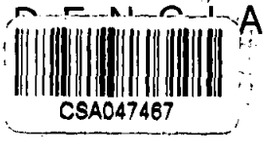
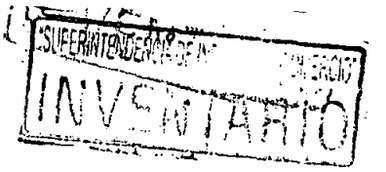
Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA





Organización y Digitalización CSA Ltda.

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

XPEDIENTE No. 08-12301

ÍTULO PREPARACION DE CONJUGADOS POLIMERICOS DE COMPUESTOS DE ADITIVOS TERAPEUTICOS, AGRICOLAS Y ALIMENTARIOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

SOLICITANTE BASELAN PHARMACEUTICALS, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, U.S.A.

APODERADO EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

BOGOTÁ, D. C.,

MA P-10)

ndustria y Comercio
UPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-012301- -00000-0000
Fecha: 2008-02-07 16:52:35 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 298

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

08 Feb. 2008

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.**
sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de California, Estados Unidos de América.

Dirección: 800 Gateway Boulevard,
South San Francisco,
California 94080,
Estados Unidos de América

Domicilio: San Francisco,
California 94080,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número ____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Andrei W. KONRADI**
30 Victoria Road,
Burlingame,
California 94010,
Estados Unidos de América

2. **Jenifer L. SMITH**
512 Cortesti Avenue,
South San Francisco,
California 94080,
Estados Unidos de América

3. **Michael S. DAPPEN**
740 Vernal Way,
Redwood City,
California 94062,
Estados Unidos de América

4. **Christopher M. SEMKO**
4493 Norris Road,
Fremont,
California 94536,
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/026292 Fecha: 7 de julio de 2006
Publicación Internacional No. WO 2007/008563 A2 Fecha: 18 de enero de 2007

6 Título (54)

PREPARACION DE CONJUGADOS POLIMERICOS DE COMPUESTOS DE ADITIVOS TERAPEUTICOS, AGRICOLAS Y ALIMENTARIOS

7 Clasificación Internacional (51) A61K 047/048

8 Prioridad SI☒ NO☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	8 de julio de 2005	60/697,726

9 Comprobante de pago No.: 08-9,455 **Fecha:** Febrero 4, 2008

10

Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 501.000.oo.
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar 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 12x12
- [ ] 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.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

AHP

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/008563 A2

   Descripción:

   Páginas 101 en el idioma original

   Páginas 156 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 28

   Figuras: Número (s)

2. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

4676 4

VELIER
3OGADOS
)IFICIO SISKI
RERA 4a N° 72-35
)TA, 8 – COLOMBIA

193 **Representación, Ratificación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.**

Representation, Ratification and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACIÓN Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

13170
6654

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

domiciliado (s) en/of 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America.

presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; ALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el ıfo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis os) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial :ultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales ajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al ıal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de La misma regla se aplicará cuando el segundo representante re haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En nsos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente. caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la :ntación mediante declaración autenticada por Notario Público en ıbia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de ıbia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el :ado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare ivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia edimento del representante principal, o de su primero o segundo ites, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno ıs según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, lo en ese momento el ejercicio de la representación por el ro, segundo o tercer suplente en su caso.

ás, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados. ıbtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra mpetencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos rados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o nas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden nistrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los ales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes os: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y os industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, sivas, de servicio, lemas comerciales, nombres :ciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y minaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre micilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de derechos: b) Las acciones de competencia desleal, protección del

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72 -35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates mentioned shall end at such time. In addition we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer,

COPIA CONFORME CON EL ORIGINAL QUE CONSTA QUE LA FOTOCOPIA CONTIENE 1 FOLIO UTIL
2 DIC 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS

consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

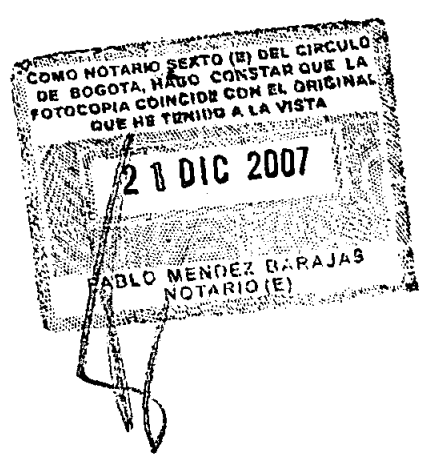
oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this September 2, 2005

en/In South San Francisco, CA 94080, USA

Firma/Signature

Carl W. Battle, Senior Vice President
Chief Intellectual Property Counsel



SEE ATTACHED NOTARY CERTIFICATE

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

los _____ días del mes de _____
200 _ compareció(eron) ante mí,
Carl W. Battle, Senior Vice President,
hief Intellectual Property Counsel
lien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
presentación de la Sociedad/compañía denominada
ELAN PHARMACEUTICALS, INC.
ertifico:
Que he visto los siguientes documentos:*

Que dichos documentos prueban lo siguiente:
1.Que ELAN PHARMACEUTICALS, INC.
; una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de
cuerdo con las leyes del Estado de Delaware,
Estados Unidos de América
2.Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
800 Gateway Boulevard, South San Francisco,
California 94080, Estados Unidos de América.
3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
oder están comprendidos dentro del objeto social de la
encionada Sociedad/Compañía.
4.Que el(los) Sr.(Sres.) Carl W. Battle, Senior
ice President, Chief Intellectual Property
stá(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder. Counsel
Ciudad _____
Estado _____
Hoy _____ de 200 __

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this _____ day of _____
200 ___ appeared before me
Carl W. Battle, Senior Vice President,
Chief Intellectual Property Counsel
who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named
ELAN PHARMACEUTICALS, INC.
I certify:
1.That I have seen the following documents:*

- Articles of Incorporation

2. That the above documents duly prove the following:
2.1.That ELAN PHARMACEUTICALS, INC.
is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of The State of Delaware,
United States of America.
2.2.That the domicile of said Corporation/Company is
800 Gateway Boulevard, South San Francisco,
California 94080, United States of America.
2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.
2.4. That Mr.(Messrs.) Carl W. Battle, Senior Vice
President, Chief Intellectual Property Counsel
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney
City South San Francisco
State California
This _____ day of _____ 200 ___

_____ NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO — NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFICIAL _____

* Los documentos que certifican la existencia de la compañía deben identificarse con fecha y origen

* The documents that certify the existence of the company must be identified with date and origin

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: _____
This public document
2. has been signed by: _____
3. acting in the capacity of: _____
4. bears the seal/stamp of: _____

Certified

5. at: _____ 6. the _____
7. by _____
8. No. _____
9. Seal/stamp 10. Signature

_____ _____

CONSULADO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
21 DIC 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

© CAVELIER ABOGADOS

State of California

SECRETARY OF STATE

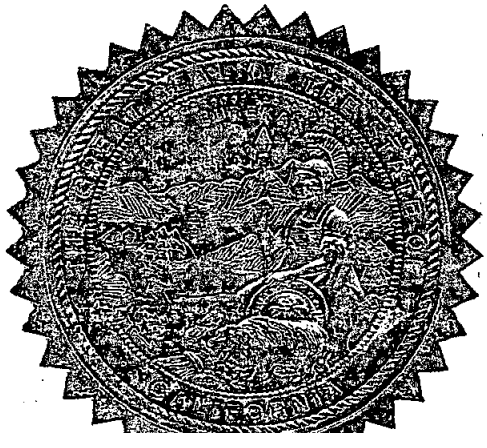
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by PETER SURLA*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of PETER SURLA, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 257972*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature



Secretary of State

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of SAN MATEO } ss.

On SEPTEMBER 2, 2005 (Date) before me, PETER SURLA, NOTARY PUBLIC (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))
personally appeared CARL W. BATTLE (Name(s) of Signer(s))

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

PETER SURLA
Commission # 1538923
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Dec 26, 2008

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY
Document Date: N/A Number of Pages: 3
Signer(s) Other Than Named Above: N/A

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO DE SAN MATEO COTEJAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
21 DIC 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO

Capacity(ies) Claimed by Signer

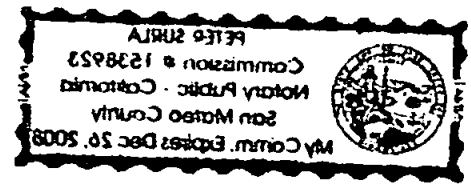
Signer's Name: CARL W. BATTLE
SENIOR VICE PRESIDENT

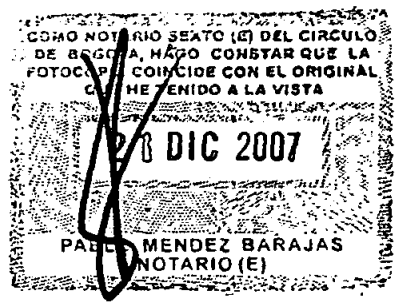
☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s): CHIEF INTELLECTUAL PROPERTY COUNSEL
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

(1)


PETER SURLA
Commission # 1538923
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Dec 26, 2008


COMO NOTARIO SEATO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
28 DIC 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

9

APOSTILLE

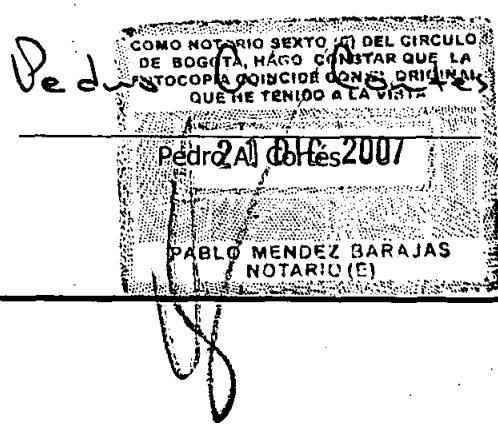
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : United States Of America
2. This public document has been signed by **LORRAINE F STRUNK**
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp LORRAINE F STRUNK, NOTARY PUBLIC, MONTGOMERY COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

Certified

5. at Harrisburg, Pennsylvania
6. The 3rd day of October, 2005
7. by Pedro A. Cortés, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania
8. No : 200536342
9. Seal/Stamp
10. Signature





10

CERTIFICATION OF AUTHORITY

1. I, Richard Collier (name), Executive Vice President, General Counsel & Secretary (title) of **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.** do hereby certify that:

1.1. Carl W. Battle is the Senior Vice President, Chief Intellectual Property Counsel of **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.** and that he/she is the authorized by **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.** to execute this Power of Attorney on its behalf.

1.2. That **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.** is a corporation/company legally constituted and in existence in accordance with the laws of the State of Delaware, United States of America.

1.3. That the domicile of said corporation/company is 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America.

1.4. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned corporation/company.

2. For issuing this certification that I have seen the following documents:

2.1. The Articles of Incorporation of **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.**, dated March 19, 2004

2.2. The Resolution of the Board of Directors and/or the By-Laws of **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.**, dated

Signed this 6th of SEPTEMBER Of the year 2005.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE QUITO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
21 DIC 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

Richard F. Collier
(name)
(Title)

Richard Collier
Executive Vice President, General Counsel & Secretary
Elan Pharmaceuticals, Inc.

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Lorraine F. Strunk, Notary Public
Upper Merion Twp., Montgomery County
My Commission Expires Apr. 4, 2009
Member, Pennsylvania Association of Notaries

Lorraine F. Strunk 9-6-05

TRADUCCIÓN OFICIAL 243/2005 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.**, EMPRESA DOMICILIADA EN 800 GATEWAY BOULEVARD, SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO HOY 2 DE SEPTIEMBRE DE 2005 EN SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. FIRMADO: CARL W. BATTLE, VICEPRESIDENTE PRINCIPAL, JEFE DE ASUNTOS JURÍDICOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLES Y EN ESPAÑOL POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE CARL W. BATTLE, VICEPRESIDENTE PRINCIPAL, JEFE DE ASUNTOS JURÍDICOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL PARA FIRMAR EL PODER ARRIBA CITADO A NOMBRE DE ELAN PHARMACEUTICALS INC. Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE CARL W. BATTLE PARA COMPROMETER A DICHA FIRMA.

RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITO DE CALIFORNIA

ESTADO DE CALIFORNIA, CONDADO DE SAN MATEO

El 2 de septiembre de 2005, ante mi, PETER SURLA, notario público, compareció personalmente CARL W. BATTLE, conocido personalmente por mi como la persona cuyo nombre está escrito en el documento adjunto y reconoció ante mi que ella firmó el mismo en su calidad autorizada y que mediante su firma en el documento la persona o entidad a cuyo nombre actuaba, firmó el documento.

Atestiguo mediante mi firma y sello oficial

Peter Surla

CONSULADO DE COLOMBIA EN SAN FRANCISCO (E.U.A.)
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
21 DIC 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

Sello: PETER SURLA, Cargo 1538923, notario público, California. Condado de San Mateo. Mi cargo vence el 26 de diciembre de 2008.

Descripción del documento adjunto: Poder y representación.

Calidad reclamada por el firmante

Nombre del firmante: Carl W. Battle, vice-presidente principal, Jefe de asuntos jurídicos de propiedad intelectual

El firmante representa a ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

CERTIFICACIÓN DE AUTORIZACIÓN

1. Yo, Richard Collier, vicepresidente ejecutivo, abogado general y secretario de ELAN PHARMACEUTICALS INC., por la presente certifico que:

1.1. Carl W. Battle es el vicepresidente principal, abogado principal de propiedad intelectual, de ELAN PHARMACEUTICALS INC, y que se encuentra autorizado por ELAN PHARMACEUTICALS, INC para firmar este poder a su nombre.

1.2. Que ELAN PHARMACEUTICALS INC, es una sociedad/compañía legalmente constituida y existente de conformidad con las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América.

1.3. Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 940080, Estados Unidos de América.

1.4. Que el objeto u objetos del presente poder están comprendidos dentro de los objetos sociales de la sociedad, de acuerdo con lo que se expone en el documento de constitución de dicha sociedad/entidad.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA ANTERIOR ES IDÉNTICA A LA QUE HE TENIDO A LA VISTA

21 DIC 2007

PABLO MENDEZ GARAJAS
NOTARIO (E)

2. Con el fin de emitir esta certificación he visto los siguientes documentos:

2.1. El documento de constitución de ELAN PHARMACEUTICALS INC, de fecha 19 de marzo de 2004.

2.2. La Resolución de la Junta directiva y o los estatutos de ELAN PHARMACEUTICALS, INC de fecha (dato en blanco)

Firmado hoy 6 de septiembre de 2005.

573

Firmado: Richard Collier

Vicepresidente ejecutivo, abogado y secretario de Elan Pharmaceuticals Inc.

SELLO: ESTADO DE PENSILVANIA

SELLO NOTARIAL, Lorraine F. Strunk, notario público

Upper Merion Twp. Condado de Montgomery

Mi cargo vence el 4 de abril de 2009

Miembro de la asociación de notarios de Pensilvania.

FIRMADO: LORRAINE F. STRUNK, 9-6-05

ESTADO DE CALIFORNIA

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por PETER SURLA
3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA
4. lleva el sello de PETER SURLA NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA

CERTIFICADO

5. en SACRAMENTO, CALIFORNIA
6. el 3 de octubre de 2005
7. por el Secretario de estado suplente, estado de California
8. Número 257972
9. Sello:

GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA

10. Firma: (ILEGIBLE) secretario de estado de Ohio.

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

21 DIC/2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
INGLES - ESPAÑOL INGLES
Res. 541 Febrero de 1976

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

17 1 17

Eduardo Galado

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 20 P 1:50

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

11 DIC 2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO ENCARGADO

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) QUE APARECE(N) EN EL (ELLOS) PRESENTE (ELLOS) ESCRITO (ELLOS) COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA, 20-OCT-2005

Eduardo Pardo Vargas

Este documento público

2. ha sido firmado por LORRAINE F STRUNK

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello de LORRAINE F STRUNK NOTARIO PÚBLICO, CONDADO DE MONTGOMERY, ESTADO DE PENSILVANIA

CERTIFICADO

5. en Harrisburg, Pensilvania

6. El 3 de octubre de 2005

7. por Pedro A. Cortés, secretario de estado de Pensilvania

8. Número 200536342

9. Sello: SECRETARIO DEL ESTADO DE PENSILVANIA

10. Firma: PEDRO A. CORTÉS.

COLO-13562-841-001-5

WPCL002G ID 7193

Bogotá, 20 de octubre de 2005.

Eduardo Calado Nogueira
"TRADUCTOR OFICIAL"
INGLES - ESPAÑOL INGLES
Res. 541. Febrero de 1994

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

21 DIC 2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Eduardo Galeano

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA,
20 OCT 2005

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ
BARAJAS
Notario Sexto Encargado

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 20 P 1:51

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

171118

Eduardo Galeano

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO QUE ANTECEDE
LAS EXIMENTES ESTAMPILLAS
ADHERIDAS

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

21 DIC 2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
18 January 2007 (18.01.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/008563 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/026292

(22) International Filing Date: 7 July 2006 (07.07.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/697,726 8 July 2005 (08.07.2005) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 800 Gateway Blvd., South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **KONRADI, Andrei, W.** [US/US]; 30 Victoria Road, Burlingame, CA 94010 (US). **SMITH, Jenifer, L.** [US/US]; 512 Cortesti Avenue, Douth San Francisco, CA 94080 (US). **DAPPEN, Michael, S.** [US/US]; 740 Vernal Way, Redwood City, CA 94062 (US). **SEMKO, Christopher, M.** [US/US]; 4493 Norris Road, Fremont, CA 94536 (US).

(74) Agent: **SARUSSI, Steven, J.**; MCDONNELL BOEHNEN HULBERT & BERGHOFF LLP, 300 South Wacker Drive, Suite 3200, Chicago, IL 60606 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

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.

WO 2007/008563 A2

(54) Title: PREPARATION OF POLYMER CONJUGATES OF THERAPEUTIC, AGRICULTURAL, AND FOOD ADDITIVE COMPOUNDS

(57) Abstract: Disclosed is a process for preparing polymer conjugates of agricultural, therapeutic, and food additive compounds using Mitsunobu conditions.

PREPARATION OF POLYMER CONJUGATES OF THERAPEUTIC, AGRICULTURAL, AND FOOD ADDITIVE COMPOUNDS

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

This invention relates to processes for making polymer conjugates of therapeutic, agricultural, and food additive compounds. More specifically, the invention relates to processes employing Mitsunobu reaction conditions to prepare conjugates for use in treating various mammalian, particularly human, diseases and disorders as well as in agriculture and as food additives. In certain aspects, the invention relates to using Mitsunobu conditions with an alcohol, particularly an alcohol-containing polymer, and an amine to form the desired conjugate.

State of the Art

Attachment of biologically active compounds to polymers has received significant attention and has become a common method to control various characteristics, e.g., biodistribution, pharmacokinetics, and toxicity, of such compounds. A frequent choice of polymer for use in making polymer conjugates of biologically active compounds is polyethylene glycol (PEG). It is widely used as a covalent modifier of both small and large biologically active molecules. For discussions of such conjugates, see, Eur. Polym. J. 19, No. 12, pages. 1177-1183 (Zaplinsky et al., 1983) et al., Journal of Controlled Release 10 (1989) 145-154 (Veronese et al., 1989), and Advanced Drug Delivery Reviews, 16, 157-182 (Zaplinsky, 1995).

It has recently been discovered that polymer conjugates of, for example, $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) antagonists have greatly improved serum half-life. These polymer compounds can be prepared using various synthetic methods, including carboxamide formation by reacting an ester of the active molecule with a polymer amine, carbamate formation between an amine of the active molecule and a polymer chloroformate, or carbamate formation between an isocyanate of the active molecule and a polymer alcohol. The overall yields from these methods are typically less than desirable, often involving multiple steps and purification means. It is therefore necessary to design a process which isolates a conjugate of a VLA-4 inhibitor in quantitative or near quantitative yields.

The importance of such polymer conjugates indicates that there is a need for convenient and efficient syntheses of such materials.

17

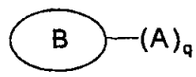
SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides an improved synthesis of polymer conjugates of agricultural, therapeutic, and food additive compounds. The process of this invention produces the final conjugate products in excellent yields. In a preferred aspect, the invention provides a process for the preparation of conjugates by condensing polymeric alcohols with amines using Mitsunobu reaction conditions. In another preferred aspect, the invention provides a process for the preparation of conjugates by condensing polymeric amines with alcohols using Mitsunobu reaction conditions.

In one aspect, the invention provides a process for the preparation of conjugates of active compounds, comprising the steps of: a) reacting a polymeric alcohol with a nucleophile in the presence of a trivalentphosphine and an appropriate azodicarbonyl compound, e.g., diethylazodicarboxylate or azodicarbonyldipiperidide, to form the conjugate; and b) isolating the conjugate.

In a specific aspect, the active compounds and the resulting conjugates exhibit VLA-4 antagonistic properties.

In another aspect, the invention provides a process for the preparation of conjugates of formula I below:



I

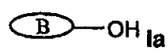
B is a bio-compatible polymer moiety;

q is from about 1 to about 100;

A at each occurrence is independently a compound having biological or agricultural activity or A is a food additive compound.

This process comprises

a) reacting polymeric alcohol of formula Ia



Ia

with a nucleophile of formula H-Nu

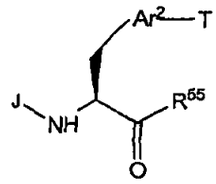
in the presence of a trivalentphosphine and an appropriately substituted azodicarbonyl compound to form the compound of formula I, where Nu is a radical corresponding to formula A above and the H is an acidic hydrogen on Nu; and

b) isolating the compound of formula I.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

As noted above, this invention provides processes for the preparation of conjugates of agricultural, therapeutic, and food additive compounds (hereinafter "active compounds"). The conjugates comprise one or more polymer moieties covalently attached to one or more active compounds where the resulting conjugates have the same type of activity as the active compound. In one aspect, the active compounds and resulting conjugates are compounds that inhibit leukocyte adhesion and, in particular, leukocyte adhesion mediated, at least in part, by α_4 integrins.

In a preferred aspect, the A group in the conjugates of Formula I can be represented by formula II

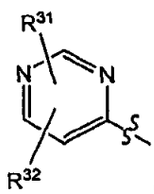


II

wherein

J is selected from:

a) a group of formula (a):



(a)

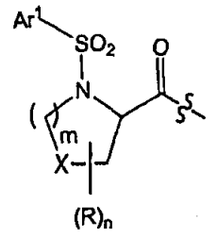
wherein R^{31} is a covalent bond to the polymer moiety which optionally comprises a linker, or R^{31} is –H, $R^{31'}$, $-NH_2$, $-NHR^{31'}$ or $-N(R^{31'})_2$, $-NC_3$-C_6cyclic, $-OR^{31'}$, $-SR^{31'}$, wherein each $R^{31'}$ is independently an optionally substituted straight or branched C_1-C_6alkyl, optionally substituted C_3-C_8cycloalkyl, optionally substituted aryl, optionally substituted heteroaryl,

and R^{32} is a covalent bond to the polymer moiety which optionally comprises a linker, or R^{32} is –H, $-NO_2$, haloalkyl or the group $-N(MR^{41})R^{42}$ wherein M is a covalent bond, –C(O)- or $-SO_2$-, R^{41} is $R^{41'}$, $N(R^{41'})_2$, or $-OR^{41'}$,

wherein each $R^{41'}$ is independently hydrogen, an optionally substituted straight or branched C_1-C_8alkyl, optionally substituted cycloalkyl, optionally substituted aryl, optionally substituted heterocyclic or an optionally substituted heteroaryl, wherein optional substitutions are halide, C_1-C_8alkyl, or $-OC_1$-C_6alkyl,

and R^{42} is hydrogen or $R^{41'}$; and

b) a group of formula (b):



(b)

wherein R is selected from the group consisting of a covalent bond to the polymer moiety, amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl wherein each amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein, in each case, the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety;

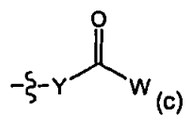
Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^1;

Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^2;

X is selected from the group consisting of $-NR^1-$, -O-, -S-, -SO-, $-SO_2$ and optionally substituted $-CH_2-$ where R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

T is selected from:

a) a group of formula (c)



(c)

wherein Y is selected from the group consisting of -O- and $-NR^1-$ wherein R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

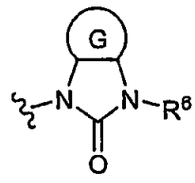
W is selected from the group consisting of a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker and $-NR^2R^3$ wherein R^2 and R^3 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and where R^2 and R^3, together with the nitrogen atom bound thereto, form a

heterocyclic ring or a substituted heterocyclic ring wherein each of alkyl, substituted alkyl, heterocyclic and substituted heterocyclic is optionally covalently bound to a polymer moiety which further optionally comprises a linker;

m is an integer equal to 0, 1 or 2;

n is an integer equal to 0, 1 or 2; and

b) a group of formula (d)



(d)

wherein G is an optionally substituted aryl or optionally substituted heteroaryl 5 or 6 membered ring containing 0 to 3 nitrogens, wherein said aryl or heteroary optionally further comprises a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker;

R^6 is a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker, or R^6 is –H;

R^{55} is selected from the group consisting of alkoxy, substituted alkoxy, cycloalkoxy, substituted cycloalkoxy, aryloxy and substituted aryloxy, and -OH;

provided that:

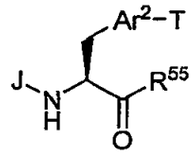
A. at least one of J, Ar^1, Ar^2, and T contains a covalent bond to the polymer moiety;

B. when J is covalently bound to the polymer moiety, *n* is one and X is not -O-, -S-, -SO-, or $-SO_2-$; and

C. when X is -O-, then *m* is two.

In a preferred embodiment, only one of J, Ar^1, Ar^2, and T contains a covalent bond to a polymer moiety.

The compound H-Nu employed in the conjugation reaction is a compound containing an acidic hydrogen covalently bonded to Nu. Preferred compounds of formula H-Nu can be represented by the formula **II.1**



wherein

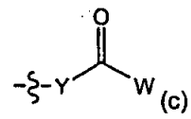
J and Ar^2 carry the same definitions as set forth for Formula II;

T is a group carrying an acidic hydrogen; and

R^{55} is a acid protecting group.

Suitable T groups include heterocyclic groups, imides, phenols, phosphoric mono- and diesters, carboxylic acids, hydroxamates, thiols, thioamides, β-keto esters, and 1,3-diketones,

A preferred T group is a group of formula (c)

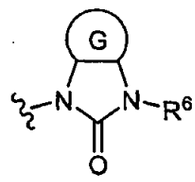


(c)

wherein Y is selected from the group consisting of -O- and -NR^1- wherein R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

W is a group containing an acidic hydrogen, preferably on a nitrogen atom adjacent a carbonyl, where the W group optionally connected to Y(CO) by a linker.

Another preferred T group is a group of formula (d)

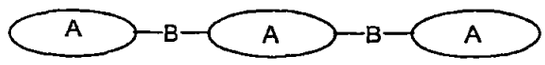


(d)

wherein G is an optionally substituted aryl or optionally substituted heteroaryl 5 or 6 membered ring containing 0 to 3 nitrogens; and

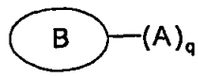
R^6 is hydrogen.

It should be understood that the value for q is calculated based on the ratio of the number of polymer moieties and the number of A-moieties. In other words, when q is 1.5, this contemplates, for example, the following formula I':



I'

Preferred conjugates of formula I prepared by the invention include those of formula Ia below:



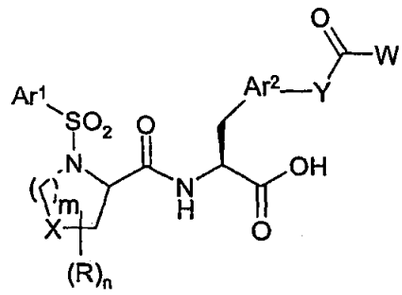
Ia

and pharmaceutically acceptable salts thereof, wherein

B is a polymer moiety optionally covalently attached to a carrier;

q is from about 1 to about 100;

A at each occurrence is independently a compound of formula **IIa**



IIa

wherein

R is selected from the group consisting of a covalent bond to the polymer moiety, amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl wherein each amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein, in each case, the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety;

Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^1;

Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^2;

X is selected from the group consisting of $-NR^1-$, -O-, -S-, -SO-, $-SO_2$ and optionally substituted $-CH_2-$ where R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

Y is selected from the group consisting of -O- and $-NR^1-$ wherein R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

W is selected from the group consisting of a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker and $-NR^2R^3$ wherein R^2 and R^3 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and where R^2 and R^3, together with the nitrogen atom bound thereto, form a heterocyclic ring or a substituted heterocyclic ring wherein each of alkyl, substituted alkyl, heterocyclic and substituted heterocyclic is optionally covalently bound to a polymer moiety which further optionally comprises a linker;

m is an integer equal to 0, 1 or 2;

n is an integer equal to 0, 1 or 2; and

pharmaceutically acceptable salts thereof;

provided that:

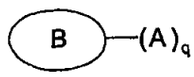
A. at least one of R, Ar^1, Ar^2, W and $-NR^2R^3$ contain a covalent bond to the polymer moiety;

B. when R is covalently bound to the polymer moiety, *n* is one and X is not -O-, -S-, -SO-, or $-SO_2-$;

C. when X is -O- or $-NR^1-$, then *m* is two;. and

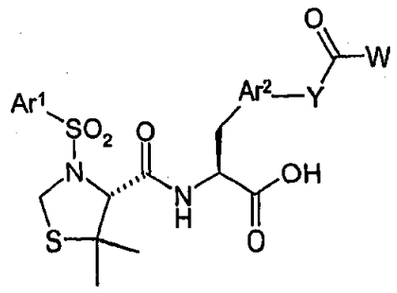
D. the conjugate of formula Ia has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferred conjugates of formula I prepared by the invention include those of formula Ib below:



Ib

wherein each **A** is independently a compound of formula **IIb** below:



IIb

and wherein *q* is about 1 to about 100;

B is a polymer moiety optionally covalently attached to a carrier;

Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein the PEG moiety optionally comprises a linker which covalently links the PEG moiety to Ar^1;

Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^2;

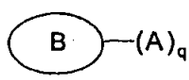
Y is selected from the group consisting of -O- and $-NR^1-$ wherein R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

W is selected from the group consisting of a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker and $-NR^2R^3$ wherein R^2 and R^3 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and where R^2 and R^3, together with the nitrogen atom bound thereto, form a heterocyclic ring or a substituted heterocyclic ring wherein each of alkyl, substituted alkyl, heterocyclic and substituted heterocyclic is optionally covalently bound to the polymer moiety which further optionally comprises a linker;

provided that at least one of Ar^1, Ar^2, W and $-NR^2R^3$ is covalently bound to a polymer moiety which optionally comprises a linker;

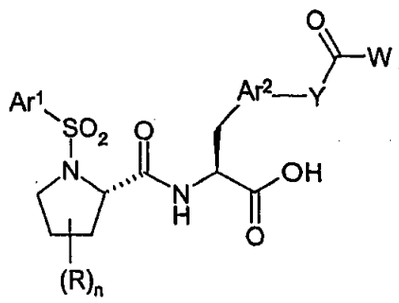
and further provided that the conjugate of formula Ib has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferred conjugates of formula I formed by the process of the invention include those of formula Ic below:



Ic

wherein each **A** is independently a compound of formula **IIc** below:



IIc

and wherein *q* is about 1 to about 100;

B is a polymer moiety optionally covalently attached to a carrier;

R is selected from the group consisting of a covalent bond to a polymer moiety, amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl wherein each amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein, in each case, the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety;

Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^1;

Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^2;

Y is selected from the group consisting of -O- and $-NR^1-$ wherein R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

W is selected from the group consisting of a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker and $-NR^2R^3$ where R^2 and R^3, together with the nitrogen atom bound thereto, form a heterocyclic ring or a substituted heterocyclic ring wherein each of alkyl, substituted alkyl, heterocyclic and substituted heterocyclic is optionally covalently bound to a polymer moiety which further optionally comprises a linker;

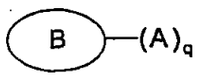
n is an integer equal to 0, 1 or 2; and

pharmaceutically acceptable salts thereof;

provided that at least one of R, Ar^1, Ar^2, W and $-NR^2R^3$ is covalently bound to a polymer moiety which optionally comprises a linker;

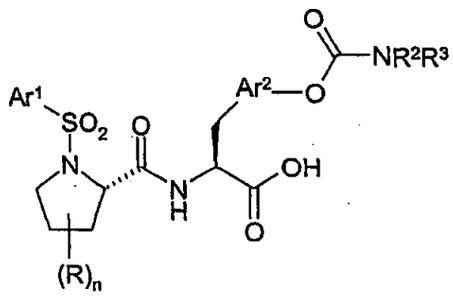
and further provided that the conjugate of formula **Ic** has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferred conjugates of formula I include those of formula Id below:



Id

wherein each **A** is independently a compound of formula **IId** below:



IId

and wherein *q* is about 1 to about 100;

B is a polymer moiety optionally covalently attached to a carrier;

R is selected from the group consisting of a covalent bond to a polymer moiety, amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl wherein each amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein, in each case, the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety;

Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^1;

Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^2;

R^2 and R^3 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and where R^2 and R^3, together with the nitrogen atom bound thereto, form a heterocyclic ring or a substituted heterocyclic ring wherein each of alkyl, substituted alkyl, heterocyclic and substituted heterocyclic is optionally covalently bound to a polymer moiety which further optionally comprises a linker;

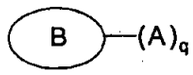
n is an integer equal to 0, 1 or 2; and

pharmaceutically acceptable salts thereof;

provided that at least one of R, Ar^1, Ar^2, and $-NR^2R^3$ is covalently bound to a polymer which optionally comprises a linker;

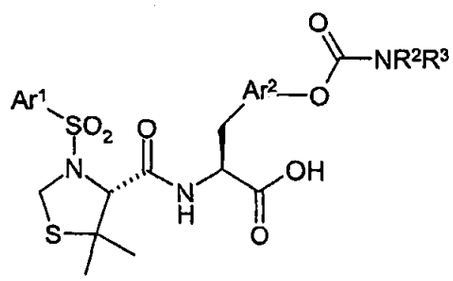
and further provided that the conjugate of formula Id has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferred conjugates of formula I include those of formula Ie below:



Ie

wherein each A is independently a compound of formula IIe below:



IIe

and wherein *q* is about 1 to about 100;

B is a polymer moiety optionally covalently attached to a carrier;

Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^1;

Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to a polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^2;

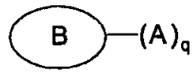
R^2 and R^3 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and where R^2 and R^3, together with the nitrogen atom bound thereto, form a heterocyclic ring or a substituted heterocyclic ring wherein each of alkyl, substituted alkyl, heterocyclic and substituted heterocyclic is optionally covalently bound to a polymer moiety which further optionally comprises a linker; and

pharmaceutically acceptable salts thereof;

provided that at least one of Ar^1, Ar^2 and $-NR^2R^3$ is covalently bound to a polymer moiety which optionally comprises a linker;

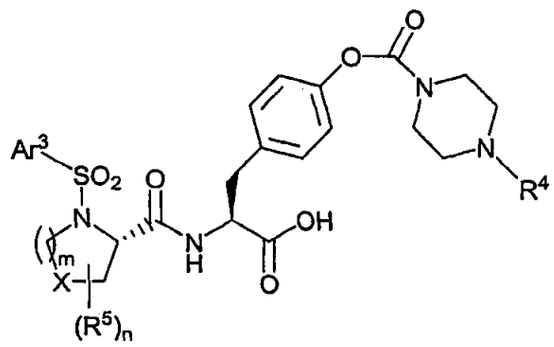
and further provided that the conjugate of formula Ie has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferred conjugates of formula I include those of formula If below:



If

wherein each A is independently a compound of formula IIf below:



IIf

and wherein *q* is about 1 to about 100;

B is a polymer moiety optionally covalently attached to a carrier;

R^4 is covalently bound to a polymer moiety which optionally comprises a linker;

R^5 is selected from the group consisting of alkyl and substituted alkyl;

Ar^3 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl;

X is selected from the group consisting of $-NR^1-$, -O-, -S-, -SO-, $-SO_2$ and optionally substituted $-CH_2-$ where R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

m is an integer equal to 0, 1 or 2;

n is an integer equal to 0, 1 or 2; and

pharmaceutically acceptable salts thereof;

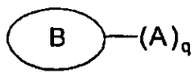
provided that:

A. when R is covalently bound to the polymer moiety, *n* is one and X is not -O-, -S-, -SO-, or $-SO_2-$;

B. when X is -O- or $-NR^1-$, then *m* is two;. and

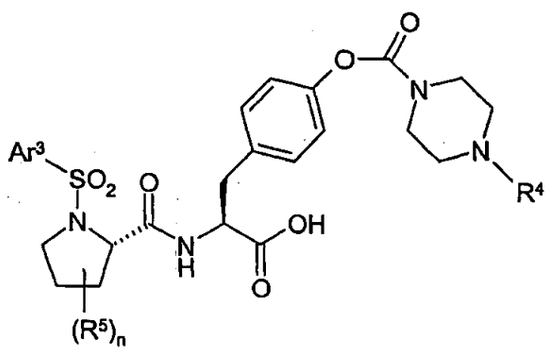
C. the conjugate of formula If has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferred conjugates of formula I include those of formula Ig below:



