydac) or by ion exchange chromatography using an ion exchange column, e.g., a Sepharose™ ion exchange column available from Amersham Biosciences. Either approach can be used to separate PEG-biomolecule isomers having the same molecular weight (positional isomers).

STORAGE

Depending upon the intended use for the resulting PEG-conjugates, following conjugation, and optionally additional separation steps, the conjugate mixture may be concentrated, sterile filtered, and stored at low temperatures from about -20 °C to about -80 °C. Alternatively, the conjugate may be lyophilized, either with or without residual buffer and stored as a lyophilized powder. In some instances, it is preferable to exchange a buffer used for conjugation, such as sodium acetate, for a volatile buffer such as ammonium carbonate or ammonium acetate, that can be readily removed during lyophilization, so that the lyophilized protein conjugate powder formulation is absent residual buffer. Alternatively, a buffer exchange step may be used using a formulation buffer, so that the lyophilized conjugate is in a form suitable for reconstitution into a formulation buffer and ultimately for administration to a mammal.

SMALL MOLECULE CONJUGATION

The conjugation of a PEG-alkanal of the invention to a small molecule such as amphotericin B is conducted generally as described in Example 14, although precise reaction conditions will vary according to the small molecule being
5 modified. Typically, the conjugation is conducted using a slight molar excess of PEG reagent relative to small molecule, e.g., about 1.2 - 1.5, to about a 5 to 10-fold molar excess. In some instances, depending upon the molecule, the small molecule drug may actually be used in excess, such as when the PEG-small molecule conjugate precipitates in the reaction solvent, e.g., ether, while the unreacted drug
10 remains in solution.

TARGET MOLECULES AND SURFACES

The reactive polymer alkanals of the invention may be attached, either covalently or non-covalently, to a number of entities including films, chemical
15 separation and purification surfaces, solid supports, metal/metal oxide surfaces such as gold, titanium, tantalum, niobium, aluminum, steel, and their oxides, silicon oxide, macromolecules, and small molecules. Additionally, the polymers of the invention may also be used in biochemical sensors, bioelectronic switches, and gates. The polymer alkanals of the invention may also be employed as carriers for
20 peptide synthesis, for the preparation of polymer-coated surfaces and polymer grafts, to prepare polymer-ligand conjugates for affinity partitioning, to prepare cross-linked or non-cross-linked hydrogels, and to prepare polymer-cofactor adducts for bioreactors.

A biologically active agent for use in coupling to a polymer of the invention
25 may be any one or more of the following. Suitable agents may be selected from, for example, hypnotics and sedatives, psychic energizers, tranquilizers, respiratory drugs, anticonvulsants, muscle relaxants, antiparkinson agents (dopamine antagonists), analgesics, anti-inflammatories, antianxiety drugs (anxiolytics), appetite suppressants, antimigraine agents, muscle contractants, anti-infectives
30 (antibiotics, antivirals, antifungals, vaccines) antiarthritics, antimalarials, antiemetics, anepileptics, bronchodilators, cytokines, growth factors, anti-cancer agents, antithrombotic agents, antihypertensives, cardiovascular drugs,

35

antiarrhythmics, antioxidants, anti-asthma agents, hormonal agents including contraceptives, sympathomimetics, diuretics, lipid regulating agents, antiandrogenic agents, antiparasitics, anticoagulants, neoplastics, antineoplastics, hypoglycemics, nutritional agents and supplements, growth supplements, antienteritis agents,

5 vaccines, antibodies, diagnostic agents, and contrasting agents.

More particularly, the active agent may fall into one of a number of structural classes, including but not limited to small molecules (preferably insoluble small molecules), peptides, polypeptides, proteins, polysaccharides, steroids, nucleotides, oligonucleotides, polynucleotides, fats, electrolytes, and the like.

10 Preferably, an active agent for coupling to a polymer alkanal of the invention possesses a native amino group, or alternatively, is modified to contain at least one reactive amino group suitable for coupling to a polymer alkanal of the invention.

Specific examples of active agents suitable for covalent attachment to a polymer of the invention include but are not limited to asparaginase, amdoxovir
15 (DAPD), antide, becaplermin, calcitonins, cyanovirin, denileukin diftitox, erythropoietin (EPO), EPO agonists (e.g., peptides from about 10-40 amino acids in length and comprising a particular core sequence as described in WO 96/40749), dornase alpha, erythropoiesis stimulating protein (NESP), coagulation factors such as Factor V, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XII,
20 Factor XIII, von Willebrand factor, ceredase, cerezyme, alpha-glucosidase, collagen, cyclosporin, alpha defensins, beta defensins, exedin-4, granulocyte colony stimulating factor (GCSF), thrombopoietin (TPO), alpha-1 proteinase inhibitor, elcatonin, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GMCSF), fibrinogen, filgrastim, growth hormones human growth hormone (hGH), growth hormone
25 releasing hormone (GHRH), GRO-beta, GRO-beta antibody, bone morphogenic proteins such as bone morphogenic protein-2, bone morphogenic protein-6, OP-1; acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, CD-40 ligand, heparin, human serum albumin, low molecular weight heparin (LMWH), interferons such as interferon alpha, interferon beta, interferon gamma, interferon
30 omega, interferon tau, consensus interferon; interleukins and interleukin receptors such as interleukin-1 receptor, interleukin-2, interleukin-2 fusion proteins, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-3, interleukin-4, interleukin-4

receptor, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-12, interleukin-13 receptor, interleukin-17 receptor; lactoferrin and lactoferrin fragments, luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), insulin, pro-insulin, insulin analogues (e.g., mono-acylated insulin as described in U.S. Patent No. 5,922,675), amylin, C-peptide, 5 somatostatin, somatostatin analogs including octreotide, vasopressin, follicle stimulating hormone (FSH), influenza vaccine, insulin-like growth factor (IGF), insulintropin, macrophage colony stimulating factor (M-CSF), plasminogen activators such as alteplase, urokinase, reteplase, streptokinase, pamiteplase, lanoteplase, and tenecteplase; nerve growth factor (NGF), osteoprotegerin, platelet- 10 derived growth factor, tissue growth factors, transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor, leukemia inhibiting factor, keratinocyte growth factor (KGF), glial growth factor (GGF), T Cell receptors, CD molecules/antigens, tumor necrosis factor (TNF), monocyte chemoattractant protein-1, endothelial growth factors, parathyroid hormone (PTH), glucagon-like peptide, somatotropin, thymosin 15 α 1, thymosin α 1 IIb/IIIa inhibitor, thymosin β 10, thymosin β 9, thymosin β 4, α -1 antitrypsin, phosphodiesterase (PDE) compounds, VLA-4 (very late antigen-4), VLA-4 inhibitors, bisphosphonates, respiratory syncytial virus antibody, cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene, deoxyribonuclease (Dnase), bactericidal/permeability increasing protein (BPI), 20 and anti-CMV antibody. Exemplary monoclonal antibodies include etanercept (a dimeric fusion protein consisting of the extracellular ligand-binding portion of the human 75 kD TNF receptor linked to the Fc portion of IgG1), abciximab, afelimomab, basiliximab, daclizumab, infliximab, ibritumomab tiuxetan, mitumomab, muromonab-CD3, iodine 131 tositumomab conjugate, olizumab, 25 rituximab, and trastuzumab (herceptin).

Additional agents suitable for covalent attachment to a polymer of the invention include but are not limited to amifostine, amiodarone, aminocaproic acid, aminohippurate sodium, aminogluthethimide, aminolevulinic acid, aminosalicyclic acid, amsacrine, anagrelide, anastrozole, asparaginase, anthracyclines, bexarotene, 30 bicalutamide, bleomycin, buserelin, busulfan, cabergoline, capecitabine, carboplatin, carmustine, chlorambucin, cilastatin sodium, cisplatin, cladribine, clodronate, cyclophosphamide, cyproterone, cytarabine, camptothecins, 13-cis

36

retinoic acid, all trans retinoic acid; dacarbazine, dactinomycin, daunorubicin, deferoxamine, dexamethasone, diclofenac, diethylstilbestrol, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, estramustine, etoposide, exemestane, fexofenadine, fludarabine, fludrocortisone, fluorouracil, fluoxymesterone, flutamide, gemcitabine, epinephrine, L-Dopa, hydroxyurea, idarubicin, ifosfamide, imatinib, irinotecan, itraconazole, goserelin, letrozole, leucovorin, levamisole, lisinopril, lovothyroxine sodium, lomustine, mechlorethamine, medroxyprogesterone, megestrol, melphalan, mercaptopurine, metaraminol bitartrate, methotrexate, metoclopramide, mexiletine, mitomycin, mitotane, mitoxantrone, naloxone, nicotine, nilutamide, octreotide, oxaliplatin, pamidronate, pentostatin, plicamycin, porfimer, prednisone, procarbazine, prochlorperazine, ondansetron, raltitrexed, sirolimus, streptozocin, tacrolimus, tamoxifen, temozolomide, teniposide, testosterone, tetrahydrocannabinol, thalidomide, thioguanine, thiotepa, topotecan, tretinoin, valrubicin, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine, dolasetron, granisetron; formoterol, fluticasone, leuprolide, midazolam, alprazolam, amphotericin B, podophylotoxins, nucleoside antivirals, aroyl hydrazones, sumatriptan; macrolides such as erythromycin, oleandomycin, troleandomycin, roxithromycin, clarithromycin, davercin, azithromycin, flurithromycin, dirithromycin, josamycin, spiromycin, midecamycin, leucomycin, miocamycin, rokitamycin, andazithromycin, and swinolide A; fluoroquinolones such as ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, alatrofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, enoxacin, grepafloxacin, gatifloxacin, lomefloxacin, sparfloxacin, temafloxacin, pefloxacin, amifloxacin, fleroxacin, tosufloxacin, prulifloxacin, irloxacin, pazufloxacin, clinafloxacin, and sitafloxacin; aminoglycosides such as gentamicin, netilmicin, paramecin, tobramycin, amikacin, kanamycin, neomycin, and streptomycin, vancomycin, teicoplanin, rampolanin, mideplanin, colistin, daptomycin, gramicidin, colistimethate; polymixins such as polymixin B, capreomycin, bacitracin, penems; penicillins including penicillinase-sensitive agents like penicillin G, penicillin V; penicillinase-resistant agents like methicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, floxacillin, nafcillin; gram negative microorganism active agents like ampicillin, amoxicillin, and hetacillin, cillin, and galampicillin; antipseudomonal penicillins like carbenicillin, ticarcillin, azlocillin,

mezlocillin, and piperacillin; cephalosporins like cefpodoxime, cefprozil, ceftibuten, ceftizoxime, ceftriaxone, cephalothin, cephapirin, cephalixin, cephadrine, cefoxitin, cefamandole, cefazolin, cephaloridine, cefaclor, cefadroxil, cephaloglycin, cefuroxime, ceforanide, cefotaxime, cefatrizine, cephacetrile, 5 cefepime, cefixime, cefonicid, cefoperazone, cefotetan, cefmetazole, ceftazidime, loracarbef, and moxalactam, monobactams like aztreonam; and carbapenems such as imipenem, meropenem, pentamidine isethiouate, albuterol sulfate, lidocaine, metaproterenol sulfate, beclomethasone dipropionate, triamcinolone acetamide, budesonide acetonide, fluticasone, ipratropium bromide, flunisolide, cromolyn 10 sodium, and ergotamine tartrate; taxanes such as paclitaxel; SN-38, and typhostines.

Preferred small molecules for coupling to a polymer alkanal of the invention are those having at least one amino group. Preferred molecules include aminohippurate sodium, amphotericin B, doxorubicin, aminocaproic acid, 15 aminolevulinic acid, aminosalicyclic acid, metaraminol bitartrate, pamidronate disodium, daunorubicin, levothyroxine sodium, lisinopril, cilastatin sodium, mexiletine, cephalixin, deferoxamine, and amifostine.

Preferred peptides or proteins for coupling to a polymer alkanal of the invention include EPO, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , consensus IFN, Factor VII, Factor 20 VIII, Factor IX, IL-2, remicade (infliximab), Rituxan (rituximab), Enbrel (etanercept), Synagis (palivizumab), Reopro (abciximab), Herceptin (trastuzimab), tPA, Cerizyme (imiglucerase), Hepatitis-B vaccine, rDNAse, alpha-1 proteinase inhibitor, GCSF, GMCSF, hGH, insulin, FSH, and PTH.

The above exemplary biologically active agents are meant to encompass, 25 where applicable, analogues, agonists, antagonists, inhibitors, isomers, and pharmaceutically acceptable salt forms thereof. In reference to peptides and proteins, the invention is intended to encompass synthetic, recombinant, native, glycosylated, and non-glycosylated forms, as well as biologically active fragments thereof. The above biologically active proteins are additionally meant to 30 encompass variants having one or more amino acids substituted, deleted, or the like, as long as the resulting variant protein possesses at least a certain degree of activity of the parent (native) protein.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention also includes pharmaceutical preparations comprising a conjugate as provided herein in combination with a pharmaceutical excipient.

- 5 Generally, the conjugate itself will be in a solid form (e.g., a precipitate), which can be combined with a suitable pharmaceutical excipient that can be in either solid or liquid form.

- Exemplary excipients include, without limitation, those selected from the group consisting of carbohydrates, inorganic salts, antimicrobial agents,
10 antioxidants, surfactants, buffers, acids, bases, and combinations thereof.

- A carbohydrate such as a sugar, a derivatized sugar such as an alditol, aldonic acid, an esterified sugar, and/or a sugar polymer may be present as an excipient. Specific carbohydrate excipients include, for example: monosaccharides, such as fructose, maltose, galactose, glucose, D-mannose, sorbose, and the like;
15 disaccharides, such as lactose, sucrose, trehalose, cellobiose, and the like; polysaccharides, such as raffinose, melezitose, maltodextrins, dextrans, starches, and the like; and alditols, such as mannitol, xylitol, maltitol, lactitol, xylitol, sorbitol (glucitol), pyranosyl sorbitol, myoinositol, and the like.

- The excipient can also include an inorganic salt or buffer such as citric acid,
20 sodium chloride, potassium chloride, sodium sulfate, potassium nitrate, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, and combinations thereof.

- The preparation may also include an antimicrobial agent for preventing or deterring microbial growth. Nonlimiting examples of antimicrobial agents suitable for the present invention include benzalkonium chloride, benzethonium chloride,
25 benzyl alcohol, cetylpyridinium chloride, chlorobutanol, phenol, phenylethyl alcohol, phenylmercuric nitrate, thimersol, and combinations thereof.

- An antioxidant can be present in the preparation as well. Antioxidants are used to prevent oxidation, thereby preventing the deterioration of the conjugate or other components of the preparation. Suitable antioxidants for use in the present
30 invention include, for example, ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, hypophosphorous acid, monothioglycerol, propyl gallate,

sodium bisulfite, sodium formaldehyde sulfoxylate, sodium metabisulfite, and combinations thereof.

A surfactant may be present as an excipient. Exemplary surfactants include: polysorbates, such as "Tween 20" and "Tween 80," and pluronics such as F68 and F88 (both of which are available from BASF, Mount Olive, New Jersey); sorbitan esters; lipids, such as phospholipids such as lecithin and other phosphatidylcholines, phosphatidylethanolamines (although preferably not in liposomal form), fatty acids and fatty esters; steroids, such as cholesterol; and chelating agents, such as EDTA, zinc and other such suitable cations.

10 Acids or bases may be present as an excipient in the preparation. Nonlimiting examples of acids that can be used include those acids selected from the group consisting of hydrochloric acid, acetic acid, phosphoric acid, citric acid, malic acid, lactic acid, formic acid, trichloroacetic acid, nitric acid, perchloric acid, phosphoric acid, sulfuric acid, fumaric acid, and combinations thereof. Examples
15 of suitable bases include, without limitation, bases selected from the group consisting of sodium hydroxide, sodium acetate, ammonium hydroxide, potassium hydroxide, ammonium acetate, potassium acetate, sodium phosphate, potassium phosphate, sodium citrate, sodium formate, sodium sulfate, potassium sulfate, potassium fumarate, and combinations thereof.

20 The pharmaceutical preparations encompass all types of formulations and in particular those that are suited for injection, e.g., powders that can be reconstituted as well as suspensions and solutions. The amount of the conjugate (i.e., the conjugate formed between the active agent and the polymer described herein) in the composition will vary depending on a number of factors, but will optimally be a
25 therapeutically effective dose when the composition is stored in a unit dose container (e.g., a vial). In addition, the pharmaceutical preparation can be housed in a syringe. A therapeutically effective dose can be determined experimentally by repeated administration of increasing amounts of the conjugate in order to determine which amount produces a clinically desired endpoint.

30 The amount of any individual excipient in the composition will vary depending on the activity of the excipient and particular needs of the composition. Typically, the optimal amount of any individual excipient is determined through

3d

routine experimentation, i.e., by preparing compositions containing varying amounts of the excipient (ranging from low to high), examining the stability and other parameters, and then determining the range at which optimal performance is attained with no significant adverse effects.

5 Generally, however, the excipient will be present in the composition in an amount of about 1% to about 99% by weight, preferably from about 5%-98% by weight, more preferably from about 15-95% by weight of the excipient, with concentrations less than 30% by weight most preferred.

 These foregoing pharmaceutical excipients along with other excipients are
10 described in "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), the "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), and Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

15 The pharmaceutical preparations of the present invention are typically, although not necessarily, administered via injection and are therefore generally liquid solutions or suspensions immediately prior to administration. The pharmaceutical preparation can also take other forms such as syrups, creams, ointments, tablets, powders, and the like. Other modes of administration are also
20 included, such as pulmonary, rectal, transdermal, transmucosal, oral, intrathecal, subcutaneous, intra-arterial, and so forth.

 As previously described, the conjugates can be administered injected parenterally by intravenous injection, or less preferably by intramuscular or by subcutaneous injection. Suitable formulation types for parenteral administration
25 include ready-for-injection solutions, dry powders for combination with a solvent prior to use, suspensions ready for injection, dry insoluble compositions for combination with a vehicle prior to use, and emulsions and liquid concentrates for dilution prior to administration, among others.

30 METHODS OF ADMINISTERING

 The invention also provides a method for administering a conjugate as provided herein to a patient suffering from a condition that is responsive to

treatment with conjugate. The method comprises administering, generally via injection, a therapeutically effective amount of the conjugate (preferably provided as part of a pharmaceutical preparation). The method of administering may be used to treat any condition that can be remedied or prevented by administration of the particular conjugate. Those of ordinary skill in the art appreciate which conditions a specific conjugate can effectively treat. The actual dose to be administered will vary depend upon the age, weight, and general condition of the subject as well as the severity of the condition being treated, the judgment of the health care professional, and conjugate being administered. Therapeutically effective amounts are known to those skilled in the art and/or are described in the pertinent reference texts and literature. Generally, a therapeutically effective amount will range from about 0.001 mg to 100 mg, preferably in doses from 0.01 mg/day to 75 mg/day, and more preferably in doses from 0.10 mg/day to 50 mg/day.

The unit dosage of any given conjugate (again, preferably provided as part of a pharmaceutical preparation) can be administered in a variety of dosing schedules depending on the judgment of the clinician, needs of the patient, and so forth. The specific dosing schedule will be known by those of ordinary skill in the art or can be determined experimentally using routine methods. Exemplary dosing schedules include, without limitation, administration five times a day, four times a day, three times a day, twice daily, once daily, three times weekly, twice weekly, once weekly, twice monthly, once monthly, and any combination thereof. Once the clinical endpoint has been achieved, dosing of the composition is halted.

One advantage of administering the conjugates of the present invention is that individual water-soluble polymer portions can be cleaved off. Such a result is advantageous when clearance from the body is potentially a problem because of the polymer size. Optimally, cleavage of each water-soluble polymer portion is facilitated through the use of physiologically cleavable and/or enzymatically degradable linkages such as urethane, amide, carbonate or ester-containing linkages. In this way, clearance of the conjugate (via cleavage of individual water-soluble polymer portions) can be modulated by selecting the polymer molecular size and the type functional group that would provide the desired clearance properties. One of ordinary skill in the art can determine the proper

34

molecular size of the polymer as well as the cleavable functional group. For example, one of ordinary skill in the art, using routine experimentation, can determine a proper molecular size and cleavable functional group by first preparing a variety of polymer derivatives with different polymer weights and cleavable functional groups, and then obtaining the clearance profile (e.g., through periodic blood or urine sampling) by administering the polymer derivative to a patient and taking periodic blood and/or urine sampling. Once a series of clearance profiles have been obtained for each tested conjugate, a suitable conjugate can be identified.

All articles, books, patents, patent publications and other publications referenced herein are incorporated by reference in their entireties.

EXAMPLES

It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with certain preferred specific embodiments thereof, the foregoing description as well as the examples that follow are intended to illustrate and not limit the scope of the invention. Other aspects, advantages and modifications within the scope of the invention will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains.

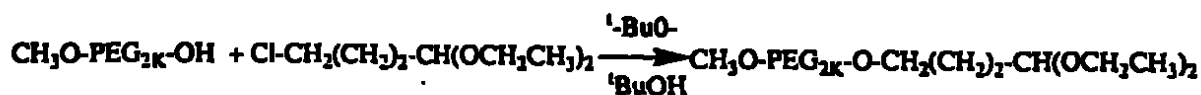
MATERIALS AND METHODS.

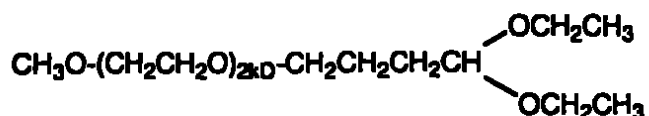
All PEG reagents referred to in the appended examples are commercially available unless otherwise indicated. All NMR data was generated by a 300 MHz NMR spectrometer manufactured by Bruker.

Lysozyme was obtained from Sigma.

EXAMPLE 1

SYNTHESIS OF MPEG (2K)-BUTYRALDEHYDE

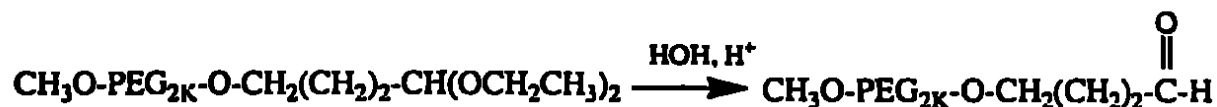


A. Preparation of mPEG (2K Da)-Butyraldehyde, diethyl acetal,

5

A mixture of mPEG (2K Da) (2.0g) and toluene (30 mL) was azeotropically dried by distilling off toluene under reduced pressure. The dried mPEG, molecular weight, 2 kilodaltons, was dissolved in anhydrous toluene (15 ml) to which was added a 1.0 M solution of potassium tert-butoxide in tert -butanol (4.0 ml, 0.004 moles) and 4-chlorobutyraldehyde diethyl acetal (0.5 g, 0.00277 moles) (Alfa Aesar). The mixture was stirred at 100-105° C overnight under an argon atmosphere. After cooling to room temperature, the mixture was filtered and added to 150 ml ethyl ether at 0-5°C. The precipitated product was filtered off and dried under reduced pressure. Yield: 1.6 g. The reaction proceeded in essentially a quantitative yield. That is to say, essentially all of the mPEG starting material was converted to the corresponding diethyl acetal, based upon the absence of hydroxyl protons corresponding to mPEG-OH starting material according to ¹H NMR. NMR (d₆-DMSO): 1.09 ppm (t, CH₃-C-) 1.52 ppm (m, C-CH₂-CH₂ -), 3.24 ppm (s, -OCH₃), 3.51 ppm (s, PEG backbone), 4.46 ppm (t, -CH, acetal).

20

B. Preparation of mPEG (2kD)-Butyraldehyde

25

A mixture of mPEG (2K Da) butyraldehyde, diethyl acetal (1.0 g) from A. above, deionized water (20 ml), and an amount of 5% phosphoric acid to adjust the pH to 3.0, was stirred for 3 hours at room temperature. To this mixture was added sodium chloride (1.0 g) and the pH was adjusted to 6.8 by addition of 0.1 M sodium hydroxide. The product, mPEG (2kD) butyraldehyde, was extracted with dichloromethane (3 x 20 ml). The extract was dried with anhydrous magnesium sulfate and the solvent was distilled off under reduced pressure to provide the mPEG butyraldehyde product in isolated form. Yield: 0.72g.

30

The reaction proceeded in essentially a quantitative yield. That is to say, essentially all of the mPEG butyraldehyde diethyl acetal was converted to the corresponding aldehyde, based upon the absence of hydroxyl protons corresponding to mPEG-OH starting material as well as absence of hydroxyl protons corresponding to diethyl acetal according to ^1H NMR.

NMR (d_6 -DMSO): 1.75 ppm (p, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}-$) 2.44 ppm (dt, $-\text{CH}_2-\text{CHO}$), 3.24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3.51 ppm (s, PEG backbone), 9.66 ppm (t, $-\text{CHO}$).

EXAMPLE 2

SYNTHESIS OF MPEG (30kD)-BUTYRALDEHYDE

A. Preparation of mPEG (30K Da)-Butyraldehyde, diethyl acetal.

$\text{mPEG}_{30\text{K}}-\text{O}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$

A mixture of mPEG (30 kD) (60% solution in toluene, 3.30g), toluene (30 ml) and BHT (butylated hydroxytoluene, 0.004 g) was azeotropically dried by distilling off the solvent under reduced pressure. The dried mPEG 30K was dissolved in anhydrous toluene (15 ml), and to this solution was added 1.0 M potassium tert-butoxide in tert-butanol (4.0 ml, 0.004 moles), 4-chlorobutyraldehyde diethyl acetal (0.5 g, 0.00277 moles) (Alfa Aesar), and potassium bromide (0.05g). The resulting mixture was stirred overnight at 105°C under argon atmosphere. The mixture was filtered, concentrated to dryness under reduced pressure and the crude product was dissolved in 20 ml of dichloromethane. This product-containing solution was added to ethyl ether (300 ml) at room temperature to precipitate the product. The precipitated product was isolated by filtration and dried under reduced pressure. Yield: 1.92 g.

NMR (d_6 -DMSO): 1.09 ppm (t, $\text{CH}_3-\text{C}-$) 1.52 ppm (m, $\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3.51 ppm (s, PEG backbone), 4.46 (t, $-\text{CH}$, acetal).

Based upon yields and analysis of the product, substitution of the acetal reagent at the hydroxy-terminus of the mPEG-OH reagent proceeded at a very high efficiency, that is to say, at essentially 100% substitution. The resulting product, without requiring further purification, was produced in high purity, without

detectable or significant amounts of unreacted mPEG-OH. Typically, the alkanal or acetal polymers of the invention are produced in high purities-that is to say, typically, the desired alkanal product is present in the final composition in at least 85% purity, preferably at least 90% purity, and even more preferably, in at least 95% purity.

B. Preparation of mPEG (30K Da)-Butyraldehyde.

mPEG_{30K}-O-CH₂(CH₂)₂-C(O)H

A mixture of mPEG (30K Da) butyraldehyde, diethyl acetal (1.0 g), from A. above, deionized water (20 mL), and an amount of 5% phosphoric acid to adjust the pH to 3.0 was stirred for 3 hours at room temperature. To this mixture was added sodium chloride (1.0 g), and the pH was adjusted to 6.8 by addition of 0.1 M sodium hydroxide. The product was extracted with dichloromethane (3 x 20 ml). The extract was dried with anhydrous magnesium sulfate and the solvent was removed by distillation. The wet product was dried under reduced pressure. Yield: 0.82 g.

NMR (d₆-DMSO): 1.75 ppm (p, -CH₂-CH₂-CHO-) 2.44 ppm (dt, -CH₂-CHO), 3.24 ppm (s, -OCH₃), 3.51 ppm (s, PEG backbone), 9.66 ppm (t, -CHO).

Substitution: ~100%.

Conversion to the corresponding aldehyde proceeded in essentially quantitative yield.

EXAMPLE 3

COMPARATIVE STABILITY OF MPEG-PROPIONALDEHYDE AND MPEG-

BUTYRALDEHYDE AT BASIC PH

Methoxy-PEG-propionaldehyde and mPEG-butyraldehyde were each exposed to high pH conditions for prolonged periods of time to compare the relative stability of each polymer under basic pH conditions. As indicated below, significant amounts of propionaldehyde PEG reacted under these conditions to form mPEG-OH and release acrolein (due to a retro-Michael type reaction), while no loss of the PEG butyraldehyde compound was detected. The details of this experiment are provided below.

21

A. Stability of mPEG(2K Da)-Butyraldehyde at Basic pH

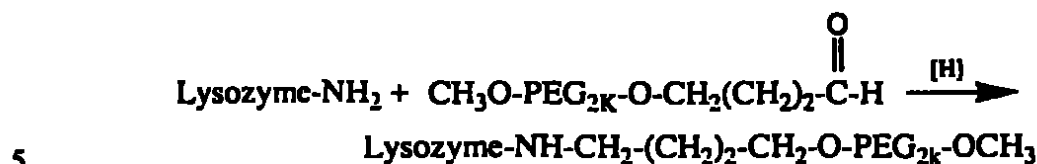
mPEG(2K Da)-butyraldehyde (from Example 1) (0.5g) was dissolved in 10 ml 5mM phosphate buffer (pH = 8.0) and the resulting solution was stirred for 24h at room temperature. NaCl (0.5g) was added and the product was extracted with methylene chloride (3 x 10 ml). The extract was dried with anhydrous magnesium sulfate and the solvent was distilled off under reduced pressure at 25° C.

Based upon ¹H NMR analysis, the product was unchanged. That is to say, no decomposition of the PEG-butanal was detected, even after an extended period of time under these basic pH conditions.

B. Stability of mPEG(5K Da)-Propionaldehyde at Basic pH

mPEG(5K Da)-Propionaldehyde (Shearwater Corporation, aldehyde substitution 82%) (0.5g), was dissolved in 10 ml 5mM phosphate buffer (pH = 8.0). The resulting solution was stirred for 24h at room temperature. Gas chromatography headspace analysis showed that the solution contained acrolein (CH₂=CH-CHO), resulting from an elimination reaction under basic conditions such as those typically employed for protein conjugation. NaCl (0.5g) was added and the product was extracted with methylene chloride (3 x 10 ml). The extract was dried with anhydrous magnesium sulfate and the solvent was distilled off under reduced pressure at 25° C.

Based upon ¹H NMR analysis, the substitution of mPEG(5K Da)-propionaldehyde dropped to 62% (that is to say, 38% of the PEG-propanal had decomposed), and the product contained a substantial amount of mPEG-OH, arising from the loss of the C-3 segment corresponding to the propanal portion of the PEG-propanal.

EXAMPLE 4**PEGYLATION OF LYSOZYME**

("Lysozyme-NH₂" is meant to indicate the lysozyme molecule with one of its reactive amino groups shown).

10 A. RANDOM PEGYLATION USING A 2 KD PEG ALKANAL. The model protein, lysozyme, an 129 amino acid secretory enzyme, was used to demonstrate coupling of an alkanal polymer of the invention to an illustrative protein. Lysozyme contains six lysine residues as potential sites for pegylation.

15 Lysozyme (2.1 mg) was dissolved in 1 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) to which was added mPEG (2kD)-butyraldehyde (from Example 1, 1.5 mg). To this solution was added the reducing agent, NaCNBH₃ (sodium cyanoborohydride), and the solution was stirred for 24 h at room temperature. The resulting lysozyme conjugate possesses PEG chains coupled to lysozyme amino groups by an intervening -(CH₂)₄-chain.

20 The reaction product was analyzed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and displayed peaks corresponding to three PEGylated species of lysozyme at 16208 Da, 18422 Da, and 20520 Da, differing in mass by approximately 2000 Da (corresponding to the size of the PEG butanal reagent), as well as unmodified protein. The mass of
25 unmodified (native) lysozyme by MALDI-TOF was determined to be 14153. Thus, the conjugate formed was really a mixture of monopegylated protein, di-pegylated protein, and tri-pegylated protein (1-mer, 2-mer and 3-mer).

30 The above demonstrates random pegylation of an illustrative protein of the invention to yield a distribution of pegylated products. If desired, the reaction mixture can be further separated to isolate the individual PEG conjugates, that is, lysozyme having one PEG molecule attached thereto, lysozyme having two PEGs attached, and lysozyme having three PEGs attached. Within each of the conjugate

compositions described above (1-mer, 2-mer, 3-mer), the PEG molecule may be attached to different reactive amino sites within the lysozyme molecule.

5 B. PEGYLATION USING A 5 KD PEG ALKANAL, mPEG-2-METHYLBUTYRALDEHYDE.

Conjugation of the model protein, lysozyme, is repeated using the alpha branched PEG reagent, mPEG_{5kD}-2-methylbutyraldehyde. Lysozyme (3 mg) is dissolved in approximately 1 mL of sodium phosphate buffer at a pH ranging from
10 about 5.5 to 7.5. A two to five-fold molar excess of the PEG reagent, mPEG_{5kD}-2-methylbutyraldehyde, is added to the lysozyme solution, and the resulting solution is placed on a rotary mixer and allowed to react at room temperature. After approximately 15 minutes, a 20-fold molar excess of NaCNBH₃ is added and the reaction allowed to continue. Aliquots are withdrawn at various time intervals (4
15 hours, 8 hours, 12 hours, 16 hours, etc.) and the reaction progress is monitored by SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry.

Upon completion of the reaction, the resulting conjugate mixture is concentrated, sterile filtered, and stored under low temperature conditions (-20°C to -80°C) until further use.

20

EXAMPLE 5

PREPARATION OF BRANCHED PEG2(40.3 KDA)- BUTYRALDEHYDE

The preparation of an exemplary polymer alkanal having a branched PEG segment is provided below.

25 SUMMARY. The overall synthesis involved first the coupling of a tetra(ethylene glycol) spacer to a reactive alkanal precursor, 4-chlorobutyraldehyde diethyl acetal. The introduction of an oligomeric ethylene glycol spacer provides greater stability to the resulting product by extending the chain length between the reactive aldehyde (or acetal) group and a reactive group that may be contained in
30 the linker moiety, X', thereby minimizing the occurrence of potential side reactions and improving yields.

•
•

The use of an oligomeric spacer, such as tetraethylene glycol, also provides a reactive functional group, in this instance, hydroxy, that can be converted, if necessary, for coupling to a polymer segment that has been chromatographically purified to remove polymeric impurities such as PEG-diol, mPEG-OH, and the like.

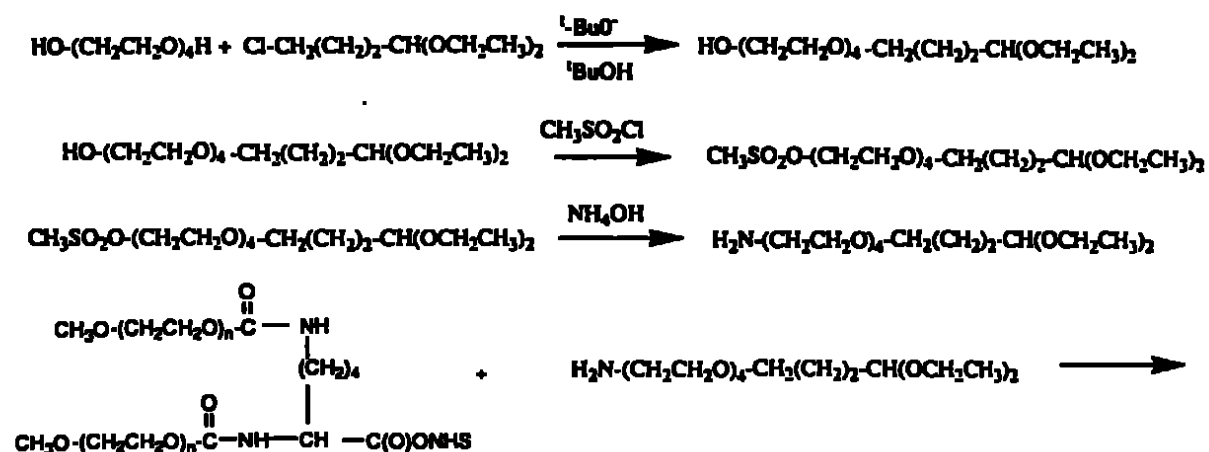
5 In this way, undesired functionalized polymeric impurities such as PEG-dialdehyde (resulting from PEG diol) and the like are removed from the PEG segment prior to coupling to the alkanal precursor to provide the ultimate product, a water soluble polymer alkanal that is essentially free of polymeric impurities.

Turning to the specific reaction below, the coupling of the tetra(ethylene glycol) spacer to 4-chlorobutyraldehyde diethyl acetal leads to formation of the
10 desired mono-alkanal product contaminated with di-alkanal product and starting tetra(ethylene glycol). However, a straightforward work-up that utilizes the differences in solubility of all of the components in the reaction mixture allows for the ready preparation of highly pure monoalkanal product, that is to say, having the
15 alkanal (acetal) function substituted on only one of the reactive hydroxy groups of the tetra(ethylene glycol) molecule. (REACTION A.). The product from REACTION A was then converted to the corresponding mesylate by reaction with methanesulfonyl chloride, i.e., the free hydroxy group of the tetra(ethylene glycol) was converted first to the mesylate (REACTION B), followed by conversion of the
20 mesylate to a primary amino group (REACTION C). The reactive amino group of the acetal reagent was then coupled to an illustrative branched polymer backbone segment having a reactive carbonyl carbon suitable for reaction with the amino group of the acetal reagent. The precursor to the PEG reactant, mPEG-disubstituted lysine, was purified by ion exchange chromatography prior to
25 conversion to the corresponding activated ester to remove polymeric impurities. The N-hydroxysuccinimidyl ester of mPEG-disubstituted lysine was then reacted with an amino-alkanal acetal, via formation of an amide bond, to form the resulting branched PEG-spacer-alkanal acetal. The acetal was then readily hydrolyzed in the acid-catalyzed reaction to form the corresponding alkanal, and in particular, the 2-
30 arm branched PEG (40KDa) butyraldehyde.

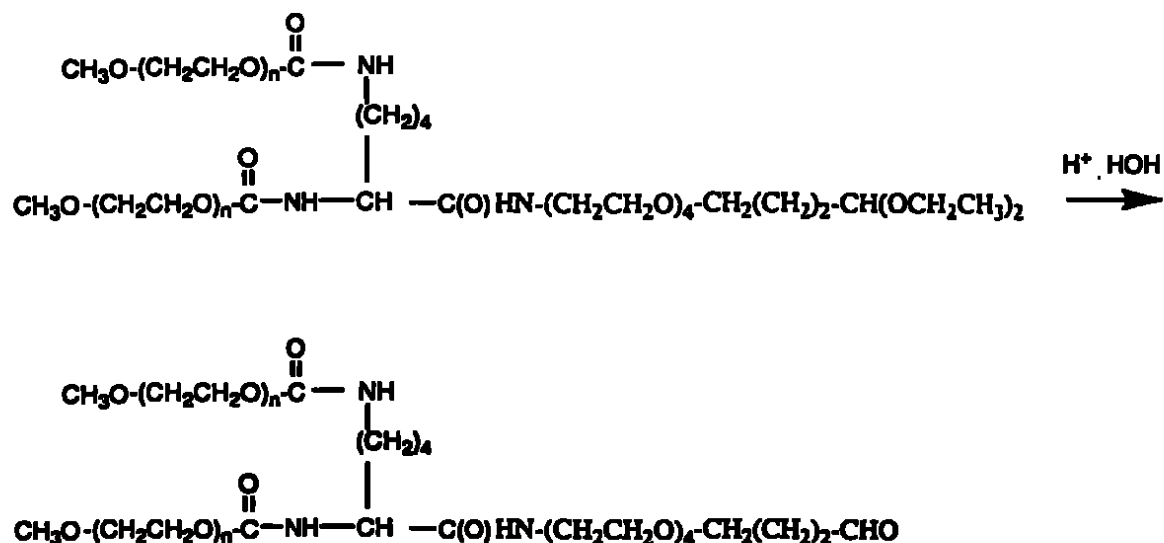
43

This synthetic approach, i.e., is not limited to branched polymer segments but may be employed for polymer segments having any of the herein described geometries.

5 SUMMARY OF OVERALL SYNTHESIS:



10



15

A. Tetra(ethylene glycol) mono-butyraldehyde, diethyl acetal.



A mixture of tetra(ethylene glycol) (97.1 g, 0.500 moles) and toluene (200 ml) was azeotropically dried by distilling off toluene under reduced pressure (rotary evaporator). The dried tetra(ethylene glycol) was dissolved in anhydrous toluene (180 ml) and 1.0 M solution of potassium tert-butoxide in tert-butanol (120.0 ml, 0.120 moles) and 4-chlorobutyraldehyde diethyl acetal (18.1 g, 0.100 moles) (Alfa Aesar) were added. The mixture was stirred at 95-100 °C overnight under argon atmosphere. After cooling to room temperature, the mixture was filtered and the solvents were distilled off under reduced pressure. The crude product was dissolved in 1000 ml deionized water and the resulting solution was filtered through active carbon. Sodium chloride (10g) was added and the product was extracted with dichloromethane (250, 200, and 150 ml). The extract was dried (over MgSO₄) and the solvent was distilled off under reduced pressure (by rotary evaporation).

The crude product was dissolved in 300 ml 10% phosphate buffer (pH = 7.5) and impurities were extracted with ethyl acetate (2 x 50 ml). The product was extracted with dichloromethane (200, 150, and 100 ml). The extract was dried (over MgSO₄) and the solvent was distilled off under reduced pressure (by rotary evaporation).

Yield: 20.3 g. NMR (d₆-DMSO): 1.10 ppm (t, CH₃-C-) 1.51 ppm (m, C-CH₂-CH₂ -), 3.49 ppm (bm, -OCH₂CH₂O-), 4.46 ppm (t, -CH, acetal), 4.58 ppm (t, -OH). Purity: ~100% (no signs of unreacted starting materials).

B. Tetra(ethylene glycol)-α-mesylate-ω-butyraldehyde, diethyl acetal,



A mixture of tetra(ethylene glycol) mono-butyraldehyde, diethyl acetal (12.5g, 0.037 moles) and toluene (120 ml) was azeotropically dried by distilling off toluene under reduced pressure (rotary evaporator). The dried tetra(ethylene glycol) mono-butyraldehyde, diethyl acetal was dissolved in anhydrous toluene (100 ml) To the solution was added 20 ml of anhydrous dichloromethane and 5.7 ml of triethylamine (0.041 moles). Then 4.5g of methanesulfonyl chloride (0.039 moles) was added dropwise. The solution was stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere overnight. Next sodium carbonate (5 g) was added, the

JH

mixture was stirred 1h. Then the solution was filtered and solvents were distilled off under reduced pressure (rotary evaporator).

1.10 ppm (t, CH₃-C-) 1.51 ppm (m, C-CH₂-CH₂-), 3.17 ppm (s, CH₃-methanesulfonate), 3.49 ppm (bm, -OCH₂CH₂O-), 4.30 ppm (m, -CH₂-methanesulfonate), 4.46 ppm (t, -CH, acetal).

Purity: ~100%.

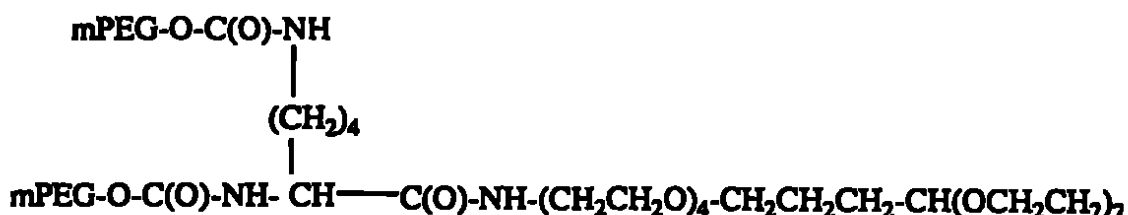
C. Tetra(ethylene glycol)-α-amino-ω-butyraldehyde, diethyl acetal



- 10 A mixture of tetra(ethylene glycol)-α-mesylate-ω-butyraldehyde, diethyl acetal (14.0g), concentrated ammonium hydroxide (650 ml), and ethyl alcohol (60 ml) was stirred 42 h at room temperature. Next all volatile materials were distilled off under reduced pressure. The crude product was dissolved in 150 ml deionized water and the pH of the solution was adjusted to 12 with 1.0 M NaOH. The product
- 15 was extracted with dichloromethane (3 x 100 ml). The extract was dried (MgSO₄) and the solvent was distilled off under reduced pressure (rotary evaporator). Yield 10.6g. NMR (D₂O): 1.09 ppm (t, CH₃-C-) 1.56 ppm (m, C-CH₂-CH₂-), 2.69 ppm (t, CH₂-N), 3.56 ppm (bm, -OCH₂CH₂O-), 4.56 ppm (t, -CH, acetal). Purity: ~100%.

20

D. Branched PEG2(40.3 KDa)-butyraldehyde, diethyl acetal



25

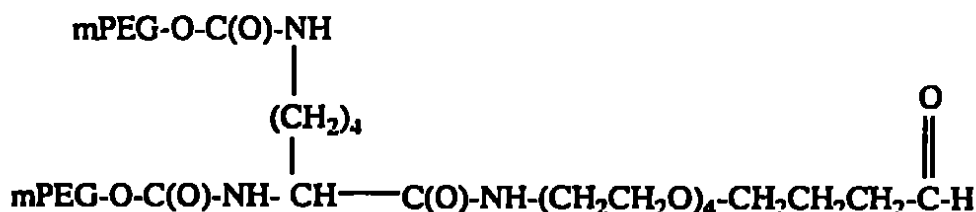
PEG2 (40 KDa)-N-hydroxysuccinimide was prepared from the corresponding PEG2-lysine as described in U.S. Patent No. 5,932,462 (Harris, J., et al.). The precursor PEG-2 lysine, a branched PEG having an ionizable carboxyl

group, was purified by ion exchange chromatography, as also described in U.S. Patent No. 5,932,462.

To a solution of PEG2 (40 KDa)-N-hydroxysuccinimide (5.0g, 0.000125 moles) (Shearwater Corporation) in methylene chloride (100 ml), tetra(ethylene glycol)- α -amino- ω -butyraldehyde, diethyl acetal (0.50g, 0.000148 moles) and triethylamine (0.035 ml) were added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature under an argon atmosphere. The solvent was evaporated to dryness using a rotary evaporator. The crude product was dissolved in methylene chloride and precipitated with isopropyl alcohol. The wet product was dried under reduced pressure. Yield 4.8 g.

NMR (d_6 -DMSO): 1.10 ppm (t, CH_3 -C), 1.51 ppm (m, C- CH_2 - CH_2 -), 3.24 ppm (s, - OCH_3), 3.51 ppm (s, PEG backbone), 4.46 ppm (t, -CH-, acetal). Substitution: ~100%.

15 E. Branched PEG2(40.3 KDa)- butyraldehyde



20 Branched PEG2(40.3 KDa)-butyraldehyde, diethyl acetal (4.8g) was dissolved in 100 ml water and the pH of the solution was adjusted to 3 with diluted phosphoric acid. The solution was stirred for 3 hours at room temperature, followed by addition of 0.5 M sodium hydroxide sufficient to adjust the pH of the solution to about 7. The product was extracted with methylene chloride, and the extract dried with anhydrous magnesium sulfate. The solvent was distilled off under reduced pressure.

25 Yield 4.2 g. NMR (d_6 -DMSO): 1.75 ppm (p, - CH_2 - CH_2 -CHO-) 2.44 ppm (dt, - CH_2 -CHO), 3.24 ppm (s, - OCH_3), 3.51 ppm (s, PEG backbone), 9.66 ppm (t, -CHO). Substitution: ~100%.

y/s

The above illustrates yet another embodiment of the invention, the preparation of a representative branched PEG alkanal. The above also illustrates an embodiment of the invention wherein the polymer alkanal contains a short oligomeric group, in this case, a tetraethylene glycol interposed between the polymer backbone and the alkanal segment of the molecule. Further, this example illustrates the use of a precursor polymer segment containing an ionizable group such that such polymer segment can be purified by ion exchange chromatography prior to coupling to the alkanal-acetal reagent, thereby effectively removing polymeric impurities early on in the reaction scheme. In this instance, the product formed is absent difunctional polymeric impurities such as those arising from reactions of PEG-diol, or mPEG, or mono-pegylated lysine, or the like, that may have been present in the mPEG2-lysine precursor but were removed by chromatography.

15

EXAMPLE 6

PREPARATION OF POLYMER-ALKANAL PROTEIN CONJUGATE

RANDOM PEGYLATION OF EPO

Recombinant EPO (produced in *E. coli*, mammalian cells (e.g., CHO cells) or another microbial source) is coupled to mPEG-butyraldehyde 30 kDa (prepared as described in Example 2).

EPO (~2 mg) is dissolved in 1 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) and mPEG(30 kDa)-butyraldehyde is added at 5X the molar EPO concentration. A reducing agent, NaCNBH₃, is added and the solution stirred for 24 h at room temperature to couple the PEG-butanal reagent to the protein via an amine linkage.

The reaction mixture is analyzed by SDS-PAGE to determine the degree of PEGylation. Confirmation of the degree of PEGylation, 1-mer, 2 mers, etc. is done by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The displayed peaks for native and mono-PEGylated species differ by approximately 30,000 Da. The resulting reaction mixture contains a mixture of native and monopegylated protein. Increasing the ratio of PEG reagent to protein increases the degree of polyPEGylation, that is to say, the formation of 2-mers, 3-mers, etc.

The use of high molecular weight PEG alkanals having molecular weight greater than about 20 kDa favors formation of mono-PEGylated species. Smaller molecular weight PEG alkanals, when coupled to a protein, are more prone to formation of poly-PEGylated species under these conditions.

5 The above demonstrates random pegylation of an illustrative protein of the invention to yield a distribution of pegylated EPO products. If desired, the reaction mixture can be further separated to isolate the individual isomers as described below.

10 PEG conjugates having different molecular weights are then separated by gel filtration chromatography. The different PEG conjugates (1-mer, 2-mer, 3-mer, etc.) are fractionated on the basis of their different molecular weights (in this case, varying by approximately 30 kDa). Specifically, the separation is performed by using a serial column system suitable for effective separation of products in the molecular weight range observed, e.g., a Superdex™200 column (Amersham
15 Biosciences). The products are eluted with 10 ml acetate buffer at a flow rate of 1.5 ml/min. The collected fractions (1 ml) are analysed by OD at 280 nm for protein content and also using an iodine test for PEG content (Sims G. E. C., *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107, 60-63, 1980). Alternatively, the results are visualized by running an SDS PAGE gel, followed by staining with barium iodide. Fractions corresponding
20 to the eluted peaks are collected, concentrated by ultrafiltration using a 10-30 kD cut-off membrane, and lyophilized. This method results in separation/purification of conjugates having the same molecular weights but does not provide separation of conjugates having the same molecular weight but different pegylation sites (i.e., positional isomers).

25 Separation of positional isomers is carried out by reverse phase chromatography using an RP-HPLC C18 column (Amersham Biosciences or Vydac). This procedure is effective for separating PEG-biomolecule isomers having the same molecular weight (positional isomers). The reverse-phase chromatography is carried out using a RP-HPLC C18 preparative column and
30 eluted with a gradient of water/0.05% TFA (Eluent A) and acetonitrile/0.05% TFA (Eluent B).

AP6

Fractions corresponding to the eluted peaks are collected, evaporated to eliminate acetonitrile and TFA, followed by removal of solvent to isolate the individual positional PEG-isomers.

5

EXAMPLE 7**PREPARATION OF POLYMER-ALKANAL PROTEIN CONJUGATE****N-TERMINAL PEGYLATION OF EPO**

Recombinant EPO (produced in *E. coli*, mammalian cells (such as CHO but not limited to) or another microbial source) is coupled to mPEG-butryaldehyde, 30 kDa (Example 2).

EPO (~2. mg) is dissolved in 1 ml of 0.1mM sodium acetate (pH 5) and mPEG(30 kDa)-butryaldehyde (from Example 2) is added at 5X the molar EPO concentration. A reducing agent, NaCNBH₃, is added and the solution is stirred for 24 h at 4° C to couple the PEG-butanal reagent to the protein via an amine linkage.

The reaction mixture is analyzed by SDS-PAGE to determine the degree of PEGylation. Confirmation of the degree of PEGylation, 1-mer, 2-mers etc. is carried out by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The displayed peaks for native and mono-PEGylated species differ by approximately 30,000 Da. The resulting reaction mixture primarily contains a mixture of native and monopegylated protein. The mono-PEGylated species are purified by column chromatography to remove free EPO and higher molecular weight species.

Confirmation of N-terminal PEGylation is carried out by peptide mapping. Increasing the ratio of PEG to protein increases the degree of PEGylation, yielding poly-pegylated protein.

The above demonstrates pegylation of an illustrative protein of the invention to yield a predominantly N-terminal single pegylated protein.

30

EXAMPLE 8**N-TERMINAL PEGYLATION OF GCSF**

Recombinant GCSF (produced in *E. coli*, mammalian cells (such as CHO cells) or other microbial source) is coupled to mPEG-butryaldehyde, 30 kDa.

GCSF (~2. mg) is dissolved in 1 ml of 0.1mM sodium acetate (pH 5) and mPEG(30 kDa)-butyraldehyde (from Example 2) is added at 5X the molar GCSF concentration . The reducing agent, NaCNBH₃, is added and the solution stirred for 24 h at 4° C to couple the PEG-butanal reagent to the protein via an amine linkage.

5 The resulting reaction mixture is analyzed by SDS-PAGE to determine the degree of PEGylation. Confirmation of the degree of PEGylation, 1-mer, 2 mers, etc. is carried out by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The displayed peaks for native and mono-PEGylated species differ by approximately 30,000 Da. The resulting reaction
10 mixture primarily contains a mixture of native and monopegylated GCSF. The nono-PEGylated species are purified by column chromatography to remove free GCSF and higher molecular weight species. Confirmation of N-terminal PEGylation is conducted by peptide mapping. Increasing the ratio of PEG to protein increases the degree of PEGylation yielding poly-pegylated protein.

15

EXAMPLE 9

N-TERMINAL PEGYLATION OF INTERFERON α

Recombinant IFN- α (produced in *E. coli*, mammalian cells (such as CHO but not limited to) or other microbial source) is coupled to mPEG-butyraldehyde,
20 30 kDa.

Interferon - α (~2. mg) is dissolved in 1 ml of 0.1mM sodium acetate (pH 5) and mPEG(30 kDa)-butyraldehyde (from Example 2) is added at 5X the molar IFN concentration . A reducing agent, NaCNBH₃, is added and the solution stirred for 24 h at 4° C to couple the PEG-butanal reagent to the protein via an amine linkage.

25 The reaction mixture is analyzed by SDS-PAGE to determine the degree of PEGylation. Confirmation of the degree of PEGylation, 1-mer, 2 mers etc. is carried out by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The displayed peaks for native and mono-PEGylated species differ by approximately 30,000 Da. The resulting reaction
30 mixture primarily contains a mixture of native and monopegylated protein. The Mono-PEGylated species are purified by column chromatography to remove free interferon α and higher molecular weight species. Confirmation of N-terminal

PEGylation is conducted by peptide mapping. Increasing the ratio of PEG to protein increases the degree of PEGylation yielding poly-pegylated IFN.

Conjugation of the proteins hGH, IFN- β , and FSH to another illustrative PEG-alkanal, mPEG-2-methyl butyraldehyde, 20 kDa is carried out essentially as
5 described in the examples above.

EXAMPLE 10

N-TERMINAL PEGYLATION OF HUMAN GROWTH HORMONE

Recombinant human growth hormone (produced in *E. coli*, mammalian cells
10 (such as CHO but not limited to) or another microbial source) is coupled to mPEG-2-methyl butyraldehyde, 20 kDa.

Human growth hormone (~2 mg) is dissolved in 1 ml of 0.1mM sodium acetate (pH 5) and mPEG-2-methyl butyraldehyde, 20 kDa is added at 5X the molar hGH concentration. A 5 to 20-fold molar excess of the reducing agent, NaCNBH₃,
15 is added and the solution is stirred for 24 h at 4° C to couple the PEG- α methylbutanal reagent to the protein via an amine linkage.

Progress of the reaction is analyzed by SDS-PAGE or MALDI-TOF mass spectrometry to determine the degree of PEGylation. Confirmation of the degree of PEGylation, 1-mer, 2 mers etc. is carried out by Matrix Assisted Laser Desorption
20 Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The displayed peaks for native and mono-PEGylated and other species differ by approximately 20,000 Da. The resulting reaction mixture primarily contains a mixture of native and monopegylated protein. The mono-PEGylated species are purified by column chromatography to remove free hGH and higher molecular weight species.
25 Confirmation of N-terminal PEGylation is conducted by peptide mapping. Increasing the ratio of PEG aldehyde to protein increases the degree of PEGylation yielding a population of poly-pegylated hGH.

EXAMPLE 11**N-TERMINAL PEGYLATION OF INTERFERON- β**

Recombinant interferon- β (produced in *E. coli*, mammalian cells (such as CHO but not limited to) or another microbial source) is coupled to mPEG-2-methyl butyraldehyde, 20 kDa.

Interferon- β (~2 mg) is dissolved in 1 ml of 0.1mM sodium acetate (pH 5) and mPEG-2-methyl butyraldehyde, 20 kDa is added at 5X the molar IFN- β concentration. A 5 to 20-fold molar excess of the reducing agent, NaCNBH₃, is added and the solution is stirred for 24 h at 4° C to couple the PEG- α methylbutanal reagent to the protein via an amine linkage.

Progress of the reaction is analyzed by SDS-PAGE or MALDI-TOF mass spectrometry to determine the degree of PEGylation. Confirmation of the degree of PEGylation, 1-mer, 2 mers etc. is carried out by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The displayed peaks for native and mono-PEGylated and other species differ by approximately 20,000 Da. The resulting reaction mixture primarily contains a mixture of native and monopegylated protein. The mono-PEGylated species are purified by column chromatography to remove free IFN- β and higher molecular weight species. Confirmation of N-terminal PEGylation is conducted by peptide mapping.

Increasing the ratio of PEG aldehyde to protein increases the degree of PEGylation yielding a population of poly-pegylated IFN- β .

EXAMPLE 12**N-TERMINAL PEGYLATION OF FSH**

Recombinant follicle stimulating hormone (produced in *E. coli*, mammalian cells (such as CHO but not limited to) or another microbial source) is coupled to mPEG-2-methyl butyraldehyde, 20 kDa.

Follicle stimulating hormone, FSH (~2 mg) is dissolved in 1 ml of 0.1mM sodium acetate (pH 5) and mPEG-2-methyl butyraldehyde, 20 kDa is added at 5X the molar FSH concentration. A 5 to 20-fold molar excess of the reducing agent,

28

NaCNBH_3 is added and the solution is stirred for 24 h at 4° C to couple the PEG- α methylbutanal reagent to the protein via an amine linkage.

Progress of the reaction is analyzed by SDS-PAGE or MALDI-TOF mass spectrometry to determine the degree of PEGylation. Confirmation of the degree of PEGylation, 1-mer, 2 mers etc. is carried out by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The displayed peaks for native and mono-PEGylated and other species differ by approximately 20,000 Da. The resulting reaction mixture primarily contains a mixture of native and monopegylated protein. The mono-PEGylated species are purified by column chromatography to remove free FSH and higher molecular weight species. Confirmation of N-terminal PEGylation is conducted by peptide mapping. Increasing the ratio of PEG aldehyde to protein increases the degree of PEGylation yielding a population of poly-pegylated FSH.

15

EXAMPLE 13

N-TERMINAL PEGYLATION OF HUMAN GROWTH HORMONE

Recombinant hGH (produced in *E. coli*, mammalian cells (such as CHO but not limited to) or another microbial source) is covalently attached to branched PEG2(40.3 KDa)- butyraldehyde (Example 5E).

20

Human growth hormone (~2 mg) is dissolved in 1 ml of 0.1mM sodium acetate (pH 5) and branched PEG2(40.3 KDa)- butyraldehyde is added at 5X the molar hGH concentration. A 5 to 20-fold molar excess of the reducing agent, NaCNBH_3 , is added and the solution is stirred for 24 h at 4° C to couple the branched PEG2(40.3 KDa)- butyraldehyde reagent to the protein via an amine linkage.

25

Progress of the reaction is analyzed by SDS-PAGE or MALDI-TOF mass spectrometry to determine the extent of PEGylation. Confirmation of the degree of PEGylation, 1-mer, 2 mers (if any) etc., is carried out by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The displayed peaks for native and mono-PEGylated and other species differ by approximately 40,000 Da. The resulting reaction mixture primarily contains a mixture of native and monopegylated protein, in particular due to the size and

30

geometry of the branched PEG alkanal reagent. The mono-PEGylated species are purified by column chromatography to remove free hGH and higher molecular weight species. Confirmation of N-terminal PEGylation is conducted by peptide mapping.

5

EXAMPLE 14

PEGYLATION OF AMPHOTERICIN B

The amino group of a small molecule, amphotericin B, is modified by attachment of a polymer alkanal.

10 To a solution of amphotericin B.HCl in deionized water is added a 2-fold molar excess of mPEG_{2k}-butyraldehyde (Example 1) dissolved in 0.1 M phosphate buffer at pH 6.5. To this mixture is added a solution of NaCNBH₃ (at a 1.5 to 10-fold molar excess) in phosphate buffer at pH 6.5, and the resulting solution is stirred at room temperature overnight under an argon atmosphere. Aliquots of the reaction
15 mixture are withdrawn at various time intervals to monitor the progress of the reaction by ¹H NMR. Upon completion, the reaction mixture is further diluted by addition of water, and NaCl is added to achieve saturation. The product is then extracted with dichloromethane, and the combined organic extracts are dried over anhydrous sodium sulfate, filtered to remove drying agent, and the solvent
20 evaporated by rotary evaporation. The product is then precipitated by addition of diethyl ether, and dried under vacuum overnight. The recovered product is analyzed by gel permeation chromatography to determine the extent of conjugation.

The crude product is purified by cation exchange chromatography using Poros 50 HS cation exchange resin (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA).
25 Following washing of the column with deionized water, the product is eluted with 1N NaCl solution. The conjugate containing extracts are combined, and the product is extracted with dichloromethane. The organic solution is dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and the solvent evaporated by rotary evaporation. The purified conjugate is purified by addition of diethyl ether.

30 If necessary, the product is further purified by reverse phase HPLC chromatography using a Betasil C18 column, (Keystone Scientific).

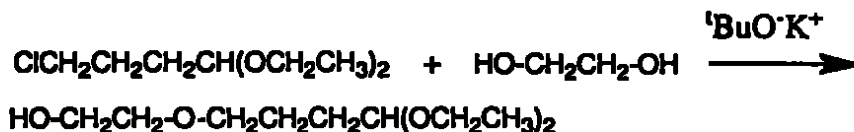
JH

EXAMPLE 15PREPARATION OF PEG(3500 DA)- α -HYDROXY- ω -BUTYRALDEHYDE BY ANIONIC RING OPENING POLYMERIZATION OF ETHYLENE OXIDE DIRECTLY ONTO AN ANIONIC ACETAL PRECURSOR

5

In this example, an acetal precursor having a site suitable for initiating ring-opening polymerization with ethylene oxide is prepared by reacting 4-chlorobutyraldehyde diethyl acetal with the di-alcohol, ethylene glycol. In this way, a halo-acetal is converted to a hydroxyl-terminated acetal. The hydroxyl group, when converted to the corresponding alkoxide anion, provides a site for initiating polymerization of ethylene oxide (EO), to thereby form a polymer alkanal precursor. The polymer alkanal precursor (acetal), upon hydrolysis, is converted to the desired polymer alkanal.

A generalized scheme for this synthetic approach for preparing a polymer alkanal of the invention is shown in FIG. 1.

A. Preparation of 2-(4,4-diethoxy-butoxy)ethanol (Compound 15A).

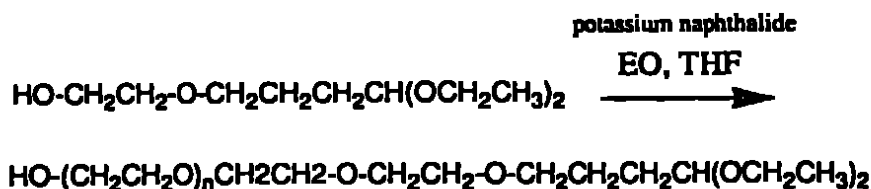
A mixture of anhydrous ethylene glycol (120 g, 1.93 moles), a 1.0M solution of potassium tert-butoxide in tert-butanol (70 ml, 0.07 moles), and 4-chlorobutyraldehyde diethyl acetal (11 g, 0.061 moles) is stirred overnight at 100 °C under an argon atmosphere. After cooling to room temperature, the reaction mixture is added to 600 ml distilled water. The product is extracted with dichloromethane (150, 125, and 125 ml). The combined extracts are then dried with anhydrous magnesium sulfate and the solvent is distilled off under reduced pressure. Next the product is subjected to vacuum distillation (kugelrohr, t = 90 - 110 °C, 0.10 mm Hg). Yield 5.5 g.

25

NMR (d_6 -DMSO): 1.11 ppm (t, 6H), 1.53 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{CH}$, 2H), 1.64 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, 2H), 3.37 ppm (t, $-\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, 2H), 3.53 ppm (t, HO-

CH₂CH₂O-, 2H), 3.62 ppm (q, -CH₂CH₃, 4H), 3.70 ppm (t, HO-CH₂-, 2H), 4.38 ppm (t, -CH acetal, 1H), 4.54 ppm (t, 1H, -OH).

5 B. Preparation of PEG(3,500 Da)-α-hydroxy-ω-butyraldehyde diethyl acetal



Compound 15A (0.51 g, 0.00247 moles), THF 200 ml, and potassium naphthalide (0.3 mol/L-tetrahydrofuran solution, 20 ml, 0.006 moles) are added to a glass reactor and stirred for 3 minutes in an argon atmosphere. Ethylene oxide (8.8 g 0.20 moles) is added to this solution and the reaction mixture is stirred for 44 h at room temperature. Next the mixture is purged with argon and 0.1M phosphate buffer (pH = 8, 100 ml) is added. The THF layer is separated and discarded. Naphthalene is removed from the solution by ethyl ether extraction. The product is extracted from the residue with dichloromethane (3 x 50 ml). The extract is dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated to about 30 ml. Next ethyl ether (250 ml) is added and the mixture is stirred 15 min at 0 °C. The precipitated product is filtered off and dried under reduced pressure.

Yield 7.2 g.

20

NMR (d₆-DMSO): 1.09 ppm (t, CH₃-, 3H) 1.52 ppm (m, C-CH₂-CH₂ -, 4H), 3.51 ppm (s, polymer backbone), 4.46 ppm (t, -CH, acetal, 1H), 4.57 ppm (t -OH, 1H).

C. PEG(3,500 Da)-α-hydroxy-ω-butyraldehyde

25 A mixture of PEG(3,500)-α-hydroxy-ω-butyraldehyde diethyl acetal (1.0 g), deionized water (20 ml), and 5% phosphoric acid to adjust the pH to 3.0 is stirred for 3 hours at room temperature. Next, sodium chloride (1.0 g) is added and the pH is adjusted to 6.8 with 0.1 M sodium hydroxide. The product is extracted with

50

dichloromethane (3 x 20 ml). The extract is dried with anhydrous magnesium sulfate and the solvent is distilled off. The wet product is dried under reduced pressure. Yield: 0.82 g.

NMR (d_6 -DMSO): 1.75 ppm (p, $-\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-CHO-}$) 2.44 ppm (dt, $-\underline{\text{CH}_2}\text{-CHO}$),
5 3.51 ppm (s, polymer backbone), 4.57 ppm (t, $-\text{OH}$), 9.66 ppm (t, $-\text{CHO}$).

EXAMPLE 16

PREPARATION OF METHOXY-PEG(3500 DA) BUTYRALDEHYDE

This example demonstrates the preparation of an illustrative end-capped
10 PEG-alkanal from a PEG α -hydroxy- ω -alkanal acetal.

A. mPEG(3,500 Da)-butyraldehyde diethyl acetal

A mixture of PEG(3,500 Da)- α -hydroxy- ω -butyraldehyde diethyl acetal
(3.5 g, 0.001 moles), toluene (50 ml), 1.0M solution of potassium tert-butoxide in
15 tert-butanol (5ml, 0.005 moles) and methyl p-toluene sulfonate (0.75 g, 0.004
moles) is stirred overnight at 45 °C. Next, the solvents are distilled off under
reduced pressure (rotovaporator). The crude product is dissolved in
dichloromethane and added to cold ethyl ether. The precipitated product is filtered
off and dried under reduced pressure. Yield: 3.1 g.
20 NMR (d_6 -DMSO): 1.09 ppm (t, CH_3 -, 3H) 1.52 ppm (m, $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$ -, 4H), 3.24
ppm (s, $\text{CH}_3\text{O-}$, 3H), 3.51 ppm (s, polymer backbone), 4.46 ppm (t, $-\text{CH}$, acetal,
1H).

B. mPEG(3,500 Da)-butyraldehyde

25 A mixture of mPEG(3,500)-butyraldehyde diethyl acetal (1.0 g), deionized
water (20 mL), and 5% phosphoric acid to adjust the pH to 3.0 is stirred for 3 hours
at room temperature. Next, sodium chloride (1.0 g) is added and the pH is adjusted
to 6.8 with 0.1 M sodium hydroxide. The product is extracted with
dichloromethane (3 x 20 ml). The extract is dried with anhydrous magnesium
30 sulfate and the solvent is distilled off. The wet product is dried under reduced
pressure. Yield: 0.85 g.

NMR (d_6 -DMSO): 1.75 ppm (p, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}-$, 2H) 2.44 ppm (dt, $-\text{CH}_2-\text{CHO}$, 2H), 3.24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$, 3H), 3.51 ppm (s, polymer backbone), 9.66 ppm (t, $-\text{CHO}$, 1H).

5

EXAMPLE 17**PREPARATION OF METHOXY-PEG(2 KDA) 2-METHYLBUTYRALDEHYDE**

This example describes the synthesis of an illustrative polymer 2-alkylsubstituted alkanal of the invention. This polymer, rather than possessing a straight alkylene chain separating the aldehyde carbon from the linker, possesses a methyl substituent in the C-2 position.

OVERVIEW: The protected acetal reagent, 17-A, was prepared from a commercially available starting material, 2-methyl-4-chlorobutanoate, by first reducing the butanoate carbon to the corresponding alcohol, followed by oxidation to the butyraldehyde. The butyraldehyde was then protected as the corresponding acetal to provide a protected acetal reagent for coupling to PEG. Following coupling to PEG, the resulting polymer acetal was hydrolyzed in acid to provide the desired polymer alkanal.

A. Preparation of 4-chloro-2-methylbutyraldehyde diethyl acetal**Preparation of 4-chloro-2-methylbutanol-1**

A solution of 2-methyl 4-chlorobutanoate (TCI America) (22.0 g, 0.146 moles) in ethyl ether (80 ml) was added dropwise during 30 min to a stirred solution of lithium aluminum hydride (4.55 g, 0.12 moles) in ethyl ether (360 ml) at 0°C under argon atmosphere. Next methanol (12 ml) was added dropwise over a period of 30 min and then ice-cold 2N HCl (420 ml) was added dropwise over a 20 minute period. The reaction mixture was transferred to a separatory funnel and the ether layer, containing 4-chloro-2-methylbutanol -1, was separated. Additional product was extracted from the water layer with ethyl ether (3 x 200 ml). The ether extracts were combined, dried with anhydrous magnesium sulfate, and the solvent was distilled under reduced pressure. Yield 18.6 g.

/

51

NMR (d_6 -DMSO): 0.84 ppm (d, $-CH_3$, 3H), 1.50 ppm (m, $-\underline{CH_2}CH_2Cl$, 1H), 1.68 ppm (m, $-CH-$, 1H), 1.82 ppm (m, $-\underline{CH_2}CH_2Cl$, 1H) 3.26 ppm (t, $-\underline{CH_2}OH$, 2H), 3.66 ppm (m, $-CH_2Cl$, 2H), 4.50 ppm (t, $-OH$, 1H).

5 4-Chloro-2-methylbutyraldehyde

Pyridinium chlorochromate (23.6 g, 0.110 g) was added gradually to a stirred solution of 4-chloro-2-methylbutanol -1 (8.80 g, 0.078 moles) in anhydrous dichloromethane (470 ml). The mixture was stirred overnight at room temperature under an argon atmosphere. Dry ether (820 ml) was added; the mixture was stirred
10 for 20 minutes, and then was filtered to remove excess of oxidizing agent. The solution was then filtered through a column filled with 400 g of Florisil, and the solvents were distilled off under reduced pressure. Yield 6.0 g.

NMR (d_6 -DMSO): 1.06 ppm (d, $-CH_3$, 3H), 1.74 ppm (m, $-\underline{CH_2}CH_2Cl$, 1H), 2.14 ppm (m, $-\underline{CH_2}CH_2Cl$, 1H), 2.56 ppm (m, $-CH$, 1H), 3.69 ppm (m, $-CH_2Cl$, 2H),
15 9.60 ppm (t, $-CHO$, 1H).

4-Chloro-2-methylbutyraldehyde diethyl acetal

A mixture of 4-chloro-2-methylbutyraldehyde (4.8 g, 0.040 moles), triethyl orthoformate (6.48 g, 0.044 moles), ethyl alcohol (3.0 g), and p-toluenesulfonic acid monohydrate (0.0144 g, 0.000757 moles) was stirred at 45 °C overnight under an argon atmosphere. Next, after cooling to room temperature, Na_2CO_3 (0.40 g) was added and the mixture was stirred for 15 min. The reaction mixture was filtered and ethyl alcohol and residual triethyl orthoformate were distilled off under reduced pressure. The residue was subjected to fractional vacuum distillation giving 3.2 g of
25 pure 4-chloro-2-methylbutyraldehyde diethyl acetal.

NMR (d_6 -DMSO): 0.85 ppm (d, $-CH_3$, 3H) 1.13 ppm (m, $-CH_3$, 6H), 1.52 ppm (m, $-CH-$, 1H), 1.87 ppm (m, $-\underline{CH_2}CH_2Cl$, 2H), 3.35 – 3.75 ppm (bm, $-O\underline{CH_2}CH_3$, 4H, and $-CH_2Cl$, 2H), 4.22 ppm (d, $-CH$ acetal, 1H).

30 B. mPEG (2K Da)-2-Methylbutyraldehyde diethyl acetal

A solution of mPEG (2K Da) (2.0g, 0.001 moles) in toluene (30 ml) was azeotropically dried by distilling off toluene under reduced pressure. The dried

mPEG 2K was dissolved in anhydrous toluene (15 ml) and 1.0 M solution of potassium tert-butoxide in tert -butanol (4.0 ml, 0.004 moles) and 4-chloro-2-methylbutyraldehyde diethyl acetal from A above (0.5 g, 0.00277 moles) were added. Next, lithium bromide (0.05 g) was added and the mixture was stirred at 100 °C overnight under an argon atmosphere. After cooling to room temperature, the mixture was filtered and added to 150 ml ethyl ether at 0-5°C. The precipitated product was filtered off and dried under reduced pressure. Yield: 1.5 g.
NMR (d₆-DMSO): 0.83 ppm (d, -CH₃, 3H) 1.10 ppm (m, -CH₃O, 6H), 1.24 ppm (m, -CH-, 1H), 1.72 ppm (m, PEG-O-CH₂-CH₂-, 2H), 3.24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3.51 ppm (s, polymer backbone), 4.18 ppm (d, -CH acetal, 1H).
Substitution: ~100%.

C. mPEG (2K Da)-2-Methylbutyraldehyde

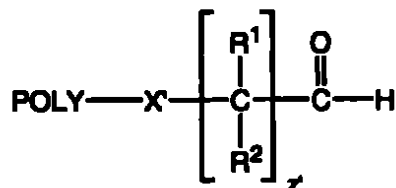
A mixture containing mPEG (2K Da)-2-methylbutyraldehyde, diethyl acetal from B above (1.0 g), deionized water (20 ml), and 5% phosphoric acid to adjust the pH to 3.0 was stirred for 3 hours at room temperature. Next, sodium chloride (1.0 g) was added and the pH was adjusted to 6.8 with 0.1 M sodium hydroxide. The product was extracted with dichloromethane (3 x 20 ml). The extract was dried with anhydrous magnesium sulfate and the solvent was distilled off under reduced pressure. Yield: 0.83 g.
NMR (d₆-DMSO): 1.01 ppm (d, -CH₃, 3H) 1.56 ppm (m, -CH, 1H), 1.90 ppm (m, PEG-O-CH₂-CH₂-, 1H), 2.45 ppm (m, PEG-O-CH₂-CH₂-, 1H), 3.24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3.51 ppm (s, polymer backbone), 9.56 ppm (d, -CH aldehyde, 1H).
Substitution: ~100%.

52

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A water-soluble polymer having the structure:

5



I

10

wherein:

POLY is a water-soluble polymer segment;

X' is a linker moiety;

z' is an integer from 1 to about 21;

15

R¹, in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl;

R², in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl,

20

and further wherein the following apply:

-when POLY is linear:

25

(a) the total number of carbonyls present in said polymer is 0 or 2 or greater except when X' comprises one or more contiguous (-CH₂CH₂O-) segments,

30

(b) and further wherein X' is oxygen or comprises at least one (-CH₂CH₂O-) segment and z' is from 2 to 12, then at least one of R¹ or R² in at least one occurrence is an organic radical as defined above or said polymer is heterobifunctional, where POLY comprises a reactive group at one terminus that is not hydroxy, and

r

-when POLY is branched:

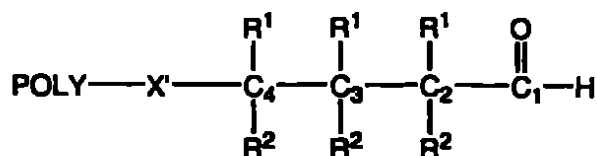
(c) either (i) at least one of R^1 or R^2 in at least one occurrence is an organic radical as defined above or (ii) X' includes $-(CH_2CH_2O)_b-$ where b is from 1 to about 20 in the instance where POLY comprises a lysine residue,

(d) and further wherein said POLY has 2 polymer arms, then neither polymer arm comprises oxygen as the only heteroatom in the instance where POLY comprises "C-H" as a branch point.

2. The polymer of claim 1, wherein z' ranges from 2 to 21.

3. The polymer of claim 1, wherein z' ranges from 3 to 12.

4. The polymer of claim 1, having the structure:



I-A

wherein POLY, X' , each R^1 , each R^2 and R^3 are as previously defined.

5. The polymer of claim 4, wherein the R^1 attached to C_2 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

6. The polymer of claim 5, wherein the R^1 attached to C_2 is lower alkyl.

7. The polymer of claim 6, wherein the R^1 attached to C_2 is selected from the group consisting of methyl, ethyl and propyl.

8. The polymer of claim 4, wherein the R^1 attached to C_3 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

53

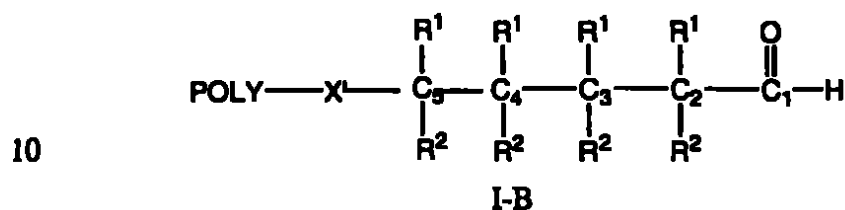
9. The polymer of claim 8, wherein the R^1 attached to C_3 is lower alkyl.

10. The polymer of claim 4, wherein the R^1 attached to C_4 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

5

11. The polymer of claim 10, wherein the R^1 attached to C_4 is lower alkyl.

12. The polymer of claim 1, having the structure:



wherein POLY, X' , and each R^1 and each R^2 are as previously defined.

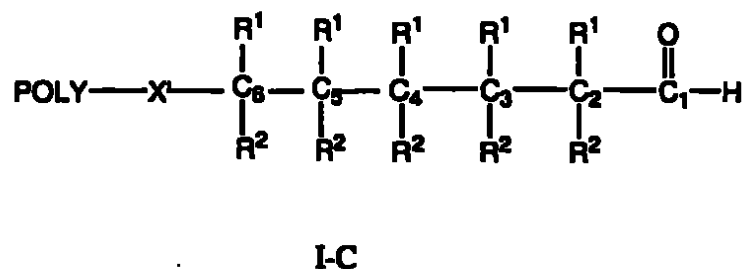
13. The polymer of claim 12, wherein the R^1 attached to C_2 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

15

14. The polymer of claim 12, wherein either the R^1 attached to C_3 or C_4 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

20

15. The polymer of claim 1, having the structure:



25

wherein POLY, X' , and each R^1 and each R^2 are as previously defined.

16. The polymer of claim 15, wherein the R^1 attached to C_2 is alkyl, and all other R^1 and R^2 variables are H.

17. The polymer of claim 15, wherein one of the R¹ variables attached to C₃ or C₄ or C₅ is alkyl, and all other R1 and R2 variables are H.

5 18. The polymer of claim 1, wherein X' comprises a moiety corresponding to the structure:



10 wherein:

- c is zero to 8,
- D is O, NH, or S,
- e is 0, 1
- f is zero to 8,
- 15 p is zero to 8,
- M is -NH, O
- K is NH, O
- q is from zero to 8, and
- r and s are each independently 0, 1

20 19. The polymer of claim 1, wherein X' includes a moiety corresponding to the structure $-(CH_2CH_2O)_b-$ or $-(CH_2CH_2NH)_g-$, and b and g are each independently 1 to 20.

25 20. The polymer of claim 19, wherein b and g are each independently 1 to 10.

 21. The polymer of claim 20, wherein b and g are each independently 1 to 6.

30

51

22. The polymer of claim 18, wherein X' comprises a moiety corresponding to the structure:



5

wherein:

P and T are each independently $-(CH_2CH_2O)_b-$ or $-(CH_2CH_2NH)_g-$

b and g are each independently 1 to 20,

and the remaining variables are as defined in claim 18.

10

23. The polymer of claim 1, wherein said X' comprises $-C(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$ or $-NHC(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$.

24. The polymer of claim 1, wherein POLY is selected from the group consisting of poly(alkylene oxide), poly(vinyl pyrrolidone), poly(vinyl alcohol), polyoxazoline, poly(acryloylmorpholine), and poly(oxyethylated polyol).

15

25. The polymer of claim 1, wherein POLY is a poly(alkylene oxide).

26. The polymer of claim 25, wherein POLY is a poly(ethylene glycol).

20

27. The polymer of claim 26, wherein the poly(ethylene glycol) is terminally capped with an end-capping moiety.

28. The polymer of claim 27, wherein the end-capping moiety is independently selected from the group consisting alkoxy, substituted alkoxy, alkenyloxy, substituted alkenyloxy, alkynyloxy, substituted alkynyloxy, aryloxy, substituted aryloxy.

25

29. The polymer of claim 28, wherein the end-capping moiety is selected from the group consisting of methoxy, ethoxy, and benzyloxy.

30

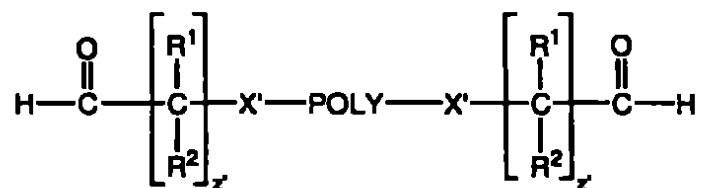
30. The polymer of claim 26, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular mass of from about 100 daltons to about 100,000 daltons.

5 31. The polymer of claim 26, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular mass of from about 1,000 daltons to about 50,000 daltons.

10 32. The polymer of claim 26, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular mass of from about 2,000 daltons to about 30,000 daltons.

33. The polymer of claim 1, comprising the structure:

15



II

wherein POLY, each X', each (z'), and each R¹ and each R² are as previously defined.

20

34. The polymer of claim 33, wherein said POLY is linear and the polymer is homobifunctional.

25 35. The polymer of claim 26, wherein said poly(ethylene glycol) has a structure selected from the group consisting of linear, branched and forked.

36. The polymer of claim 26, wherein said poly(ethylene glycol) comprises the structure:

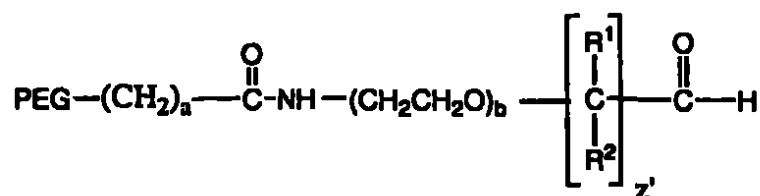
r

5



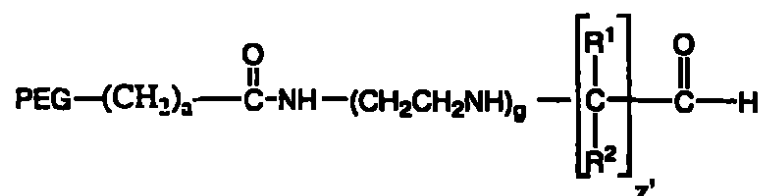
where n is from about 10 to about 4000, and Z comprises a moiety selected from the group consisting of hydroxy, amino, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, isothiocyanate, hydrazide, maleimide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodoacetamide, alkoxy, benzyloxy, silane, lipid, phospholipid, biotin, and fluorescein.

- 10 37. The polymer of claim 1, having a structure selected from the group consisting of:

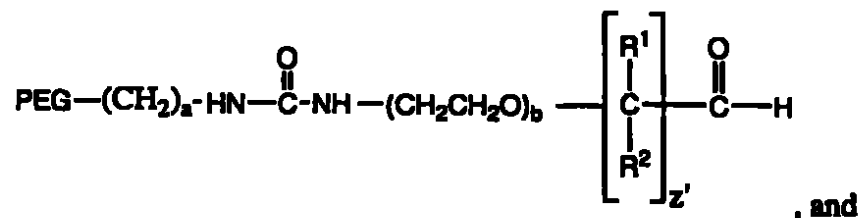


III-A

15



IV-A

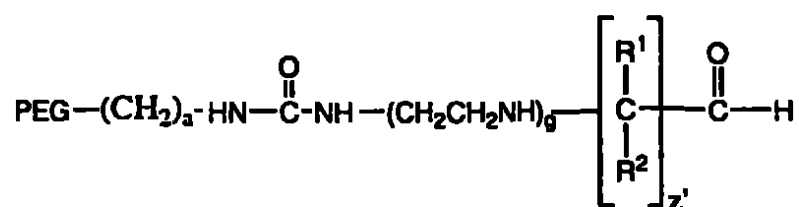


, and

III-C

20

r
r

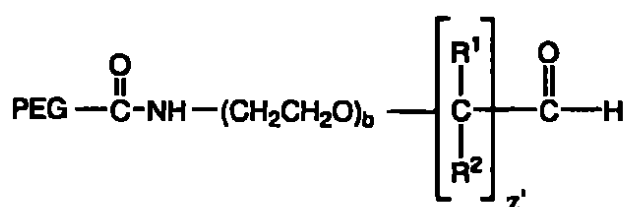


IV-C

wherein PEG is poly(ethylene glycol), b and g are each independently 0 to 20, a is 0 to 6, and the remaining variables are as defined in claim 1.

5

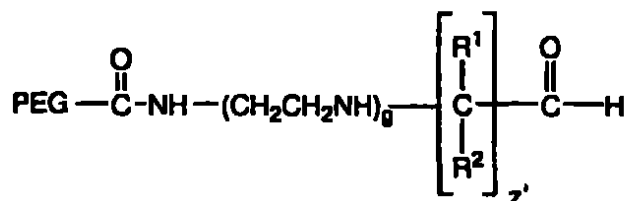
38. The polymer of claim 37, having the structure:



III-B

10

or



IV-B

wherein the variables are as defined as in claim 37.

15

39. The polymer of claim 37, wherein PEG has a structure selected from the group consisting of linear, branched, and forked.

20

40. The polymer of claim 37, wherein b and g each independently are from 1-8.

41. The polymer of claim 37, wherein b and g each independently are from 1 to 6.

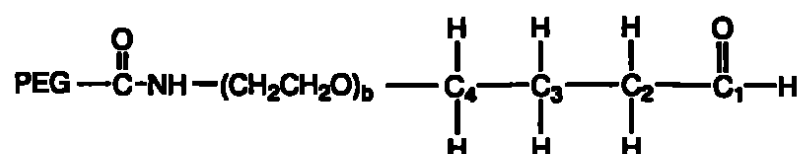
5b

42. The polymer of claim 37, wherein z' is from 2 to 6.

43. The polymer of claim 37, wherein z' is 3.

5 44. The polymer of claim 37, wherein a is 0 or 1.

45. The polymer of claim 37, having the structure:



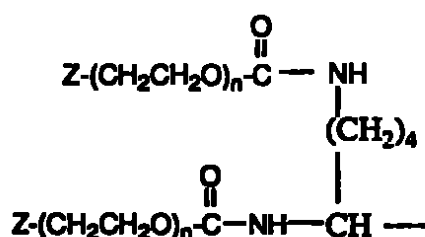
10

III-D

46. The polymer of claim 45, wherein "PEG" is a poly(ethylene glycol) having a structure corresponding to:

15 $Z-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$,

or



20

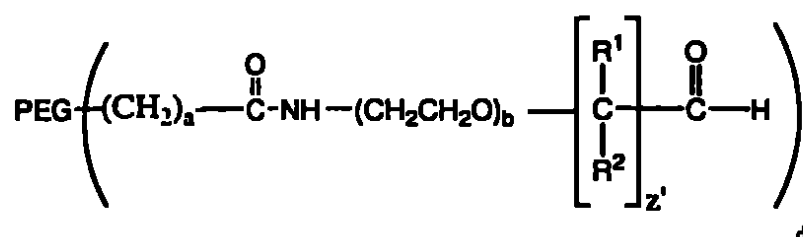
V

wherein n in each occurrence is independently from about 10 to about 4000, and Z comprises a moiety selected from the group consisting of hydroxy, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, isothiocyanate, maleimide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodoacetamide, alkoxy, benzyloxy, silane, phospholipid, biotin, and fluorescein.

25

47. The polymer of claim 46, wherein Z is alkoxy, and n in each occurrence is the same and ranges from about 100 -600.

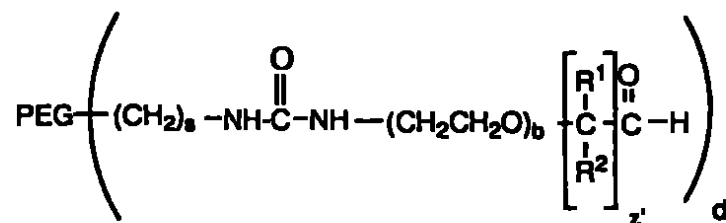
5 48. The polymer of claim 1, having the structure:



VI-A

or

10



VI-B

wherein:

PEG is poly(ethylene glycol),

15

b is 0 to 20,

s is 0 to 6,

d is 1, 2 or 3,

and the remaining variables are as defined in claim 1.

20

49. The polymer of claim 48, wherein PEG is linear or branched.

50. The polymer of claim 48, wherein R¹ and R² in each occurrence are H.

51. The polymer of claim 48, wherein z' ranges from 3 to 12.

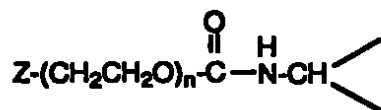
25

57

52. The polymer of claim 48, wherein z' is 3.

53. The polymer of claim 48, wherein d is 2 and PEG corresponds to the structure:

5

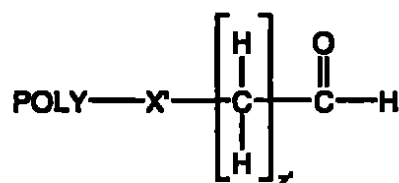


wherein n is from about 10 to about 4000, Z comprises a moiety selected from the group consisting of hydroxy, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, isothiocyanate, maleimide, hydrazide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodoacetamide, alkoxy, benzyloxy, silane, lipid, phospholipid, biotin, and fluorescein, and the remaining variables are as defined in claim 48.

54. The polymer of claim 53, wherein Z is alkoxy or benzyloxy, n ranges from about 200 to about 1500, and b is from 1 to 8.

55. A composition comprising a water-soluble polymer having the structure:

20



VII

wherein:

25

POLY is a water-soluble polymer segment;

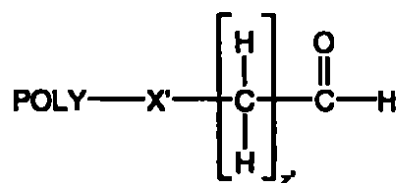
X' is a linker moiety, and

z' is an integer from 1 to about 21,

5
5

and said composition is absent detectable amounts of iodine-containing species or retro-Michael type reaction products.

- 5 56. A composition comprising a water-soluble polymer having the structure:



VII

- 10 wherein:

POLY is a linear, terminally end-capped water-soluble polymer segment;

X' is a linker moiety,

z' is an integer from 1 to about 21,

- 15 and said composition is absent detectable amounts of dialdehyde polymer derivative.

57. The composition of claim 55 or 56, wherein z' ranges from 2 to 21.

- 20 58. The composition of claim 55 or 56, wherein z' ranges from 3 to 12.

59. The composition of claim 55 or 56, wherein z' ranges from 3 to 8.

- 25 60. The composition of claim 55 or 56, wherein POLY is selected from the group consisting of a poly(alkylene oxide), poly(vinyl pyrrolidone), poly(vinyl alcohol), polyoxazoline, poly(acryloylmorpholine), and poly(oxyethylated polyol).

- 30 61. The composition of claim 55, wherein POLY is a poly(alkylene oxide).

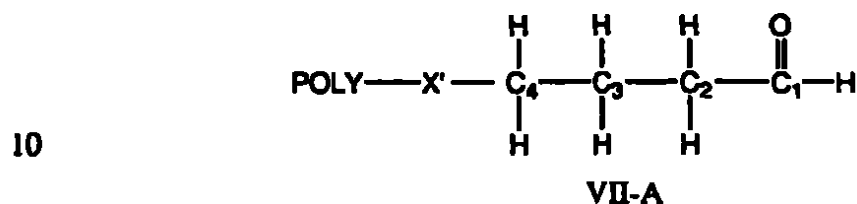
48

62. The composition of claim 61, wherein POLY is a poly(ethylene glycol).

63. The composition of claim 56, wherein POLY is a poly(alkylene oxide).

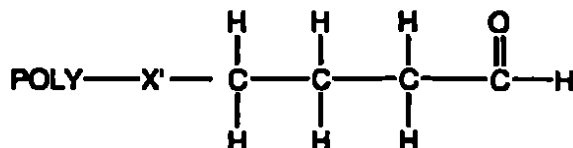
5 64. The composition of claim 63, wherein POLY is a poly(ethylene glycol).

65. The composition of claim 55, wherein said polymer comprises the structure:



66. The composition of claim 65, wherein POLY is a poly(ethylene glycol).

15 67. The composition of claim 56, wherein said polymer comprises the structure:



20 68. The composition of claim 67, wherein POLY is a poly(ethylene glycol).

69. The composition of claim 65, wherein X' comprises a moiety corresponding to the structure:



wherein:

c is zero to 8,

D is O, NH, or S,

e is 0, 1

f is zero to 8,

p is zero to 8,

5

M is -NH, O

K is NH, O

q is from zero to 8, and

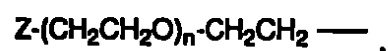
r and s are each independently 0, 1.

10

70. The composition of claim 65, wherein X' is hydrolytically stable.

71. The composition of claim 65, wherein POLY corresponds to the structure:

15



X' is O,

n is from about 10 to about 4000, and

20

Z comprises a moiety selected from the group consisting of hydroxy, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, isothiocyanate, maleimide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodoacetamide, alkoxy, benzyloxy, silane, phospholipid, biotin, and fluorescein.

25

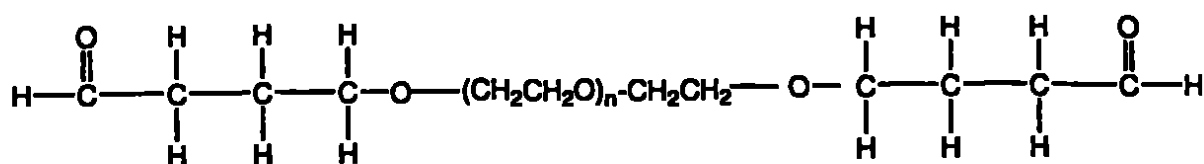
72. The composition of claim 71, wherein Z is C1 to C20 alkoxy or benzyloxy.

73. The composition of claim 71, wherein said polymer comprises the structure:

30

;

84



VIII

5 where n is as defined in claim 71.

74. The composition of claim 72, wherein Z is methoxy.

10 75. The composition of claim 66, wherein said poly(ethylene glycol) has a structure selected from the group consisting of linear, branched and forked.

76. The composition of claim 66, wherein X' includes an oligomeric moiety corresponding to the structure $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$ or $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, and b and g are
15 each independently 1 to 20.

77. The composition of claim 76, wherein b and g are each independently 1 to 10.

20 78. The composition of claim 20, wherein b and g are each independently 1 to 6.

79. The composition of claim 76, wherein said oligomeric moiety is covalently attached to the C4 methylene.

25

80. The composition of claim 79, wherein said X' further comprises an amide or a urethane.

30 81. The composition of claim 80, wherein X' comprises a moiety selected from the group consisting of $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, and b and g are as defined in claim 76 above.

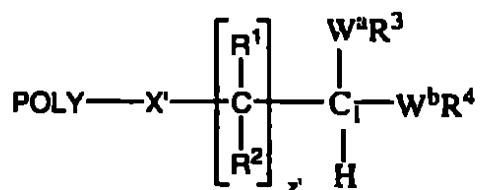
82. A hydrate or acetal form of the water-soluble polymer of claim 1.

83. A hydrate or acetal form of the water-soluble polymer of claim 55.

5 84. The acetal of claim 82, wherein said acetal is selected from the group consisting of dimethyl acetal, diethyl acetal, di-isopropyl acetal, dibenzyl acetal, 2,2,2-trichloroethyl acetal, bis(2-nitrobenzyl) acetal, S,S'-dimethyl acetal, and S,S'-diethyl acetal.

10 85. A water soluble polymer of claim 1, protected as a dioxolane.

86. A polymer comprising the structure:



IX

wherein:

POLY is a water-soluble polymer segment;

X' is a linker moiety

z' is an integer from 1 to about 21;

20 R¹, in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl;

25 R², in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl,

W^a and W^b are each independently O or S, and

R³ and R⁴ are each independently H, or an organic radical selected from the group consisting of methyl, ethyl, isopropyl, benzyl, 1,1,1-trichloroethyl,

60

and nitrobenzyl, or when taken together, are $-(CH_2)_2-$ or $-(CH_2)_3-$, forming a 5 or 6 membered ring when considered together with W^a , C_1 , and W^b .

87. The polymer of claim 83, wherein the following apply:

5

-when POLY is linear:

(a) then the total number of carbonyls present in said polymer is 0 or 2 or greater except when X' comprises one or more contiguous $(-CH_2CH_2O-)$ segments,

10

(b) and further wherein X' is oxygen or comprises at least one $(-CH_2CH_2O-)$ segment and z' is from 2 to 12, then at least one of R^1 or R^2 in at least one occurrence is an organic radical as defined above or said polymer is heterobifunctional, where POLY comprises a reactive group at one terminus that is not hydroxy, and

-when POLY is branched:

15

(c) then either at least one of R^1 or R^2 in at least one occurrence is an organic radical as defined above or X' includes $-(CH_2CH_2O)_b-$ where b is from 1 to about 20,

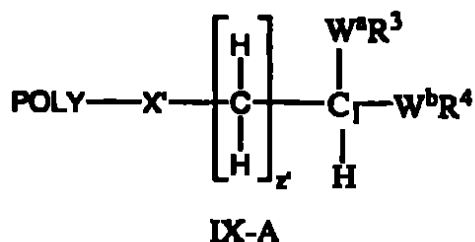
and further in the instance where POLY comprises a lysine residue,

20

(d) and has 2 polymer arms, then neither polymer arm comprises oxygen as the only heteroatom in the instance where POLY comprises "C-H" as a branch point.

88. A water-soluble polymer having the structure:

25



wherein:

30

POLY is a water-soluble polymer segment;

X' is a linker moiety,

z' is an integer from 1 to about 21,

W^a and W^b are each independently O or S, and

- 5 R^3 and R^4 are each independently H, or an organic radical selected from the group consisting of methyl, ethyl, isopropyl, benzyl, 1,1,1-trichloroethyl, and nitrobenzyl, or when taken together, are $-(CH_2)_2-$ or $-(CH_2)_3-$, forming a 5 or 6 membered ring when considered together with W^a , C_1 , and W^b .

- 10 89. The polymer of claim 88, wherein said polymer is absent detectable amounts of iodine-containing species or retro-Michael-type reaction products.

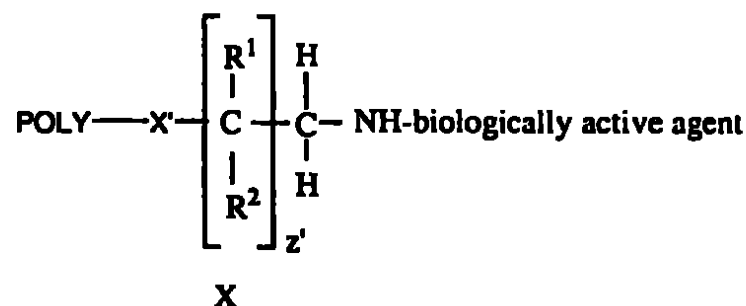
90. A conjugate formed by reaction of a biologically active agent with the polymer of claim 1.

- 15 91. A conjugate formed by reaction of a biologically active agent with the composition of claim 55.

92. A conjugate formed by reaction of a biologically active agent with the composition of claim 56.

20

93. A conjugate comprising the following structure:



25

wherein:

POLY is a water-soluble polymer segment;

X' is a linker moiety;

z' is an integer from 1 to about 21;

61

R^1 , in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl;

R^2 , in each occurrence, is independently H or an organic radical
5 selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl,

-"NH-biologically active agent" represents a biologically active agent comprising an amino group,

and further wherein the following apply:

10

-when POLY is linear:

(a) the total number of carbonyls present in said polymer is 0 or 2 or greater except when X' comprises one or more contiguous $(-CH_2CH_2O-)$ segments,

15

(b) and X' is oxygen or comprises at least one $(-CH_2CH_2O-)$ segment and z' is from 2 to 12, then at least one of R^1 or R^2 in at least one occurrence is an organic radical as defined above or said polymer is heterobifunctional where POLY comprises a reactive group at one terminus that is not hydroxy, and

20

-when POLY is branched:

(c) then either at least one of R^1 or R^2 in at least one occurrence is an organic radical as defined above or X' includes $-(CH_2CH_2O)_b-$ where b is from 1 to about 20,

25

and further in the instance where POLY comprises a lysine residue,

(d) and has 2 polymer arms, then neither polymer arm comprises oxygen as the only heteroatom in the instance where POLY comprises "C-H" as a branch point.

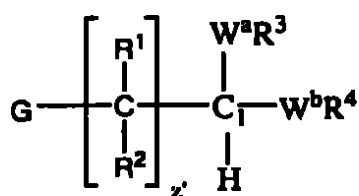
30

94. A hydrogel formed using the water soluble polymer of claim 1.

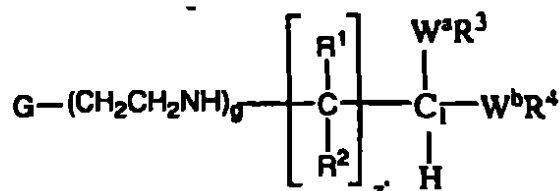
95. A hydrogel formed using the composition of claim 55.

96. A protected aldehyde comprising a structure selected from the group consisting of :

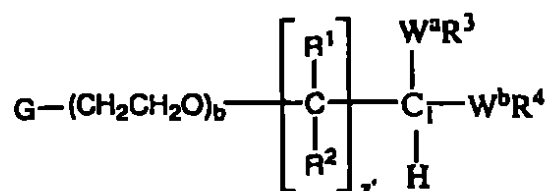
5



XI-A



XI-B



10

XI-C

wherein :

15

z' is an integer from 1 to about 21;

R^1 , in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl;

20

R^2 , in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl,

W^a and W^b are each independently O or S, and

R^3 and R^4 are each independently H, or an organic radical selected from the group consisting of methyl, ethyl, isopropyl, benzyl, 1,1,1-trichloroethyl,

62

and nitrobenzyl, or when taken together, are $-(CH_2)_2-$ or $-(CH_2)_3-$, forming a 5 or 6 membered ring when considered together with W^a , C_1 , and W^b .

b and g are each independently 1 to 20, and

G is a functional group.

5

97. The protected aldehyde of claim 96, wherein G is a leaving group.

98. The protected aldehyde of claim 97, wherein G is selected from the group consisting of Cl, Br, para-tolylsulfonate ester, methylsulfonyl ester, trifluorosulfonyl ester, and trifluoroethylsulfonyl ester.

10

99. The protected aldehyde of claim 96, wherein G is a functional group selected from the group consisting of -OH, -NH₂, -SH, and protected forms thereof.

15

100. The protected aldehyde of claim 96, wherein z' is ranges from 2 to 12.

101. The protected aldehyde of claim 96, wherein R¹ in any one position selected from the group consisting of C₂ (α), C₃ (β), and C₄ (γ), is alkyl, and all other R¹ and R² variables are H.

20

102. The protected aldehyde of claim 96, wherein b and g are each independently 1 to 8.

103. The protected aldehyde of claim 96, wherein b and g are each independently 1 to 6.

25

104. The protected aldehyde of claim 96, wherein b and g each equal 4.

105. A method of forming a water-soluble polymer alkanal, optionally in protected form, said method comprising the steps of:

30

reacting a water soluble polymer comprising at least one reactive group, Y,
with a protected alkanal reagent comprising from about 2 to 20 carbon atoms and a
reactive group, K, suitable for displacement by or alternatively, reaction with Y,
under conditions effective to form a water soluble polymer alkanal in protected
5 form.

106. The method of claim 105, wherein said reacting step is carried out in
an organic solvent.

107. The method of claim 106, wherein said organic solvent is selected
from the group consisting of toluene, chloroform, methylene chloride, acetonitrile,
acetone, dioxane, methanol, and ethanol.

108. The method of claim 105, wherein said reacting is carried out under an
15 inert atmosphere.

109. The method of claim 105, wherein said reacting is carried out at
temperatures ranging from about 20°C to about 150°C.

20 110. The method of claim 105, further comprising hydrolyzing said water
soluble polymer alkanal in protected form under acidic conditions to thereby form
the corresponding water soluble polymer alkanal.

111. The method of claim 110, wherein said hydrolyzing is carried out in
25 aqueous solvent.

112. The method of claim 111, wherein said alkanal reagent comprises 4 or
more carbon atoms.

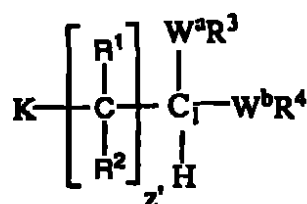
30 113. The method of claim 112, wherein said hydrolyzing is carried out at a
pH of no lower than about 3.

63

114. The method of claim 105, wherein said alkanal reagent is protected as an acetal.

115. The method of claim 114, wherein said acetal is selected from the group consisting of dimethyl acetal, diethyl acetal, di-isopropyl acetal, dibenzyl acetal, 2,2,2-trichloroethyl acetal, bis(2-nitrobenzyl) acetal, S,S'-dimethyl acetal, and S,S'-diethyl acetal, cyclic acetals and cyclic thioacetals.

116. The method of claim 105, wherein said water soluble polymer comprises the structure, POLY-Y, and said protected alkanal reagent comprises the structure,



XI-D

wherein:

z' is an integer from 1 to about 21;

R^1 , in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl;

R^2 , in each occurrence, is independently H or an organic radical selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, and substituted aryl,

W^a and W^b are each independently O or S, and

R^3 and R^4 are each independently H or an organic radical selected from the group consisting of methyl, ethyl, isopropyl, benzyl, 1,1,1-trichloroethyl, and nitrobenzyl, or when taken together, are $-(\text{CH}_2)_2-$ or $-(\text{CH}_2)_3-$, forming a 5 or 6 membered ring when considered together with W^a , C_1 , and W^b .

117. The method of claim 116, wherein POLY is selected from the group consisting of a poly(alkylene oxide), poly(vinyl pyrrolidone), poly(vinyl alcohol), polyoxazoline, poly(acryloylmorpholine), and poly(oxyethylated polyol).

5 118. The method of claim 117, wherein POLY is a poly(ethylene glycol).

119. The method of claim 118, wherein the poly(ethylene glycol) is terminally capped with an end-capping moiety.

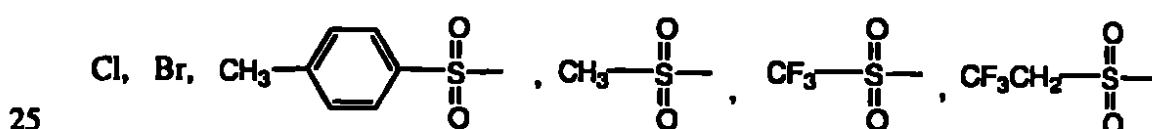
10 120. The method of claim 119, wherein the end-capping moiety is selected from the group consisting alkoxy, substituted alkoxy, alkenyloxy, substituted alkenyloxy, alkynyloxy, substituted alkynyloxy, aryloxy, substituted aryloxy.

121. The method of claim 120, wherein the end-capping moiety is selected from the group consisting of methoxy, ethoxy, and benzyloxy.

122. The method of claim 119, wherein:

POLY-Y comprises the structure $Z-(CH_2CH_2O)_nH$, wherein n is from about 10 to about 4000, and Z is selected from the group consisting of $-OCH_3$,
20 $-OCH_2CH_3$, $-OCH_2(C_6H_5)$,

and K is selected from the group consisting of:



wherein:

R^1 and R^2 are each independently H or lower alkyl, and

W^a and W^b are each O.

30 123. The method of claim 122, wherein z' ranges from 4 to about 12.

124. The method of claim 122, wherein z' ranges from 4 to about 8.

5 125. The method of claim 122, wherein R^1 and R^2 are both H in each occurrence.

126. The method of claim 122, wherein said a water soluble polymer alkanal in protected form is formed in greater than about 85% yield.

10 127. The method of claim 126, wherein said water soluble polymer alkanal in protected form is formed in greater than about 95% yield.

128. The method of claim 122, further comprising hydrolyzing said water soluble polymer alkanal in protected form under acidic conditions to thereby form
15 the corresponding water soluble polymer alkanal in a reaction mixture.

129. The method of claim 128, wherein said hydrolyzing is carried out in aqueous solvent.

20 130. The method of claim 126, further comprising the step of isolating said alkanal from the reaction mixture.

131. The method of claim 130, wherein said isolating comprises:
raising the pH of the reaction mixture to from about 6.0 to 7.5,
25 extracting the alkanal into an organic solvent, and
removing the solvent.

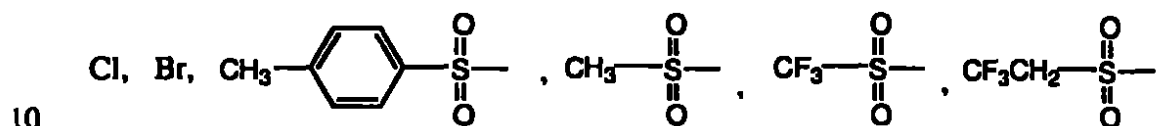
132. The method of claim 131, wherein said isolated alkanal is absent detectable amounts of $Z-(CH_2CH_2O)_nH$ and retro-Michael type reaction products.
30

133. The method of claim 132, wherein said isolated alkanal has a purity of at least about 95%, based upon polymeric contaminants.

134. The method of claim 118, wherein:

POLY-Y comprises the structure $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, wherein n is
5 from about 10 to about 4000,

and K is selected from the group consisting of:

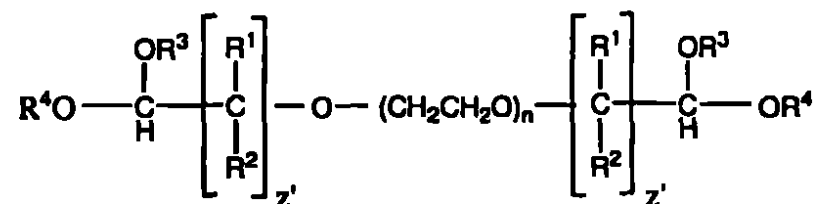


wherein:

R^1 and R^2 are each independently H or lower alkyl, and

W^a and W^b are each O, to form an alkanal in protected form having
the structure:

15



XII

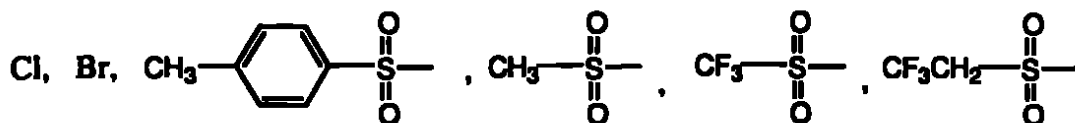
20 135. The method of claim 118, wherein:

POLY-Y comprises the structure $\text{Z}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, wherein n is
from about 10 to about 4000, and Z is protected hydroxyl,

and K is selected from the group consisting of:

,

65



wherein:

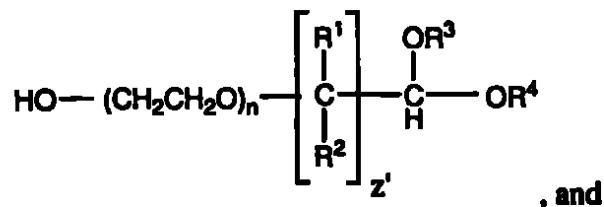
5

R^1 and R^2 are each independently H or lower alkyl, and

W^a and W^b are each O.

136. The method of claim 135, further comprising after said reacting step, deprotecting said protected hydroxyl to form

10



XI-E

converting said terminal ---OH on the poly(ethylene glycol) to a functional group other than hydroxyl.

15

137. The method of claim 136, wherein said functional group is selected from the group consisting of amino, ester, carbonate, aldehyde, alkenyl, acrylate, methacrylate, acrylamide, sulfone, thiol, carboxylic acid, isocyanate, isothiocyanate, maleimide, vinylsulfone, dithiopyridine, vinylpyridine, iodoacetamide, and silane.

20

138. The method of claim 137, wherein said functional group is selected from the group consisting of N-hydroxysuccinimidyl ester, benzotriazolyl carbonate, amine, protected amine, vinylsulfone, and maleimide.

25

r
r

139. The method of claim 136, further comprising the step of hydrolyzing said water soluble polymer alkanal in protected form under acidic conditions to thereby form the corresponding water soluble polymer alkanal.

5 140. The method of claim 118, wherein Y in said POLY-Y is an ionizable group or is a derivative of an ionizable group.

141. The method of claim 140, wherein Y is selected from the group consisting of carboxylic acid, active ester, and amine.

10

142. The method of claim 141, wherein said POLY-Y has been chromatographically purified prior to use in said reacting step.

143. The method of claim 142, wherein said POLY-Y has been purified by
15 ion exchange chromatography.

144. The method of claim 142, wherein said POLY-Y for use in said reacting step is essentially absent detectable amounts of polymeric impurities.

20 145. The method of claim 142, wherein said POLY-Y for use in said reacting step is end-capped, and is essentially absent detectable amounts of PEG-diol or difunctional PEG impurities.

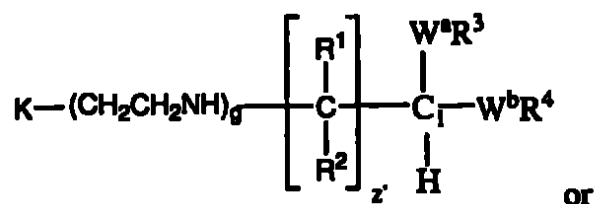
25 146. The method of claim 142, wherein said poly(ethylene glycol) has a structure selected from the group consisting of linear, branched, and forked.

147. The method of claim 142, wherein said alkanal reagent comprises the structure:

30

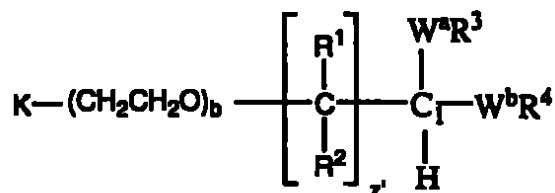
$\begin{matrix} R \\ | \\ R \end{matrix}$

66



or

XI-F



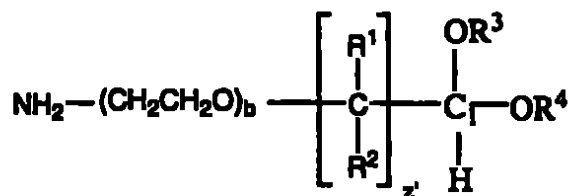
XI-G

5 wherein g and b each independently range from about 1 to about 20.

148. The method of claim 147, wherein R^1 and R^2 are each independently H or lower alkyl, and W^a and W^b are each O.

10 149. The method of claim 147, wherein K is a moiety comprising a group selected from the group consisting of carboxylic acid, active ester, amine, active carbonate, and isocyanate.

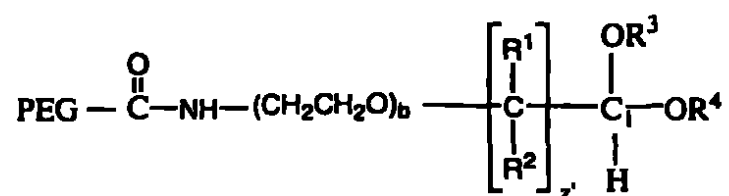
15 150. The method of claim 148, wherein said alkanal reagent comprises the structure:



XI-H

20 and the product of said reacting step comprises a structure:

,



IX-B

5 151. The method of claim 147, further comprising the step of hydrolyzing said water soluble polymer alkanal in protected form under acidic conditions to form the corresponding water soluble polymer alkanal in greater than 50% yield.

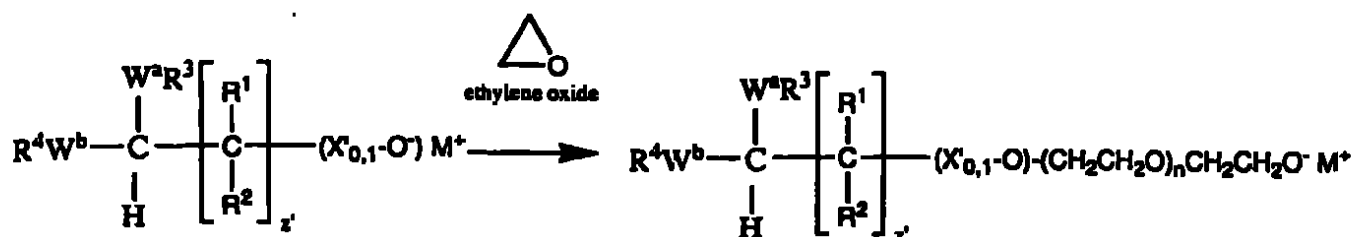
10 152. The method of claim 151, wherein said hydrolyzing step is effective to form said water soluble polymer alkanal in greater than about 90% yield.

 153. The method of claim 110, further comprising the step of conjugating said water soluble polymer alkanal with a biologically active agent comprising an amino group.

15

 154. The method of claim 147, wherein said reacting step is carried out at ambient temperature.

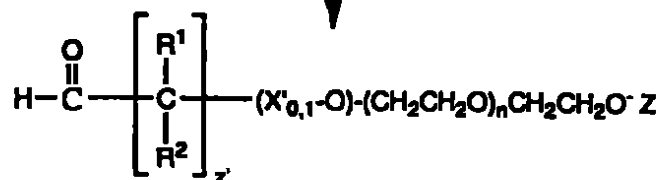
67



Acetal precursor having an anionic site, where M^+ is a metal counterion, and $(X'_{0,1}-O^-)$ indicates a linker terminating in an alkoxide, where $X'_{0,1}-O$ when taken together may be simply O^- , or the portion X' may comprise any of the herein described linkers or combinations of linkers.

terminate H^+HOH
optionally end cap

hydrolyze to polymer alkanal



$Z=H$ or end-capping group

FIG. 1

68

ALCANALES POLIMÉRICOS SOLUBLES EN AGUA

5

CAMPO DEL INVENTO

Este invento se relaciona con derivados de aldehídos particulares de polímeros solubles en agua, y con métodos para la preparación y utilización de tales derivados de aldehídos poliméricos.

10

FUNDAMENTO DEL INVENTO

En años recientes, la terapéutica humana se ha expandido más allá de los fármacos de moléculas pequeñas tradicionales y hacia el reino de los biofarmacéuticos. El descubrimiento de nuevas proteínas y péptidos ha llevado al desarrollo de numerosos biofarmacéuticos proteicos y polipéptidos. Desafortunadamente, cuando las proteínas y polipéptidos se utilizan como terapéutica a menudo exhiben propiedades que hacen extremadamente difícil la formulación o administración, tales como vidas medias cortas, inmunogenicidad, degradación proteolítica, y baja solubilidad. Un enfoque para mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los biofarmacéuticos es la conjugación a polímeros naturales o sintéticos, tal como glicol de polietileno (PEG). La unión covalente de PEG a una proteína terapéutica puede proporcionar un número de ventajas, tales como (i) protección de los epítopos antigénicos de la proteína, reduciendo así su evacuación reticuloendotelial y reconocimiento por parte del sistema inmune, (ii) reducción de la degradación por enzimas proteolíticas, y (iii) reducción de la filtración renal.

15

20

Se ha realizado mucho trabajo en el desarrollo de derivados poliméricos para acoplamiento a biofarmacéuticos tales como péptidos, y en particular, en el desarrollo de derivados poliméricos para acoplamiento a grupos amino reactivos de proteínas. Tales derivados poliméricos son conocidos como "activados de forma electrofílica", puesto que llevan grupos electrofílicos apropiados para reacción con nucleófilos tales como aminas. Ejemplos de tales derivados PEG incluyen diclorotriazina PEG, tresilato PEG, carbonato de succinimidilo PEG, carbonilimidazol PEG, y succinato de succinimidilo PEG. Desafortunadamente, el uso de estos reactivos particulares puede producir: reacciones secundarias indeseables bajo las condiciones de reacción necesarias para realizar acoplamiento, carencia de selectividad, y/o la formación de uniones débiles (es decir, inestables) entre el biofarmacéutico y el PEG.

25

30

69

En un esfuerzo por superar estos problemas, se han desarrollado muchos PEGs electrofílicamente activados nuevos o de "segunda generación", tales como propionaldehído PEG y acetaldehído PEG (ver, por ejemplo las Patentes U.S. No. 5.252.714 y 5.990.237, respectivamente). Los derivados de aldehídos son reactivos particularmente atractivos para acoplamiento a proteínas y a otras biomoléculas, puesto que los aldehídos reaccionan solamente con aminas (es decir, son selectivos en su química de unión). Los reactivos antes mencionados ofrecen muchas ventajas: se pueden preparar para evitar los problemas de contaminación con polietilenglicol diol, no son restringidos a mPEG de bajo peso molecular, forman uniones de aminas estables al acoplarse, y son selectivos. Aunque los derivados anteriormente anotados ofrecen muchas ventajas sobre los reactivos PEG de primera generación, los solicitantes han anotado algunas desventajas particulares de estos reactivos aldehídos, haciéndolos menos ideales en ciertas circunstancias.

Más específicamente, los Solicitantes han reconocido, en su extenso trabajo con estos reactivos, que el acetaldehído de PEG es muy inestable, particularmente en medios básicos, y es difícil de aislar debido a la excesiva formación de sal que resulta de la neutralización de la mezcla de reacción. En particular, el acetaldehído PEG es muy susceptible a dimerización a través de condensación de aldol. El propionaldehído PEG, mientras es un reactivo mucho mejor en términos de su estabilidad, posee algunas desventajas debido a las reacciones secundarias que pueden ocurrir durante su preparación, dificultando la obtención del producto de propionaldehído PEG con alta pureza.

Más específicamente, los Solicitantes han encontrado que cuando se prepara propionaldehído PEG *in situ* a partir de su hidrato de aldehído PEG precursor, los rendimientos del producto generalmente son solo de aproximadamente 50%, debido a una reacción de eliminación que consume una parte significativa del reactivo acetal. Aunque se puede emplear una ruta sintética mejorada para la síntesis de propionaldehído PEG, es decir a través de una reacción catalizada por base de acetal dietílico de 3-hidroxi propionaldehído con mesilato PEG, los Solicitantes han descubierto que esta ruta de reacción también conduce a una reacción secundaria de eliminación que produce cantidades significativas de éter vinílico PEG, el cual es inestable y produce PEG dihidroxilo difícil de remover (también conocido como polietilenglicol diol). Por consiguiente, el rendimiento de esta reacción generalmente es menor que 85 a 90% aproximadamente. Además, la utilización de cualquiera de las síntesis de propionaldehído PEG

20

anteriormente descritas requiere hidrólisis del intermedio acetal a pHs muy bajos, ej., a pHs de 2 o menos. La hidrólisis de tales pHs bajos es indeseable debido a las grandes cantidades de base necesarias para neutralizar la mezcla de reacción a pHs apropiados para conjugación.

Adicionalmente, el acoplamiento de propionaldehído PEG a una proteína a pHs básicos puede ser problemático debido a la formación de cantidades significativas de acroleína (que resulta de una reacción secundaria del tipo retro-Michael), la cual es bastante difícil de retirar. La formación de tales productos secundarios indeseables necesita purificación extensa para obtener un producto de calidad farmacéutica.

Por lo tanto, existe la necesidad de derivados poliméricos electrofílicamente activados mejorados para conjugación a moléculas y superficies biológicamente activas, particularmente derivados poliméricos que (i) sean selectivos en su química de acoplamiento, (ii) se puedan preparar en altos rendimientos y en pocos pasos de reacción, (iii) sean estables sobre un amplio rango de pHs, (iv) se puedan aislar fácilmente, (v) se puedan preparar con alta pureza (es decir, impurezas y subproductos derivados a partir de polímeros sustancialmente ausentes), y (v) superen al menos algunas de las desventajas de los derivados poliméricos conocidos tales como aquellos descritos anteriormente.

RESUMEN DEL INVENTO

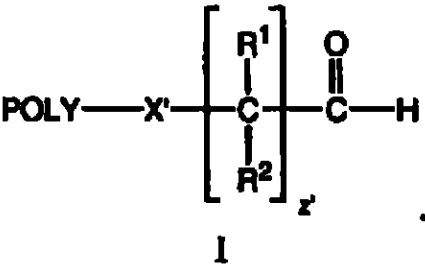
El presente invento proporciona una única familia de alcanales poliméricos – *es decir*, polímeros que comprenden al menos una funcionalidad de aldehído acoplada a un segmento polimérico por uno o más átomos de carbono interpuestos.

Los alcanales poliméricos del invento son, en su mayor parte, menos reactivos que los derivados de aldehído del estado de la técnica anterior y, por lo tanto, más selectivos. Además, los alcanales poliméricos del invento son preparados en alto rendimiento, y ciertas estructuras se pueden preparar en un proceso directo de un paso. Ciertos aldehídos poliméricos descritos en la presente son más estables a pHs básicos que los derivados de aldehído antes conocidos, y se forman sin cantidades significativas o aún detectables de subproductos de reacción tipo retro-Michael. Además, los alcanales poliméricos del invento se forman a partir de los correspondientes precursores de acetal mediante hidrólisis bajo condiciones ácidas suaves, es decir, bajo condiciones ácidas mucho menos severas que las requeridas ya sea para acetaldehído PEG o propionaldehído PEG. Tales condiciones suaves permiten la conjugación directa *in situ* de

21

los derivados poliméricos del invento con proteínas, péptidos, u otros objetivos moleculares sin requerir un paso de aislamiento intermedio. Los alcanales poliméricos del invento también son preparados con alta pureza, haciéndolos particularmente ventajosos para acoplamiento a fármacos y biofarmacéuticos para proporcionar composiciones de conjugados poliméricos con una pureza suficiente para administración a un sujeto mamífero.

Más particularmente, en un aspecto, el presente invento está dirigido a un polímero soluble en agua con la estructura:



En la anterior estructura, POLY representa un segmento polimérico soluble en agua; X' es una fracción enlazadora; z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente; R¹, en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical organico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido, y R², en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido.

En algunas instancias, los alcanales poliméricos del invento poseerán ciertas características. Por ejemplo, según una realización del invento, cuando POLY es lineal: (a) el número total de carbonilos (excluyendo/sin contar el carbón de carbonilo de aldehído) presentes en el polímero es 0 o 2 o más, excepto cuando X' comprende uno o más segmentos contiguos de (-CH₂CH₂O-) o (-CH₂CH₂NH-). Cuando X' comprende uno o más segmentos de (-CH₂CH₂O-) o (-CH₂CH₂NH), entonces el número total de carbonilos presente en el polímero es 0, 1, 2, o más.

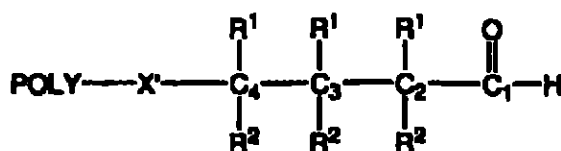
En aún otro ejemplo, según una realización adicional, cuando X' es oxígeno o comprende al menos un segmento (-CH₂CH₂O) y z' está entre 2 y 12, entonces al menos uno entre R¹ o R² en al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o el polímero es heterobifuncional, donde POLY comprende un grupo reactivo en un límite que no es hidroxilo.

22

Los alcanales poliméricos proporcionados en la presente pueden poseer cualquiera de un número de geometrías o estructuras generales, que se describirán con mayor detalle en la presente. Preferiblemente, cuando POLY es ramificado entonces cualquiera (i) al menos uno entre R^1 o R^2 en al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o (ii) X' incluye $-(CH_2CH_2O)_b-$ donde b está entre 1 y 20 aproximadamente en la instancia donde POLY comprende un residuo de lisina. Alternativamente, cuando POLY es ramificado y posee dos brazos poliméricos, entonces ningún brazo polimérico comprende oxígeno como el único heteroátomo en la instancia donde POLY comprende "C-H" como un punto de ramificación.

Generalmente, los alcanales poliméricos del invento poseen una estructura donde z' está dentro de uno de los siguientes rangos: z' está entre 2 y 21, entre 3 y 12 aproximadamente, entre 3 y 8 aproximadamente, o entre 3 y 6 aproximadamente.

En una realización particular del invento, el polímero tiene la estructura:



I-A

donde POLY, X' , cada R^1 , cada R^2 y R^3 son como se definieron anteriormente. En la estructura anterior, C_1 indica el carbono de carbonilo de aldehído; C_2 indica el carbono adyacente a o α (alfa) al carbono carbonilo o C_1 ; C_3 indica el átomo de carbono una vez retirado del carbono carbonilo o en la posición β (beta); y C_4 indica el átomo de carbono en la posición γ . Los alcanales poliméricos con la estructura general ilustrada por I-A son generalmente conocidos en la presente como butanales poliméricos. En variaciones preferidas de la formula I-A anterior, R^1 unido a C_2 es alquilo, y todas las demás variables de R^1 y R^2 son H. Preferiblemente, el R^1 unido a C_2 es alquilo inferior. Alternativamente, el alcanal polimérico corresponde a la estructura I-A anterior, donde el R^1 unido a C_3 es alquilo, y todas las demás variables de R^1 y R^2 son H. En aún otra realización preferida, el alcanal polimérico es descrito por la estructura I-A donde R^1 unido a C_4 es alquilo, y todas las demás variables de R^1 y R^2 son H.

23

En aún otra realización particular, un alcanal polimérico del invento corresponde a la formula I, y posee un átomo de carbono adicional en la cadena de alquileo cuando se compara con la estructura I-A. En esta realización (ver estructura I-B en la presente), z' es 4, el R^1 unido a C_2 es alquilo, y todas las demás variables de R^1 y R^2 son H. Alternativamente, cualquiera el R^1 unido a C_3 o C_4 es alquilo, y todas las demás variables de R^1 y R^2 son H.

En aún otra realización particular que está dentro de la formula I, z' es 5, el R^1 unido a C_2 es alquilo, y todas las demás variables de R^1 y R^2 son H (ver estructura I-C). Alternativamente, una de las variables de R^1 unida a C_3 o C_4 o C_5 es alquilo, y todas las demás variables R^1 y R^2 son H.

El alcanal polimérico según la formula I, en ciertas realizaciones, posee una fracción enlazadora descrita generalmente por la formula: $-(CH_2)_e-D_e-(CH_2)_f-$ o $-(CH_2)_p-M_f-C(O)-K_s-(CH_2)_q-$, donde e está en el rango entre cero y 8; D es O, NH, o S; e es 0 o 1; f está en el rango entre cero y 8; p está en el rango entre cero y 8; M es $-NH$ o O ; K es NH o O; q está en el rango entre cero y 8, y r y s son cada uno independientemente 0 o 1. Los eslabones específicos que están dentro de esta formula general son descritos con mayor detalle a continuación.

La fracción enlazadora pueden opcionalmente incluir un segmento oligomérico que corresponde a la estructura $-(CH_2CH_2O)_b-$ o $-(CH_2CH_2NH)_g-$, donde b y g están cada uno independientemente entre 1 y 20. Preferiblemente, b y g cada uno independientemente están en el rango entre 1 y 10, y aún más preferiblemente en el rango entre 1 y 6 aproximadamente. Estos eslabones oligoméricos proporcionan estabilidad adicional a los alcanales del invento, y también proporcionan ventajas en la metodología sintética para preparación de polímeros, a ser descritos con mayor detalle a continuación.

Más particularmente, en ciertas realizaciones, X' comprende una fracción correspondiente a la estructura: $-(CH_2)_e-D_e-(CH_2)_f-P-$ o $(CH_2)_p-M_f-C(O)-K_s-(CH_2)_q-T-$, donde P y T son cada uno independientemente $-(CH_2CH_2O)_b-$ o $-(CH_2CH_2NH)_g-$; y b y g están cada uno independientemente en el rango entre 1 y 20 aproximadamente. En una realización específica de un alcanal polimérico según la formula I, X' comprende $-C(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$ o $-NHC(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$.

Preferiblemente, el segmento polimérico soluble en agua de un alcanal polimérico del invento es un poli(óxido de alquileo), un poli(pirrolidona de vinilo), un poli(alcohol vinílico), una polioxazolina, una poli(acrilolmorfolina), o un poli(poliol oxietilado). En una realización

24

preferida, el segmento polimérico es un poli(óxido de alquileo), preferiblemente poli(glicol de etileno).

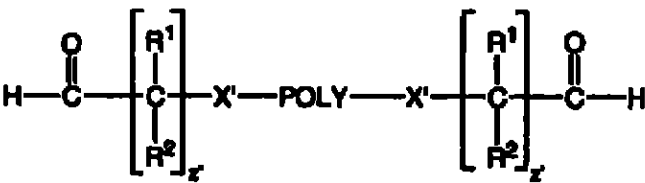
Según una realización, el segmento poli(etilenglicol) comprende la estructura: Z-(CH₂CH₂O)_n- o Z-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-, donde n está en el rango entre 10 y 4000

aproximadamente y Z es una fracción que comprende un grupo funcional seleccionado del grupo que consta de hidróxilo, amino, éster, carbonato, aldehído, alquileo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, hidrazuro, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxilo, benciloxilo, silano, lípido, fosfolípido, biotina, y fluoresceína.

Alternativamente, POLY puede ser taponado en extremo con un fracción de taponamiento en extremo tal como alcoxilo, alcoxilo sustituido, alqueniloxilo, alqueniloxilo sustituido, alquililoxilo, alquililoxilo sustituido, ariloxilo, y ariloxilo sustituido. Grupos de taponamiento en extremo preferidos incluyen metoxilo, etoxilo, y benciloxilo.

Generalmente, POLY posee una masa molecular promedio nominal que está dentro de uno de los siguientes rangos: entre 100 y 100.000 daltons aproximadamente, entre 1.000 y 50.000 daltons, o entre 2.000 y 30.000 daltons aproximadamente. Masas moleculares preferidas para POLY incluyen 250 daltons, 500 daltons, 750 daltons, 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, y 50 kDa, o aún más.

En aún otra realización particular, el alcanal polimérico del invento comprende la estructura:



II

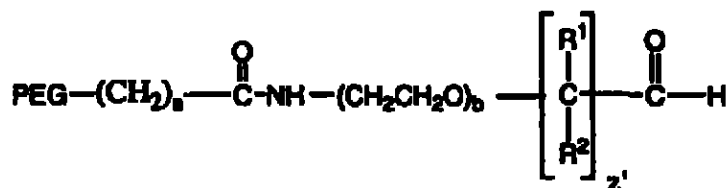
en donde POLY, cada X', cada (z'), cada R¹, cada R², y cada R³ son como se definieron anteriormente. En una realización específica, POLY es lineal y el polímero es homobifuncional.

Como se declaró anteriormente, el segmento polimérico dentro del alcanal polimérico puede poseer cualquiera de un número de geometrías, tales como lineal, ramificado, bifurcado, multiextensivo, o dendrítico, lo cual se describirá con mayor detalle a continuación.

28

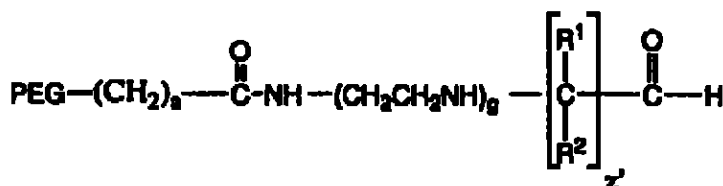
Realizaciones específicas del invento incluyen alcanales poliméricos que corresponden a las siguientes estructuras:

5



III-A

10



IV-A

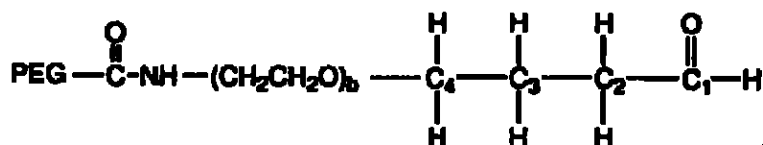
15

En las anteriores estructuras, PEG es poli(etilenglicol), y b y g están cada uno independientemente entre 0 y 20, a está entre 0 y 6. Para estructuras generalizadas proporcionadas en esta sección, las variables corresponden a rangos/valores previamente proporcionados a menos que se anote lo contrario.

20

En una realización específica, un alcanal polimérico según el invento corresponde a la estructura:

25

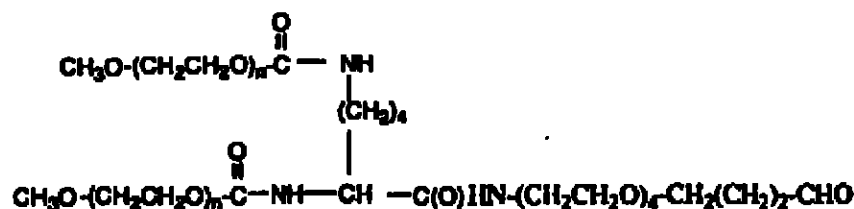


III-D

Un alcanal polimérico particularmente preferido que está dentro de la estructura generalizada III-D posee la estructura:

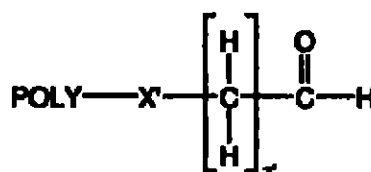
30

26



III-E

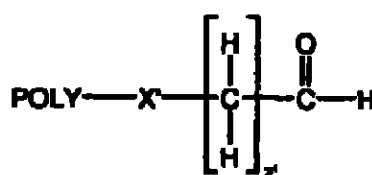
Según otro aspecto, el invento está dirigido a una composición que comprende un polímero soluble en agua que tiene la estructura:



VII

donde la composición no tiene cantidades detectables de especies que contienen yodo o productos de reacción tipo retro-Michael. Esto es particularmente ventajoso, puesto que las especies que contienen yodo pueden llevar a degradación de cadenas de poli(etilenglicol) debido a la escisión de cadena, resultando en un producto polimérico con un alto valor de polidispersidad, ej., más de 1.2 aproximadamente. Preferiblemente, un alcanal polimérico del invento poseerá un valor de polidispersidad menor que 1.2 aproximadamente, preferiblemente menor que 1.1 aproximadamente, y aún más preferiblemente menor que 1.05 aproximadamente. Aún más preferidos son los alcanales poliméricos tales como aquellos descritos en la presente caracterizados por una polidispersidad de 1.04, 1.03 o menos.

Según otro aspecto, el invento se relaciona con una composición que comprende un polímero soluble en agua que tiene la estructura:



27

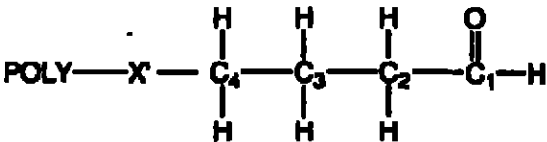
donde POLY es un segmento polimérico lineal soluble en agua, taponado en extremo y la composición no tiene cantidades detectables de derivado de polímero de dialdehído.

Una característica adicional de los alcanales poliméricos del invento es su estabilidad, ej., estabilidad de almacenamiento, en comparación con otras composiciones de aldehído polimérico.

5 Por ejemplo, en la presente se proporciona una composición alcanal polimérica que exhibe 10% o menos de degradación del grupo de aldehído polimérico cuando se almacena a 40°C durante 15 días, tal como se determinó mediante NMR.

En una realización preferida, la composición del invento comprende un alcanal polimérico correspondiente a la siguiente estructura:

10



5

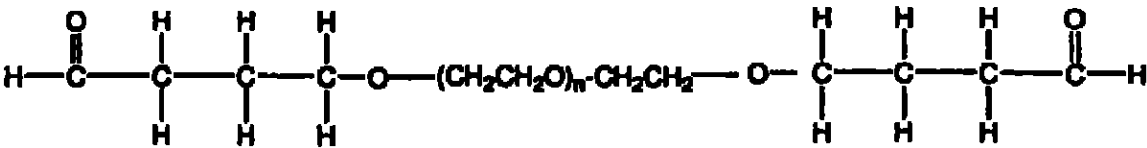
VII-A.

En aún una realización más preferida, según la estructura VII-A, POLY posee la estructura $\text{Z}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, donde X es O, n está en el rango entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z comprende un grupo funcional, fracción de blanco, reportero, grupo de taponamiento, o similares.

20

Otra composición del invento comprende un polímero según la estructura:

25



VIII

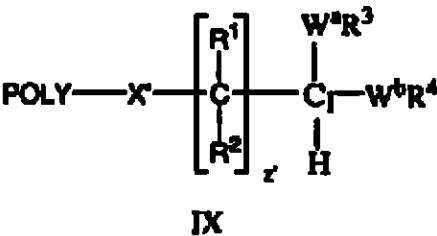
En aún otro aspecto de invento, se proporcionan formas de hidrato o acetal de los alcanales poliméricos anteriormente descritos.

30 Los acetales del invento incluyen acetal dimetillico, acetal dietílico, acetal di-isopropílico, acetal dibencillico, acetal 2,2,2-tricloroetillico, acetal bis(2-nitrobencilo), acetal S,S'-dimetillico, acetal S,S'-dietílico, y dioxolanos.

78

Más particularmente, un acetal o forma de hidrato de un alcanal polimérico del invento se puede describir generalmente mediante la siguiente estructura:

5



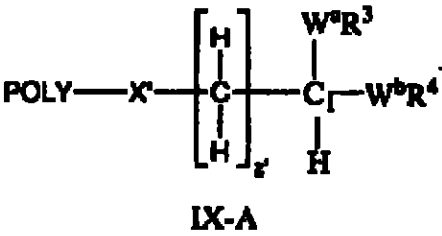
10

donde W^a y W^b son cada uno independientemente O o S, y R^3 y R^4 son cada uno independientemente H, o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de metilo, etilo, isopropilo, bencilo, 1,1,1- tricloroetilo, y nitrobencilo, o cuando se toman juntos, son $-(\text{CH}_2)_2-$ o $-(\text{CH}_2)_3-$, formando un anillo de 5 o 6 miembros cuando se consideran junto con W^a , C_1 , y W^b . Los acetales poliméricos son precursores útiles de los alcanales del invento, y se pueden hidrolizar para proporcionar un alcanal polimérico.

15

En una realización particular, se proporciona un polímero soluble en agua con la estructura:

20



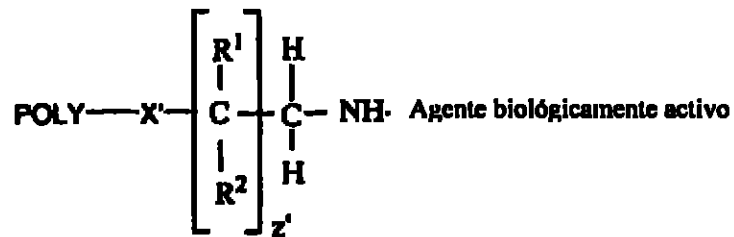
En la estructura IX-A, el alcanal tiene solamente metileno o carbonos $-(\text{CH}_2)-$ que separan el acetal o la porción de hidrato de aldchido de la molécula del eslabón, X' .

25

Además, el invento está dirigido a conjugados formados mediante la reacción de un agente biológicamente activo con los alcanales poliméricos descritos en la presente, sus hidratos y/o los alcanales correspondientes.

Preferiblemente, el conjugado corresponde a la siguiente estructura:

30

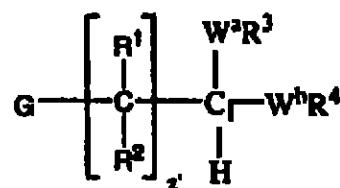


donde "agente biologicamente activo NH" representa un agente biologicamente activo que comprende un grupo amino.

5 También forman parte del presente invento los hidrogeles formados a partir de los alcanales poliméricos descritos en la presente o sus precursores.

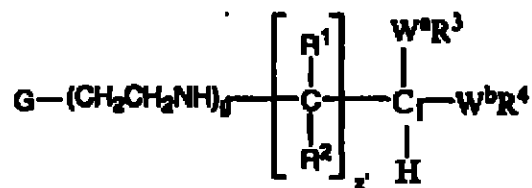
Según otro aspecto, el invento proporciona reactivos aldehidos protegidos. Estos reactivos aldehidos protegidos son particularmente útiles para formar los alcanales poliméricos del invento, y corresponden generalmente a las siguientes estructuras:

10



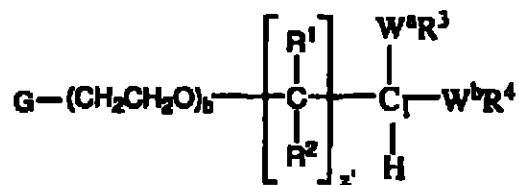
15

XI-A



20

XI-B



25

XI-C

80

donde G es un grupo funcional, y las restantes variables tienen los valores divulgados anteriormente.

En realizaciones preferidas de las estructuras XI-A, B, y C, G es un grupo saliente tal como cloruro, bromuro, éster de para-tolilsulfonato, éster de metilsulfonilo, trifluorosulfonilester, y trifluoroetilsulfoniloéster.

Alternativamente, G es un grupo funcional seleccionado del grupo que consta de -OH, -NH₂, -SH, y formas protegidas de los mismos.

Otro aspecto del invento está dirigido a un método para preparar un alcanal polimérico soluble en agua, opcionalmente en forma protegida. Brevemente, el método incluye los pasos de reaccionar un polímero soluble en agua que comprende al menos un grupo reactivo, Y, con un reactivo de alcanal protegido que comprende entre 2 y 20 átomos de carbono y un grupo reactivo, K, apropiado para desplazamiento por o alternativamente, reacción con Y, bajo condiciones efectivas para formar un alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida. En este método, un polímero activado es acoplado a un reactivo que lleva la porción alcanal del producto final, o un precursor del mismo.

Preferiblemente, la reacción es realizada bajo una atmósfera inerte.

En una realización específica, POLY-Y, se prepara mediante polimerización directa.

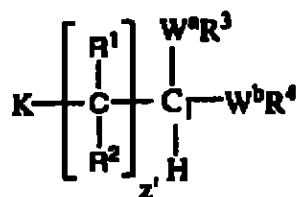
El método también puede incluir el paso adicional de hidrolización del alcanal polimérico soluble en agua protegido, ej., bajo condiciones ácidas, para formar el correspondiente alcanal polimérico soluble en agua.

En una realización preferida, el paso de hidrolización es realizado a un pH no menor de 3 aproximadamente.

Las formas protegidas del reactivo de alcanal para realizar el método incluyen acetales tales como acetal dimetilico, acetal dietilico, acetal di-isopropilico, acetal dibencilico, acetal 2,2,2-tricloroetilico, acetal bis(2-nitrobencilo), acetal S,S'-dimetilico, acetal S,S'-dietilico, acetales cíclicos y tioacetales cíclicos.

En aún una realización adicional, el alcanal polimérico producido así es recuperado elevando el pH de la mezcla de reacción desde 6.0 hasta 7.5, extrayendo el alcanal polimérico a un solvente orgánico, y retirando el solvente.

En una realización preferida del método, el polímero soluble en agua corresponde a la estructura, "POLY-Y", y el reactivo de alcanal protegido corresponde a la estructura:



XI-D

5

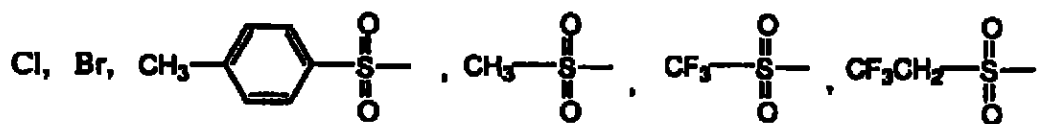
Preferiblemente, POLY comprende un poli(etilenglicol) que puede o no ser de taponamiento en extremo. En una realización particular del método, POLY-Y comprende la estructura $Z-(CH_2CH_2O)_nH$, en donde n está entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z es seleccionado del grupo que consta de $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, y $-OCH_2(C_6H_5)$. En una realización adicional, POLY-Y comprende la estructura $Z-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O^-M^+$, donde POLY-Y es preparado mediante polimerización de abertura de anillo aniónico de óxido de etileno sobre una sal de alcoholato taponado en extremo tal como $Z-CH_2CH_2O^-M^+$, preparada mediante metalación del grupo $-OH$ terminal de $Z-CH_2CH_2OH$ con una base fuerte. M^+ representa un contraion metálico tal como Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Rb^+ . El POLY-Y preparado de esta forma es luego apropiado para reacción con un reactivo de alcanal protegido tal como se describió anteriormente.

15

En aún una realización adicional particularmente preferida, el alcanal recuperado no tiene cantidades detectables de POLY Y sin reaccionar (ej., $Z-(CH_2CH_2O)_nH$) y productos de reacción tipo retro-Michael.

En aún otra realización del método, POLY-Y corresponde a polietilenglicol diol, es decir, POLY-Y posee la estructura $HO-(CH_2CH_2O)_nH$, en donde n está entre 10 y 4000 aproximadamente, K es seleccionado del grupo que consta de:

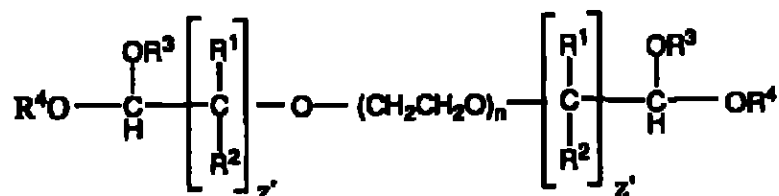
20



25

y el método resulta en la formación de un alcanal polimérico protegido con la estructura:

30



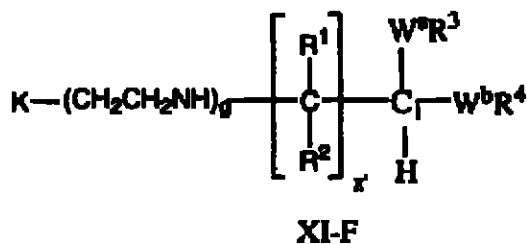
5

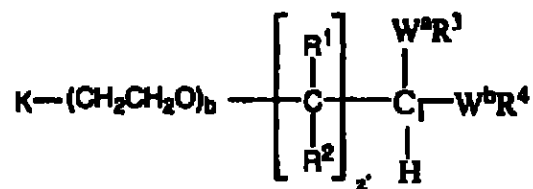
En aún otra realización del método, POLY-Y comprende la estructura $Z-(CH_2CH_2O)_nH$, en donde n está entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z es hidroxilo protegido. En esta instancia, una realización preferida del método incluye la desprotección del hidroxilo protegido después del paso de reacción, opcionalmente seguido por la conversión del hidroxilo terminal del poli(etilenglicol) en un grupo funcional diferente de hidroxilo.

Grupos funcionales de ejemplo incluyen amino, éster, carbonato, aldehído, alquénilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, y silano. Preferiblemente, el grupo funcional es seleccionado del grupo que consta de éster de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de benzotriazolilo, amina, amina protegida, vinilsulfona, y maleimida.

Según otra realización del invento, "Y" en POLY-Y es un grupo ionizable o es un derivado de un grupo ionizable tal como un ácido carboxílico, éster activo, o amina. Preferiblemente, POLY-Y ha sido cromatográficamente purificado antes de utilizar en el paso de reacción. En una realización particular, POLY-Y es purificado antes de utilizar mediante cromatografía de intercambio iónico. De manera ideal, tal POLY-Y cromatográficamente purificado para utilizar en el paso de reacción esencialmente no tiene cantidades detectables de impurezas poliméricas. En tal realización de este método, POLY-Y es taponado en extremo, y esencialmente no tiene cantidades detectables de polietilenglicol diol o impurezas PEG difuncionales.

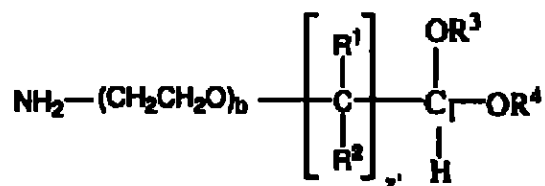
Alternativamente, al practicar el método del invento, el reactivo de alcanal comprende la estructura:





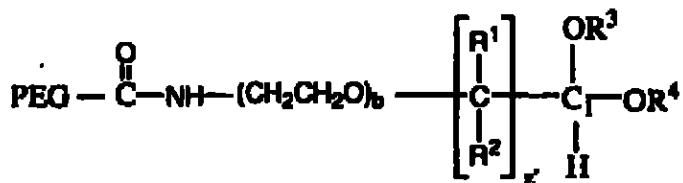
XI-G

donde g y b cada uno independientemente están en el rango entre 1 y 20 aproximadamente. Como un ejemplo, un reactivo de alcanal preferido corresponde a la estructura:



XI-H

y el producto del paso de reacción posee la estructura generalizada:



IX-B

En aún otro enfoque para la preparación de un alcanal polimérico del invento, un alcanal polimérico tal como se describió en la presente es preparado mediante la construcción de un segmento polimérico directamente sobre un precursor de acetal, cj., mediante polimerización directa. Más específicamente, este método comprende los pasos de:

(i) proporcionar un precursor de acetal que comprenda al menos un sitio aniónico activo apropiado para iniciar la polimerización.

(ii) poner en contacto el sitio aniónico del precursor de acetal con un monomero reactivo capaz de polimerizar, para iniciar así la polimerización del monomero reactivo sobre el precursor de acetal.

84

(iii) como un resultado del paso de poner en contacto, adicionar monómeros reactivos adicionales al precursor de acetal para formar una cadena polimérica.

(iv) permitir que dicho contacto continúe hasta alcanzar una longitud deseada de la cadena polimérica, y

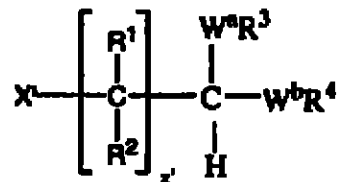
5 (v) terminar la reacción para lograr un precursor de aldehído polimérico del invento.

El precursor de aldehído polimérico resultante puede ser adicionalmente hidrolizado al correspondiente alcanal tal como se divulgó anteriormente, si se desea.

En una realización particular del método anterior, el monomero reactivo es óxido de etileno y el sitio aniónico reactivo contenido dentro del precursor de acetal es un anión de alcóxido (O⁻), preferiblemente acompañado por un metal alcalino u otro contraion apropiado. El grupo final de alcóxido presente en el precursor de acetal es activo para polimerización de abertura de anillo aniónico de óxido de etileno para formar un alcanal polimérico del invento.

El precursor de acetal generalmente poseerá una estructura que corresponde a:

15



donde las variables poseen los valores descritos anteriormente, con la excepción que X^a termina en un anión de oxígeno, o O⁻ (ej., en su forma neutral, X^a típicamente termina en un grupo hidroxilo o -OH, que en presencia de una base fuerte, se convierte en la correspondiente sal de alcóxido). Contraiones apropiados incluyen Na⁺, K⁺, Li⁺, y Cs⁺. El paso de terminación generalmente comprende la neutralización de la reacción, ej., mediante la adición de ácido. Opcionalmente, el segmento polimérico puede ser taponado mediante la adición de un reactivo de alquilación u otro reactivo apropiado para proporcionar un extremo no reactivo.

Estos y otros objetos y características del invento serán manifiestos cuando sean leídos en conjunción con la siguiente descripción detallada.

65

BREVE DESCRIPCION DE LA FIGURA

La fig. 1 es un esquema de reacción general para la preparación de un alcanal polimérico del invento mediante polimerización de abertura de anillo aniónico de óxido de etilo (EO) sobre un precursor de acetal que tiene un sitio aniónico.

DESCRIPCION DETALLADA DEL INVENTO

Antes de describir el presente invento en detalle, se debe entender que este invento no está limitado a los polímeros particulares, técnicas sintéticas, agentes activos, y similares. Se debe entender que la terminología utilizada en la presente es para describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante.

Se debe notar que, como se utilizan en esta especificación, las formas singulares “uno”, “una”, “el”, “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un “polímero” incluye un único polímero así como también dos o más polímeros iguales o diferentes, la referencia a un “conjugado” se refiere a un único conjugado así como también a dos o más conjugados iguales o diferentes, la referencia a un “excipiente” incluye un único excipiente así como también dos o más excipientes iguales o diferentes, y similares.

Al describir y reivindicar el presente invento, la siguiente terminología será utilizada según las definiciones descritas a continuación.

DEFINICIONES

Los siguientes términos como se utilizan en la presente tienen los significados indicados.

Como se utilizan en la especificación, y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “uno”, “una”, “el”, “la”, incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario.

“PEG” o “poli(etilenglicol)” como se utiliza en la presente, pretende incluir cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEGs para utilizar en el presente invento comprenderán una de las dos siguientes estructuras: “-(CH₂CH₂O)_n-” o “-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-”, dependiendo de si el oxígeno terminal ha sido o no desplazado, ej., durante una transformación sintética. La variable (n) está entre 3 y 3000, y los grupos terminales y

86

arquitectura del PEG general puede variar. Cuando PEG además comprende una fracción enlazadora (la cual se describirá con mayor detalle más adelante), los átomos que comprenden el eslabón (X'), cuando están covalentemente unidos a un segmento PEG, no producen la formación de (i) un enlace oxígeno-oxígeno (-O-O-, un enlace de peróxido), o (ii) un enlace nitrógeno-oxígeno (N-O, O-N). "PEG" significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más de 50%, de subunidades que son -CH₂CH₂O-. PEGs para utilizar en el invento incluyen PEGs con una variedad de pesos moleculares, estructuras o geometrías (ej., ramificados, lineales, PEGs bifurcados, dendríticos, y similares), a ser descritas con mayor detalle más adelante.

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

Un grupo de "taponamiento en extremo" o "taponado en extremo" es un grupo inerte presente sobre el extremo de un polímero tal como PEG. Un grupo de taponamiento en extremo es aquel que fácilmente no experimenta la transformación química bajo condiciones típicas de reacción sintética. Un grupo de taponamiento en extremo generalmente es un grupo alcóxido, -OR, donde R es un radical orgánico comprendido de 1-20 carbonos y preferiblemente es un alquilo menor (ej., metilo, etilo) o bencilo. "R" puede ser saturado o no saturado, e incluye arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo, y formas substituidas de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, un PEG de taponamiento en extremo típicamente comprenderá la estructura "RO-(CH₂CH₂O)_n", donde R es como se definió anteriormente. Alternativamente, el grupo de taponamiento en extremo también puede ventajosamente comprender un rotulo detectable. Cuando el polímero tiene un grupo de taponamiento en extremo que comprende un rotulo detectable, la cantidad o locación del polímero y/o la fracción (ej., agente activo) al cual el polímero es acoplado, se puede

87

determinar mediante la utilización de un detector apropiado. Tales rótulos incluyen, sin limitación, fluorescentes, quimioluminiscentes, fracciones utilizadas para rotulación enzimática, colorimétricos (ej., tintes), iones metálicos, fracciones radioactivas, y similares.

5 “De ocurrencia no natural” con respecto a un polímero del invento significa un polímero que en su totalidad no es encontrado en la naturaleza. Un polímero de ocurrencia no natural del invento sin embargo puede contener una o más subunidades o segmentos de subunidades que son de ocurrencia natural, siempre que la estructura polimérica general no se encuentre en la naturaleza.

10 “Masa molecular” en el contexto de un polímero soluble en agua del invento tal como PEG, se refiere a la masa molecular promedio nominal de un polímero, típicamente determinada mediante cromatografía de exclusión de tamaño, técnicas de diseminación de luz, o determinación de velocidad intrínseca en 1,2,4-triclorobenceno. Los polímeros del invento típicamente son polidispersos, con valores de polidispersidad bajos de menos de 1.20 aproximadamente.

15 El término “reactivo” o “activado” cuando se utiliza en conjunción con un grupo funcional particular, se refiere a un grupo funcional que reacciona rápidamente con un electrofilo o un nucleófilo típicamente presente en otra molécula, para experimentar una transformación. Esto en contraste a aquellos grupos que requieren fuertes catalizadores o condiciones severas de reacción con el objeto de reaccionar (es decir, un grupo “no reactivo” o “inerte”).

20 El término “protegido” o “grupo protector” se refiere a la presencia de una fracción (es decir, el grupo protector) que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional particular químicamente reactivo en una molécula bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que sea protegido así como también de las condiciones de reacción a ser empleadas y la presencia de grupos protectores o reactivos
25 adicionales en la molécula, si existen. Los grupos protectores conocidos en el estado de la técnica se pueden encontrar en Greene. T.W., GRUPOS PROTECTORES EN SINTESIS ORGÁNICA, tercera Edición, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1999).

 Como se utiliza en la presente, el término “grupo funcional” o cualquier sinónimo del mismo incluye formas protegidas del mismo.

30 El término “fracción enlazadora” se utiliza en la presente para referirse a un átomo o una colección de átomos opcionalmente utilizados para enlazar fracciones de interconexión, tal como

88

un segmento polimérico y un alcanal. Las fracciones enlazadoras del invento pueden ser hidrolíticamente estables o pueden incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

5 Un enlace "fisiológicamente escindible" o "hidrolizable" o "degradable" es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (es decir, es hidrolizado) bajo condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizar en agua dependerá no solo del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Enlaces hidrolíticamente inestables o débiles apropiados incluyen pero no están limitados a éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, éter de
10 aciloxialquilo, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos.

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

Un enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es substancialmente estable en agua, es decir, no experimenta hidrólisis bajo
15 condiciones fisiológicas en cualquier medida apreciable sobre un periodo de tiempo extendido. Ejemplos de enlaces hidrolíticamente estables incluyen pero no están limitados a los siguientes: enlaces carbono-carbono (ej., en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos, y similares. Generalmente, un enlace hidrolíticamente estable es aquel que exhibe una tasa de hidrólisis menor que 1-2% aproximadamente por día bajo condiciones fisiológicas. Las tasas de hidrólisis
20 de enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de textos estándares de química.

"Alcanal" se refiere a la porción de aldehído de un polímero soluble en agua del invento (CHO), incluyendo el carbón carbonilo y cualquier metileno adicional o metilenos substituidos ($-C(R^1)(R^2)-$ hasta la fracción enlazadora que conecta la porción alcanal del polímero al segmento
25 polimérico. Al nombrar un segmento alcanal, C1 corresponde al carbón carbonilo. El termino "alcanal" se utiliza en la presente para significar la inclusión de hidrato y formas protegidas del grupo aldehído, así como también análogos de chalcógeno. Una forma protegida particularmente preferida de un alcanal del invento es un acetal.

El "número total de carbonilos", en referencia a ciertos alcanales poliméricos del invento,
30 es el número total de grupos carbonilos contenidos en el alcanal polimérico, sin contar los carbonos de aldehído.

“Ramificado” en referencia a la geometría o estructura general de un polímero se refiere a un polímero con dos o más “brazos” poliméricos. Un polímero ramificado puede poseer 2 brazos poliméricos, 3 brazos poliméricos, 4 brazos poliméricos, 6 brazos poliméricos, 8 brazos poliméricos o más. Un tipo particular de polímero altamente ramificado es un polímero dendrítico o dendrímero, que para propósitos del invento, se considera posee una estructura diferente de aquella de un polímero ramificado.

“Punto de ramificación” se refiere a un punto de bifurcación que comprende uno o más átomos en los cuales un polímero se divide o ramifica desde una estructura lineal en uno o más brazos poliméricos adicionales.

Un “dendrímero” es un polímero globular, monodisperso de tamaño en el cual todos los enlaces emergen radialmente desde un punto central focal o núcleo con un patrón regular de ramificación y con unidades de repetición que contribuyen cada una a un punto de ramificación. Los dendrímeros exhiben ciertas propiedades de estado dendrítico tales como encapsulación de núcleo, haciéndolos únicos entre otros tipos de polímeros.

“Substancialmente” o “esencialmente” significa casi totalmente o completamente, por ejemplo, 95% o más de alguna cantidad dada.

Un “producto tipo retro-Michael” se refiere a un producto que proviene de lo contrario de una reacción de adición tipo Michael. Una reacción de adición Michael (dirección hacia adelante) se refiere a la adición de una especie de carbono nucleofílico a un enlace doble electrofílico.

Típicamente, pero no necesariamente, el nucleófilo es un enolato o una enamina aunque el nucleófilo también puede ser un alcóxido o una amina u otra especie. El electrofilo típicamente es una cetona alfa, beta-no saturada, éster, o nitrilo, aunque otros grupos retiradores de electrones también pueden activar un enlace doble carbono-carbono para ataque nucleofílico. Un producto que proviene de lo contrario (o dirección hacia atrás) de una adición tipo Michael como se describió anteriormente, es decir, una reacción de eliminación que resulta en la pérdida de una especie de carbono nucleofílico (que puede pero no necesariamente es un enolato o enamina) y formación de un enlace doble electrofílico tal como una cetona alfa, beta no saturada o similar tal como se describió anteriormente, se considera un producto tipo retro-Michael. Por ejemplo, una reacción tipo retro-Michael de mPEG-propionaldehído resulta en los productos tipo retro-Michael, mPEG-OH y acroleína ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$).

“Alquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos, típicamente en el rango entre 1 y 20 átomos de longitud. Tales cadenas de hidrocarburos preferiblemente no son necesariamente saturadas y pueden ser cadenas ramificadas o lineales, aunque típicamente la cadena lineal es preferida. Grupos alquilo de ejemplo incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares. Como se utiliza en la presente, “alquilo” incluye cicloalquilo cuando tres o más átomos de carbono son referenciados.

“Alquilo menor” se refiere a un grupo alquilo que contiene entre 1 y 6 átomos de carbono, y puede ser de cadena lineal o ramificada, como se ejemplificó mediante metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo.

“Cicloalquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos cíclica saturada o no saturada, incluyendo compuestos unidos, fusionados, o espiro-cíclicos, preferiblemente compuestos de 3 a 12 átomos de carbono aproximadamente, más preferiblemente entre 3 y 8.

“Substituyentes de no interferencia” son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, típicamente no son reactivos con otros grupos funcionales contenidos dentro de la molécula.

El término “substituido” como en, por ejemplo, “alquilo substituido”, se refiere a una fracción (ej., un grupo alquilo) substituido con uno o más substituyentes de no interferencia, tal como, pero sin limitar a: cicloalquilo C3-C8, ej., ciclopropilo, ciclobutilo, y similares; halo, ej., fluoro, cloro, bromo, y yodo; ciano; alcoxilo, fenilo menor; fenilo substituido; y similares. Para substituciones sobre un anillo de fenilo, los substituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta, o para).

“Alcoxilo” se refiere a un grupo –O-R, en donde R es alquilo o alquilo substituido, preferiblemente alquilo C1-C20 (ej., metoxilo, etoxilo, propiloxilo, bencilo, etc.), preferiblemente C1-C7.

Como se utiliza en la presente, “alqueno” se refiere a un grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado de 1 a 15 átomos longitud, que contiene al menos un enlace doble, tal como etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-butenilo, isobutenilo, octenilo, decenilo, tetradecenilo, y similares.

El término “alquino” como se utiliza en la presente se refiere a un grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado de 2 a 15 átomos longitud, que contiene al menos un enlace triple, etinilo, n-propinilo, isopropinilo, n-butinilo, isobutinilo, octinilo, decinilo, y así sucesivamente.

al

"Arilo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno de cinco o seis átomos de carbono principales. Arilo incluye múltiples anillos de arilo que pueden ser fusionados, como en naftilo o no fusionados, como en bifenilo. Los anillos de arilo también pueden ser fusionados o no fusionados con uno o más anillos cíclicos de hidrocarburos cíclicos, heteroarílicos, o heterocíclicos. Como se utiliza en la presente, "arilo" incluye heteroarilo.

"Heteroarilo" es un grupo arilo que contiene entre 1 y 4 heteroátomos, preferiblemente N, O, o S, o una combinación de los mismos. Los anillos de heteroarilo también pueden ser fusionados con uno o más anillos cíclicos de hidrocarburo, heterocíclico, arilo, o heteroarilo.

"Heterociclo" o "heterocíclico" significa uno o más anillos de 5 a 12 átomos, preferiblemente 5-7 átomos, con o sin carácter de no saturación o aromático y que tiene al menos un átomo cíclico el cual no es un carbono. Heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno, y nitrógeno.

"Heteroarilo sustituido" es heteroarilo con uno o más grupos de no interferencia como sustituyentes.

"Heterociclo sustituido" es un heterociclo con una o más cadenas laterales formadas a partir de sustituyentes de no interferencia.

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

"Nucleófilo" se refiere a un ión o átomo o colección de átomos que pueden ser iónicos, con un centro nucleofílico, es decir, un centro que está buscando un centro electrofílico, y capaz de reaccionar con un electrofilo.

"Agente activo" tal como se utiliza en la presente incluye cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de materia o mezcla el cual proporciona algún efecto farmacológico, a menudo benéfico que puede ser demostrado in vivo o in vitro. Este incluye alimentos, suplementos alimenticios, nutrientes, nutracéuticos, fármacos, vacunas, anticuerpos, vitaminas, y otros agentes benéficos. Como se utiliza en la presente, estos términos además incluyen cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produce un efecto localizado o sistémico en un paciente.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que puede ser incluido en las composiciones del invento y que no produce

Q2

efectos toxicológicos adversos significativos al paciente.

"Cantidad farmacológicamente efectiva," cantidad fisiológicamente efectiva," y "cantidad terapéuticamente efectiva" son utilizadas intercambiabilmente en la presente para significar la cantidad de un conjugado de agente PEG-activo presente en una preparación farmacéutica y es necesario para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o conjugado en la corriente sanguínea o en el tejido objetivo. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, ej., el agente activo particular, los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes objetivo, las consideraciones del paciente, y similares, y se puede determinar fácilmente por alguien con experiencia en el estado de la técnica, con base en la información proporcionada en la presente y disponible en la literatura pertinente.

"Multifuncional" en el contexto de un polímero del invento significa una cadena principal polimérica con tres o más grupos funcionales contenidos en la misma, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes, y típicamente están presentes sobre los extremos poliméricos. Los polímeros multifuncionales del invento típicamente contendrán entre 3 y 100 grupos funcionales, o entre 3 y 50 grupos funcionales, o entre 3 y 25 grupos funcionales, o entre 3 y 15 grupos funcionales, o entre 3 y 10 grupos funcionales, o contendrán 3,4,5,6,7,8,9 o 10 grupos funcionales dentro de la cadena principal polimérica.

Un polímero "difuncional" significa un polímero con dos grupos funcionales contenidos en el mismo, típicamente en los extremos poliméricos. Cuando los grupos funcionales son iguales, se dice que el polímero es homodifuncional. Cuando los grupos funcionales son diferentes, se dice que el polímero es heterobifuncional.

Un reactivo ácido o básico descrito en la presente incluye formas de sal neutrales, cargadas, y cualquier forma de sal correspondiente del mismo.

"Alcohol poliolefinico," se refiere a un polímero que comprende una cadena principal polimérica de olefina, tal como polietileno, con múltiples grupos hidroxilo colgantes unidos a la cadena principal polimérica. Un alcohol poliolefinico de ejemplo es alcohol polivinílico.

Como se utiliza en la presente, "no peptídico" se refiere a una cadena principal polimérica substancialmente libre de enlaces peptídicos. Sin embargo, el polímero puede incluir un número menor de enlaces peptídicos espaciados a lo largo de las subunidades de monómeros repetidos, tal como por ejemplo, no más de un enlace peptídico aproximadamente por 50 unidades de monómeros.

93

Como se utiliza en la presente, "hidrato" se refiere a un aldehído hidratado que resulta a partir de la adición de una molécula de agua al grupo aldehído, el cual reemplaza la funcionalidad de carbonilo con dos grupos hidroxilo. Los aldehídos alcanzan equilibrio con el correspondiente hidrato en agua.

5 El término "análogo de chalcógeno" se refiere a análogos de aldehído en donde el átomo de oxígeno es reemplazado con otro heteroátomo, generalmente azufre, selenio, o telurio.

El término "paciente," se refiere a un organismo viviente que padece o está propenso a una condición que puede ser evitada o tratada mediante la administración de un polímero del invento, típicamente pero no necesariamente en la forma de un conjugado de polímero y agente
10 activo, e incluye tanto humanos como animales.

"Opcional" o "opcionalmente" significa que la circunstancia subsecuentemente descrita puede o no ocurrir, de manera que la descripción incluye instancias donde la circunstancia ocurre e instancias donde no.

15 EL POLÍMERO

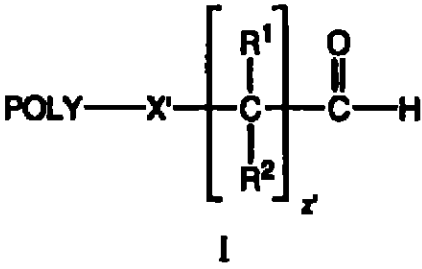
En un primer aspecto, el invento proporciona un polímero soluble en agua con un grupo aldehído reactivo. Los polímeros del invento son únicos en muchos aspectos. Estos son preparados no solamente en alto rendimiento, sino que también son de almacenamiento estable debido a la ausencia de subproductos de reacción perjudicial que pueden llevar a la degradación
20 de la cadena polimérica y pobre polidispersidad polimérica. Los polímeros, en particular polímeros de taponamiento en extremo, son adicionalmente preparados en alta pureza, ej., sin cantidades detectables de polietilenglicol diol derivado y otras impurezas poliméricas. Esta característica es particularmente ventajosa para preparar polímeros PEG de taponamiento en extremo de alto peso molecular, ej., con un peso molecular de 30 kDa o más aproximadamente,
25 donde la cantidad de impureza de polietilenglicol diol en la materia prima tal como mPEG puede estar en el rango entre 2% y 30% por peso aproximadamente o más, dependiendo del proveedor. Además en ciertas realizaciones, los polímeros del invento son menos reactivos que otros aldehídos poliméricos conocidos, haciéndolos más discriminatorios en reacciones de conjugación y más estables durante transformación, manipulación, y reacción de aislamiento o purificación.

30

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES GENERALES Y PORCIÓN ALCANAL

94

Generalmente, el polímero del invento posee un segmento polimérico conectado a aproximadamente entre 1 y 21 metilenos contiguos o metilenos sustituidos que terminan en una función de aldehído (es decir, la porción alcanal) a través de una fracción enlazadora interpuesta. Una estructura generalizada correspondiente al polímero del invento es proporcionada a continuación como Estructura I.



Estructura I

En referencia a la descripción anterior cuando se observa en conjunción con la estructura I, el segmento polimérico es representado por POLY, la fracción enlazadora es representada por X', y los metilenos contiguos (formando una cadena de alquilenos) o metilenos sustituidos (formando una cadena de alquilenos sustituidos) son representados por C(R¹(R²)-. Más específicamente, en la Estructura I, POLY es un segmento polimérico soluble en agua; X' es una fracción enlazadora; y z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente. R¹, en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico tal como alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido. R², en cada ocurrencia, también es independientemente H o un radical orgánico tal como del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido. Aunque muchas de las estructuras explícitamente proporcionadas en la presente son aldehídos, se debe entender que estas mismas estructuras y en realidad el invento como un todo pretende extenderse hacia los correspondientes hidratos de aldehído, aldehídos en forma protegida, y análogos de chalcógeno, donde el oxígeno de carbonilo en la estructura I es reemplazado por azufre, selenio, o telurio.

El presente invento proporciona considerable flexibilidad con respecto al tamaño de la cadena de alquileo conectada al grupo aldehído. La longitud de la cadena de carbono se considera como el carbón carbonilo (C1) más el número de átomos de carbono que intervienen,

PS

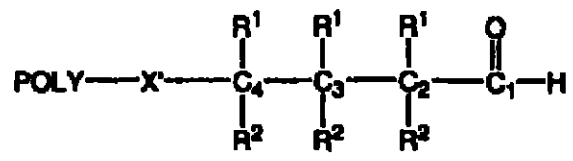
(ej., el número total de $\underline{C}$ s comprendiendo la porción $[-\underline{C}(R^1)(R^2)]_{z'}$ del polímero), conectando el carbón carbonilo al eslabón. La longitud de la cadena de carbono típicamente es de 3 a 22 átomos de carbono aproximadamente, o más típicamente de 4 a 13 átomos de carbono aproximadamente. En referencia a la estructura I anterior, esto significa que el valor de z' típicamente está en el rango entre 2 y 21, o más típicamente entre 3 y 12. Más explícitamente, el valor de z' es típicamente uno de los siguientes: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12, o más. Los valores de z' más preferidos están en el rango entre 2 y 8 aproximadamente. Un alcanal polimérico particularmente preferido del invento es aquel donde z' es 3.

Con referencia a la estructura I anterior, ciertos tipos de alcanales son particularmente preferidos. Tales compuestos incluyen alcanales como se describió anteriormente con al menos un radical orgánico posicionado en al menos un "C" en la cadena de carbono. El radical orgánico puede ser cualquiera de los radicales orgánicos anteriormente mencionados, ej., alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, con alquilo como preferido. Típicamente, el grupo alquilo es un alquilo menor de cadena lineal o alquilo menor ramificado tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, etc, con cadena lineal como preferida. Un sustituyente de alquilo particularmente preferido es metilo.

Aunque la porción alcanal del polímero puede poseer más de un radical orgánico posicionado sobre uno o más "C"s en la cadena de carbono, un tipo de alcanal preferido es aquel en el cual solamente un "C" en la cadena de carbono es sustituido con un radical orgánico y todos los demás R^1 y R^2 son H. Por ejemplo, sin considerar la longitud de la cadena de alquileo, se prefieren los alcanales donde todas las variables de R^1 y R^2 son H, con excepción que: (i) uno entre R^1 y R^2 posicionado en C-2 es alquilo, o (ii) uno entre R^1 o R^2 posicionado en C-3 es alquilo; o (iii) uno entre R^1 o R^2 posicionado en C-4 es alquilo; o (iv) uno entre R^1 o R^2 posicionado en C-5 es alquilo, y así sucesivamente. Un tipo particularmente preferido de sustituyente en este aspecto es el alquilo menor tal como metilo, etilo, o propilo. La síntesis de un alcanal 2-metilo-sustituido del invento, mPEG-2-metilbutiraldehído, se describe en el Ejemplo 17.

Contemplando ahora la porción alcanal del polímero, ciertos alcanales preferidos son mostrados a continuación.

96

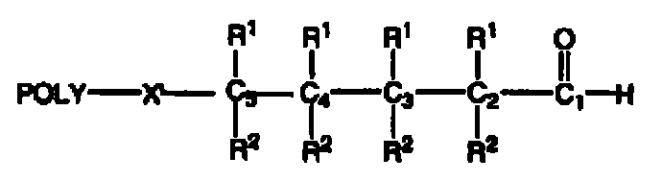


5 Estructura I-A

La Estructura I-A es aquella donde el valor de z' a partir de la estructura I es 3. Esta estructura, sin considerar si uno o más de C2, C3, o C4 es sustituido con un alquilo u otro radical orgánico como se describió anteriormente, se conoce en la presente como un "butiraldehído" o como un "butanal". Butiraldehídos poliméricos ilustrativos del invento incluyen aquellos donde la porción

10 alcanal del polímero es 2-metilbutiraldehído, 3-metilbutiraldehído, o 4-metilbutiraldehído, 2-etilbutiraldehído, 3-etilbutiraldehído, o 4-etilbutiraldehído.

15

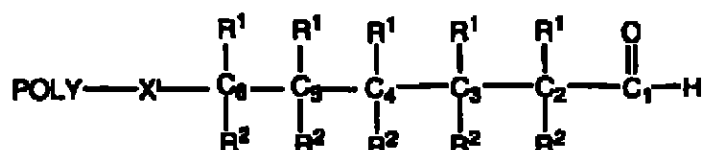


Estructura I-B.

20 La estructura I-B es aquella donde el valor de z' de la estructura I es 4. Esta estructura, sin considerar si cualquiera uno o más de C2, C3, C4, o C5 es sustituido con un alquilo u otro radical orgánico como se describió anteriormente, es conocida en la presente como un "pentanal" o como un "valeraldehído". Pentanales poliméricos ilustrativos del invento incluyen aquellos donde la porción alcanal del polímero es 2-metilpentanal, 3-metilpentanal, 4-metilpentanal, o 5-

25 metilpentanal. Pentanales poliméricos adicionales incluyen aquellos donde la porción alcanal del polímero es 2-etilpentanal, 3-etilpentanal, 4-etilpentanal, o 5-etilpentanal.

97



5 Estructura I-C

La Estructura I-C es aquella donde el valor de z' en la estructura I es 5. Esta estructura, sin considerar si uno o más de C2, C3, C4, C5 o C6 es sustituido con un alquilo u otro radical orgánico como se describió anteriormente, es conocida en la presente como "hexanal". Hexanales
 10 poliméricos ilustrativos del invento incluyen aquellos donde la porción alcanal del polímero es 2-metilhexanal, 3-metilhexanal, 4-metilhexanal, 5-metilhexanal, 6-metilhexanal, 2-etilpentanal, 3-etilpentanal, 4-etilpentanal, o 5-etilpentanal.

Componentes alcanales adicionales de un polímero del invento incluyen heptanales, octanales, nonanales, y similares.

15 LA FRACCION ENLAZADORA

Considerando ahora la fracción enlazadora, una fracción enlazadora o simplemente "eslabón" del invento está representada generalmente por la variable, X'. La fracción enlazadora es la porción del polímero general que enlaza la porción alcanal del polímero con el segmento
 20 polimérico (a ser descrito con mayor detalle más adelante). Un eslabón del invento puede ser un átomo simple, tal como un oxígeno o un azufre, dos átomos, o un número de átomos. Un eslabón típicamente pero no necesariamente es de naturaleza lineal. La longitud total del eslabón típicamente estará en el rango entre 1 y 40 átomos, donde por longitud se entiende el número de átomos en una cadena simple, sin contar los sustituyentes. Por ejemplo, -CH2- vale como un
 25 átomo con respecto a la longitud enlazadora total, -CH2CH2O- vale como 3 átomos de longitud. Preferiblemente, un eslabón tendrá una longitud entre 1 y 20 átomos aproximadamente, o entre 2 y 15 átomos aproximadamente.

Un eslabón del invento puede ser un grupo funcional simple tal como una amida, un éster, un uretano, o una urea, o puede contener metileno u otros grupos alquilenos que limitan con
 30 cualquier lado del grupo funcional simple. Adicionalmente, un eslabón del invento puede ser una cadena de alquilenos, opcionalmente conteniendo uno o más átomos de oxígeno o azufre (es decir,

af

un éter o tioéter). Eslabones preferidos son aquellos que son hidrolíticamente estables. Cuando se observa en el contexto de la estructura I, un eslabón es aquel que cuando se considera parte del polímero general, no resulta en una estructura general que contiene un enlace de peróxido (-O-O-) o un enlace -N-O- o -O-N-.

- 5 Eslabones ilustrativos, X', son aquellos que corresponden a cualquiera de las siguientes estructuras:



- 10 Con referencia a las estructuras enlazadoras anteriores, la variable "c" está en el rango entre cero y 8; "D" es O, NH, o S; la variable "e" es 0 o 1; la variable "r" está en el rango entre 0 y 8; la variable "p" está en el rango entre cero y 8; "M" es -NH o O; "K" es NH o O; la variable "q" está en el rango entre cero y 8; y las variables "r" y "s" son cada una independientemente 0 o 1.

En el contexto de la estructura I, un eslabón del invento, X' puede ser cualquiera de los siguientes:

- 15 -O-, -NH-, -S-, -C(O)-, C(O)-NH, NH-O-C(O)-NH, -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂CH₂-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH₂-, -CH₂-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-O-CH₂-, -C(O)-O-CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-, C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, NH-CH₂-, NH-CH₂-CH₂-, CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-, -C(O)-CH₂-, -C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-, CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, grupo cicloalquilo bivalente -N(R⁶)-, CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-[CH₂]_h-(OCH₂CH₂)_j-, y
- 20
- 25
- 30

94

combinaciones de dos o más de cualquiera de los anteriores, en donde (h) está entre 0 y 6, (j) está entre 0 y 20, R^6 es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido. Otros eslabones específicos tienen las estructuras: $-C(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$, o $-NHC(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$ o $-OC(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$, donde los valores subíndices después de cada metileno indican el número posible de metilenos contenidos en la estructura enlazadora, ej., $(CH_2)_{1-6}$ significa que el eslabón pueden contener 1,2,3,4,5 o 6 metilenos.

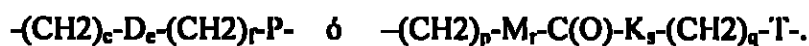
Para propósitos de la presente divulgación, sin embargo, un serie de átomos no se considera como una fracción enlazadora cuando la serie de átomos es inmediatamente adyacente a un segmento polimérico, POLY, y la serie de átomos es solo otro monómero tal que la fracción enlazadora propuesta representaría una mera extensión de la cadena polimérica. Por ejemplo, dada la estructura parcial "POLY-X", donde POLY en esta instancia se define como " $CH_3O(CH_2CH_2O)_n-$ ", la fracción enlazadora no sería " $-CH_2CH_2O-$ " puesto que tal definición meramente representaría una extensión del polímero. No se puede decir, sin embargo, que un eslabón del invento no puede poseer una o más porciones contiguas $-CH_2CH_2O-$. Por ejemplo, un eslabón puede contener una o más subunidades $(-CH_2CH_2O-)$ limitadas sobre uno o ambos lados por uno o una combinación de eslabones ilustrativos tal como se proporcionó anteriormente.

Es decir, un eslabón como se describió anteriormente también puede incluir un oligómero tal como $-(CH_2CH_2O)_b-$ o $-(CH_2CH_2NH)_g-$ donde b y g cada uno independientemente están en el rango entre 1 y 20 aproximadamente. Los solicitantes han encontrado que la inclusión de tales oligómeros dentro del eslabón puede proporcionar estabilidad al producto alcanal polimérico final al extender la distancia entre la funcionalidad de aldehído y cualquier grupo reactivo contenido dentro del eslabón. En esta forma, las interacciones intramoleculares son desfavorecidas, llevando a rendimientos aumentados durante la preparación y estabilidad mejorada del producto alcanal polimérico. Preferiblemente, las variables b y g están en el rango entre 1 y 10, o en ciertas instancias, en el rango entre 1 y 6. La síntesis de un alcanal polimérico ilustrativo con cuatro unidades contiguas $-(CH_2CH_2O)$ en el eslabón se describe en el Ejemplo 5.

Ejemplos adicionales de eslabones específicos que contienen los segmentos oligoméricos $-(CH_2CH_2O)_b-$ o $(CH_2CH_2NH)_g-$ son mostrados a continuación, donde X' incluye o esta

100

definido por:



En las estructuras ilustrativas anteriores, P y T son cada una independientemente $-(CH_2CH_2O)_b-$ o $-(CH_2CH_2NH)_g-$, b y g están cada uno independientemente entre 1 y 20, y las demás variables son como se definieron anteriormente. Ejemplos de eslabones preferidos de esta clase son $-O-C(O)-NH-(CH_2CH_2O)_b-$, $-C(O)-NH-(CH_2CH_2O)_b-$, $NH-C(O)-NH-(CH_2CH_2O)_b-$, $-O-C(O)-NH-(CH_2CH_2NH)_g-$, $-C(O)-NH-(CH_2CH_2BH)_g-$, y $-NH-C(O)-NH-(CH_2CH_2BH)_g-$.

En ciertas instancias, por ejemplo, cuando POLY representa un segmento polimérico lineal, entonces preferiblemente el número total de carbonilos presentes en el alcanal polimérico es cero o dos o más, donde el número total de carbonilos no incluye los carbonilos de aldehído. Sin embargo, cuando el eslabón, X' incluye uno o más segmentos contiguos $-(CH_2CH_2O)-$, entonces preferiblemente el número total de carbonilos presentes en el alcanal polimérico es 0, o 1, o 2, o 3, o más.

Refiriéndonos nuevamente la estructura I, en otra realización preferida del invento, cuando X' es oxígeno o incluye al menos un segmento $-(CH_2CH_2O)-$, y z' está en el rango entre 2 y 12, entonces al menos uno entre R¹ o R² es al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o alternativamente, el polímero es heterobifuncional. En tal instancia donde el polímero es heterobifuncional, el segmento polimérico, POLY, preferiblemente posee un grupo reactivo en un extremo que no es hidroxilo.

Preferiblemente, el eslabón es hidrolíticamente estable, y puede contener uno o más de los siguientes grupos funcionales: amida, uretano, éter, tioéter, o urea. Sin embargo, los eslabonamientos hidrolíticamente degradables, tales como éster de carboxilato, éster de fosfato, ortoéster, anhídrido, imina, acetal, cetel, oligonucleótido, o péptido, también pueden estar presentes en un eslabón del invento. Los eslabones de heteroátomos tales como O o S, son particularmente preferidos, como son los eslabones que contienen segmentos oligoméricos $-(CH_2CH_2O)_b-$ o $(CH_2CH_2NH)_g$ como se describió anteriormente.

EL SEGMENTO POLIMÉRICO/POLÍMEROS PARA PREPARAR UN ALCANAL POLIMÉRICO

Como se muestra en las estructuras ilustrativas anteriores, un alcanal polimérico del invento contiene un segmento polimérico soluble en agua. POLYs representativos incluyen

101

poli(glicoles de alquilenos) tales como poli(etilenglicol), poli(glicol de propileno) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y glicol de propileno, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxi alquilmetacrilamida), poli(hidroxi alquilmetacrilato), poli(sacaridos), poli(ácido α -hidroxílico), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilóilmorfolina).

- 5 POLY puede ser un homopolímero, un copolímero alternante, un copolímero aleatorio, un copolímero de bloque, un tripolímero alternante, un tripolímero aleatorio, o un tripolímero de bloque de cualquiera de los anteriores. El segmento polimérico soluble en agua preferiblemente es, aunque no necesariamente, un poli(etilenglicol) o "PEG" o un derivado del mismo.

- 10 El segmento polimérico puede tener cualquiera de un número de geometrías diferentes, por ejemplo, POLY puede ser lineal, ramificado o bifurcado. Más típicamente, POLY es lineal o ramificado, por ejemplo, con dos brazos poliméricos. Aunque mucha de la discusión en la presente está enfocada en PEG como un POLY ilustrativo, la discusión y las estructuras presentadas en la presente pueden ser fácilmente extendidas para incluir cualquiera de los segmentos poliméricos solubles en agua descritos anteriormente.

- 15 Cualquier polímero soluble en agua con al menos un extremo reactivo se puede utilizar para preparar un alcanal polimérico según el invento y el invento no está limitado en este aspecto. Aunque se pueden utilizar polímeros solubles en agua que llevan solamente un único extremo reactivo, se pueden utilizar polímeros que llevan dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más extremos reactivos apropiados para conversión a un alcanal polimérico tal como se estableció en la presente. De manera ventajosa, a medida que aumenta el número de hidroxilo u otras fracciones reactivas sobre el segmento polimérico soluble en agua, aumenta el número de sitios disponibles para introducir un grupo alcanal. Ejemplos no limitantes del límite superior del número de fracciones de hidroxilo y/o otras fracciones reactivas con el segmento polimérico soluble en agua incluyen 500, 100, 80, 40, 20, y 10.

- 25 Considerando ahora el POLY preferido, PEG, "PEG" incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas lineal, ramificada o multi-extensión, incluyendo PEG de taponamiento en extremo, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante, y PEG que contiene uno o más eslabonamientos degradables que separan subunidades de monómeros, a ser completamente descritos a continuación.

- 30 Para preparar un alcanal polimérico del invento, un material de inicio PEG comúnmente utilizado es polietilenglicol libre, un polímero lineal con grupos hidroxilo en cada extremo:

102



El anterior polímero, alfa-, omega-dihidroxi polietilenglicol, se puede presentar en una forma breve como HO-PEG-OH, y también es conocido en la presente como polietilenglicol diol, donde "-PEG-" en "HO-PEG-OH" corresponde a:



y (n) típicamente está en el rango entre 3 y 4000 aproximadamente, o entre 3 y 3000 aproximadamente, o más preferiblemente entre 20 y 1000 aproximadamente. En referencia a la estructura I, POLY por ejemplo puede ser un PEG con terminación hidroxilo tal como HO-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_{n-1}-CH₂CH₂-.

Otro tipo de PEG útil para preparar los alcanales poliméricos del invento es PEG de taponamiento en extremo, donde PEG es taponado en extremo con un grupo de taponamiento en extremo inerte. PEGs de taponamiento en extremo preferidos son aquellos que tienen como una fracción de taponamiento en extremo un grupo tal como alcoxilo, alcoxilo sustituido, alqueniloxilo, alqueniloxilo sustituido, alquinioloxilo, alquinioloxilo sustituido, ariloxilo, ariloxilo sustituido. Preferidos son grupos de taponamiento en extremo tales como metoxilo, etoxilo, y benciloxilo.

Con referencia ahora a las estructuras I y I-A a través de I-C, POLY, en ciertas realizaciones, es o comprende un poli(etilenglicol) correspondiente a la estructura:

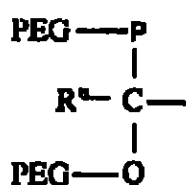


donde n está en el rango entre 3 y 4000 aproximadamente, o entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z es o incluye un grupo funcional tal como hidroxilo, amino, éster, carbonato, aldehído, alquénilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, hidrazida, malcínida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxilo, benciloxilo, silano, lípido, fosfolípido, biotina, y fluoresceína. Nuevamente, las estructuras POLY mostradas anteriormente pueden representar segmentos poliméricos lineales, o pueden formar parte de un segmento polimérico ramificado o bifurcado. En una instancia donde

103

el segmento polimérico es ramificado, las estructuras POLY inmediatamente anteriores pueden, por ejemplo, corresponder a los brazos poliméricos formando parte de la estructura POLY general. Alternativamente, en una instancia donde POLY posea una estructura bifurcada, la anterior estructura POLY puede, por ejemplo, corresponder a la porción lineal del segmento polimérico antes del punto de ramificación.

POLY también puede corresponder a una molécula PEG ramificada con dos brazos, 3 brazos, 4 brazos, 5 brazos, 6 brazos, 7 brazos, 8 brazos o más. Los polímeros ramificados utilizados para preparar los alcanales poliméricos del invento pueden poseer cualquiera entre 2 y 300 extremos reactivos. Se prefieren segmentos poliméricos ramificados con 2 o 3 brazos poliméricos. Un POLY ilustrativo ramificado, como se describe en la Patente U.S. No. 5.932.462 corresponde a la estructura:



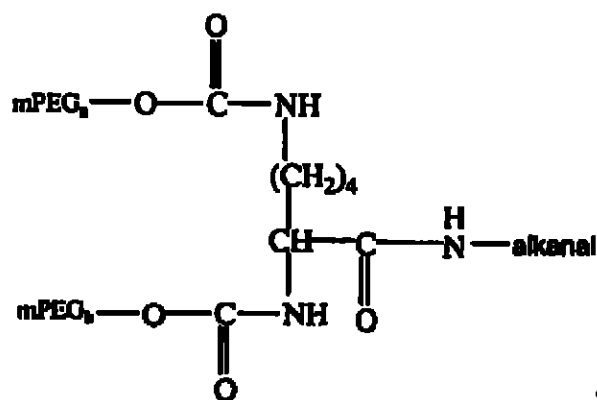
En esta representación, R'' es una fracción no reactiva, tal como H, metilo o un PEG, y P y Q son eslabonamientos no reactivos. En una realización preferida, el segmento polimérico PEG ramificado es lisina disustituida con metoxi poli(etilenglicol).

En la anterior configuración ramificada particular, el segmento polimérico ramificado posee un sitio reactivo único que se extiende desde el punto de ramificación "C" para posicionamiento del grupo alcanal reactivo a través de un eslabón. Los PEGs ramificados tales como estos para utilizar en el presente invento típicamente tendrán menos de 4 brazos PEG, y más preferiblemente, tendrán 2 o 3 brazos PEG. Tales PEGs ramificados ofrecen la ventaja de tener un único sitio reactivo, acoplado con una nube polimérica mas grande y densa que sus contrapartes PEG lineales.

Un tipo particular de alcanal PEG ramificado corresponde a la estructura: (MeO-PEG)_iG-X'-alcanal, donde i es igual a 2 o 3, y G es una lisina u otro residuo aminoácido apropiado.

Un alcanal polimérico ilustrativo ramificado del invento tiene la estructura mostrada a continuación:

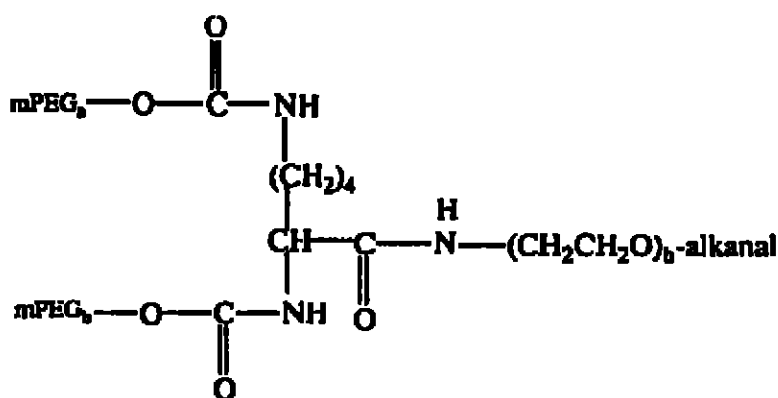
104



Estructura V-A

En esta instancia, el eslabón corresponde a C(O)-NH, opcionalmente conteniendo un segmento oligomérico $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$ o $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$ posicionado entre el nitrógeno de amida y la porción alkanal del polímero como se muestra en la Estructura V-B a continuación.

Los segmentos oligoméricos de ejemplo poseerán valores b o g en el rango entre 1 y 40 aproximadamente, o entre 1 y 30 aproximadamente. Preferiblemente b o g posee valores de alrededor de 20 o menos. Preferiblemente, b o g tendrá uno de los siguientes valores: 2,3,4,5,6,7,8,9,10, o más. En una realización particularmente preferida, b o g está en el rango entre 2 y 6, y mPEG_a y mPEG_b son iguales o diferentes.



Estructura V-B.

Ciertas realizaciones son preferidas para alcanales poliméricos con una estructura ramificada. Por ejemplo, en una realización particular, por ejemplo cuando POLY en la Estructura I es ramificado, entonces al menos uno entre R^1 o R^2 en al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente. En una realización alternativa preferida, por

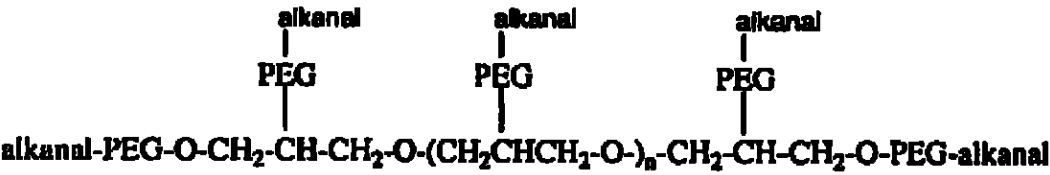
105

ejemplo, cuando POLY en la Estructura I es ramificado, entonces X' incluye $-(CH_2CH_2O)_b-$ donde b está entre 1 y 20 aproximadamente, en la instancia donde POLY comprende un residuo de lisina. En ocasiones cuando POLY tiene dos brazos poliméricos, es preferible que ningún brazo polimérico comprenda oxígeno como el único heteroátomo en la instancia donde POLY comprende "C-H" como un punto de ramificación.

PEGs ramificados para utilizar en la preparación de un alcanal polimérico del invento adicionalmente incluyen aquellos representados generalmente por la fórmula $G(PEG)_n$, donde G es una molécula central o principal desde la cual se extienden 2 o más brazos PEG. La variable n representa el número de brazos PEG, donde cada uno de los brazos poliméricos puede independientemente ser de taponamiento en extremo o alternativamente, puede poseer un grupo funcional reactivo en su extremo, tal como un alcanal u otro grupo funcional reactivo. Los PEGs ramificados tales como aquellos representados generalmente por la fórmula, $G(PEG)_n$ anterior poseen de 2 a 300 brazos poliméricos (es decir, n está en el rango entre 2 y 300 aproximadamente). Los PEGs ramificados tales como estos preferiblemente poseen entre 2 y 25 brazos poliméricos aproximadamente, más preferiblemente entre 2 y 20 brazos poliméricos aproximadamente, y aún más preferiblemente entre 2 y 15 brazos poliméricos aproximadamente o menos. Los más preferidos son los polímeros de múltiples brazos con 3, 4, 5, 6, 7 o 8 brazos.

Las moléculas centrales o principales preferidas en PEGs ramificados como se describió anteriormente son los polioles. Tales polioles incluyen polioles alifáticos con entre 1 y 10 átomos de carbono y entre 1 y 10 grupos hidroxilo, incluyendo etilenglicol, dioles alcanos, glicoles alquilicos, dioles alquilidenalquilicos, dioles alquilcicloalcanos, 1,5-decalindiol, 4,8-bis(hidroximetil)triclodccano, dioles de cicloalquilideno, hidroxialcanos, trihidroxialcanos, y similares. También se pueden emplear polioles cicloalifáticos, incluyendo azúcares de cadena lineal o de anillo cerrado y alcoholes de azúcar, tales como manitol, sorbitol, inositol, xilitol, quebrachitol, treitol, arabitól, eritritol, adonitol, dulcitol, sacosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, ramnosa, galactosa, glucosa, fructosa, sorbosa, manosa, piranosa, altrosa, talosa, tagitosa, piranosidas, sacarosa, lactosa, maltosa y similares. Polioles alifáticos adicionales incluyen derivados de gliceraldehído, glucosa, ribosa, manosa, galactosa, y estercoisómeros relacionados. Otros polioles centrales que se pueden utilizar incluyen éter corona, ciclodextrinas, dextrinas y otros carbohidratos tales como almidones y amilosa. Polioles preferidos incluyen glicerol, pentacritritol, sorbitol, y trimetilolpropano.

PEGs multi-extensivos para utilizar en la preparación de un alcanal polimérico del invento incluyen PEGs multi-extensivos disponibles en Nektar, Huntville, Alabama. En una realización preferida, un alcanal polimérico multi-extensivo del invento corresponde a lo siguiente, donde los detalles de la porción alcanal de la molécula se proporcionan en cualquier parte en la presente.

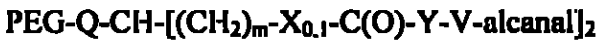


$$n = 0 \text{ a } 4$$

Estructura XIII-A

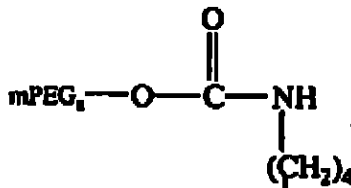
Alternativamente, el alcanal polimérico puede poseer una estructura bifurcada general. Un ejemplo de un PEG bifurcado corresponde a la estructura: PEG-Y-CH-(X'-[C(R¹)(R²)]_x-CHO)₂, donde PEG es cualquiera de las formas de PEG descritas en la presente, Y es un grupo enlazador, preferiblemente un eslabonamiento hidrolíticamente estable, y las otras variables que corresponden al eslabón y la porción alcanal son como se definieron anteriormente.

Derivados de alcanales PEG bifurcados ilustrativos adicionales corresponden a la siguiente estructura:



Estructura XIII-B.

donde PEG es cualquiera de las formas de PEG descritas en la presente. Q es un eslabonamiento hidrolíticamente estable, tal como oxígeno, azufre, o -C(O)-NH-; m está en el rango entre 1 y 10, (es decir, m puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) pero preferiblemente m es 1, 2, 3, o 4; X es un átomo opcional, y cuando está presente, es O o N; Y es NH o O; y V es un segmento oligomérico opcional tal como -(CH₂CH₂O)_b- o (CH₂CH₂NH)_g- como se describió anteriormente. Un PEG ramificado de ejemplo que corresponde a "PEG" en la formula anterior es lisina mPEG-disustituida, donde "PEG" corresponde a:



107

5

Alternativamente, el segmento polimérico PEG para utilizar en la preparación de un
10 alcanal polimérico del invento puede ser una molécula PEG con grupos reactivos colgantes a lo
largo de la longitud de la cadena PEG mas que en los extremos, para proporcionar un alcanal
polimerico con uno o más grupos alcanales colgantes fijados a la cadena PEG mediante un
eslabón, X'.

Además, el segmento polimérico puede poseer uno o más eslabonamientos degradables o
15 débiles, tales como eslabonamientos de éster que están sujetos a hidrólisis. Otros
eslabonamientos hidroliticamente degradables que pueden estar contenidos en POLY incluyen
carbonato, imina, éster de fosfato, e hidrazona.

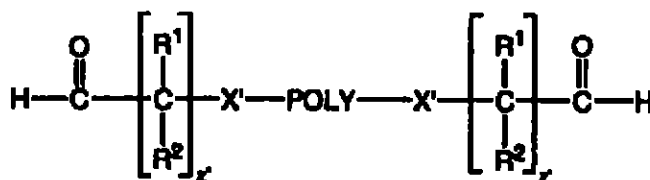
Generalmente, la masa molecular promedio nominal del segmento polimérico soluble en
agua, POLY variará. La masa molecular promedio nominal de POLY típicamente cae en uno o
20 más de los siguientes rangos. Entre 100 y 100.000 daltons aproximadamente; entre 500 y 80.000
daltons aproximadamente; entre 1.000 y 50.000 daltons aproximadamente; entre 2.000 y 25.000
daltons aproximadamente; entre 5.000 y 20.000 daltons aproximadamente. Masas moleculares
promedio nominales para el segmento polimérico soluble en agua POLY incluyen 1.000 daltons
aproximadamente, 5.000 daltons aproximadamente, y 10.000 daltons aproximadamente, 15.000
25 daltons aproximadamente, 20.000 daltons aproximadamente, 25.000 daltons aproximadamente,
30.000 daltons aproximadamente, y 40.000 daltons aproximadamente. Los POLYs de bajo peso
molecular poseen masas moleculares de aproximadamente 250, 750, 1000, 2000, o 5000 daltons.

ALCANALES POLIMÉRICOS REPRESENTATIVOS

30 Después de la descripción general anterior, las siguientes son algunas estructuras
ilustrativas que demuestran alcanales poliméricos preferidos según el invento.

108

Por ejemplo, el alcanal polimérico del invento, cuando es lineal, puede poseer una estructura homobifuncional o heterobifuncional según la estructura II a continuación. Una estructura homobifuncional según la estructura a continuación es aquella donde ambos extremos son iguales.

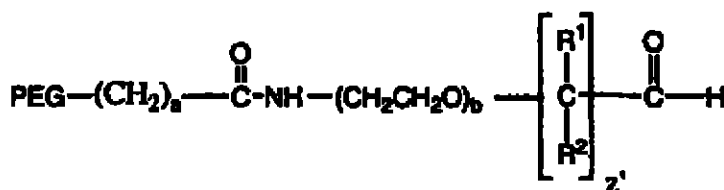


II

Estructura II

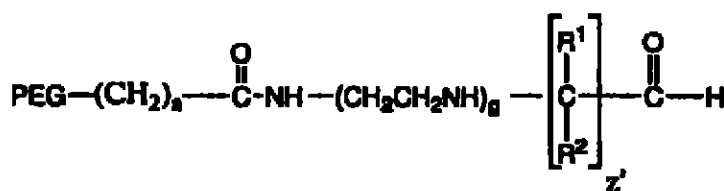
Valores preferidos para X' y -CR¹R²- son como se establecieron anteriormente.

Estructuras particularmente preferidas según la estructura II son aquellas en las cuales POLY es poly(etilenglicol), y X' es -O-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-(CH₂CH₂O)_b-, -C(O)-NH-(CH₂CH₂O)_b- o -NH-C(O)-NH-(CH₂CH₂O)_b-, y z' está en el rango entre 1 y 12, y más preferiblemente es 2, 3, 4, 5, o 6. Más específicamente, alcanales poliméricos representativos del invento incluyen los siguientes:



III-A

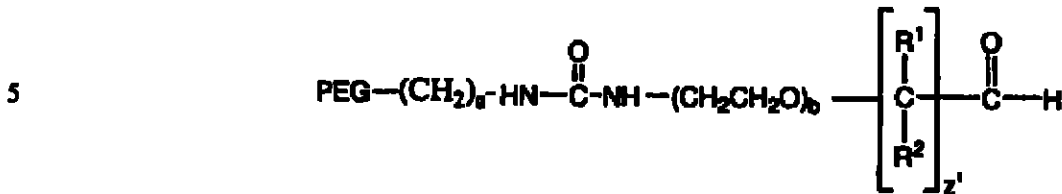
Estructura III-A



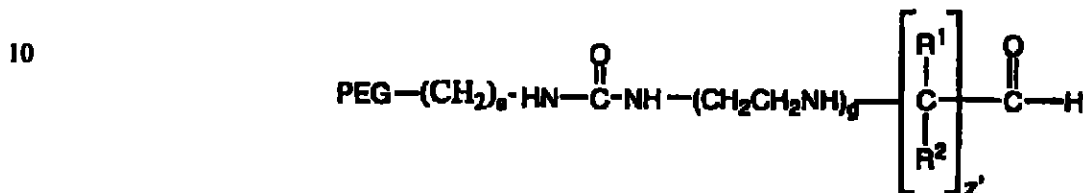
IV-A

109

Estructura IV-A



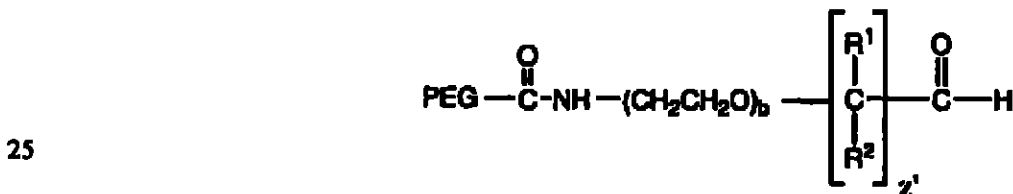
Estructura III-C



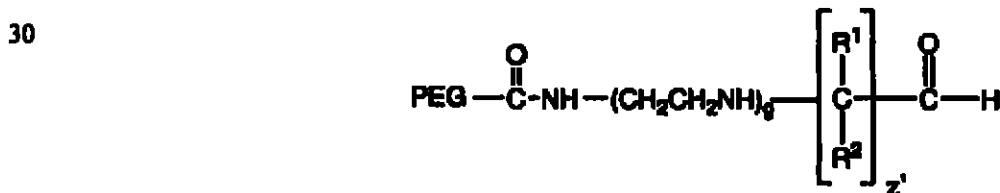
Estructura IV-C

15 en donde PEG es poli(etilenglicol), b y g están cada uno independientemente entre 0 y 20, a está entre 0 y 6, y las demás variables son como se definieron anteriormente. Se prefieren las estructuras en las cuales b y g están en el rango entre 1 y 8 o alternativamente en el rango entre 1 y 6. Aunque z' está en el rango entre 1 y 21 aproximadamente, se prefieren las estructuras en las cuales z' está en el rango entre 2 y 6, ej., 3 o 4.

20 Representaciones estructurales de dos alcanales poliméricos donde la variable "a" (tal como se demuestra en las estructuras a continuación) es cero están proporcionadas abajo.

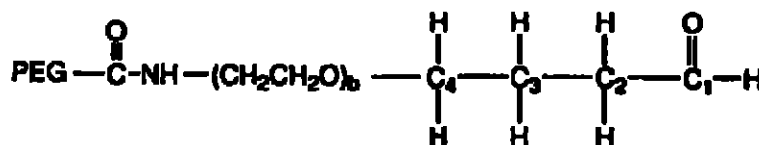


Estructura III-B.



Estructura IV-B.

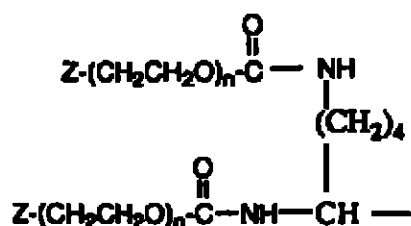
5 Un butanal polimérico ilustrativo tiene la siguiente estructura:



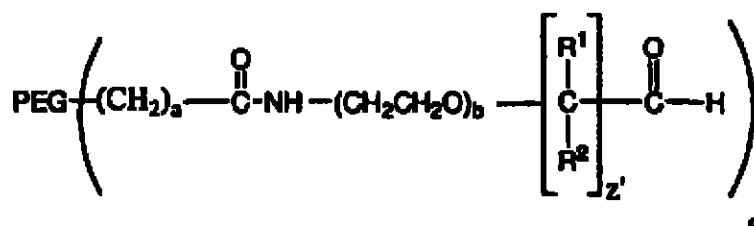
III-D

Estructura III-D.

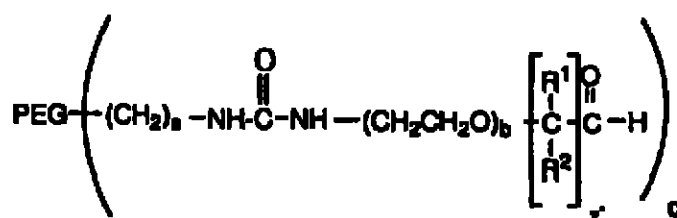
PEGs particularmente preferidos que corresponden a la estructura III-D anterior incluyen $\text{Z}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ o



Estructuras ramificadas adicionales según el invento son como sigue, donde b típicamente está entre 0 y 20, s típicamente está entre 0 y 6, y d es 1, 2 o 3,

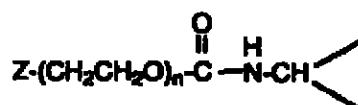


Estructura VI-A

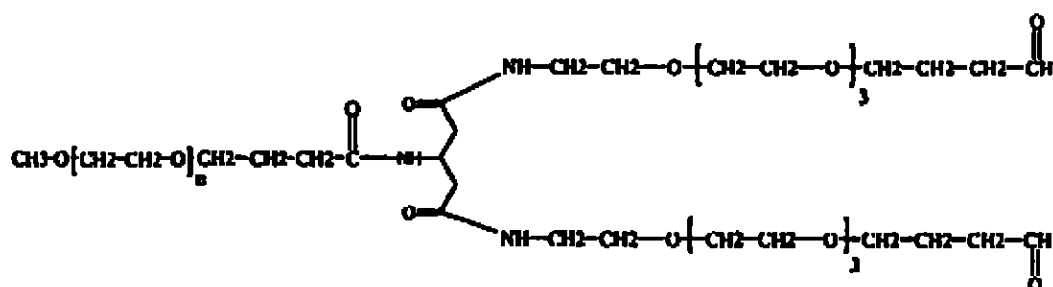


111

Preferiblemente, R^1 y R^2 en cada ocurrencia son H, y z' está en el rango entre 3 y 12, y aún más preferiblemente 3, 4, 5, o 6. Como un ejemplo, un polímero según la Estructura VI-B es aquel donde PEG corresponde a la estructura:

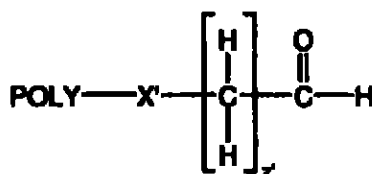


Otro alcanal polimérico del invento posee la estructura mostrada a continuación:



En la realización anterior, el alcanal polimérico también tiene una estructura bifurcada y es apropiada para unión covalente a dos agentes biológicamente activos. La anterior estructura contiene, en las porciones que se extienden desde el punto de ramificación $-\text{CH}-$ un eslabón que contiene segmentos oligoméricos $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$, donde el número de tales segmentos en cada porción es 3. El número de tales segmentos oligoméricos en la anterior estructura puede ser variado según la descripción generalizada proporcionada anteriormente.

Estructuras de alcanales poliméricos de ejemplo adicionales incluyen las siguientes, donde las variables han sido previamente definidas:

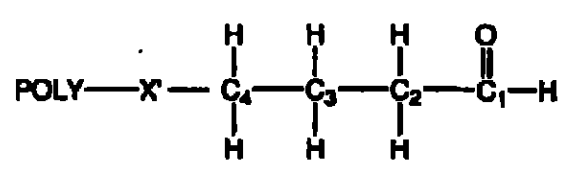


vii

112

5

Estructura VII

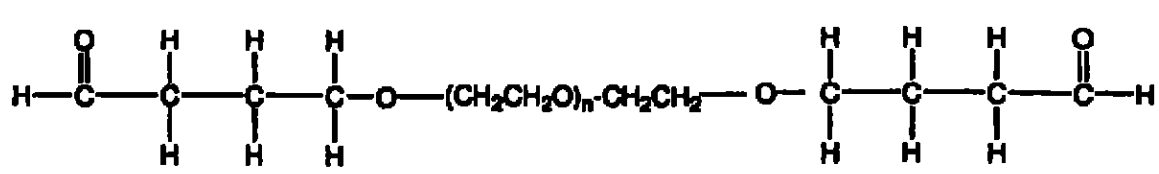


10

VII-A.

Estructura VII-A

15



VIII

Estructura VIII

20

Preferiblemente, cualquiera de las anteriores estructuras es proporcionada como una composición que tiene una o más características únicas de composición descritas con mayor detalle a continuación.

CARACTERÍSTICAS DE LAS COMPOSICIONES ALCANALES POLIMÉRICAS FORMADAS Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN

25

30

Los alcanales poliméricos del invento poseen varias ventajas sobre los aldehídos poliméricos previamente preparados. Primero, los alcanales poliméricos son preparados en rendimientos muy altos, en parte debido a la simplicidad del enfoque sintético empleado, particularmente para los alcanales con oxígeno como la fracción enlazadora. Además, al examinar la estabilidad de los butanales del invento, se descubrió que estos tipos de alcanales son más estables a pHs básicos que los derivados de aldehídos poliméricos antes conocidos (ej.,

113

propionaldehídos, acetaldehídos), y son formados sin cantidades significativas o aún detectables de subproductos de reacción tipo retro-Michael. Por ejemplo, como se demostró en el Ejemplo 3, bajo condiciones básicas, el propionaldehído mPEG experimenta una reacción tipo retro – Michael, produciendo mPEG-OH y el producto de eliminación, acroleína, en cantidades significativas (después de 24 horas a temperatura ambiente y pH 8, casi 40% del propionaldehído PEG se descompuso). En contraste el butiraldehído mPEG es significativamente más estable bajo condiciones básicas, demostrando esencialmente no descomposición de esta clase bajo las condiciones empleadas.

Además, el derivado de polímero de butanal del invento alcanza equilibrio en agua con su correspondiente hidrato a hidrato de 50% aproximadamente, mucho menos que el equilibrio de hidrato del 70% exhibido por el propionaldehído y el hidrato de 100% exhibido por el acetaldehído. La reactividad menor de los derivados poliméricos del invento también es evidenciada por la estabilidad marcadamente mayor de los derivados del invento bajo condiciones básicas (ver ejemplo 3 a continuación). No se observó el subproducto de acroleína durante las reacciones de conjugación entre los derivados de aldehído del invento y proteínas u otras moléculas a pH básico. La reactividad baja de los derivados de aldehído del invento indica que los derivados del invento son más selectivos, significando que los derivados inventivos son capaces de reaccionar con mayor selectividad o especificidad con grupos amino específicos, particularmente grupos amino en el extremo N, sobre proteínas o péptidos, opuesto a reacción no selectiva o aleatoria con cualquier número de grupos amino sobre una proteína o molécula peptídica. En muchas aplicaciones, la unión en el extremo N selectiva de la cadena principal polimérica es preferida para preservar mejor la conformación proteica y actividad biológica.

Además, los alcanales poliméricos del invento son formados a partir de los correspondientes precursores de acetal mediante hidrólisis bajo condiciones ácidas suaves, es decir, bajo condiciones ácidas mucho menos severas que las requeridas ya sea para acetaldehído PEG o propionaldehído PEG. Si se desea, tales condiciones suaves permiten conjugación directa *in situ* de los derivados poliméricos del invento con proteínas, péptidos, u otros blancos moleculares sin necesidad de un paso de aislamiento intervencionista. Además, debido a los enfoques sintéticos empleados, los alcanales poliméricos del invento también son proporcionados en alta pureza, a menudo especies ausentes que contienen yodo o que pueden promover la descomposición del segmento polimérico.

124

Debido a la suavidad del enfoque sintético empleado, y además debido a la naturaleza estable de las estructuras proporcionadas en la presente, los alcanales poliméricos del invento son adicionalmente proporcionados como composiciones que esencialmente no tienen productos de reacción tipo retro- Michael. Por lo tanto, las composiciones de alcanales poliméricos

5 proporcionadas en la presente son particularmente de almacenamiento estable, exhibiendo cantidades muy limitadas de descomposición polimérica. Como un ejemplo, con base en los datos de estabilidad recolectados, se encontró que los alcanales poliméricos del invento exhiben menos de 10% de degradación aproximadamente del grupo aldehído polimérico cuando se almacenan a 40°C durante 15 días. Éste porcentaje de degradación se determinó mediante análisis NMR.

10 Adicionalmente, se proporcionaron alcanales poliméricos mPEG lineales del invento que son sustancialmente libres del correspondiente PEG-dialcanal (es decir, una impureza PEG homobifuncional que proviene de la presencia de una cantidad de polietilenglicol diol en la materia prima de mPEG-OH).

Considerando ahora más específicamente el método para preparación de un alcanal
15 polimérico del invento, un alcanal polimérico generalmente es preparado haciendo reaccionar un polímero soluble en agua que tiene al menos un grupo reactivo, Y, con un reactivo de alcanal protegido que contiene un grupo reactivo, K, apropiado para desplazamiento por o
alternativamente, reacción con Y, bajo condiciones efectivas para formar un alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida. Generalmente, un reactivo de alcanal protegido poseerá entre
20 2 y 20 átomos de carbono aproximadamente. El alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida formado así luego es típicamente hidrolizado, por ejemplo, bajo condiciones ácidas para formar el alcanal polimérico soluble en agua deseado.

Típicamente, la reacción de acoplamiento (es decir, el acoplamiento del polímero reactivo y reactivo de alcanal protegido) es realizada en un solvente orgánico tal como tolueno,
25 cloroformo, cloruro de metileno, acetonitrilo, acetona, dioxano, metanol, y etanol. La reacción preferiblemente es realizada bajo una atmósfera inerte, a temperaturas en el rango entre 20°C y 150°C aproximadamente. La hidrólisis para formar el alcanal deseado típicamente es promovida por ácido, y es realizada a pHs menores que 7.0, con pHs preferidos en el rango entre 3 y 6.5. La hidrólisis se puede realizar a un pH de 3, 4, 5, o 6 aproximadamente, con pHs menores alrededor
30 de 3 como preferidos.

MS

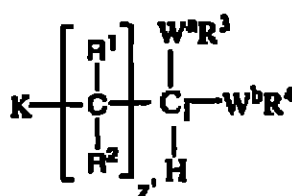
Ejemplos detallados del enfoque sintético descrito anteriormente son proporcionados en los ejemplos 1, 2, 5, y 17.

Más típicamente, el acoplamiento del segmento polimérico al reactivo de alcanal protegido avanza a través de una síntesis de éter de Williamson. Más específicamente, el grupo reactivo Y del polímero es hidroxilo (el cual en presencia de una base fuerte es convertido a su correspondiente forma aniónica o alcóxido), y el grupo reactivo K sobre el acetal de reactivo de alcanal protegido es un buen grupo saliente, tal como un haluro (preferiblemente Cl o Br) o sulfato de metilo (un éster de sulfonato), que puede ser fácilmente desplazado por el anión de oxígeno posicionado en el extremo polimérico. El eslabonamiento preferido resultante es un eslabonamiento de éter (O-) que conecta POLY al alcanal.

Después de unión a POLY, el alcanal protegido es hidrolizado a un pH ácido para formar el correspondiente aldehído o grupo funcional alcanal. Como se anotó anteriormente, los acetales de alcanal tales como acetal de butanal son hidrolizados bajo condiciones más suaves que los correspondientes acetales de propanal o etanal. Por ejemplo, cuando z' es 3 o más, un acetal de alcanal del invento puede ser hidrolizado a un pH de 3 o 4 o más aproximadamente, particularmente cuando R^1 y R^2 en todas las instancias son H. Como se anotó en los ejemplos 2 y 4, el grupo acetal de butanal descrito aquí es hidrolizado en aproximadamente 3 horas, a un pH de 3. La capacidad para formar este grupo funcional alcanal bajo condiciones ácidas suaves es ventajosa puesto que permite el uso *in situ* del polímero aldehído -funcionalizado para conjugación a una proteína u otra molécula biológicamente activa después de neutralización de la solución que contiene el alcanal polimérico a un pH apropiado para conjugación (típicamente un pH entre 5 y 10 aproximadamente). En contraste, los propionaldehídos poliméricos lineales requieren aislamiento antes de la conjugación debido a la cantidad de base requerida para neutralizar la solución de pH bajo y la cantidad correspondientemente mayor de sales generadas durante tal paso de neutralización.

En el método empleado, el reactivo de alcanal protegido típicamente es un acetal tal como acetal dimetilico, acetal dietílico, acetal di-isopropílico, acetal dibencilico, acetal 2,2,2-tricloroetilico, acetal bis(2-nitrobencilo), acetal S,S'-dimetilico, y acetal S,S'-dietílico. Alternativamente, el acetal puede ser un acetal cíclico o un tioacetal cíclico.

Más específicamente, el alcanal protegido usualmente poscerá una estructura como:



116

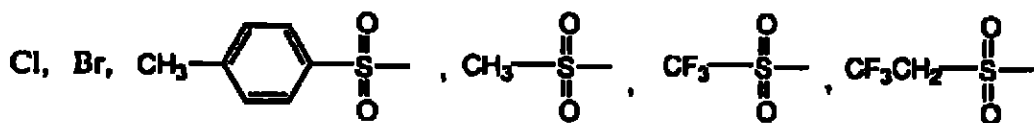
5

Estructura XI-D.

En esta estructura, z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente. Como para los aldehídos poliméricos proporcionados anteriormente, R^1 , en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido; y R^2 , en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido. W^a y W^b son cada uno independientemente O o S, R^3 y R^4 son cada uno independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de metilo, etilo, isopropilo, bencilo, 1,1,1-tricloroetilo, y nitrobencilo, o cuando se toman juntos, son $-(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_3-$, formando un anillo de 5 o 6 miembros cuando se consideran juntos con W^a , C_1 , y W^b .

Preferiblemente, K es uno de los siguientes grupos reactivos:

20



En este método, el alcanal polimérico en la forma protegida típicamente es formado en un rendimiento mayor que 85% aproximadamente, y aún más preferiblemente un rendimiento mayor que 90 a 95%.

Después de la hidrólisis para obtener el polímero aldehído -funcionalizado deseado, el producto puede ser aislado si se desea neutralizando la mezcla de reacción, ej., elevando el pH de 6.0 a 7.5 aproximadamente, seguido por la extracción del alcanal polimérico en un solvente orgánico, y remoción del solvente, ej., mediante evaporación giratoria, liofilización, o destilación.

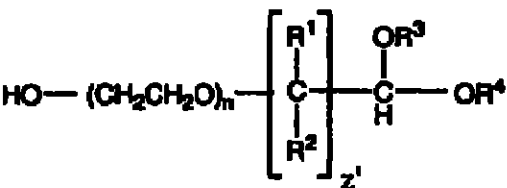
30

117

Debido a la simplicidad de este enfoque que no utiliza métodos oxidativos directos ni especies que contienen yodo para proporcionar la función de aldehído deseada, los productos así formados son altamente puros, con estabilidad de almacenamiento aumentada en comparación con otros aldehídos poliméricos conocidos, y poseen valores de polidispersidad menores (menos de 1.5 aproximadamente preferiblemente menos de 1.2 aproximadamente, y típicamente polidispersidades menores que 1.1, 1.08, 1.05, 1.04, 1.3 aproximadamente). Los polímeros con polidispersidades tan bajas como 1.03, 1.04 y 1.01 han sido preparados de esta manera.

Un alcanal polimérico aislado del invento preferiblemente tendrá una pureza de al menos 95% aproximadamente, con base en los contaminantes poliméricos.

Los ejemplos 1 y 2 ilustran la formación de alcanales poliméricos mPEG. En instancias en las cuales el material de inicio polimérico es polietilenglicol diol, uno de los grupos PEG hidroxilo generalmente es protegido antes de reacción con el reactivo de alcanal protegido, seguido por la subsiguiente desprotección para acoplamiento. Todo alcanal protegido polimérico ilustrativo formado de esta manera se muestra por la estructura XI-E a continuación.

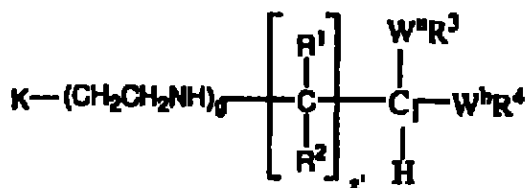


Estructura XI-E.

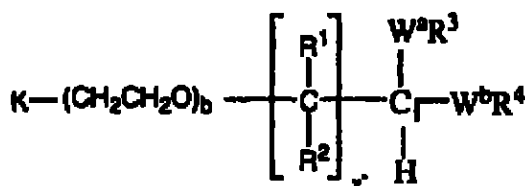
La extremo hidroxilo del PEG puede luego, si se desea, ser convertido en un grupo funcional para proporcionar un alcanal protegido homobifuncional o heterobifuncional. Grupos funcionales apropiados incluyen amino, éster, carbonato, aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, hidrazida, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, y silano. Se prefieren los grupos funcionales tales como éster de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de benzotriazolilo, amina, vinilsulfona, y maleimida, carbonato de N-succinimidilo, hidrazida, propionato de succinimidilo, butanoato de succinimidilo, succinato de succinimidilo, éster de succinimidilo,

éter de glicidilo, oxicarbonilimidazol, carbonato de p-nitrofenilo, aldehído, ortopiridil-disulfuro, y acrilol.

Otros reactivos de alcanal representativos son descritos por las estructuras:



Estructura XI-F



XI-G

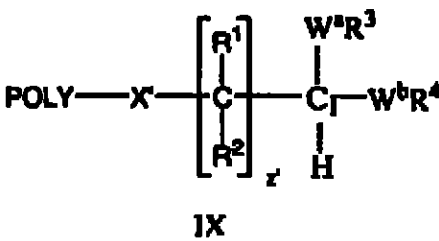
Estructura XI-G.

En aún otro enfoque, un alcanal polimérico del invento es ventajosamente preparado a partir de un POLY-Y cromatograficamente purificado. En esta forma, las impurezas poliméricas, y en particular las impurezas difuncionales que provienen del polietilenglicol diol son retiradas para permitir la formación de un producto de alcanal polimérico extremadamente puro tal como se describió anteriormente. Este enfoque es mostrado en el ejemplo 5. Un resumen del enfoque sintético general empleado, sus ventajas, su aplicabilidad a los métodos generales descritos en la presente, así como también detalles específicos de las reacciones realizadas es proporcionado en el ejemplo 5.

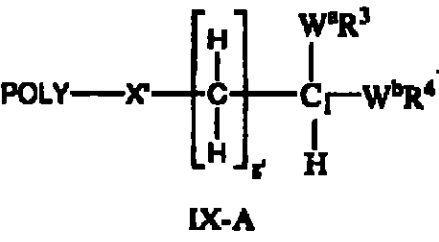
Aunque cualquier método de separación cromatográfico puede ser utilizado, particularmente se prefiere la cromatografía de intercambio iónico, donde Y en POLY-Y es un grupo ionizable o es un derivado de un grupo ionizable tal como un ácido carboxílico, éster activo, amina o similares.

119

Acetales de alcanal poliméricos ilustrativos del invento pueden poseer cualquiera de las siguientes estructuras, donde las variables han sido previamente descritas:



Estructura IX.



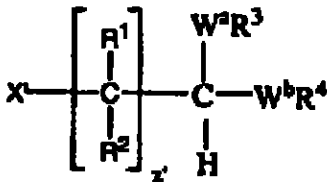
Estructura IX-A

En aún otra aproximación para preparar un alcanal polimérico del invento, un alcanal polimérico se puede preparar mediante la construcción del segmento polimérico, POLY, directamente sobre un precursor de acetal, ej., mediante polimerización directa. Más específicamente, en este método, primero se proporciona un precursor de acetal con al menos un sitio aniónico activo apropiado para iniciar polimerización. El sitio aniónico del precursor de acetal luego se coloca en contacto con un monomero reactivo capaz de la polimerización, para así iniciar la polimerización del monomero reactivo sobre el precursor de acetal. Como un resultado del paso de contacto, monomeros reactivos adicionales son agregados al precursor de acetal para formar una cadena polimérica. Se permite que el contacto continúe hasta que la longitud deseada de la cadena polimérica sea alcanzada, seguido por la terminación de la reacción para lograr un precursor de aldehído polimérico del invento.

El precursor de aldehído polimérico resultante puede ser adicionalmente hidrolizado al correspondiente alcanal tal como se estableció anteriormente, si se desea. Más preferiblemente, el monomero reactivo es óxido de etileno y el sitio aniónico reactivo contenido dentro del precursor de acetal es un anión de alcóxido (O-), preferiblemente acompañado por un metal alcalino u otro

contraion apropiado. El grupo final alcóxido presente en el precursor acetal es activo para polimerización de abertura de anillo aniónico de óxido de etileno para formar un alcanal polimérico del invento.

Más particularmente, el precursor de acetal generalmente poseerá una estructura que corresponde a:



donde las variables poseen los valores descritos anteriormente, con la excepción que X' termina en un anión de oxígeno, o O- (ej., en su forma neutral, X' típicamente termina en un grupo hidroxilo o -OH, que en presencia de una base fuerte, se convierte en la correspondiente sal de alcóxido). Contraiones apropiados incluyen Na+, K+, Li+, y Cs+. El paso de terminación generalmente comprende la neutralización de la reacción, ej., mediante la adición de ácido. Opcionalmente, el segmento polimérico puede ser taponado mediante la adición de un reactivo de alquilación u otro reactivo apropiado para proporcionar un extremo no reactivo.

En una realización particular del método anterior, POLY-Y corresponde a la estructura Z-(CH2CH2O)nH, en donde n esta entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z es seleccionado del grupo que consta de -OCH3, -OCH2CH3, y -OCH2(C6H5). En una realización adicional, POLY-Y corresponde a la estructura Z-(CH2CH2O)nCH2CH2O-M+, donde POLY-Y se preparó mediante polimerización aniónica de abertura de anillo de oxido de etileno sobre una sal de alcoholato taponado en extremo tal como Z-CH2CH2O-M+, preparada mediante metalación del grupo -OH terminal de Z-CH2CH2OH con una base fuerte. M+ representa un contraion metálico tal como Na+, K+, Li+, Cs+, Rb+. POLY-Y preparado de esta manera es luego apropiado para reacción con un reactivo de alcanal protegido tal como se describió anteriormente.

Un esquema generalizado que describe este enfoque es proporcionado en la presente como Fig. 1, y las condiciones para realizar tal reacción o serie de reacciones son proporcionadas en el Ejemplo 15.

ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS ALCANALES POLIMERICOS

421

Preferiblemente, los alcanales poliméricos del invento son almacenados bajo una atmósfera inerte, tal como bajo argón o bajo nitrógeno, puesto que la funcionalidad de aldehído puede reaccionar el oxígeno atmosférico para producir el correspondiente ácido carboxílico. Debido al potencial para la reacción de la porción de aldehído de la molécula con agua (ej., mediante exposición a humedad para formar el hidrato correspondiente), también es preferible minimizar la exposición de los alcanales poliméricos del invento a humedad. Por lo tanto, las condiciones preferidas de almacenamiento son bajo argón seco u otro gas seco inerte a temperaturas por debajo de -15°C aproximadamente. El almacenamiento bajo condiciones de temperaturas menores reduce la tasa de hidrólisis del aldehído polimérico a la correspondiente forma de hidrato. Adicionalmente, en instancias donde el segmento polimérico del alcanal polimérico es PEG, la porción PEG del alcanal puede reaccionar lentamente con oxígeno para formar peróxidos a lo largo de la porción PEG de la molécula. La formación de peróxidos puede llevar finalmente a escisión en cadena, aumentando así la polidispersidad del reactivo de alcanal PEG. En vista de lo anterior, adicionalmente se prefiere almacenar los alcanales PEG del invento en la obscuridad.

CONJUGADOS BIOLOGICAMENTE ACTIVOS

QUIMICA DE ACOPLAMIENTO

CONJUGACION A PROTEINAS - ALEATORIA Y SELECTIVO EN EL EXTREMO N

Los alcanales poliméricos anteriormente descritos son útiles para la conjugación a agentes o superficies biológicamente activas que contienen al menos un grupo amino disponible para reacción. Típicamente, un aldehído PEG del invento es acoplado a un grupo amino mediante aminación reductiva, resultando en la formación de un eslabonamiento de amina secundaria entre el segmento polimérico y el agente o superficie biológicamente activa. Al conjugar un alcanal polimérico del invento con un agente o superficie biológicamente activa que contiene un grupo amino, el alcanal polimérico reacciona con la molécula objetivo que contiene un grupo amino en un solvente apropiado para formar el correspondiente intermedio ligado a amina, el cual luego es reducido para formar un eslabonamiento de amina secundaria entre el polímero y el agente o superficie biológicamente activa. La reducción de la imina a la correspondiente amina es

122

realizada mediante la adición de un agente reductor. Agentes reductores de ejemplo incluyen cianoborohidruro de sodio, borohidruro de sodio, hidruro de litio-aluminio, y similares.

Generalmente, los aldehidos poliméricos del invento se pueden utilizar para señalar selectivamente la modificación del extremo-N bajo condiciones que diferencian la reactividad de la amina alfa en el aminoácido en el extremo N. Ciertos alcanales poliméricos del invento parecen demostrar una mayor selectividad que los derivados de aldehido anteriormente conocidos y, por lo tanto, son más apropiados para aplicaciones donde se desea modificación selectiva proteica en el extremo N. Las condiciones de reacción para preparar un péptido o proteína modificada en el extremo N incluyen (i) disolución de la proteína o péptido a ser modificado en un amortiguador que no contiene amina (ej., en un rango de pH entre 4 y 6.5 aproximadamente, preferiblemente entre 5 y 6.5 aproximadamente, más preferiblemente a un pH entre 5 y 5.5 aproximadamente, (ii) adición a la proteína o solución peptídica de un alcanal polimérico del invento, (iii) permitir que la proteína o péptido y alcanal polimérico reaccionen para formar el conjugado polimérico acoplado a imina, seguido por (iv) la adición de un agente reductor para formar el correspondiente conjugado polimérico acoplado por aminas. Las condiciones de reacción para unión aleatoria de un alcanal polimérico son esencialmente idénticas a aquellas descritas anteriormente, con la excepción que el pH es algo mayor (se discutirá con mayor detalle más adelante).

Para favorecer la modificación del extremo N, se prefiere un pH entre 5 y 5.5 aproximadamente puesto que se cree facilita la modificación selectiva del extremo N debido a las diferencias en el valor pKa del grupo amino de un aminoácido en el extremo N y grupo amino de lisinas. Generalmente, las condiciones que favorecen la selectividad en el extremo N incluyen pHs por debajo de 7, y típicamente no menores que 4 aproximadamente. El pH más favorable para promover la selectividad en el extremo N se puede determinar por alguien con experiencia en el estado de la técnica, y dependerá de la proteína particular a ser modificada. Amortiguadores apropiados para realizar conjugación incluyen fosfato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, solución salina amortiguada con fosfato. Típicamente, el alcanal polimérico es agregado a la solución que contiene proteínas en una cantidad equimolar o en un exceso molar relativo a la proteína objetivo. El alcanal polimérico es agregado a la proteína objetivo en una proporción molar de 1:1 aproximadamente (alcanal polimérico: proteína), 1.5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1, o 10:1. Excesos molares de PEG-alcanal relativos a la proteína objetivo típicamente están en el

103

rango entre 2 y 5. La reacción de aminación reductiva típicamente es realizada a temperatura ambiente o temperaturas por debajo de la temperatura ambiente aproximadamente (25°C), aunque las temperaturas pueden estar en el rango entre -15°C y 100°C aproximadamente, más preferiblemente entre 4°C y 37°C, durante aproximadamente 1 a 24 horas. Típicamente el agente reductor también es agregado en exceso, es decir, en cantidades en un rango entre 2 y 30 veces el exceso molar con relación al conjugado polímero-proteína. Se prefiere agregar el agente reductor en un exceso molar de 10 a 20 veces con relación al conjugado polímero-proteína. El tiempo exacto de reacción es determinado monitoreando el progreso de la reacción con el paso del tiempo. El progreso de la reacción típicamente es monitoreando retirando alícuotas de la mezcla de reacción en varios puntos de tiempo y analizando la mezcla de reacción mediante espectrometría de masa SDS-PAGE o MALDI-TOF o cualquier otro método analítico apropiado. Los conjugados pegilados resultantes son adicionalmente caracterizados utilizando métodos analíticos tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel, y/o cromatografía.

Más específicamente, para acoplar un derivado de polímero de aldehído a una proteína o péptido, se pueden emplear un número diferentes de enfoques. Un enfoque (es decir, un enfoque de pegilación aleatorio) es unir covalentemente PEG a cualquier número de residuos de lisinas que son accesibles por superficie. Para realizar tal reacción, una proteína o péptido (tal como aquellas biomoléculas de ejemplo proporcionadas más adelante) típicamente se hace reaccionar con un alcanal polimérico del invento en un amortiguador sin aminas a pHs suaves generalmente en el rango entre 5 y 8 aproximadamente. (Los amortiguadores que no contienen aminas son preferidos puesto que los grupos amino en el amortiguador pueden competir con los grupos amino proteicos por el acoplamiento al alcanal polimérico). Un amortiguador que no contiene aminas apropiado es seleccionado con un pK apropiado para el rango pH deseado para realizar la química de conjugación. La reacción de acoplamiento generalmente tarda entre minutos y varias horas (ej., desde 5 minutos hasta 24 horas o más), y en promedio, el acoplamiento es logrado entre 0.2 y 4 horas aproximadamente para formar el conjugado acoplado por iminas. A la mezcla de reacción luego se agrega cualquiera de un número de agentes reductores apropiados tal como se describió anteriormente (ej., cianoborohidruro de sodio). Luego la mezcla resultante generalmente se deja reaccionar bajo condiciones de temperatura baja a ambiente, ej., 4°C a 37°C durante 1 hora a 48 horas. Preferiblemente, la reacción de reducción se completa en menos de 24 horas aproximadamente. El acoplamiento aleatorio es favorecido a pHs alrededor de 7 a 7.5,

174
mientras el acoplamiento en el extremo N es favorecido a pHs bajos (ej., alrededor de 5.5 aproximadamente).

Para aumentar el grado de modificación, es decir, para promover un aumento en el número de PEGs que son covalentemente unidos en sitios disponibles sobre la molécula objetivo, cualquiera o más de las condiciones anteriormente descritas (ej., proporción molar de alcanal polimérico a proteína o péptido, temperatura, tiempo de reacción, pH, etc.) se pueden aumentar, ya sea de manera independiente o de manera simultánea. Sin considerar el peso molecular del alcanal PEG empleado, la mezcla de producto resultante es preferiblemente pero no necesariamente purificada para separar los reactivos de exceso, proteína sin pegar (o cualquier molécula objetivo), conjugados multipegilados, y alcanal PEG libre o sin reaccionar.

La pegilación aleatoria de proteínas ilustrativas es proporcionada en los ejemplos 4 y 6. La pegilación selectiva por sitios de proteínas ilustrativas es descrita en los ejemplos 7 a 13.

CARACTERIZACIÓN/SEPARACIÓN OPCIONAL DE PEG-POLÍMEROS

Opcionalmente, los conjugados producidos al reaccionar un aldehído PEG del invento con un agente biológicamente activo son purificados para obtener/aislar diferentes especies PEGiladas. Alternativamente, y más preferiblemente para PEGs de peso molecular menor, ej., que tienen pesos moleculares menores que 20 kilodaltons aproximadamente, preferiblemente menos o igual a 10 kilodaltons aproximadamente, la mezcla de producto puede ser purificada para obtener una distribución alrededor de un cierto número de PEGs por molécula de proteína. Por ejemplo, la mezcla de producto puede ser purificada para obtener un promedio entre uno y cinco PEGs por proteína, típicamente un promedio de 3 PEGs aproximadamente por proteína. La estrategia para purificación de la mezcla de reacción de conjugado final dependerá de un número de factores - el peso molecular del polímero empleado, la proteína particular, el régimen de dosificación deseado, y la actividad residual y propiedades *in vivo* de las especies de conjugados individuales.

Si se desea, los conjugados PEG con diferentes pesos moleculares se pueden aislar utilizando cromatografía de filtración en gel. Es decir, la cromatografía de filtración en gel es utilizada para fraccionar diferentes PEG-polímeros (1-polímero, 2-polímeros, 3-polímeros, etc) sobre la base de sus diferentes pesos moleculares (donde la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular promedio de las cadenas PEG). Por ejemplo, en una reacción de ejemplo donde

MS

una proteína de 100 kDa es aleatoriamente conjugada a un alcanal PEG con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, la mezcla de reacción resultante probablemente contendrá proteína sin modificar (PM 100 kDa), proteína mono-pegilada (PM 120 kDa), proteína di-pegilada (PM 140 kDa), etc. Mientras este enfoque se puede utilizar para separar conjugados PEG con diferentes pesos moleculares, generalmente no es efectivo para separar isómeros posicionales que tienen diferentes sitios de pegilación dentro de la proteína. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel se puede utilizar para separar entre sí mezclas de PEG 1-polímeros, 2-polímeros, 3-polímeros, etc., aunque cada una de las composiciones PEG-polímero recuperadas puede contener PEGs unidas a diferentes grupos amino reactivos (ej., residuos de lisinas) dentro de la proteína.

Las columnas de filtración de gel apropiadas para realizar este tipo de separación incluyen columnas Superdex y Sephadex disponibles en Amersham Biosciences. La selección de una columna particular dependerá del rango de fraccionamiento deseado. La elución generalmente es realizada utilizando un amortiguador no basado en aminas, tal como fosfato, acetato, o similares. Las fracciones recolectadas se pueden analizar mediante un número de métodos diferentes, por ejemplo, (i) OD a 280 nm para contenido proteico, (ii) análisis proteico con BSA, (iii) prueba de yodo para contenido PEG (Sims G. E. C., *Anal. Biochem.* 107, 60-63, 1980), o alternativamente, (iv) corriendo un gel SDS PAGE, seguido por tinte con yoduro de bario.

La separación de los isómeros posicionales es realizada mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna RP-HPLC C18 (Amersham Biosciences o Vydac) o mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de intercambio iónico, ej. una columna de intercambio iónico Sepharose™ disponible en Amersham Biosciences. Cualquier enfoque se puede utilizar para separar isómeros de biomoléculas PEG que tengan el mismo peso molecular (isómeros posicionales).

ALMACENAMIENTO

Dependiendo del uso futuro de los conjugados PEG resultantes, después de la conjugación, y los pasos de separación opcionalmente adicionales, la mezcla de conjugados puede ser concentrada, filtrada estéril, y almacenada a bajas temperaturas desde -20°C hasta -80°C aproximadamente. Alternativamente, el conjugado puede ser liofilizado, ya sea con o sin

176

amortiguador residual y almacenado como un polvo liofilizado. En algunas instancias, se prefiere intercambiar un amortiguador utilizado para conjugación, tal como acetato de sodio, por un amortiguador volátil tal como carbonato de amonio o acetato de amonio, que puede ser fácilmente retirado durante la liofilización, de manera que la formulación en polvo de conjugado proteico liofilizado quede libre de amortiguador residual. Alternativamente, un paso de intercambio de amortiguador se puede utilizar empleando un amortiguador de formulación, de manera que el conjugado liofilizado esté en una forma apropiada para reconstitución en un amortiguador de formulación y finalmente para administración a un mamífero.

10 CONJUGACIÓN DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS

La conjugación de un alcanal PEG del invento a una molécula pequeña tal como anfotericina B es realizada generalmente tal como se describe en el ejemplo 14, aunque las condiciones precisas de reacción variarán dependiendo de la molécula pequeña que es modificada. Típicamente, la conjugación es realizada utilizando un exceso molar leve de reactivo PEG relativo a la molécula pequeña, ej., aproximadamente 1.2 - 1.5, a aproximadamente un exceso molar de 5 a 10 veces. En algunas instancias, dependiendo de la molécula, el fármaco de moléculas pequeñas puede actualmente ser utilizado en exceso, tal como cuando el conjugado de moléculas pequeñas PEG se precipita en el solvente de reacción, ej., éter, mientras el fármaco sin reaccionar permanece en la solución.

20 SUPERFICIES Y MOLÉCULAS OBJETIVO

Los alcanales poliméricos reactivos del invento pueden ser unidos, ya sea de manera covalente o no covalente, a un número de entidades incluyendo películas, separación química y superficies de purificación, soportes sólidos, superficies metálicas y óxido de metal tales como oro, titanio, tantalio, niobio, aluminio, acero, y sus óxidos, óxido de silicio, macromoléculas, y moléculas pequeñas. Adicionalmente, los polímeros del invento también se pueden utilizar en sensores bioquímicos, interruptores bioelectrónicos, y compuertas. Los alcanales poliméricos del invento también se pueden utilizar como vehículos para síntesis de péptidos, para la preparación de superficies recubiertas por polímeros e injertos poliméricos, para preparar conjugados de polímeros y ligandos para particionamiento de afinidad, para preparar hidrogeles entrecruzados o no entrecruzados, y para preparar aductos de polímeros y cofactores para biorreactores.

Un agente biologicamente activo para utilizar en el acoplamiento a un polímero del invento puede ser uno o más de los siguientes. Agentes apropiados se pueden seleccionar a partir de, por ejemplo, hipnóticos y sedantes, energizantes psíquicos, tranquilizantes, fármacos respiratorios, anticonvulsivos, relajantes musculares, agentes antiparkinson (antagonistas de la dopamina), analgésicos, antiinflamatorios, fármacos antiansiedad (anxiolíticos), supresores del apetito, agentes antimigraña, estimuladores musculares, fármacos anti-infecciosos (antibióticos, antivirales, antimicóticos, vacunas), antiartríticos, antimaláricos, antieméticos, antiepilépticos, broncodilatadores, citoquinas, factores de crecimiento, agentes anti-cancerígenos, agentes antitrombóticos, antihipertensivos, fármacos cardiovasculares, antiarrítmicos, antioxidantes, agentes antiasmáticos, agentes hormonales incluyendo contraceptivos, simpatomiméticos, diuréticos, agentes reguladores de lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasíticos, anticoagulantes, neoplásicos, antineoplásicos, hipoglicémicos, agentes y suplementos nutricionales, suplementos de crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico, y agentes de contraste.

Más particularmente, el agente activo puede estar dentro de un número de clases estructurales, incluyendo pero sin limitar a moléculas pequeñas (preferiblemente moléculas pequeñas insolubles), péptidos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, esteroides, nucleótidos, oligonucleótidos, poligonucleótidos, grasas, electrolitos, y similares. Preferiblemente, un agente activo para acoplamiento a un alcanal polimérico del invento posee un grupo amino nativo, o alternativamente, es modificado para contener al menos un grupo amino reactivo apropiado para acoplamiento a un alcanal polimérico del invento.

Ejemplos específicos de agentes activos apropiados para unión covalente a un polímero del invento incluyen pero no están limitados a aspariginasa, amdoxovir (DAPD), antide, bccaplermina, calcitoninas, cianovirina, denileikin difitox, eritropoyetina (EPO), agonistas de la EPO (ej., péptidos con 10-40 aminoácidos de longitud y que comprenden una secuencia central particular tal como se describió en WO 96/40749), alfa dornasa, proteína estimulante de eritropoyesis (NESP), factores de coagulación tales como Factor V, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XII, Factor XIII, factor von Willebrand; ccredasa®, ccrezyme®, alfa-glucosidasa, colágeno, ciclosporina, alfa defensinas, beta defensinas, exedina-4, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de la alfata 1 proteinasa, elcatonina, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos

(GM-CSF), fibrinógeno, filgrastina, hormonas de crecimiento, hormona de crecimiento humano (hGH), hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), GRO-beta, anticuerpo GRO-beta, proteínas morfogénicas óseas tales como proteína-2 morfogénica ósea, proteína-6 morfogénica ósea, OP-1; factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, ligando CD-40, heparina, albumina de suero humano, heparina de bajo peso molecular (LMWH), interferonas tales como interferona alfa, interferona beta, interferona gamma, interferona omega, interferona tau, concenso interferona; interleucinas y receptores de interleucinas tales como receptor de la interleucina-1, interleucina-2, proteínas de fusión de la interleucina-2, antagonistas de receptores de la interleucina-1, interleucina-3, interleucina-4, receptor de la interleucina-4, interleucina-6, interleucina-8, interleucina-12, receptor de la interleucina-13, receptor de la interleucina-17; lactoferrina y fragmentos de lactoferrina, hormona de liberación de la hormona luteinizante (LHRH), insulina, pro-insulina, análogos de insulina (ej., insulina mono-acilada tal como se describió en la Patente U.S. No. 5.922.675), amilina, C-peptido, somatostatina, análogos de somatostatina incluyendo octreotida, vasopresina, hormona de estimulación de folículo (FSH), vacuna contra la influenza, factor de crecimiento tipo insulina (IGF), insulintropina, factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF), activadores de plasminógeno, tales como alteplasa, uroquinasa, reteplasa, estreptoquinasa, pamiteplasa, lanoteplasa, y tenecteplasa; factor nervioso del crecimiento (FCN), osteoprotegerina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento de tejidos, factor de crecimiento de transformante-1, factor de crecimiento vascular endotelial, factor de inhibición de leucemia, factor de crecimiento de queratinocitos (FCQ), factor de crecimiento glial (FCG), receptores de células T, moléculas/antígenos CD, factor de necrosis tumoral (FNT), proteína quimioatrayente de monocitos-1, factores de crecimiento endotelial, hormona paratiroide (PTH), péptido tipo glucagon, somatotropina, timosina alfa 1, inhibidor de timosina alfa 1 IIb/IIIa, timosina beta 10, timosina beta 9, timosina beta 4, antitripsina alfa-1, compuestos de fosfodiesterasa (PDE), VLA-4 (antígeno-4 muy tardío), inhibidores de VLA-4, bisfosfonatos, anticuerpo del virus sincitial respiratorio, gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (Dnasa), proteína bactericida/aumentadora de la permeabilidad, y anticuerpo anti-CMV. Anticuerpos monoclonales de ejemplo incluyen etanercept (una proteína de fusión dimerica que consta de la porción fijadora de ligandos extracelular del receptor humano del p75 FNT fijado a la porción Fc de IgG1), abciximab, afelimomab, basiliximab, daclizumab, infliximab,

MD

ibritumomab tiuxetan, mitumomab, muromonab-CD3, conjugado de yoduro 131 y tositumomab, olizumab, rituximab, y trastuzumab (herceptina).

Agentes adicionales apropiados para unión covalente a un polímero del invento incluyen pero no están limitados a amifostina, amiodarona, ácido aminocapróico, aminohipurato sódico, 5 aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, amsacrina, anagrelida, anastrozol, asparaginasa, antraciclinas, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfan, cabergolina, capecitabina, carboplatina, carmustina, clorambucina, sodio de cilastatina, cisplatina, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, camptotecinas, ácido 13-cis retinoico, ácido todo-trans-retinóico; dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, 10 deferoxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilstilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estramustina, etopósido, exemestano, fexofenadina, fludarabina, fludocortisona, fluorouracil, fluoximestrona, flutamida, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidrox urea, idarubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecan, itraconazola, goserelina, letrozola, leucovorina, levamisola, lisinopril, lovotiroxina sodio, lomustina, mecloretamina, medroxi progesterona, megestrol, 15 melfalan, mercaptopurina, bitartrato de metaraminol, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, naloxona, nicotina, nilutamida, octreotida, oxaliplatina, pamidronato, pentostatina, pilcamicina, porfímero, prednisona, procarbazina, proclorperazina, ondansetron, raltitrexed, sirolimus, estreptomicina, tacrolimus, tamoxifen, termozolomida, teniposida, testosterona, tetrahidrocanabinol, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecan, 20 tretinoína, valrubicina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, dolasetron, granisetron; formoterol, fluticasona, leuprolida, midazolam, alprazolam, anfotericina B, podofilotoxinas, antivirales de nucleosido, hidrazonas de aroilo, sumatriptan; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davericina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, leucomicina, miocamicina, 25 roquitamicina, andazitromicina, y eswinolida A; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, lomefloxacina, csparfloxacina, tema floxacina, perfloxacina, amiflaxacina, feroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina, y sita floxacina; aminoglicósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amicacina, canamicina, neomicina, y estreptomicina, vancomicina, amicacina, 30 canamicina, neomicina, y estreptomicina, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato; polimixinas tales como polimixina b,

30

capreomicina, bacitracina, pencins; penicilinas incluyendo agentes sensibles a penicilinasa como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a penicilinasa como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos de microorganismos gram negativos como ampicilina, amoxicilina, y hetacilina, cilina, y galampicilina; penicilinas antipseudomonales como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, y piperacilina; cefalosporinas tales como cefpodoxima, cefprozil, cefbuten, ceflizoxima, ceftriaxoma, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradrina, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxil, cefaloglicina, cefuroxima, ceforanida, cefotazima, cefatrizina, cefacetrilo, cefepima, cefixima, cefonicid, cefoperazona, cefotetan, cefmetazol, ceftazidima, loracarbef, y moxalactam, monocactams tipo aztreonam; y carbapenems tales como imipenem, meropenem, isetiouato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaina, sulfato de metaproterenol, diprepionato de beclometasona, diprepionato, acetamida de triancinolona, budesonida acetonida, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromolina sódica, y tartrato de ergotamina; taxonos tales como paclitaxel; SN-38, y tirfostinas.

Moléculas pequeñas preferidas para acoplamiento a un alcanal polimérico del invento son aquellas con al menos un grupo amino. Moléculas preferidas incluyen sodio de aminohipurato, anfotericina B, doxorubicina, ácido aminocapróico, ácido aminolevunílico, ácido aminosalicílico, bitartrato de metarabinol, disodio de pamidronato, daunorubicina, levotiroxina sódica, lisinopril, sodio de cilastatina, mexiletina, cefalexina, deferoxamina, y aminofostina.

Proteínas o péptidos preferidos para acoplamiento a un alcanal polimérico del invento incluyen EPO, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN-con 1, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, IL-2, remicade (infliximab), Rituxan (riximab), Enbrel (etanercept), Synagis (palivizumab), Reopro (abciximab), Herceptin (trastuzimab), tPA, Cerizima (imiglucerasa), vacuna contra la Hepatitis-B, rDNAse, inhibidor de la alfa-1 proteinasa, GCSF, GMCSF, hGH, insulina, FSH, y PTH.

Los anteriores agentes biologicamente activos de ejemplo pretenden incluir, donde sea aplicable, análogos, agonistas, antagonistas, inhibidores, isómeros, y formas de sal farmacéuticamente aceptables de los mismos. Con referencia a péptidos y proteínas, el invento pretende incluir formas sintéticas, recombinantes, nativas, glicosiladas, y no glicosiladas así como también fragmentos biologicamente activos de las mismas. Las anteriores proteínas biologicamente activas adicionalmente incluyen variantes con uno o más aminoácidos

131

sustituidos, suprimidos, o similares, siempre que la proteína variante resultante posea al menos un cierto grado de actividad de la proteína precursora (nativa).

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

5 El presente invento también incluye preparaciones farmacéuticas que comprenden un conjugado tal como se proporcionó en la presente en combinación con un excipiente farmacéutico. Generalmente, el conjugado mismo estará en forma sólida (ej., un precipitado), el cual se puede combinar con un excipiente farmacéutico apropiado que puede estar en forma sólida o líquida.

10 Excipientes de ejemplo incluyen, sin limitación, aquellos seleccionados del grupo que consta de carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, surfactantes, amortiguadores, ácidos, bases, y combinaciones de los mismos.

Un carbohidrato tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado, y/o un polímero de azúcar puede estar presente como un
15 excipiente. Excipientes de carbohidratos específicos incluyen, por ejemplo: monosacaridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacaridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacaridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranas, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), sorbitol de piranosilo, y similares.

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

La preparación también puede incluir un agente antimicrobiano para prevenir o evitar crecimiento microbiano. Ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos apropiados para el
25 presente invento incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol benzílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timersol, y combinaciones de los mismos.

Un antioxidante también puede estar presente en la preparación. Los antioxidantes son utilizados para prevenir oxidación, evitando así el deterioro del conjugado u otros componentes
30 de la preparación. Antioxidantes apropiados para utilizar en el presente invento incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido

hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, sulfoxilato de formaldehído de sodio, metabisulfito de sodio, y combinaciones de los mismos.

Un surfactante puede estar presente como un excipiente. Surfactantes de ejemplo incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80", y pluronicos tales como F68 y F88 (ambos disponibles en BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitan; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, zinc y otros cationes apropiados.

Pueden estar presentes ácidos o bases como un excipiente en la preparación. Ejemplos no limitantes de ácidos que se pueden utilizar incluyen aquellos ácidos seleccionados del grupo que consta de ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de bases apropiadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consta de hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato sódico, fosfato de potasio, citrato de sodio, formato sódico, sulfato sódico, sulfato de potasio, fumarato de potasio, y combinaciones de los mismos.

Las preparaciones farmacéuticas incluyen todos los tipos de formulaciones y en particular aquellos que son apropiados para inyección, ejemplo, polvos que pueden ser reconstituidos así como también suspensiones y soluciones. La cantidad del conjugado (es decir, el conjugado formado entre el agente activo y el polímero descrito en la presente) en la composición variará dependiendo de un número de factores, pero óptimamente será una dosis terapéuticamente efectiva cuando la composición es almacenada en un contenedor de dosis unitarias (ej., un vial). Además, la preparación farmacéutica puede ser contenida en una jeringa. Una dosis terapéuticamente efectiva puede ser determinada experimentalmente mediante administración repetida de cantidades crecientes del conjugado con objeto de determinar cual cantidad produce un punto final clínicamente deseado.

La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la actividad del excipiente y las necesidades particulares de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual es determinada a través de experimentación de rutina, es decir, mediante preparación de composiciones que contienen cantidades variables del

✓ 57

excipiente (en el rango de bajo a alto), examinando la estabilidad y otros parámetros, y luego determinando el rango en el cual el desempeño óptimo es conseguido sin efectos adversos significativos.

5 Sin embargo, generalmente el excipiente estará presente en la composición en una cantidad entre 1% y 99% por peso aproximadamente, preferiblemente entre 5% y 98% por peso aproximadamente, y más preferiblemente entre 15% y 95% por peso aproximadamente del excipiente, con concentraciones menores de 30% por peso como preferidas.

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

15 Las preparaciones farmacéuticas del presente invento típicamente son, aunque no necesariamente, administradas a través de inyección y por lo tanto generalmente son suspensiones o soluciones líquidas inmediatamente antes de la administración. La preparación farmacéutica también puede tomar otras formas tales como jarabes, cremas, ungüentos, tabletas, polvos, y similares. También se incluyen otros modos de administración, tales como pulmonar, rectal, transdermal, transmucosal, oral, intratecal, subcutáneo, intra-arterial, y así sucesivamente.

20 Como se describió previamente, los conjugados se pueden administrar por inyección parenteral mediante inyección intravenosa, o menos preferiblemente mediante inyección intramuscular o subcutánea. Tipos de formulación apropiados para administración parenteral incluyen soluciones listas para inyección, polvos secos para combinación con un solvente antes de utilizar, suspensiones listas para inyección, polvos secos para combinación con un solvente antes de utilizar, suspensiones listas para inyección, composiciones insolubles secas para
25 combinación con un vehículo antes de utilizar, y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de administración, entre otros.

MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

30 El invento también proporciona un método para administrar un conjugado tal como se indica en la presente a un paciente que padece de una condición que responde a tratamiento con el conjugado. El método comprende administración, generalmente a través de inyección, de una

cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado (preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica). El método de administración puede ser utilizado para tratar cualquier condición que puede ser remediada o prevenida mediante administración del conjugado particular. Aquellos con experiencia común en el estado de la técnica apreciarán cuáles

5 condiciones pueden ser tratadas efectivamente con un conjugado específico. La dosis actual a ser administrada variará dependiendo de la edad, peso, y condición general del sujeto así como también de la severidad de la condición tratada, la opinión del médico, y el conjugado administrado. Cantidades terapéuticamente efectivas son conocidas por aquellos con experiencia en el estado de la técnica y/o son descritas en textos y literatura de referencia pertinentes.

10 Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva está en el rango entre 0.001 mg y 100 mg aproximadamente, preferiblemente en dosis entre 0.01 mg/día y 75 mg/día, y más preferiblemente en dosis entre 0.10 mg/día y 50 mg/día.

La dosificación unitaria de cualquier conjugado dado (nuevamente, preferiblemente proporcionado como parte de una preparación farmacéutica) se puede administrar en una
15 variedad de esquemas de dosificación dependiendo de la opinión del médico, las necesidades del paciente, etc. El esquema de dosificación específico será conocido por aquellos con experiencia común en el estado de la técnica y puede ser determinado experimentalmente utilizando métodos de rutina. Esquemas de dosificación de ejemplo incluyen, sin limitación, administración de cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la
20 semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de estos. Una vez el punto final clínico ha sido alcanzado, la dosificación de la composición es detenida.

Una ventaja de administrar conjugados del presente invento es que las porciones poliméricas solubles en agua individuales pueden sufrir escisión. Tal resultado es ventajoso
25 cuando la evacuación desde el cuerpo es potencialmente un problema debido al tamaño del polímero. Óptimamente, la escisión de cada porción polimérica soluble en agua es facilitada por medio del uso de eslabonamientos fisiológicamente escindibles y/o enzimáticamente degradables tales como eslabonamientos de uretano, amida carbonato, y que contienen éster. En esta forma, la evacuación del conjugado (a través de escisión de porciones poliméricas solubles en agua
30 individuales) puede ser modulada mediante la selección del tamaño molecular del polímero y el tipo de grupo funcional que proporcionaría las propiedades de evacuación deseadas. Alguien con

experiencia común en el estado de la técnica puede determinar el tamaño molecular apropiado del polímero así como el grupo funcional escindible. Por ejemplo, alguien con experiencia común en el estado de la técnica, utilizando experimentación de rutina, puede determinar el tamaño molecular apropiado y el grupo funcional escindible mediante la preparación primero de una variedad de derivados poliméricos con diferentes pesos poliméricos y grupos funcionales escindibles, y luego obteniendo el perfil de evacuación (ej. a través de muestreo periódico de sangre y orina) mediante administración del derivado de polímero a un paciente y tomando muestra periódica de sangre y/o orina. Una vez obtenida una serie de perfiles de evacuación para cada conjugado probado, un conjugado apropiado puede ser identificado.

EJEMPLOS

Se debe entender que mientras el invento ha sido descrito en conjunción con ciertas realizaciones específicas preferidas del mismo, la anterior descripción así como también los siguientes ejemplos tienen el propósito de ilustrar y no de limitar el alcance del invento. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance del invento serán manifiestos para aquellos con experiencia en el estado de la técnica a los cuales el invento atañe.

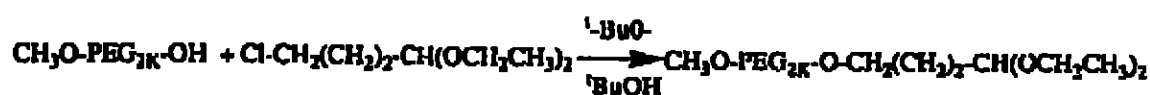
MATERIALES Y MÉTODOS.

Todos los reactivos PEG citados en los ejemplos son comercialmente disponibles a menos que se indique lo contrario. Todos los datos NMR son generados mediante un espectrómetro NMR fabricado por Bruker.

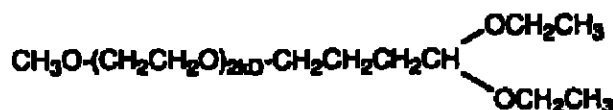
Lisozima fue obtenido en Sigma.

Ejemplo 1

SINTESIS DE MPEG (2K)-BUTIRALDEHIDO



A. Preparación de mPEG (2K Da) –Butiraldehido, acetal dietílico.



136

Una mezcla de mPEG (2KDa) (2.0g) y tolueno (30 mL) fue azeotropicamente secada mediante destilación de tolueno bajo presión reducida. El mPEG seco, peso molecular 2 kilodaltos, fue disuelto en tolueno anhidro (15 ml) al cual se agregó una solución 1.0M de ter-butoxido de potasio en tert -butanol (4.0 ml, 0.004 moles) y acetal dietílico de 4-clorobutiraldehído (0.5 g, 0.00277 moles) (Alfa Acsar). La mezcla fue agitada a 100-105°C durante la noche bajo una atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla fue filtrada y agregada a 150 ml de éter etílico a 0-5°C. El producto precipitado fue filtrado y secado bajo presión reducida. Rendimiento: 1.6 g. La reacción avanzó en esencialmente un rendimiento cuantitativo. Es decir, esencialmente todo el material de inicio mPEG fue convertido en el correspondiente acetal dietílico, con base en la ausencia de protones de hidroxilo correspondientes al material de inicio mPEG-OH según ¹H NMR. NMR (d₆-DMSO): 1.09 ppm (m, C-CH₂-CH₂-), 3.24 ppm (s, -OCH₃), (s, PEG estructura), 4.46 ppm (t, -CH, acetal).

B. Preparación de mPEG (2kD)-Butiraldehído



Una mezcla de acetal dietílico de mPEG (2K Da)butiraldehído (1.0 g) de A. Anterior, agua desionizada (20 ml), y una cantidad de ácido fosfórico al 5% para ajustar el pH a 3.0, se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. A esta mezcla se agregó cloruro de sodio (1.0 g) y el pH se ajustó a 6.8 mediante adición de hidroxido de sodio 0.1 M. El producto, mPEG (2KD) butiraldehído, fue extraído con diclorometano (3 x 20 ml). El extracto fue secado con sulfato de magnesio anhidro y el solvente fue destilado bajo presión reducida para proporcionar el producto de butiraldehído mPEG en forma aislada. Rendimiento: 0.72g.

La reacción avanzó en esencialmente un rendimiento cuantitativo. Es decir, esencialmente todo el acetal dietílico de mPEG butaraldehído fue convertido en el correspondiente aldehído, con base en la ausencia de protones de hidroxilo correspondientes al material de iniciación mPEG-

137

OH así como también la ausencia de protones de hidroxilo correspondientes a acetal dietílico según ^1H NMR. NMR (d_6 -DMSO): 1.75 ppm (p, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}$) 2.44 ppm (dt, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}$) 2.44 ppm (dt, $-\text{CH}_2-\text{CHO}$), 3.24 PPM (S, $-\text{OCH}_3$), 3.51 ppm (s, PEG estructura), 9.66 ppm (t, $-\text{CHO}$).

5

EJEMPLO 2

SINTESIS DE MPEG (30Kd)-BUTIRALDEHIDO

A. Preparación de mPEG (30K Da)-Butiraldehido, acetal dietílico

10 $\text{MPEG}_{30\text{K}}-\text{O}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$

Una mezcla de mPEG (30 kD) (solución al 60% en tolueno, 3.30g), tolueno (30 ml) y BHT (hidroxitolueno butilado, 0.004 g) fue azeotropicamente secado mediante destilación del solvente bajo presión reducida. El mPEG secado 30K fue disuelto en tolueno anhidro (15 ml), y a esta solución se agregó tert-butoxido de potasio 1.0M en tert-butanol (4.0 ml, 0.004 moles),

15 acetal dietílico de 4-clorobutiraldehido (0.5 g, 0.00277 moles) (Alfa Aesar), y bromuro de potasio (0.05g). La mezcla resultante fue agitada durante la noche a 105°C bajo atmosfera de argón. La mezcla fue filtrada, concentrada hasta sequedad bajo presión reducida y el producto crudo fue disuelto en 20 ml de diclorometano. Esta solución conteniendo el producto fue agregada a éter etílico (300 ml) a temperatura ambiente para precipitar el producto. El producto precipitado fue
20 aislado mediante filtración y secado bajo presión reducida. Rendimiento: 1.92 g.

NMR (d_6 -DMSO): 1.09 ppm (T, $-\text{CH}_3-\text{C}-$) 1.52 ppm (M, $\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) 3.24 ppm (S, $-\text{OCH}_3$), 3.51 ppm (s, PEG estructura), 4.46 ppm (t, $-\text{CH}$, acetal).

Con base en los rendimientos y análisis del producto, la sustitución del reactivo acetal en el extremo hidroxilo del reactivo mPEG-OH avanzó con una eficiencia muy alta, es decir,

25 sustitución esencialmente del 100%. El producto resultante, sin requerir purificación adicional, fue producido con alta pureza, sin cantidades detectables o significativas de mPEG-OH sin reaccionar. Típicamente, el alcanal o polímeros de acetal del invento son producidos en altas purzas, es decir, típicamente, el producto alcanal deseado está presente en la composición final en al menos 85% de pureza, preferiblemente al menos 90% de pureza, y aún más
30 preferiblemente, en al menos 95% de pureza.

138

B. Preparación de mPEG (30K Da)-Butiraldehido,

MPEG_{30K}-O-CH₂(CH₂)₂-C(O)H

Una mezcla de mPEG (30Kda) butiraldehido, acetal dietílico (1.0 g), a partir de A. anterior, agua desionizada (20 mL), y una cantidad de ácido fosfórico al 5% para ajustar el pH a 3.0 se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. A esta mezcla se agregó cloruro de sodio (1.0g), y el pH fue ajustado a 6.8 mediante adición de hidroxido de sodio 0.1 M. El producto fue extraído con diclorometano (3 x 20 ml). El extracto fue secado con sulfato de magnesio anhidro y el solvente fue retirado mediante destilación. El producto humedo fue secado bajo presión reducida. Rendimiento: 0.82 g.

NMR (d₆-DMSO): 1.75 ppm (p, -CH₂-CH₂-CHO) 2.44 ppm (dt, -CH₂-CHO-) 3.24 ppm (s, -OCH₃), 3.51 ppm (s, PEG estructura), 9.66 ppm (t, -CHO).

Substitución: ~100%.

La conversión al correspondiente aldehido avanzó en esencialmente rendimiento cuantitativo.

EJEMPLO 3

ESTABILIDAD COMPARATIVA DE MPEG-PROPIONALDEHIDO Y MPEG-BUTIRALDEHIDO A pH BASICO

Metoxi-PEG-propionaldehido y mPEG-butiraldehido fueron cada uno expuestos a condiciones de alto pH durante periodos prologados de tiempo para comparar la estabilidad relativa de cada polímero bajo condiciones de pH básico. Como se indica a continuación, cantidades significativas de propionaldehido PEG reaccionaron bajo estas condiciones para formar mPEG-OH y liberar acroleina (debido a reacción tipo retro-Michael), mientras no se detectó pérdida del compuesto PEG butiraldehido. Los detalles de este experimento son proporcionados a continuación.

A. Estabilidad de mPEG(2Kda)-Butiraldehido a pH Básico

MPEG(2K Da)-butiraldehido (del Ejemplo 1) (0.5 g) fue disuelto en 10 ml de amortiguador de fosfato 5 mM (pH = 8.0) y la solución resultante fue agitada durante 24h a temperatura ambiente. Se agregó NaCl (0.5g) y el producto fue extraído con cloruro de metileno (3 x 10 ml).

134

El extracto fue secado con sulfato de magnesio anhidro y el solvente fue destilado bajo presión reducida a 25°C.

Con base en el análisis ¹H NMR, el producto no cambio. Es decir, no se detectó descomposición del PEG-butanal, aún después de un periodo de tiempo extendido bajo estas condiciones de pH básico.

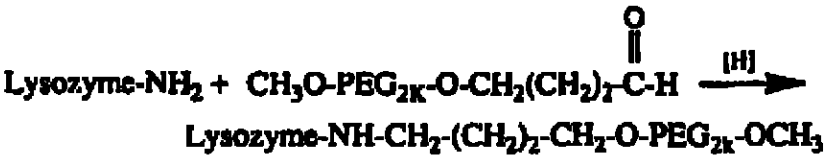
B. Estabilidad de mPEG(5K Da)- Propionaldehido a pH Básico

MPEG (5K Da)-Propionaldehido (Shearwater Corporation, sustitución de aldehido 82%) (0.5g), fue sustituido en 10 ml de amortiguador de fosfato 5mM (pH = 8.0). La solución resultante fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El análisis con *headspace* cromatografía de gases mostró que la solución contenia acroleina (CH₂=CH-CHO), que resulta de la reacción de eliminación bajo condiciones básicas tales como aquellas típicamente empleadas para conjugación de proteínas. Se agregó NaCl (0.5g) y el producto fue extraido con cloruro de metileno (3 x 10 ml). El extracto fue secado con sulfato de magnesio anhidro y el solvente fue destilado bajo presión reducida a 25°C.

Con base en el análisis ¹H NMR, la sustitución de mPEG(5K Da)-propionaldehido cayó hasta 62% (es decir, 38% del PEG-propanal fue descompuesto), y el producto tuvo una cantidad sustancial de mPEG-OH, que se origina de la perdida del segmento C-3 que corresponde a la porción propanal del PEG-propanal.

EJEMPLO 4

PEGILACION DE LISOZIMA



("Lisozima-NH₂" indica la molécula de lisozima con uno de sus grupos amino reactivos mostrados).

140

A. PEGILACION ALEATORIA UTILIZANDO UN PEG ALCANAL DE 2 KD.

proteína modelo, lisozima, una enzima secretoria de 129 aminoácidos, fue utilizada para demostrar acoplamiento de un polímero alcanal del invento a una proteína ilustrativa. El lisozima contiene seis residuos de lisina como sitios potenciales para pegilación.

5 El lisozima (2.1 mg) fue disuelto en 1 ml de amortiguador de fosfato 50 mM (pH 7.6) al cual se agregó mPEG (2kD)-butiraldehído (del ejemplo 1, 1.5 mg). A esta solución se agregó el agente reductor, NaCNBH₃ (cianoborohidruro de sodio), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El conjugado de lisozima resultante posee cadenas PEG acopladas a grupos amino de lisozima mediante una cadena -(CH₂)₄ que interviene.

10 El producto de reacción fue analizado mediante espectroscopia de masa de tiempo de vuelo de ionización-desorción láser asistida con matriz (MALDI-TOF) y los picos mostrados correspondientes a tres especies pegiladas de lisozima a 16208 Da, 1822 Da, y 20520 Da, con diferencia en masa de 2000 Da aproximadamente (correspondiendo al tamaño de reactivo PEG butanal), así como también proteína sin modificar. La masa de lisozima sin modificar (nativo) se
15 determinó mediante MALDI-TOF como 14153. Por lo tanto, el conjugado formado realmente fue una mezcla de proteína monopegilada, proteína di-pegilada, y proteína tri-pegilada (1-mer, 2-mer y 3-mer).

Lo anterior demuestra que la pegilación aleatoria de una proteína ilustrativa del invento proporciona una distribución de productos pegilados. Si se desea, la mezcla de reacción puede ser
20 adicionalmente separada para aislar los conjugados PEG individuales, es decir, lisozima con una molécula PEG fijada al mismo, lisozima con dos PEGs fijados, y lisozima con tres PEGs fijados. Dentro de cada una de las composiciones conjugadas descritas anteriormente (1-mer, 2-mer, 3-mer), la molécula PEG puede ser fijada a diferentes sitios amino reactivos dentro de la molécula de lisozima.

25

B. PEGILACION UTILIZANDO UN PEG ALCANAL DE 5 KD, MPEG-2-METILBUTIRALDEHIDO

La conjugación de la proteína modelo, lisozima, es repetida utilizando el reactivo PEG ramificado alfa, mPEG5kD-2-metilbutiraldehído. El lisozima (3 mg) es disuelto en
30 aproximadamente 1 mL de amortiguador de fosfato de sodio a un pH en el rango entre 5.5 y 7.5 aproximadamente. Un exceso molar de dos a cinco veces del reactivo PEG, mPEG5kD-2-

221

metilbutiraldehído, es agregado a la solución de lisozima, y la solución resultante es colocada sobre un mezclador rotatorio y dejada reaccionar a temperatura ambiente. Después de 15 minutos aproximadamente, se agregó un exceso molar de 20 veces de NaCNBH_3 y la reacción se dejó continuar. Las alícuotas son retiradas a varios intervalos de tiempo (4 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, etc) y el progreso de la reacción es monitoreado mediante espectrometría de masa SDS-PAGE y MALDI-TOF.

Al terminar la reacción, la mezcla de conjugado resultante es concentrada, filtrada esteril, y almacenada bajo condiciones de baja temperatura (-20°C a -80°C) hasta uso posterior.

EJEMPLO 5

PREPARACION DE PEG2(40.3 KDA)-BUTIRALDEHIDO RAMIFICADO

La preparación de un alcanal polimérico de ejemplo con un segmento PEG ramificado es proporcionada a continuación.

RESUMEN. La síntesis general primero involucró el acoplamiento de una cadena lateral de tetra(etilenglicol) a un precursor de alcanal reactivo, acetal dietílico de 4-clorobutiraldehído. La introducción de una cadena lateral de etilenglicol oligomérico proporciona mayor estabilidad al producto resultante mediante la extensión de la longitud de cadena entre el grupo aldehído reactivo (o acetal) y un grupo reactivo que puede estar contenido en la fracción enlazadora, X' , minimizando así la ocurrencia de reacciones secundarias potenciales y mejorando rendimientos.

El uso de una cadena lateral oligomérica, tal como glicol de tetraetileno, también proporciona un grupo funcional reactivo, en esta instancia, hidroxilo, que puede ser convertido, si es necesario, para acoplamiento a un segmento polimérico que ha sido purificado cromatográficamente para remover impurezas poliméricas tales como polietilenglicol diol, mPEG-OH, y similares. En esta forma, las impurezas poliméricas funcionalizadas indeseadas tales como polietilenglicol dialdehído (que resultan de polietilenglicol diol) y similares son retiradas del segmento PEG antes de acoplamiento al precursor alcanal para proporcionar el producto final, un alcanal polimérico soluble en agua que es esencialmente libre de impurezas poliméricas.

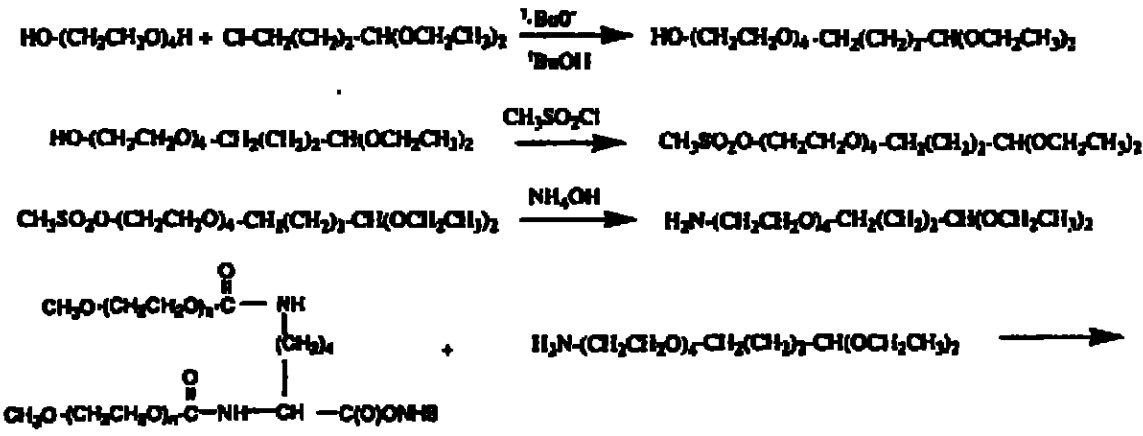
Considerando la reacción específica a continuación, el acoplamiento de la cadena lateral de tetra(etilenglicol) a acetal dietílico de 4-clorobutiraldehído lleva a la formación del producto

122

mono-alcanal deseado contaminado con producto di-alcanal y tetra(etilenglicol) de inicio. Sin embargo, un aislamiento o purificación directa que utiliza las diferencias en solubilidad de todos los componentes en la mezcla de reacción permite la fácil preparación de producto monoalcanal altamente puro, es decir, con la función alcanal (acetal) substituida solamente sobre uno de los grupos hidroxilo reactivos de la molecula de tetra(etilenglicol). (REACCION A.). El producto de la reacción A luego fue convertido en el correspondiente mesilato mediante la reacción con cloruro de metanosulfonilo, es decir, el grupo hidroxilo libre del tetra(etilenglicol) fue convertido primero al mesilato (REACCION B), seguido por la conversión del mesilato en un grupo amino primario (REACCION C). El grupo amino reactivo del reactivo acetal luego fue acoplado a un segmento de estructura polimerica ramificado con un carbon de carbonilo apropiado para reacción con el grupo amino del reactivo acetal. El precursor al reactivo PEG, lisina mPEG-disustituida, fue purificado mediante cromatografia de intercambio iónico antes de la conversión al correspondiente éster activado para retirar impurezas poliméricas. El éster de N-hidroxisuccinimidilo de lisina mPEG-disustituida fue luego hecho reaccionar con un acetal de amino-alcanal, a través de la formación de un enlace de amida, para formar el resultante acetal de PEG-cadena lateral-alcanal. El acetal luego fue fácilmente hidrolizado en la reacción catalizada por ácido para formar el correspondiente alcanal, y en particular, el butiraldehido PEG (40KDa) ramificado de 2 brazos.

Este enfoque sintético, es decir, no está limitado a segmentos poliméricos ramificados pero puede ser empleado para segmentos poliméricos que tienen cualquiera de las geometrias descritas en la presente.

RESUMEN DE LA SINTESIS GENERAL:



243

5

10

15

A. Acetal dietílico de tetra(etilenglicol) mono-butiraldehído



Una mezcla de tetra(etilenglicol) (97.1 g, 0.500 moles) y tolueno (200 ml) fue
azeotropicamente secada mediante destilación de tolueno bajo presión reducida (evaporador
rotatorio). El tetra(etilenglicol) secado fue disuelto en tolueno anhidro (180 ml) y se agregó
solución de tert-butoxido de potasio 1.0M en tert-butanol (120.0 ml, 0.120 moles) y acetal
dietílico de 4-clorobutiraldehído (18.1 g, 0.100 moles) (Alfa Aesar). La mezcla fue agitada a 95-
100 °C durante la noche bajo atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la
mezcla fue filtrada y los solventes fueron destilados bajo presión reducida. El producto crudo fue
disuelto en 1000 ml de agua desionizada y la solución resultante fue filtrada a través de carbon
activo. Se agregó cloruro de sodio (10 g) y el producto fue extraído con diclorometano (250, 200,
y 150 ml). El extracto fue secado (sobre MgSO_4) y el solvente fue destilado bajo presión reducida
(mediante evaporación giratoria).

El producto crudo fue disuelto en 300 ml de amortiguador de fosfato al 10% (pH = 7.5) y
las impurezas fueron extraídas con acetato de etilo (2 x 50 ml). El producto fue extraído con

144

diclorometano (200, 150, y 100 ml). El extracto fue secado (sobre MgSO₄) y el solvente fue destilado bajo presión reducida (mediante evaporación giratoria).

Rendimiento: 20.3 g. NMR (d₆-DMSO): 1.10 ppm (t, -CH₃-C-) 1.51 ppm (m, -C-CH₂-CH₂-) 3.49 ppm (bm, -OCH₂CH₂O-), 4.46 ppm (t, -CH, acetal), 4.58 ppm (t, -OH).

Pureza: 100% (no hay signos de materiales de inicio sin reaccionar).

B. Tetra(etilenglicol)-α-mesilato-ω-butiraldehido, acetal dietílico.



Una mezcla de tetra(etilenglicol) monobutiraldehido acetal dietílico, (12.5g, 0.037 moles) y tolueno (120 ml) se seco azeotropicamente mediante destilación de tolueno bajo presión reducida (evaporador rotatorio). El acetal dietílico de tetra(etilenglicol) monobutiraldehido seco fue disuelto en tolueno anhidro (100 ml). A la solución se agregó 20 ml de diclorometano anhidro y 5.7 ml de trietilamina (0.041 moles). Luego se agregó por goteo 4.5g de cloruro de metanosulfonilo (0.039 moles). La solución fue agitada a temperatura ambiente bajo una atmosfera de nitrógeno durante la noche. Luego se agregó carbonato de sodio (5g), La mezcla se agitó durante 1 hora. Luego la solución fue filtrada y los solventes fueron destilados bajo presión reducida (evaporador rotatorio).

1.10 ppm (t, -CH₃-C-) 1.51 ppm (m, -C-CH₂-CH₂-), 3.17 ppm (s, CH₃-metanosulfonato), 3.49 ppm (bm, OCH₂CH₂O-), 4.30 ppm (m, -CH₂-metanosulfonato), 4.46 ppm (t, -CH, acetal).

Pureza: ~100%

C. Tetra(etilenglicol)-α-amino-ω-butiraldehido, acetal dietílico



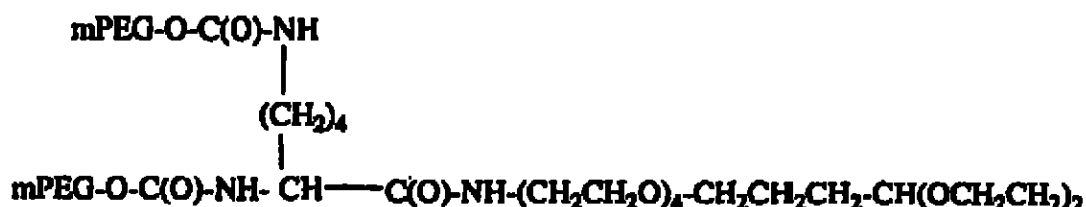
Una mezcla de tetra(etilenglicol)-α-mesilato-ω-butiraldehido, acetal dietílico (14.0g), hidroxido de amonio concentrado (650 ml), y alcohol etílico (60 ml) fue agitada 42 horas a temperatura ambiente. Luego todo el material volátil fue destilado bajo presión reducida. El producto crudo fue disuelto en 150 ml de agua desionizada y el pH de la solución fue ajustado a 12 con NaOH 1.0M. El producto fue extraído con diclorometano (3 x 100 ml). El extracto fue secado (MgSO₄) y el solvente fue destilado bajo presión reducida (evaporador rotatorio).

MS

Rendimiento 10.6 g. NMR (D₂O) 1.09 ppm (t, -CH₃-C-) 1.56 ppm (m, -C-CH₂-CH₂-), 2.69 ppm (t, -CH₂-N), 3.56 ppm (bm, -OCH₂CH₂O-), 4.56 ppm (t, -CH, acetal).

Pureza: ~100%

5 D. PEG2(40.3 KDa)-butiraldehido ramificado, acetal dietílico



10 PEG2 (40 KDa)-N-hidroxisuccinimida se preparó a partir de la correspondiente PEG2-lisina como se describió en la Patente U.S. No. 5.932.462 (Harris, J.). La PEG-2-lisina precursora, un PEG ramificado que tiene un grupo carboxilo ionizable, fue purificado mediante cromatografía de intercambio iónico, como se describe en la Patente U.S. No. 5.932.462.

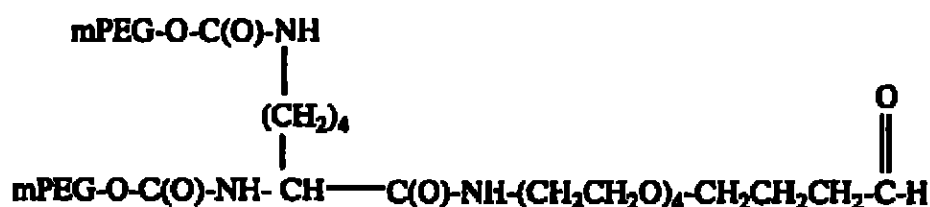
15 A una solución de PEG2 (40 KDa)-N-hidroxisuccinimida (5.0g, 0.000125 moles) (Shearwater Corporation) en cloruro de metileno (100 ml), se agregó tetra(etilenglicol)-α-amino-ω-butiraldehido, acetal dietílico (0.50g, 0.000148 moles) y trietilamina (0.035 ml) y la mezcla de reacción fue agitada durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmosfera de argón. El solvente fue evaporado hasta sequedad utilizando un evaporador giratorio. El producto crudo fue

20 disuelto en cloruro de metileno y precipitado con alcohol isopropílico. El producto húmedo fue secado bajo presión reducida. Rendimiento de 4.8 g.

NMR (d₆-DMSO): 1.10 ppm (T, -CH₃-C-) 1.51 ppm (M, -C-CH₂CH₂-) 3.24 ppm (s, -OCH₃), 3.51 ppm (s, PEG estructura), 4.46 ppm (t, -CH-, acetal).

Sustitución: ~100%.

25 E. PEG2(40.3 KDa)- butiraldehido ramificado



26

Acetal dietílico de PEG2(40.3 KDa)- butiraldehído ramificado (4.8 g) fue disuelto en 100 ml de agua y el pH de la solución fue ajustado a 3 con ácido fosfórico diluido. La solución fue agitada durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido por la adición de hidróxido de sodio 0.5 M para ajustar el pH de la solución a 7 aproximadamente. El producto fue extraído con cloruro de metileno, y el extracto fue secado con sulfato de magnesio anhidro. El solvente fue destilado bajo presión reducida.

Rendimiento 4.2 g. NMR (d_6 -DMSO): 1.75 ppm (p, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CHO}$) 2.44 ppm (dt, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CHO}-$) 3.24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$), 3.51 ppm (s, PEG estructura), 9.66 ppm (t, $-\text{CHO}$).

Substitución: ~100%.

Lo anterior ilustra aún otra realización del invento, la preparación de un PEG alcanal ramificado representativo. El anterior también ilustra una realización del invento en donde el alcanal polimérico contiene un grupo oligomérico corto, en este caso, un glicol de tetraetileno interpuesto entre la cadena principal polimérica y el segmento alcanal de la molécula. Además, este ejemplo ilustra el uso de un segmento polimérico precursor que contiene un grupo ionizable tal que el segmento polimérico puede ser purificado mediante cromatografía de intercambio iónico antes del acoplamiento al reactivo de alcanal-acetal, retirando de manera efectiva las impurezas temprano en el esquema de reacción. En esta instancia, el producto formado no tiene impurezas poliméricas difuncionales tales como aquellas que provienen de las reacciones de polietilenglicol diol, o mPEG, o lisina mono-pegilada, o similares, que pueden haber estado presentes en el precursor de lisina-mPEG2 pero que fueron removidas mediante cromatografía.

EJEMPLO 6

PREPERACION DE CONJUGADO PROTEICO DE POLÍMERO-ALCANAL PEGILACION ALEATORIA DE EPO

EPO recombinante (producido en *E. Coli*, células mamíferas (ej., células CHO) u otra fuente microbiana) es acoplado a mPEG-butiraldehído 30 kDa (preparado como se describe en el Ejemplo 2).

EPO (~2 mg) es disuelto en 1 ml de amortiguador de fosfato 50 mM (pH 7.6) y mPEG(30 kDa)-butiraldehído es agregado a 5X la concentración EPO molar. Se agrega un agente reductor, NaCNBH₃, y la solución se agita durante 24 horas a temperatura ambiente para acoplar el reactivo PEG-butanal a la proteína a través de un eslabonamiento de aminas.

147

La mezcla de reacción es analizada mediante SDS-PAGE para determinar el grado de PEGilación. La confirmación del grado de PEGilación, 1-polímero, 2-polímeros, etc., es hecha mediante espectrometría de masa (MALDI-TOF). Los picos mostrados para especies nativas y mono-PEGiladas difieren en aproximadamente 30.000 Da. La mezcla de reacción resultante
5 contiene una mezcla de proteína nativa y monopegilada. Aumentando la proporción de reactivo PEG a proteína se aumenta el grado de poliPEGilación, es decir, la formación de 2-polímeros, 3-polímeros, etc.

El uso de alcanales PEG de alto peso molecular con peso molecular mayor que 20 kDa favorece la formación de especies mono-PEGiladas. Alcanales PEG de pesos moleculares
10 menores, cuando se acoplan a una proteína, son más propensos a formación de especies poli-PEGiladas bajo estas condiciones.

Lo anterior demuestra que la pegilación aleatoria de una proteína ilustrativa del invento proporciona una distribución de productos EPO pegilados. Si se desea, la mezcla de reacción se puede separar adicionalmente para aislar isómeros individuales tal como se describe a
15 continuación.

Los conjugados PEG con diferentes pesos moleculares son luego separados mediante cromatografía de filtración de gel. Los diferentes conjugados PEG (1-mer, 2-mer, 3-mer, etc) son fraccionados sobre la base de sus pesos moleculares diferentes (en este caso, variando en aproximadamente 30 kDa). Específicamente, la separación es realizada mediante el uso de un
20 sistema de columna serial para separación efectiva de productos en rango de peso molecular observado, ej., una columna Superdex 200 (Amersham™ Biosciences). Los productos son eluidos con 10 ml de amortiguador de acetato a una tasa de flujo de 1.5 ml/min. Las fracciones recolectadas (1 ml) son analizadas mediante OD a 280 nm para contenido de proteínas y también utilizando una prueba de yodo para contenido PEG (Sims G. E. C. *Anal. Biochem*, 107, 60-63,
25 1980). Alternativamente, los resultados son visualizados corriendo un gel SDS PAGE, seguido por tefido con yoduro de bario. Las fracciones correspondientes a los picos eluidos son recolectadas, concentradas por ultrafiltración utilizando una membrana de corte con peso molecular entre 10-30 kD, y liofilizadas. Este método produce la separación/purificación de conjugados que tienen los mismos pesos moleculares pero no proporciona separación de
30 conjugados con el mismo peso molecular pero diferentes sitios de pegilación (es decir, isómeros posicionales).

148

La separación de isómeros posicionales es realizada mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna RP-HPLC C18 (Amersham Biosciences o Vydac). Este procedimiento es efectivo para separación de isómeros de biomoléculas PEG y tiene el mismo peso molecular (isómeros posiciones). La cromatografía de fase inversa es realizada utilizando una columna preparativa RP-HPLC C18 y eluida con un gradiente de agua/TFA al 0.05% (Eluyente A) y acetonitrilo/0.05% TFA (Eluyente B).

Las fracciones correspondientes a los picos eluidos son recolectas, evaporadas para eliminar acetonitrilo y TFA, seguido por remoción de solvente para aislar los isómeros PEG posicionales individuales.

EJEMPLO 7

PREPARACION DE CONJUGADO PROTEICO DE POLÍMERO-ALCANAL PEGILACION DE EPO EN EXTREMO AMINO

EPO recombinante (producido en *E. Coli*, células mamíferas (tales como CHO pero sin limitar a) u otra fuente microbiana) es acoplado a mPEG-butiraldehído, 30 kDa (Ejemplo 2).

EPO (~2. Mg) es disuelto en 1 ml de acetato de sodio 0.1 mM (pH 5) y mPEG (30 kDa)-butiraldehído (del Ejemplo 2) es agregado a 5X la concentración EPO. Se agrega un agente reductor, NaCNBH₃, y la solución es agitada durante 24 h a 4°C para acoplar el reactivo PEG-butanal a la proteína a través de un eslabonamiento de aminas.

La mezcla de reacción es analizada mediante SDS-PAGE para determinar el grado de PEGilación. La confirmación del grado de PEGilación, 1-polímero, 2-polímeros, etc. es realizada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los picos mostrados para especies nativas y mono-PEGiladas difieren en aproximadamente 30.000 Da. La mezcla de reacción resultante principalmente contiene una mezcla de proteína nativa y monopegilada. Las especies mono-PEGiladas son purificadas mediante cromatografía de columna para retirar EPO libre y especies de pesos moleculares altos.

La confirmación de PEGilación en el extremo N es realizada mediante mapa peptídico. Aumentando la tasa de PEG a proteína se aumenta en grado de PEGilación, proporcionando proteína poli-pegilada.

Lo anterior demuestra que la pegilación de una proteína ilustrativa del invento proporciona una proteína pegilada simple predominantemente en el extremo N.

129

EJEMPLO 8

PEGILACION EN EL EXTREMO N DE GCSF

5 GCSF recombinante (producido en *E. Coli*, células mamíferas (tal como células CHO= u otra fuente microbiana) es acoplado a mPEG-butiraldehído, 30 kDa.

GCSF (~ 2. mg) es disuelto en 1 ml de acetato de sodio 0.1 mM (pH 5) y mPEG(30 kDa)-butiraldehído (del Ejemplo 2) es agregado a 5X la concentración GCSF molar. Se agrega el agente reductor, NaCNBH₃, y la solución es agitada 24 h a 4°C para acoplar el reactivo PEG-butanol a la proteína a través de eslabonamiento de aminas.

10 La mezcla de reacción resultante es analizada mediante SDS-PAGE para determinar el grado de PEGilación. La confirmación del grado de PEGilación, 1-polímero, 2 polímeros, etc., es realizada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los picos mostrados para especies nativas y mono-PEGiladas difieren en aproximadamente 30.000 Da. La mezcla de reacción resultante contiene principalmente una mezcla de GCSF nativo y monopegilado. Las especies
15 monopegiladas son purificadas mediante cromatografía de columna para retirar el GCSF libre y especies de peso molecular alto. La confirmación de PEGilación en el extremo N es realizada mediante mapa peptídico. Aumentado la proporción de PEG a proteína se aumenta el grado de PEGilación proporcionando proteína poli-pegilada.

20

EJEMPLO 9

PEGILACION EN EL EXTREMO N DE INTERFERONA α

IFN- α recombinante (producido en *E. Coli*, células mamíferas (tal como CHO u otra fuente microbiana) es acoplado a mPEG-butiraldehído, 30 kDa.

La interferona- α (~2. Mg) es disuelta en 1 ml de acetato de sodio 0.1 mM (pH 5) y
25 mPEG(30 kDa)-butiraldehído (del ejemplo 2) es agregado a 5X la concentración IFN molar. Un agente reductor, NaCNBH₃, es agregado y la solución es agitada durante 24 h a 4°C para acoplar el reactivo PEG-butanol a la proteína a través de eslabonamiento de aminas.

La mezcla de reacción es analizada mediante SDS-PAGE para determinar el grado de PEGilación. La confirmación del grado del PEGilación, 1-polímero, 2 polímeros etc., es realizada
30 mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los picos mostrados para las especies nativas y monoPEGiladas difieren en aproximadamente 30.000 Da. La mezcla de reacción resultante

150.

principalmente contiene una mezcla de proteína nativa y monopegilada. Las especies monopegiladas son purificadas mediante cromatografía de columna para remover la interferona- α libre y especies de alto peso molecular. La confirmación de PEGilación en el extremo N es realizada mediante mapa peptídico. Aumentando la proporción de PEG a proteína se aumenta el grado de PEGilación proporcionando IFN poli-pegilado.

La conjugación de las proteínas hGH, IFN- β , y FSH a otro PEG-alcanal ilustrativo, mPEG-2-metilbutiraldehído, 20 kDa es realizada esencialmente como se describe en los ejemplos anteriores.

EJEMPLO 10

PEGILACION EN EL EXTREMO N DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANO

La hormona de crecimiento humano recombinante (producida en *E. Coli*), células mamíferas (tal como CHO) u otra fuente microbiana) es acoplada a mPEG-2-metil-butiraldehído, 20 kDa.

La hormona de crecimiento humano (~2 mg) es disuelta en 1 ml de acetato de sodio 0.1 mM (pH 5) y mPEG-2-metil-butiraldehído, 20 kDa es agregado a 5X la concentración de hGH molar. Un exceso molar de 5 a 20 veces el agente reductor, NaCNBH₃, es agregado y la solución es agitada durante 24 h a 4°C para acoplar el reactivo PEG- α metilbutanal a la proteína a través de un eslabonamiento de aminas.

El progreso de la reacción es analizado mediante espectrometría de masa SDS-PAGE o MALDI-TOF para determinar el grado de PEGilación. La confirmación del grado de PEGilación, 1-polímero, 2 polímeros etc., es realizada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los picos mostrados para especies nativas y mono-PEGiladas y otras especies difieren en aproximadamente 20.000 Da. La mezcla de reacción resultante principalmente contiene una mezcla de proteína nativa y monopegilada. Las especies mono-PEGiladas son purificadas mediante cromatografía de columna para retirar hGH libre y especies de alto peso molecular. La confirmación de PEGilación en el extremo N es realizada mediante mapa peptídico. Aumentado la proporción de aldehído PEG a proteína se aumenta el grado de PEGilación proporcionando una población de hGH poli-pegilado.

151

EJEMPLO 11

PEGILACION EN EL EXTREMO N DE INTERFERONA- β

Interferona- β recombinante (producida en E. Coli, células mamíferas (tal como CHO pero sin limitar al mismo) u otra fuente microbiana) es acoplada a mPEG-2-metil-butiraldehido, 20 kDa.

La interferona- β (~2 mg) es disuelta en 1 ml de 0.1 mM de acetato de sodio (pH 5) y mPEG-2-metil-butiraldehido, 20 kDa es agregado a 5X la concentración molar de IFN- β . Un exceso molar de 5 a 20 veces el agente reductor, NaCNBH₃, es agregado y la solución es agitada durante 24 h a 4°C para acoplar el reactivo PEG- α metilbutanal a la proteína a través de un eslabonamiento de aminas.

El progreso de la reacción es analizado mediante espectrometría de masa SDS-PAGE o MALDI-TOF para determinar el grado de PEGilación. La confirmación del grado de PEGilación, 1-polímero, 2 polímeros etc., es realizada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los picos mostrados para especies nativas y mono-PEGiladas y otras especies difieren en aproximadamente 20.000 Da. La mezcla de reacción resultante principalmente contiene una mezcla de proteína nativa y monopegilada. Las especies mono-PEGiladas son purificadas mediante cromatografía de columna para retirar IFN- β libre y especies de alto peso molecular. La confirmación de PEGilación en el extremo N es realizada mediante mapa peptídico. Aumentado la proporción de aldehido PEG a proteína se aumenta el grado de PEGilación proporcionando una población de IFN- β poli-pegilado.

EJEMPLO 12

PEGILACION EN EL EXTREMO N DE FSH

La hormona de estimulación de folículo recombinante (producida en E. Coli, células mamíferas (tal como CHO pero sin limitar al mismo) u otra fuente microbiana) es acoplada a mPEG-2-metil-butiraldehido, 20 kDa.

La hormona de estimulación de folículo, FSH (~2 mg) es disuelta en 1 ml de 0.1 mM de acetato de sodio (pH 5) y mPEG-2-metil-butiraldehido, 20 kDa es agregado a 5X la concentración molar de FSH. Un exceso molar de 5 a 20 veces el agente reductor, NaCNBH₃, es

152

agregado y la solución es agitada durante 24 h a 4°C para acoplar el reactivo PEG- α metilbutanal a la proteína a través de un eslabonamiento de aminas.

El progreso de la reacción es analizado mediante espectrometría de masa SDS-PAGE o MALDI-TOF para determinar el grado de PEGilación. La confirmación del grado de PEGilación, 1-polímero, 2 polímeros etc., es realizada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los picos mostrados para especies nativas y mono-PEGiladas y otras especies difieren en aproximadamente 20.000 Da. La mezcla de reacción resultante principalmente contiene una mezcla de proteína nativa y monopegilada. Las especies mono-PEGiladas son purificadas mediante cromatografía de columna para retirar FSH libre y especies de alto peso molecular. La confirmación de PEGilación en el extremo N es realizada mediante mapa peptídico. Aumentado la proporción de aldehído PEG a proteína se aumenta el grado de PEGilación proporcionando una población de FSH poli-pegilada.

EJEMPLO 13

PEGILACION EN EL EXTREMO N DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANO

hGH recombinante (producida en E. Coli, células mamíferas (tal como CHO pero sin limitar al mismo) u otra fuente microbiana) es covalentemente unida a mPEG-2(40.3 KDa)-butiraldehído ramificado (Ejemplo 5E).

La hormona de crecimiento humano, (~2 mg) es disuelta en 1 ml de 0.1 mM de acetato de sodio (pH 5) y mPEG-2(40.3 KDa)-butiraldehído ramificado es agregado a 5X la concentración molar de hGH. Un exceso molar de 5 a 20 veces el agente reductor, NaCNBH₃, es agregado y la solución es agitada durante 24 h a 4°C para acoplar el reactivo mPEG-2(40.3 KDa)-butiraldehído ramificado a la proteína a través de un eslabonamiento de aminas.

El progreso de la reacción es analizado mediante espectrometría de masa SDS-PAGE o MALDI-TOF para determinar el grado de PEGilación. La confirmación del grado de PEGilación, 1-polímero, 2 polímeros etc., es realizada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los picos mostrados para especies nativas y mono-PEGiladas y otras especies difieren en aproximadamente 40.000 Da. La mezcla de reacción resultante principalmente contiene una mezcla de proteína nativa y monopegilada, en particular debido al tamaño y geometría del reactivo PEG alcanal ramificado. Las especies mono-PEGiladas son purificadas mediante

153

cromatografía de columna para retirar hGH libre y especies de alto peso molecular. La confirmación de PEGilación en el extremo N es realizada mediante mapa peptídico.

EJEMPLO 14

PEGILACION DE ANFOTERICINA B

El grupo amino de una molécula pequeña, anfotericina B, es modificado mediante fijación de un alcanal polimérico.

A una solución de anfotericina B. HCl en agua desionizada se agrega un exceso molar de 2 veces de mPEG_{2k}-butiraldehído (Ejemplo 1) disuelto en amortiguador de fosfato 0.1 M a pH 6.5. A esta mezcla se agrega una solución de NaCNBH₃ (a un exceso molar de 1.5 a 10 veces) en amortiguador de fosfato a pH 6.5, y la solución resultante es agitada a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de argón. Aliquotas de la mezcla de reacción son retiradas en varios intervalos de tiempo para monitorcar el progreso de la reacción mediante ¹H NMR. Al terminar, la mezcla de reacción es adicionalmente diluida mediante la adición de agua, y se agrega NaCl para lograr saturación. El producto luego es extraído con diclorometano, y los extractos orgánicos combinados son secados sobre sulfato de sodio anhidro, filtrados para retirar el agente secante, y el solvente es evaporado mediante evaporación rotatoria. Luego el producto es precipitado mediante la adición de éter de dietilo, y secado al vacío durante la noche. El producto recuperado es analizado mediante cromatografía de permeación de gel para determinar la medida de la conjugación.

El producto crudo es purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando resina de intercambio catiónico Poros 50 HS (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Después de lavar la columna con agua desionizada, el producto es eluido con solución de NaCl 1N. Los extractos que contienen el conjugado son combinados, y el producto es extraído con diclorometano. La solución orgánica es secada sobre sulfato de sodio anhidro, filtrada, y el solvente es evaporado mediante evaporación rotatoria. El conjugado purificado es purificado mediante la adición de éter de dietilo.

Si es necesario, el producto es purificado adicionalmente mediante cromatografía HPLC de fase inversa utilizando una columna Betasil C18, Keystone Scientific).

EJEMPLO 15

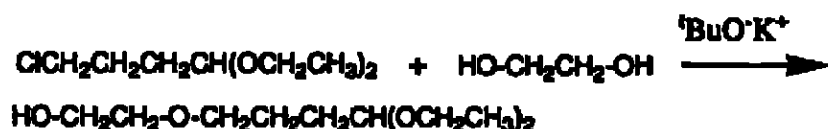
154

PREPARACIÓN DE PEG(3500 DA)- α -HIDROXI- ω -BUTIRALDEHIDO MEDIANTE
POLIMERIZACIÓN DE ABERTURA DE ANILLO ANIÓNICO DE OXIDO DE ETILENO
DIRECTAMENTE SOBRE UN PRECURSOR DE ACETAL ANIÓNICO

5 En este ejemplo, un precursor de acetal con un sitio apropiado para iniciar polimerización de abertura de anillo con oxido de etileno es preparada al reaccionar acetal dietílico de 4-clorobutiraldehido con di-alcohol, etilenglicol. En esta forma, un halo- acetal es convertido en un acetal con extremo hidroxilo. El grupo hidroxilo, cuando es convertido en el correspondiente anión de alcóxido, proporciona un sitio para iniciar la polimerización de oxido de etileno, para
10 formar así un precursor de alcanal polimérico. El precursor de alcanal polimérico (acetal), ante hidrólisis, es convertido en el alcanal polimérico deseado.

Un esquema generalizado para este enfoque sintético para preparación de un alcanal polimérico del invento es mostrado en la Fig. 1.

15 A. Preparación de 2-(4,4-dietoxi-butoxi)etanol (Compuesto 15A).

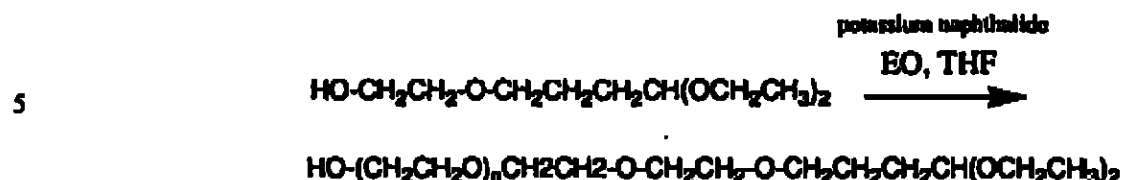


20 Una mezcla de etilenglicol anhidro (120 g, 1.93 moles), una solución 1.0M de tert-butoxido de potasio en tert-butanol (70 ml, 0.07 moles), y 4-acetal dietílico de 4-clorobutiraldehido (11 g, 0.061 moles) es agitada durante la noche a 100°C bajo una atmosfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción es agregada a 600 ml de agua destilada. El producto es extraído con diclorometano (150, 125, y 125 ml). Los extractos combinados son
25 luego secados con sulfato de magnesio anhidro y el solvente es destilado bajo presión reducida. Luego el producto es sometido a destilación al vacío (kugelrohr, t = 90 – 100°C, 0.10 mm Hg). Rendimiento 5.5 g.

NMR (d_6 -DMSO): 1.11 ppm (t, 6H), 1.53 ppm (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}$, 2H) 1.64 ppm (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, 2H), 3.37 ppm (t, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, 2H), 3.53 ppm (t, $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, 2H), 3.62 ppm
30 (q, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, 4H), 3.70 ppm (t, $\text{HO}-\text{CH}_2-$ 2H), 4.38 ppm (t, $-\text{CH}$ acetal, 1H), 4.54 ppm (t, 1H, $-\text{OH}$).

155

B. Preparacion de acetal dietilico de PEG(3.500 Da)-α-hidroxi-ω-butiraldehido.



10 Compuesto 15A (0.51 g, 0.00247 moles), THF 200 ml, y naftaluro de potasio (solución de 0.3 mol/L-tetrahidrofurano, 20 ml, 0.006 moles) son agregados a un reactor de vidrio y agitados durante 3 minutos en una atmosfera de argon. El oxido de etileno (8.8 g 0.20 moles) es agregado a esta solución y la mezcla de reacción es agitada durante 44 h a temperatura ambiente. Luego la mezcla es purgada con argón y se agrega amortiguador de fosfato 0.1M (pH = 8, 100 ml). La capa de THF es separada y descartada. El naftaleno es retirado de la solución mediante extracción de éter de etilo. El producto es extraído del residuo con diclorometano (3 x 50 ml). El extracto es

15 secado con sulfato de sodio anhidro y concentrado a 30 ml aproximadamente. Luego se agrega éter etílico (250 ml) y la mezcla es agitada 15 minutos a 0°C. El producto precipitado es filtrado y secado bajo presión reducida.

Rendimiento 7.2 g.

20 NMR (d₆-DMSO):1.09 ppm (t,-CH₃-3H)1.52 ppm (m, C-CH₂-CH₂-4H), 3.51 ppm (s, estructura polímero), 4.46 ppm(t, CH, acetal, 1H), 4.57 ppm (t, -OH, 1H).

C. PEG(3.500 Da)-α-hidroxi-ω-butiraldehido

Una mezcla de acetal dietilico de PEG(3.500)-α-hidroxi-ω-butiraldehido(1.0 g), agua desionizada (20 ml), y ácido fosfórico al 5% para ajustar el pH a 3.0 es agitada durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, se agrega cloruro de sodio (1.0 g) y el pH es ajustado a 6.8 con

25 hidroxido de sodio 0.1 M. El producto es extraído con diclorometano (3 x 20 ml). El extracto es secado con sulfato de magnesio anhidro y el solvente es destilado. El producto húmedo es secado bajo presión reducida. Rendimiento: 0.82 g.

NMR (d₆-DMSO):1.75 ppm (p,-CH₂-CH₂-CHO-)2.44 ppm (dt, -CH₂-CHO), 3.51 ppm (s, estructura polímero), 4.57 ppm(t, OH),9.66 ppm (t, -CHO).

30 EJEMPLO 16

PREPARACION DE METOXI-PEG(3.500 DA)BUTIRALDEHIDO

18

Este ejemplo demuestra la preparación de un PEG-alcanal de taponamiento en extremo a partir de un acetal PEG α -hidroxi- ω -alcanal.

A. acetal dietílico de mPEG(3.500 Da)-butiraldehído

5 Una mezcla de acetal dietílico de PEG(3.500 Da)- α -hidroxi- ω -butiraldehído (3.5g, 0.001 moles), tolueno (50 ml), solución 1.0M de tert-butoxido de potasio en tert-butanol (5 ml, 0.005 moles) y sulfonato de metil-p-tolueno (0.75 g, 0.004 moles) es agitado durante la noche a 45°C. Luego, los solventes son destilados bajo presión reducida (rotoevaporador). El producto crudo es disuelto en diclorometano y se agrega a éter etílico frío. El producto precipitado es filtrado y
10 secado bajo presión reducida. Rendimiento: 3.1 g

NMR (d_6 -DMSO): 1.09 ppm (t, -CH₃-3H), 1.52 ppm (m, C-CH₂-CH₂-, 4H), 3.24 (s, CH₃O-, 3H), 3.51 ppm (s, estructura polímero), 4.46 ppm (t, CH, acetal, 1H).

B. mPEG(3.500 Da)-butiraldehído

15 Una mezcla de acetal dietílico de mPEG(3.500)-butiraldehído (1.0 g), agua desionizada (20 mL), y ácido fosfórico al 5% para ajustar el pH a 3.0 es agitada durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, se agrega cloruro de sodio (1.0 g) y el pH es ajustado a 6.8 con hidróxido de sodio 0.1 M. El producto es extraído con diclorometano (3 x 20 ml). El extracto es secado con sulfato de magnesio anhidro y el solvente es destilado. El producto húmedo es secado bajo presión reducida. Rendimiento: 0.85 g.

20 NMR (d_6 -DMSO): 1.75 ppm (p, -CH₂-CH₂-CHO-, 2H), 2.44 ppm (dt, -CH₂-CH₂-CHO-, 2H), 2.44 ppm (dt, -CH₂-CHO, 2H), 3.24 ppm (s, -OCH₃, 3H), 3.51 ppm (s, estructura polímero), 9.66 ppm (t, -CHO, 1H).

EJEMPLO 17

PREPARACION DE METOXI-PEG(2KDA) 2-METILBUTIRALDEHIDO

25 Este ejemplo describe la síntesis de un alcanal polimérico 2-alquil-substituido ilustrativo del invento. Este polímero, más que poseer una cadena de alquileo lineal que separa el carbono de aldehído del eslabón, posee un substituyente de metilo en la posición C-2.

30 **GENERALIDADES:** El reactivo acetal protegido, 17-A, fue preparado a partir de un material de inicio comercialmente disponible, 2-metil-4-clorobutanona, primero al reducir el carbono de butanoato al correspondiente alcohol, seguido por oxidación al butiraldehído. El

137

butiraldehído luego fue protegido como el acetal correspondiente para proporcionar un reactivo acetal protegido para acoplamiento a PEG. Después de acoplamiento a PEG, el acetal polimérico resultante fue hidrolizado en ácido para proporcionar el alcanal polimérico deseado.

5 A. Preparación de acetal dietílico de 4-cloro-2-metilbutiraldehído

Preparación de 4-cloro-3-metilbutanol-1

Una solución de 4-clorobutanoato de 2-metilo (TCI America) (22.0 g, 0.146 moles) en éter etílico (80 ml) fue agregada por goteo durante 30 min a una solución agitada de hidruro de litio-aluminio (4.55 g, 0.12 moles) en éter etílico (360 ml) a 0°C bajo atmósfera de argón. Luego se
10 agregó metanol (12 ml) por goteo durante un periodo de 30 min y luego se agregó HCl 2N helado (420 ml) por goteo durante un periodo de 20 minutos. La mezcla de reacción fue transferida a un embudo separador y la capa de éter, conteniendo 4-cloro-2-metilbutanol -1, fue separada. El producto adicional fue extraído a partir de la capa de agua con éter etílico (3 x 200 ml). Los extractos de éter fueron combinados, secados con sulfato de magnesio anhidro, y el solvente fue
15 destilado bajo presión reducida. Rendimiento 18.6 g.

NMR (d_6 -DMSO): 0.84 ppm (d, -CH₃-3H) 1.50 ppm (m, C-CH₂CH₂Cl, 1H), 1.68 ppm (m, -CH-, 1H), 1.82 ppm (m, CH₂CH₂Cl, 1H), 3.26 ppm (t, -CH₂OH, 2H), 3.66 ppm (m, -CH₂Cl, 2H), 4.50 ppm (t, -OH, 1H).

4-Cloro-2-metilbutiraldehído

20 Se agregó clorocromato de piridinio (23.6 g, 1.110 g) gradualmente a una solución de sodio agitada de 4-cloro-2-metilbutanol -1 (8.80 g, 0.078 moles) en diclorometano anhidro (470 ml). La mezcla fue agitada durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. Se agregó éter seco (820 ml); la mezcla fue agitada durante 20 minutos, y luego fue filtrada para retirar el exceso de agente oxidante. La solución luego fue filtrada a través de una columna con
25 400 g de Florisil, y los solventes fueron destilados bajo presión reducida. Rendimiento 6.0 g.

NMR (d_6 -DMSO): 1.06 ppm (d, -CH₃-3H) 1.74 ppm (m, -CH₂CH₂Cl, 1H), 2.14 ppm (m, -CH₂CH₂Cl-, 1H), 2.56 ppm (m, CH, 1H), 3.69 ppm (m, -CH₂Cl, 2H), 9.60 ppm (t, -CHO, 1H).

Acetal dietílico de 4-cloro-2-metilbutiraldehído

30 Una mezcla de 4-cloro-2-metilbutiraldehído (4.8 g, 0.040 moles), ortoformato de trietilo (6.48 g, 0.044 moles), alcohol etílico (3.0g), y monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (0.0144 g, 0.000757 moles) fue agitada a 45°C durante la noche bajo una atmósfera de argón. Luego,

158

después de enfriar a temperatura ambiente, se agregó Na_2CO_3 (0.40g) y la mezcla se agitó durante 15 minutos. La mezcla de reacción fue filtrada y el alcohol etílico y ortoformato de trietilo residual fueron destilados bajo presión reducida. El residuo fue sometido a destilación de vacío fraccional dando 3.2 g de acetal dietílico de 4-cloro-2-metilbutiraldehído.

- 5 NMR (d_6 -DMSO): 0.85 ppm (d, $-\text{CH}_3$ -3H) 1.13 ppm (m, $-\text{CH}_3$, 6H), 1.52 ppm (m, $-\text{CH}$ -, 1H), 1.87 ppm (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, 2H), 3.35-3.75 ppm (bm, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, 4H y CH_2Cl , 2H), 4.22 ppm (d, $-\text{CH}$ acetal, 1H).

B. mPEG (2K Da)-2-metilbutiraldehído, acetal dietílico

- 10 Una solución de mPEG (2K Da) (2.0g, 0.001 moles) en tolueno (30 ml) fue azeotrópicamente secada mediante destilación de tolueno bajo presión reducida. El mPEG 2k seco fue disuelto en tolueno anhidro (15 ml) y se agregó una solución 1.0 M de tert-butoxido de potasio en tert-butanol (4.0 ml, 0.004 moles) y acetal dietílico de 4-cloro-2-metilbutiraldehído de A anterior (0.5 g, y 0.00277 moles). Luego, se agregó bromuro de litio (0.05 g) y la mezcla fue
- 15 agitada a 100°C durante la noche bajo atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla fue filtrada y se agregó a 150 ml de éter etílico a $0-5^\circ\text{C}$. El producto precipitado fue filtrado y secado bajo presión reducida. Rendimiento: 1.5 g.
- NMR (d_6 -DMSO): 0.83 ppm (d, $-\text{CH}_3$, 3H) 1.10 ppm (m, $-\text{CH}_3\text{O}$, 6H), 1.24 ppm (m, $-\text{CH}$ -, 1H), 1.72 ppm (m, PEG-O- CH_2CH_2 -, 2H), 3.24 ppm (s, $-\text{OCH}_3$, 3H), 3.51 ppm (s, r
- 20 Estructura polímero), 4.18 ppm (d, $-\text{CH}$ acetal, 1H).
Substitución: ~ 100%.

C. mPEG (2Kda)-2-metilbutiraldehído

- 25 Una mezcla que contiene mPEG (2K Da)-2-metilbutiraldehído, acetal dietílico a partir de B anterior (1.0 g), agua desionizada (20 ml), ácido fosfórico al 5% para ajustar el pH a 3.0 fue agitada durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, se agregó cloruro de sodio (1.0) y el pH fue ajustado a 6.8 con hidróxido de sodio 0.1 M. El producto fue extraído con diclorometano (3 x 20 ml). El extracto fue secado con sulfato de magnesio anhidro y el solvente fue destilado bajo presión reducida. Rendimiento: 0.83 g.

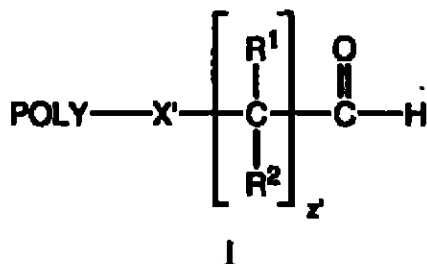
151

NMR (d_6 -DMSO): 1.01 ppm (d, $-CH_3$, 3H) 1.56 ppm (m, $-CH$, 1H), 1.90 ppm (m, PEG-O- CH_2CH_2- , 1H), 2.45 ppm (m, PEG-O- CH_2CH_2- , 1H), 3.24 ppm (s, OCH_3 , 3H), 3.51 ppm (Estructura polímero), 9.56 ppm (d, $-CH$ aldehído, 1H).

REIVINDICACIONES

1. Un polímero soluble en agua que tiene la estructura:

5



10 en donde:

POLY es un segmento polimérico soluble en agua;

X' es una fracción enlazadora;

Z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente;

15 R¹, en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido;

R², en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido,

20 Y adicionalmente donde aplica lo siguiente:

-cuando POLY es lineal

(a) el número total carbonilos presentes en dicho polímero es 0 o 2 o más excepto cuando X' comprende uno o más segmentos contiguos (-CH₂CH₂O-),

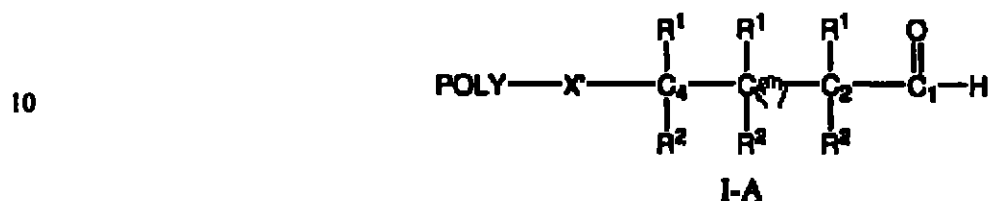
25 (b) y además en donde X' es oxígeno o comprende al menos un segmento (-CH₂CH₂O-) y z' está entre 2 y 12, entonces al menos uno entre R¹ o R² en al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o dicho polímero es heterobifuncional, donde POLY comprende un grupo reactivo en un extremo que no es hidroxilo, y

-cuando POLY es ramificado:

30 (c) cualquiera (i) al menos uno entre R¹ o R² el menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o (ii) X' incluye -(CH₂CH₂O)_b- donde b esta entre 1 y 20 aproximadamente en la instancia donde POLY comprende un residuo de lisina,

(d) y además en donde dicho POLY tiene dos brazos poliméricos, ningún brazo polimérico comprende oxígeno como el único heteroátomo en la instancia donde POLY comprende "C-H" como el punto de ramificación.

- 5 2. El polímero de la reivindicación 1, en donde z' está en el rango entre 2 y 21.
 3. El polímero de la reivindicación 1, en donde z' está en el rango entre 3 y 12.
 4. El polímero de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

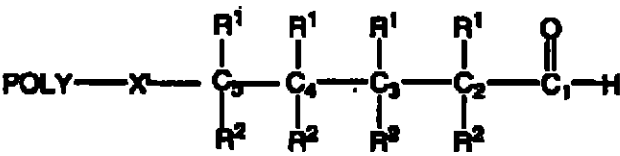


en donde POLY, X' , cada R^1 , cada R^2 y R^3 son tal como se definieron anteriormente.

- 15 5. El polímero de la reivindicación 4, en donde el R^1 unido a C_2 es alquilo, y las demás variables de R^1 y R^2 son H.
 6. El polímero de la reivindicación 6, en donde el R^1 unido a C_2 es alquilo menor.
 20 7. El polímero de la reivindicación 6, en donde el R^1 unido a C_2 es seleccionado del grupo que consta de metilo, etilo y propilo.
 8. El polímero de la reivindicación 4, en donde el R^1 unido a C_3 es alquilo, y todas las demás variables de R^1 y R^2 son H.
 25 9. El polímero de la reivindicación 8, en donde el R^1 unido a C_3 es alquilo menor.
 10. El polímero de la reivindicación 4, en donde el R^1 unido a C_4 es alquilo, y todas las demás variables de R^1 y R^2 son H.
 30 11. El polímero de la reivindicación 10, en donde el R^1 unido a C_4 es alquilo inferior.

162

12. El polímero de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



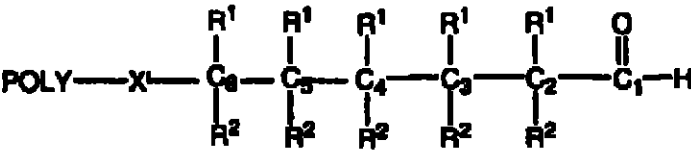
I-B

en donde POLY, X', y cada R¹ y cada R² son tal como se definieron anteriormente.

13. El polímero de la reivindicación 12, en donde el R¹ unido a C₂ es alquilo, y todas las demás variables de R¹ y R² son H.

14. El polímero de la reivindicación 12, en donde cualquiera el R¹ unido a C₃ o C₄ es alquilo, y todas las demás variables de R¹ y R² son H.

15. El polímero de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



en donde POLY, X', y cada R¹ y cada R² son como se definieron anteriormente.

16. El polímero de la reivindicación 15, en donde el R¹ unido a C₂ es alquilo, y todas las demás variables de R¹ y R² son H.

17. El polímero de la reivindicación 15, en donde una de las variables de R¹ unido a C₃ o C₄ o C₅ es alquilo, y todas las demás variables de R¹ y R² son H.

18. El polímero de la reivindicación 1, en donde X' comprende una fracción que corresponde a la estructura:

163



en donde:

c está entre 0 y 8

D es O, NH, o S,

5 e es 0, 1

f está entre 0 y 8,

p está entre 0 y 8,

M es -NH, O

K es NH, O

10 q está entre cero y 8, y

r y s son cada uno independientemente 0, 1

19. El polímero de la reivindicación 1, en donde X' incluye una fracción que corresponde a la estructura $-(CH_2CH_2O)_b-$ o $-(CH_2CH_2NH)_g-$, y b y g están cada una independientemente entre 1 y 20.

15

20. El polímero de la reivindicación 19, en donde b y g son cada uno independientemente 1 a 10.

21. El polímero de la reivindicación 20, en donde b y g están cada uno independientemente entre 1 y 6.

20

22. El polímero de la reivindicación 18, en donde X' comprende una fracción que corresponde a la estructura:



25

en donde:

P y T son cada uno independientemente $-(CH_2CH_2O)_b-$ ó $-(CH_2CH_2NH)_g-$,

B y g están cada uno independientemente entre 1 y 20,

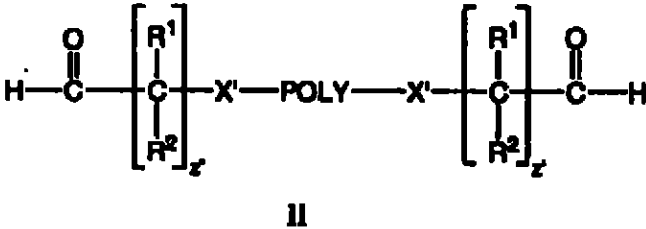
y las demás variables son como se definieron anteriormente en la reivindicación 18.

30

164

23. El polímero de la reivindicación 1, en donde X' comprende $-C(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$ o $-NHC(O)NH-(CH_2)_{1-6}NH-C(O)-$.
24. El polímero de la reivindicación 1, en donde POLY es seleccionado del grupo que consta de poli(óxido de alquileo), poli(pirrolidona de vinilo), poli(alcohol vinílico), polioxazolina, poli(acrililmorfolina), y poli(poliol oxetilado).
25. El polímero de la reivindicación 1, en donde POLY es un poli(óxido de alquileo).
26. El polímero de la reivindicación 25, en donde POLY es un poli(etilenglicol).
27. El polímero de la reivindicación 26, en donde el poli(etilenglicol) es taponado en extremo con una fracción de taponamiento en extremo.
28. El polímero de la reivindicación 27, en donde la fracción de taponamiento en extremo es independientemente seleccionada del grupo que consta de alcoxilo, alcoxilo sustituido, alqueniloxilo, alqueniloxilo sustituido, alquililoxilo, alquililoxilo sustituido, ariloxilo, y ariloxilo sustituido.
29. El polímero de la reivindicación 28, en donde la fracción de taponamiento en extremo es seleccionada del grupo que consta de metoxilo, etoxilo, y benciloxilo.
30. El polímero de la reivindicación 26, en donde el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular promedio nominal de entre 100 y 100.000 daltons aproximadamente.
31. El polímero de la reivindicación 26, en donde el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular promedio nominal de entre 1000 y 50.000 daltons aproximadamente.
32. El polímero de la reivindicación 26, en donde el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular promedio nominal de entre 2.000 y 30.000 daltons aproximadamente.

33. El polímero de la reivindicación 1, que comprende:



en donde POLY, cada X', cada (z') y cada R¹ y cada R² son como se definieron anteriormente.

34. El polímero de la reivindicación 33, donde dicho POLY es lineal y el polímero es homobifuncional.

35. El polímero de la reivindicación 26, en donde dicho poli(etilenglicol) tiene una estructura seleccionada del grupo que consta de estructura lineal, ramificada y bifurcada.

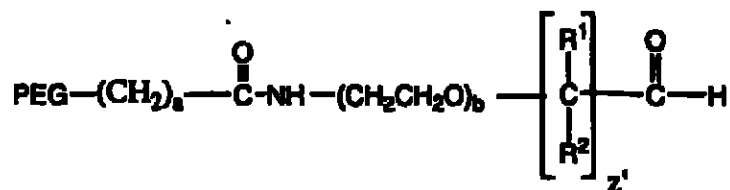
36. El polímero de la reivindicación 26, en donde dicho poli(etilenglicol) comprende la estructura:



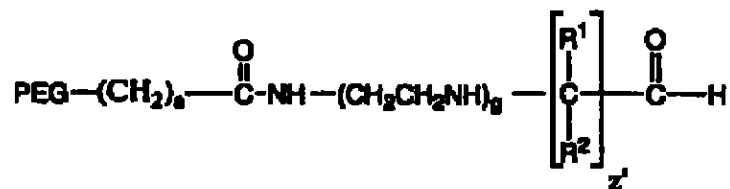
donde n está entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z comprende una fracción seleccionada del grupo que consta de hidroxilo, amino, éster, carbonato, aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, hidrazida, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcóxido, bencilóxido, silano, lípido, fosfolípido, biotina, y fluoresceína.

37. El polímero de la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada del grupo que consta de:

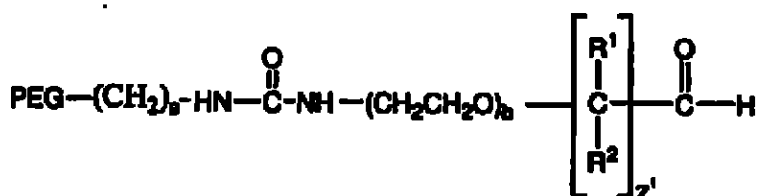
166



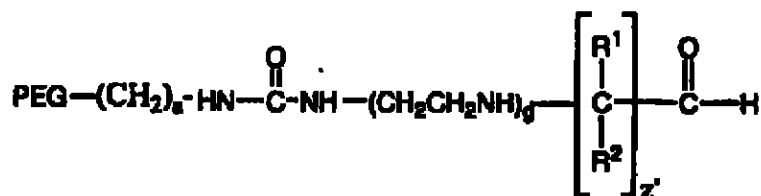
III-A



IV-A



III-C

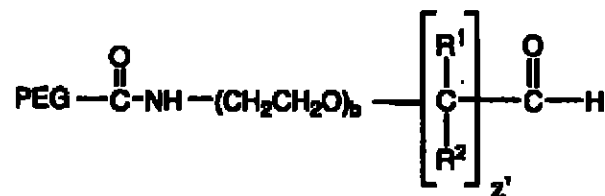


IV-C

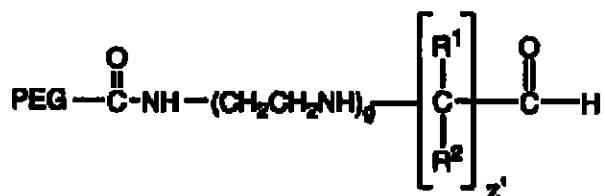
en donde PEG es poli(etilenglicol), b y g son cada uno independientemente 0 a 20, a está entre 0 y 6, y las demás variables son como se definieron en la reivindicación 1.

38. El polímero de la reivindicación 37, que tiene la estructura:

167



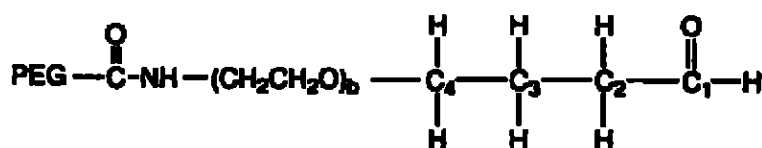
III-B



IV-B

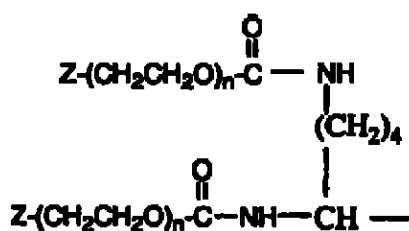
en donde las variables son como se definieron en la reivindicación 37.

39. El polímero de la reivindicación 37, en donde PEG tiene una estructura seleccionada del grupo que consta de estructura lineal, ramificada, y bifurcada.
40. El polímero de la reivindicación 37, en donde b y g cada uno están independientemente entre 1 y 8.
41. El polímero de la reivindicación 37, en donde b y g están cada uno independientemente entre 1 y 6.
42. El polímero de la reivindicación 37, en donde z' está entre 2 y 6.
43. El polímero de la reivindicación 37, en donde z' es 3.
44. El polímero de la reivindicación 37, en donde a es 0 o 1.
45. El polímero de la reivindicación 37, que tiene la estructura:



III-D

46. El polímero de la reivindicación 45, en donde "PEG" es un poli(etilenglicol) que tiene la estructura correspondiente a:



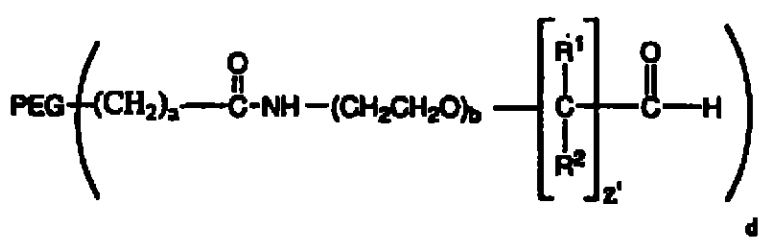
V

en donde n en cada ocurrencia está independientemente entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z comprende una fracción seleccionada del grupo que consta de hidroxilo, éster, carbonato, aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, malcímida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxilo, benciloxilo, silano, fosfolípido, biotina, y fluoresceína.

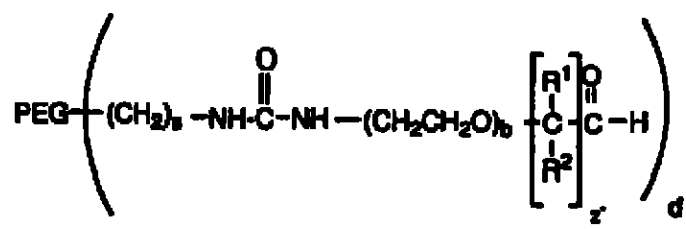
47. El polímero de la reivindicación 46, en donde Z es alcoxilo, y n en cada ocurrencia es igual y está en el rango entre 100 y 600.

48. El polímero de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

169.



VI-A



VI-B

en donde:

PEG es poli(etilenglicol),

b está entre 0 y 20,

s está entre 0 y 6,

d es 1, 2 o 3,

y las demás variables son como se definieron en la reivindicación 1.

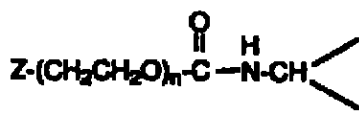
49. El polímero de la reivindicación 48, en donde PEG es lineal o ramificado.

50. El polímero de la reivindicación 48, en donde R¹ y R² en cada ocurrencia son H.

51. El polímero de la reivindicación 48, en donde z' está en el rango entre 3 y 12.

52. El polímero de la reivindicación 48, en donde z' es 3.

53. El polímero de la reivindicación 48, en donde d es 2 y PEG corresponde a la estructura:

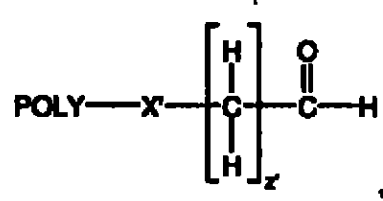


5 en donde n esta entre 10 y 4000 aproximadamente Z comprende una fracción seleccionada del grupo que consta de hidroxilo, éster, carbonato, aldehido, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, hidrazida, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxilo, benciloxilo, silano, lípido, fosfolípido, biotina, y fluoresceína y las demás variables son como se definieron en la

10 reivindicación 48.

54. El polímero de la reivindicación 53, en donde Z es alcoxilo o benciloxilo, n está en el rango entre 200 y 1500 aproximadamente, y b está entre 1 y 8.

15 55. Una composición que comprende un polímero soluble en agua que tiene la estructura:



VII

en donde:

POLY es un segmento polimérico soluble en agua;

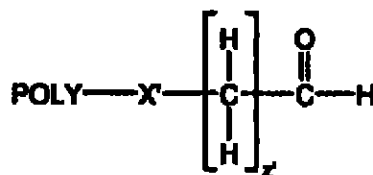
25 X' es una fracción enlazadora, y

Z' es un entero entre 1 y 21,

y dicha composición no tiene cantidades detectables de especies que contienen yodo o productos de reacción tipo retro-Michael.

30 56. Una composición que comprende un polímero soluble en agua que tiene la estructura:

121



VII

5

en donde:

POLY es un segmento lineal, polimérico, soluble en agua terminalmente de taponamiento en extremo.

X' es una fracción enlazadora,

10

Z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente,

y dicha composición no tiene cantidades detectables de derivado de polímero de dialdehído.

15

57. La composición de la reivindicación 55 o 56, en donde z' está en el rango entre 1 y 21.

58. La composición de la reivindicación 55 o 56, en donde z' está en el rango entre 3 y 12.

59. La composición de la reivindicación 55 o 56, en donde z' está en el rango entre 3 y 8.

20

60. La composición de la reivindicación 55 o 56, en donde POLY es seleccionado del grupo que consta de poli(óxido de alquileo), poli(pirrolidona de vinilo), poli(alcohol vinílico), polioxazolina, poli(acrilomorfolina), y poli(poliol oxetilado).

25

61. La composición de la reivindicación 55, en donde POLY es un poli(óxido de alquileo).

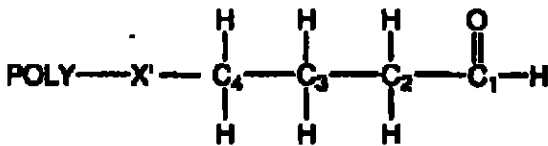
62. La composición de la reivindicación 61, en donde POLY es un poli(etilenglicol).

63. La composición de la reivindicación 56, en donde POLY es un poli(óxido de alquileo).

30

64. La composición de la reivindicación 63, en donde POLY es un poli(etilenglicol).

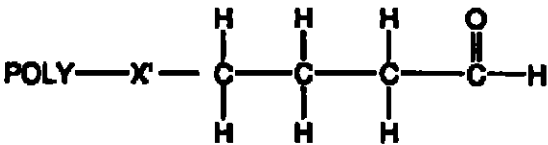
65. La composición de la reivindicación 55, en donde dicho polímero comprende la estructura:



VII-A.

66. La composición de la reivindicación 65, en donde POLY es un poli(etilenglicol).

67. La composición de la reivindicación 56, en donde dicho polímero comprende la estructura:



68. La composición de la reivindicación 67, en donde POLY es un poli(etilenglicol).

69. La composición de la reivindicación 65, en donde X' comprende una fracción que corresponde a la estructura:



en donde:

- c está entre 0 y 8,
- D es O, NH, o S,
- e es 0, 1
- f está entre 0 y 8,
- p está entre 0 y 8,
- M es ---NH , O
- K es NH, O
- q está entre cero y 8, y
- r y s son cada uno independientemente 0, 1

70. La composición de la reivindicación 65, en donde X' es hidrolíticamente estable.

71. La composición de la reivindicación 65, en donde POLY corresponde a la estructura:



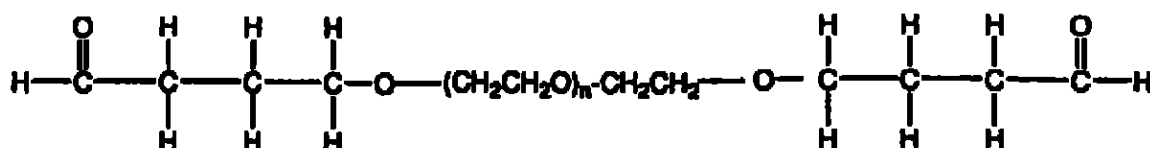
X' es O,

N está entre 10 y 4000 aproximadamente, y

Z comprende una fracción seleccionada del grupo que consta de hidroxilo, éster, carbonato, aldehído, alquénilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, alcoxilo, benciloxilo, silano, lípido, fosfolípido, biotina, y fluoresceína.

72. La composición de la reivindicación 71, en donde Z es C1 a C20 alcoxilo o benciloxilo.

73. La composición de la reivindicación 71, en donde dicho polímero comprende la estructura:



VIII

donde n es tal como se definió en la reivindicación 71.

74. La composición de la reivindicación 72, en donde Z es metoxilo.

75. La composición de la reivindicación 66, en donde dicho poli(etilenglicol) tiene una estructura seleccionada del grupo que consta de estructura lineal, ramificada y bifurcada.

76. La composición de la reivindicación 66, en donde X' incluye una fracción oligomérica que corresponde a la estructura $-(CH_2CH_2O)_b-$ o $-(CH_2CH_2NH)_g-$, y b y g están cada uno independientemente entre 1 y 20.

124

77. La composición de la reivindicación 76, en donde b y g están cada uno independientemente entre 1 y 10.

5 78. La composición de la reivindicación 20, en donde b y g están cada uno independientemente entre 1 y 6.

79. La composición de la reivindicación 76, en donde dicha fracción oligomérica está covalentemente unida al metileno C4.

10 80. La composición de la reivindicación 79, en donde dicho X' comprende además una amida o un uretano.

15 81. La composición de la reivindicación 80, en donde X' comprende una fracción seleccionada del grupo que consta de $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$, $\text{OC}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_g-$, y b y g son tal como se definieron en la reivindicación 76 anterior.

82. Una forma de hidrato o acetal del polímero soluble en agua de la reivindicación 1.

20 83. Una forma de hidrato o acetal del polímero soluble en agua de la reivindicación 55.

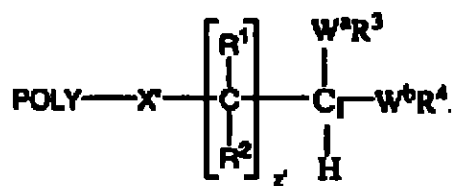
84. El acetal de la reivindicación 82, en donde dicho acetal es seleccionado del grupo que consta de acetal dimetilíco, acetal dietilíco, acetal di-isopropilíco, acetal dibencílico, acetal 2,2,2-tricloroetilíco, acetal bis(2-nitrobencilo), acetal S,S'-dimetilíco, y acetal S,S'-dietilíco.

25

85. Un polímero soluble en agua de la reivindicación 1, protegido como un dioxolano.

86. Un polímero que comprende la estructura:

175



IX

en donde:

POLY es un segmento polimérico soluble en agua;

X' es una fracción enlazadora

Z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente;

R¹, en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido;

R², en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido,

W^a y W^b son cada uno independientemente O o S, y

R³ y R⁴ son cada uno independientemente H, o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de metilo, etilo, isopropilo, bencilo, 1,1,1- tricloroetilo, y nitrobencilo, o cuando se toman juntos, son -(CH₂)₂- o -(CH₂)₃-, formando un anillo de 5 o 6 miembros cuando se considera junto con W^a, C₁, y W^b.

87. El polímero de la reivindicación 83, en donde aplica lo siguiente:

-cuando POLY es lineal:

(a) entonces el número total de carbonilos presentes en dicho polímero es 0 o 2 o más excepto cuando X' comprende uno o más segmentos (-CH₂CH₂O-) contiguos,

(b) y además en donde X' es oxígeno o comprende al menos un segmento (-CH₂CH₂O-) y z' está entre 2 y 12, entonces al menos uno entre R¹ o R² en al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o dicho polímero es heterobifuncional, donde

POLY comprende un grupo reactivo en un extremo que no es hidroxilo, y

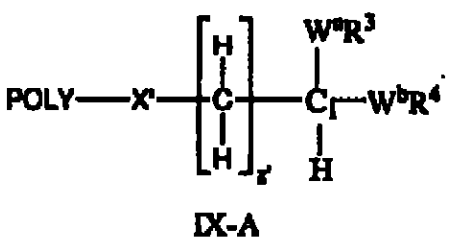
-cuando POLY es ramificado;

126

(c) luego cualquiera al menos uno entre R^1 o R^2 en al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o X' incluye $-(CH_2CH_2O)_b-$ donde b está entre 1 y 20 aproximadamente, y además en la instancia donde POLY comprende un residuo de lisina,

(d) y tiene 2 brazos poliméricos, entonces ningún brazo polimérico comprende oxígeno como un único heteroátomo en la instancia donde POLY comprende "C-H" como un punto de ramificación.

88. Un polímero soluble en agua que tiene la estructura:



en donde:

POLY es un segmento polimérico soluble en agua;

X' es una fracción enlazadora,

Z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente,

W^a y W^b son cada uno independientemente O o S, y

R^3 y R^4 son cada uno independientemente H, o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de metilo, etilo, isopropilo, bencilo, 1,1,1- tricloroetilo, y nitrobencilo, o cuando se toman juntos, son $-(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_3-$, formando un anillo de 5 o 6 miembros cuando se consideran junto con W^a , C_1 , y W^b .

89. El polímero de la reivindicación 88, en donde dicho polímero no tiene cantidades detectables de especies que contienen yodo o productos de reacción tipo retro-Michael.

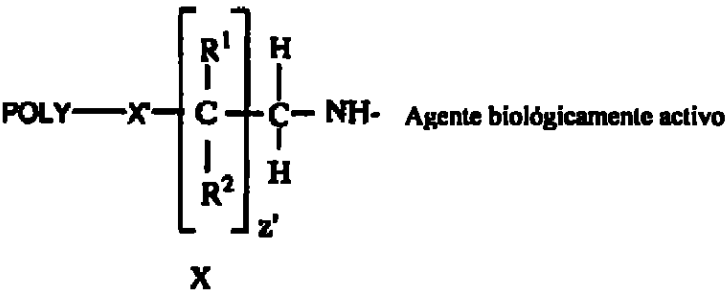
90. Un conjugado formada mediante la reacción de un agente biológicamente activo con el polímero de la reivindicación 1.

197

91. Un conjugado formado por la reacción de un agente biológicamente activo con la composición de la reivindicación 55.

92. Un conjugado formado mediante la reacción de un agente biológicamente activo con la composición de la reivindicación 56.

93. Un conjugado que comprende la siguiente estructura:



en donde:

- POLY es un segmento polimérico soluble en agua;
- X' es una fracción enlazadora;
- Z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente;
- R¹, en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido;
- R², en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido,
- “agente NH-biológicamente activo” representa un agente biológicamente activo que comprende un grupo amino,
- y además en donde lo siguiente aplica:

-cuando POLY es lineal:

- (a) el número total de carbonilos presentes en dicho polímero es 0 o 2 o más excepto cuando X' comprende uno o más segmentos (-CH₂CH₂O-) contiguos,

120

(b) y X' es oxígeno o comprende al menos un segmento (-CH₂CH₂O-) y z' está entre 2 y 12, entonces al menos uno entre R1 o R2 en al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o dicho polímero es heterobifuncional donde POLY comprende un grupo reactivo en un extremo que no es hidroxilo, y

5

-cuando POLY es ramificado:

(c) luego cualquiera al menos uno entre R1 o R2 en al menos una ocurrencia es un radical orgánico tal como se definió anteriormente o X' incluye -(CH₂CH₂O)_b- donde b está entre 1 y 20 aproximadamente,

10

y además en la instancia donde POLY comprende un residuo de lisina,

(d) y tiene 2 brazos poliméricos, entonces ningún brazo polimerico comprende oxígeno como el único heteroátomo en la instancia donde POLY comprende "C-H" como un punto de ramificación.

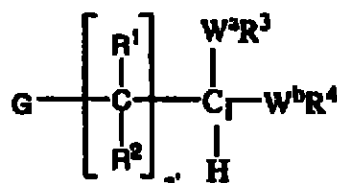
15

94. Un hidrogel formado utilizando el polímero soluble en agua de la reivindicación 1.

95. Un hidrogel formado utilizando la composición de la reivindicación 55.

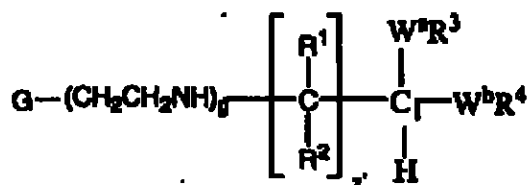
96. Un aldehído protegido que comprende una estructura seleccionada del grupo que consta de:

20



XI-A

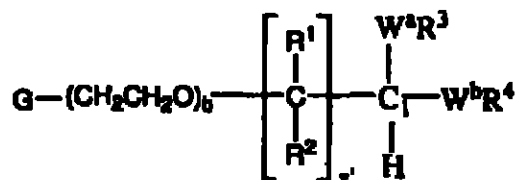
25



30

XI-B

179



XI-C

en donde:

10 z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente;

R^1 , en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido;

15 R^2 , en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido,

W^a y W^b son cada uno independientemente O o S, y

20 R^3 y R^4 son cada uno independientemente H, o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de metilo, etilo, isopropilo, bencilo, 1,1,1- tricloroetilo, y nitrobencilo, o cuando se toman juntos, son $-(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_3-$, formando un anillo de 5 o 6 miembros cuando se consideran junto con W^a , C_1 , y W^b .

b y g están cada uno independientemente entre 1 y 20, y

G es un grupo funcional.

25 97. El aldehído protegido de la reivindicación 96, en donde G es un grupo saliente.

98. El aldehído protegido de la reivindicación 97, en donde G es seleccionado del grupo que consta de Cl, Br, éster de para-tolilsulfonato, éster de metilsulfonilo, trifluorosulfoniléster, y éster de trifluoroetilsulfonilo.

30

100

99. El aldehído protegido de la reivindicación 96, en donde G es un grupo funcional seleccionado del grupo que consta de -OH, -NH₂, SH, y formas protegidas de los mismos.

100. El aldehído protegido de la reivindicación 96, en donde z' está en el rango entre 2 y 12.

5

101. El aldehído protegido de la reivindicación 96, en donde R¹ en cualquier posición seleccionada del grupo que consta de C₂(α), C₃(β), y C₄(γ), es alquilo, y las demás variables de R¹ y R² son H.

10 102. El aldehído protegido de la reivindicación 96, en donde b y g están cada uno entre 1 y 8.

103. El aldehído protegido de la reivindicación 96, en donde b y g están cada uno independientemente entre 1 y 6.

15 104. El aldehído protegido de la reivindicación 96, en donde b y g son cada uno igual a 4.

105. Un método para formar un alcanal polimérico soluble en agua, opcionalmente en forma protegida, dicho método comprendiendo los pasos de:

20 reaccionar un polímero soluble en agua que comprende al menos un grupo reactivo, Y, con un reactivo de alcanal protegido que comprende entre 2 y 20 átomos de carbono aproximadamente y un grupo reactivo, K, apropiado para desplazamiento por o alternativamente, reacción con Y, bajo condiciones efectivas para formar un alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida.

25 106. El método de la reivindicación 105, en donde dicho paso de reacción es llevado a cabo en un solvente orgánico.

30 107. El método de la reivindicación 106, en donde dicho solvente orgánico es seleccionado del grupo que consta de tolueno, cloroformo, cloruro de metileno, acetonitrilo, acetona, dioxano, metanol, y etanol.

181

108. El método de la reivindicación 105, en donde dicha reacción es realizada bajo una atmósfera inerte.

5 109. El método de la reivindicación 105, en donde dicha reacción es realizada a temperaturas en el rango entre 20°C y 150°C aproximadamente.

10 110. El método de la reivindicación 105, que comprende además hidrolización de dicho alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida bajo condiciones ácidas formando así el correspondiente alcanal polimérico soluble en agua.

111. El método de la reivindicación 110, en donde dicha hidrolización es realizada en un solvente acuosos.

15 112. El método de la reivindicación 111, en donde dicho reactivo de alcanal comprende 4 o más átomos de carbono.

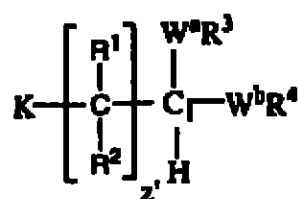
113. El método de la reivindicación 112, en donde tal hidrolización es realizada a un pH no menor de 3 aproximadamente.

20 114. El método de la reivindicación 105, en donde dicho reactivo de alcanal es protegido como un acetal.

25 115. El método de la reivindicación 114, en donde dicho acetal es seleccionado del grupo que consta de acetal dimetillico, acetal dietílico, acetal di-isopropílico, acetal dibencílico, acetal 2,2,2-tricloroetillico, acetal bis(2-nitrobencilo), acetal S,S'-dimetilo, y acetal S,S'-dietilo, acetales cíclicos y tioacetales cíclicos.

116. El método de la reivindicación 105, en donde dicho polímero soluble en agua comprende la estructura POLY-Y, y en donde dicho reactivo de alcanal polimérico comprende la estructura,

182



XI-D

en donde:

Z' es un entero entre 1 y 21 aproximadamente;

R^1 , en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido;

R^2 , en cada ocurrencia, es independientemente H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, y arilo sustituido,

W^a y W^b son cada uno independientemente O o S, y

R^3 y R^4 son cada uno independientemente H, o un radical orgánico seleccionado del grupo que consta de metilo, etilo, isopropilo, bencilo, 1,1,1- tricloroetilo, y nitrobencilo, o cuando se toman juntos, son $-(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_3-$, formando un anillo de 5 o 6 miembros cuando se considera junto con W^a , C_1 , y W^b .

117. El método de la reivindicación 116, en donde POLY es seleccionado del grupo que consta de poli(óxido de alquileo), poli(pirrolidona de vinilo), poli(alcohol vinílico), polioxazolina, poli(acrilolmorfolina), y poli(poliol oxietilado).

118. El método de la reivindicación 117, en donde POLY es un poli(etilenglicol).

119. El método de la reivindicación 118, en donde el poli(etilenglicol) es taponado en extremo con una fracción de taponamiento en extremo.

183

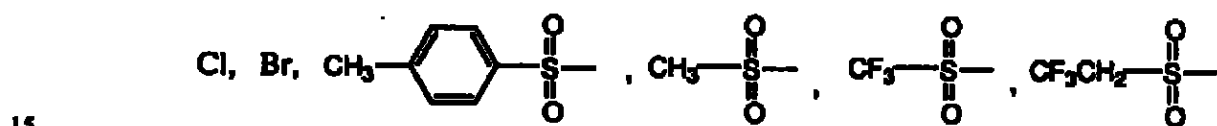
120. El método de la reivindicación 119, en donde la fracción de taponamiento en extremo es seleccionada del grupo que consta de alcoxilo, alcoxilo sustituido, alqueniloxilo, alqueniloxilo sustituido, alquiniloxilo, alquiniloxilo sustituido, ariloxilo, ariloxilo sustituido.

5 121. El método de la reivindicación 120, en donde la fracción de taponamiento en extremo es seleccionada del grupo que consta de metoxilo, etoxilo, y benciloxilo.

122. El método de la reivindicación 119, en donde:

10 POLY-Y comprende la estructura $Z-(CH_2CH_2O)_nH$, en donde n está entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z es seleccionado del grupo que consta de $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-OCH_2(C_6H_5)$,

K es seleccionado del grupo que consta de:



en donde:

R^1 y R^2 son cada uno independientemente H o alquilo inferior, y

W^a y W^b son cada uno O.

20 123. El método de la reivindicación 122, en donde z' está en el rango entre 4 y 12.

124. El método de la reivindicación 122, en donde z' está en el rango entre 4 y 8 aproximadamente.

25 125. El método de la reivindicación 122, en donde R^1 y R^2 son ambos H en cada ocurrencia.

126. El método de la reivindicación 122, en donde dicho alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida es formado en un rendimiento mayor al 85%.

30 127. El método de la reivindicación 126, en donde dicho alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida es formado en un rendimiento mayor al 95%.

128. El método de la reivindicación 122, que comprende además la hidrolización de dicho alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida bajo condiciones ácidas para formar así el correspondiente alcanal polimérico soluble en agua en una mezcla de reacción.

5

129. El método de la reivindicación 128, en donde dicha hidrolización es realizada en un solvente acuoso.

10

130. El método de la reivindicación 126, que comprende además el paso de aislar dicho alcanal de la mezcla de reacción.

15

131. El método de la reivindicación 130, en donde dicho aislamiento comprende:
 elevar el pH de la mezcla de reacción desde 6.0 a 7.5 aproximadamente
 extraer el alcanal en un solvente orgánico, y
 retirar el solvente.

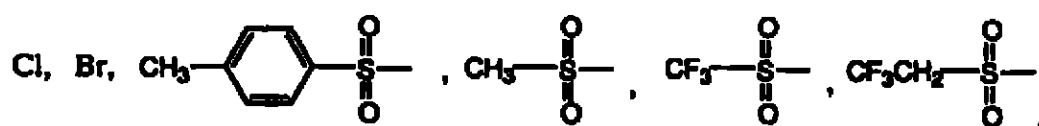
20

132. El método de la reivindicación 131, en donde dicho alcanal aislado no tiene cantidades detectables de $Z-(CH_2CH_2O)_nH$ y productos de reacción tipo retro-Michael.

133. El método de la reivindicación 132, en donde dicho alcanal aislado tiene una pureza de al menos 95%, con base en los contaminantes poliméricos.

25

134. El método de la reivindicación 118, en donde:
 POLY-Y comprende la estructura $HO-(CH_2CH_2O)_nH$, en donde n está entre 10 y 4000 aproximadamente,
 y K es seleccionado del grupo que consta de:



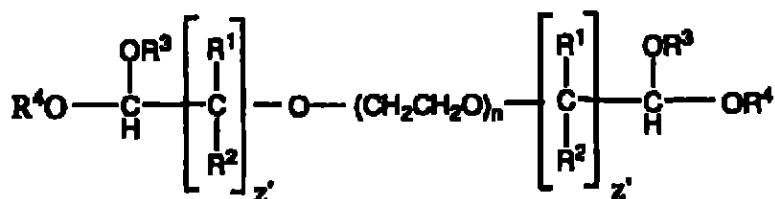
30

185

en donde:

R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo menor, y

W^a y W^b son cada uno O, para formar un alcanal en forma protegida que tiene la estructura:

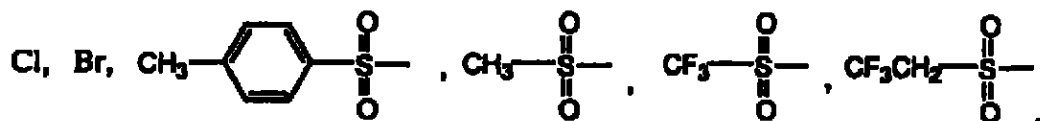


XII

135. El método de la reivindicación 118, en donde:

POLY-Y comprende la estructura Z-(CH₂CH₂O)_nH, en donde n está entre 10 y 4000 aproximadamente, y Z es hidroxilo protegido,

y K es seleccionado del grupo que consta de:

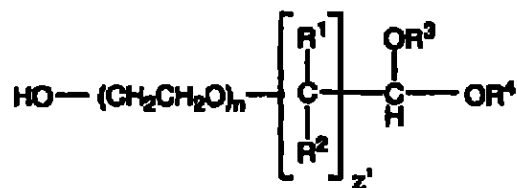


en donde:

R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo inferior, y

W^a y W^b son cada uno O.

136. El método de la reivindicación 135, que comprende además después de tal paso de reacción, la desprotección de tal hidroxilo protegido para formar



XI-E

5

, y

conversión de dicho -OH terminal sobre el poli(etilenglicol) en un grupo funcional diferente de hidroxilo.

10 137. El método de la reivindicación 136, en donde dicho grupo funcional es seleccionado del grupo que consta de amino, éster, carbonato, aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, y silano.

15 138. El método de la reivindicación 137, en donde dicho grupo funcional es seleccionado del grupo que consta de éster de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de benzotriazolilo, amina, amina protegida, vinilsulfona, y maleimida.

20 139. El método de la reivindicación 136, que comprende además el paso de hidrolización de dicho alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida bajo condiciones ácidas para formar así el correspondiente alcanal polimérico soluble en agua.

140. El método de la reivindicación 118, en donde Y en dicho POLY-Y es un grupo ionizable o es un derivado de un grupo ionizable.

25

141. El método de la reivindicación 140, en donde Y es seleccionado del grupo que consta de ácido carboxílico, éster activo, y amina.

30 142. El método de la reivindicación 141, en donde dicho POLY-Y ha sido cromatográficamente purificado antes de utilizar en dicho paso de reacción.

187

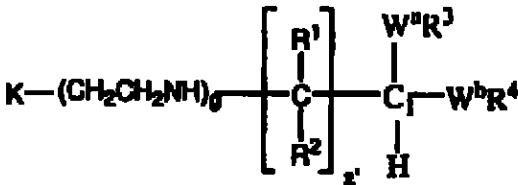
143. El método de la reivindicación 142, en donde dicho POLY-Y ha sido purificado mediante cromatografía de intercambio iónico.

144. El método de la reivindicación 142, en donde dicho POLY-Y para utilizar en dicho paso de reacción es esencialmente libre de cantidades detectables de impurezas poliméricas.

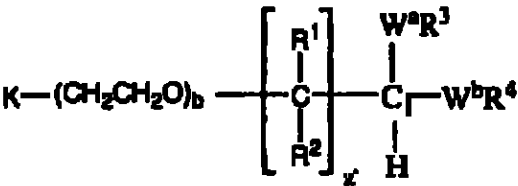
145. El método de la reivindicación 142, en donde dicho POLY-Y para utilizar en dicho paso de reacción es de taponamiento en extremo, y esencialmente está libre de cantidades detectables de impurezas polietilenglicol diol o polietilenglicol difuncional.

146. El método de la reivindicación 142, en donde dicho poli(etilenglicol) tiene una estructura seleccionada del grupo que consta de lincal, ramificada, y bifurcada.

147. El método de la reivindicación 142, en donde dicho reactivo de alcanal comprende la estructura:



XI-F



XI-G

XI-G

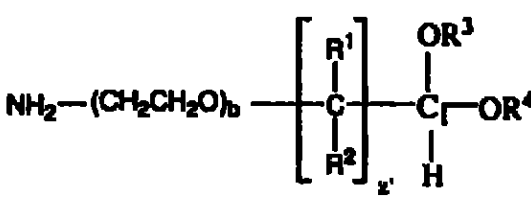
en donde g y b cada uno independientemente están entre 1 y 20 aproximadamente.

186

148. El método de la reivindicación 147, en donde R¹ y R² cada uno son independientemente H o alquilo menor, y W^a y W^b son cada uno O.

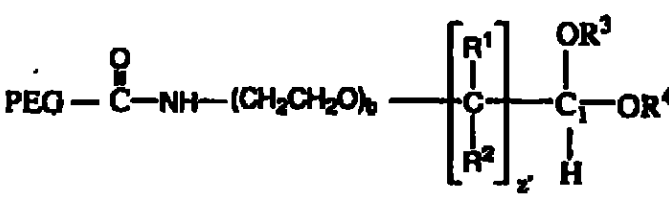
149. El método de la reivindicación 147, en donde R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo menor, y W^a y W^b son cada uno O.

150. El método de la reivindicación 148, en donde dicho reactivo de alcanal comprende la estructura:



XI-H

y el producto de dicho paso de reacción comprende una estructura:



IX-B

151. El método de la reivindicación 147, que comprende además el paso de hidrolizar dicho alcanal polimérico soluble en agua en forma protegida bajo condiciones ácidas para formar el correspondiente alcanal polimérico soluble en agua en un rendimiento mayor de 50%.

152. El método de la reivindicación 151, en donde dicho paso de hidrolización es efectivo para formar dicho alcanal polimerico soluble en agua en un rendimiento mayor de 90%.

154

153. El método de la reivindicación 110, que comprende además el paso de conjugar dicho alcanal polimérico soluble en agua con un agente biológicamente activo que comprende un grupo amino.

- 5 154. El método de la reivindicación 147, en donde dicho paso de reacción es realizado a temperatura ambiente.

120

Resumen:

El presente invento se relaciona con derivados de alcanales de polímeros solubles en agua tales como el poli(etilenglicol), sus hidratos y acetales correspondientes, y a métodos de preparar y
5 utilizar tales alcanales poliméricos. Los alcanales poliméricos del invento son preparados en alta pureza y demuestran estabilidad en almacenamiento.

PATENT COOPERATION TREATY

1d1

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

To:

Evans; Wilson; Tucker
NEKTAR THERAPEUTICS
150 Industrial Road
San Carlos, CA 94070
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
DEC 18 2004

BY: _____

Date of mailing
(day/month/year) 03.12.2004

Applicant's or agent's file reference
SHE0073.PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No. PCT/US 03/28221	International filing date (day/month/year) 09.09.2003	Priority date (day/month/year) 09.09.2002
--	--	--

Applicant
NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80289 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523856 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Georgakopoulou, P Tel. +49 89 2399-6037 
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

192

Applicant's or agent's file reference SHE0073.PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEAA18)	
International application No. PCT/US 03/28221	International filing date (day/month/year) 09.09.2003	Priority date (day/month/year) 09.09.2002
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C08G65/329		
Applicant NEKTAR THERAPEUTICALS, CORPORATION et al.		
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 38. 2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of sheets.		
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the opinion II ☐ Priority III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 08.04.2004	Date of completion of this report 03.12.2004	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Kositza, M Telephone No. +49 89 2399-7885 	

193

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/US 03/28221**

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, Pages

1-94 as originally filed

Claims, Numbers

1-154 as originally filed

Drawings, Sheets

1/1 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

194

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/US 03/28221**

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-154
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-154
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-154
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/US 03/28221

105

Prior art

D1: WO 03/049699 A

D2: WO 03/040211 A

D3: US-A-5 252 714

D4: TOPCHIEVA I N: "SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLYETHYLENE GLYCOL DERIVATIVES. A REVIEW" POLYMER SCIENCE USSR, PERGAMON PRESS LTD. OXFORD, GB, vol. 32, no. 5, 1990, pages 833-851, XP000261916

D5: US-A-4 002 531

Independent claims

Independent claims are claims 1, 55, 56, 82, 83, 85, 86, 90-92, 96, 105.

The terms X' ("linker moiety"), POLY ("polymer segment") and G ("functional group") represent no clear structural limitations. Given a specific compound it is not clear which part of its structure belongs to POLY and which one to X'. Whether a given residue represents a functional group G or not depends on the reactants and reaction conditions present. Obviously, the terms X', POLY and G are not appropriate to delimit the claims from the prior art and to clearly define the scope of protection of the claims.

Novelty

Claims 1, 55, 56, 82, 83, 85, 86, 90-92, 96, 105 are not novel.

D1-D5 disclose subject-matter having all the technical features of claims 1, 55, 56, 82, 83, 85, 86, 90-92, 96, 105. See D1 examples 1-10, p. 19 l. 17-19, p. 4 l. 14-17; D2 claim 1, example 6; D3 claims 1-2, col. 5 l. 1- col. 6 l. 30 (in particular col. 5 l. 1-20; D4 p. 838-839, formula (11); D5 example 1. Therefore, claims 1, 55, 56, 82, 83, 85, 86, 90-92, 96, 105 are not novel.

Inventive step

At present it cannot be seen which part of the original disclosure could serve as a basis for drafting a novel independent claim which is non-obvious to the skilled man knowing D1-D5.

Industrial applicability

The claimed subject-matter is industrially applicable.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference SHE0073 . PCT	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 03/28221	International filing date (day/month/year) 09/09/2003	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 09/09/2002
Applicant NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 04 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 35.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 03/28221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C08G65/329 C07C47/198 C07K1/107

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C08G C07C C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 03 049699 A (SUN BIO INC) 19 June 2003 (2003-06-19) examples 1-10 page 19, line 17-19 page 4, line 14-17	1-154
X,P	WO 03 040211 A (BATTLE WILLIAM DUDLEY III ;BENTLEY MICHAEL DAVID (US); SHEN XIAOMI) 15 May 2003 (2003-05-15) claim 1; example 6	1,55,56, 90-92
X	US 5 252 714 A (HARRIS J MILTON ET AL) 12 October 1993 (1993-10-12) claims 1,2 column 5, line 1 -column 6, line 30 column 5, line 1-20	1-154

	-/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *S* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 2004

Date of mailing of the international search report

19/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kositza, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

198

International Application No
PCT/US 03/28221

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	TOPCHIEVA I N: "SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLYETHYLENE GLYCOL DERIVATIVES. A REVIEW*" POLYMER SCIENCE USSR. PERGAMON PRESS LTD. OXFORD, GB, vol. 32, no. 5, 1990, pages 833-851, XP000261916 page 838-839, formula (11)	1,55,56, 82,83, 86, 90-92, 96,105
X	US 4 002 531 A (ROYER GARFIELD P) 11 January 1977 (1977-01-11) example 1	1,55,56, 90-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 03/28221

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03049699	A	19-06-2003	KR 2003048293 A WO 03049699 A2 US 2003153694 A1	19-06-2003 19-06-2003 14-08-2003
WO 03040211	A	15-05-2003	WO 03040211 A2 US 2003143596 A1	15-05-2003 31-07-2003
US 5252714	A	12-10-1993	NONE	
US 4002531	A	11-01-1977	CA 1052693 A1 GB 1528112 A	17-04-1979 11-10-1978

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05021296 00000000 Folios: 199
Fecha (AMD): 2005-03-08 14:50:14
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓	()	(✓)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	(✓)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	(✓)
- Descripción de la invención.	()	(✓)
- Dibujos de ser estos pertinentes. X	()	(✓)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	(✓)
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	() .
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable: Claudia M Nueva

Fecha:



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 201

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor(a)
CARLOS R. OLARTE

Oficio N°
12672

ASUNTO:	Radicación N°	05-21298
	Solicitud Internacional	PCT/US2003/028221
	Fecha inicio fase nacional	08/04/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene el poder otorgado por la sociedad NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION, este debe presentarse con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
- La solicitud no contiene la copia de los documentos en que consta la cesión del derecho a la patente de los inventores a los solicitantes o a su causantes. (Art. 28-k) Decisión 486/00.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10

Conmutador: 382 0840

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en Pauta 250 8320
fecha 29 ABR 2005

E-mail: Info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia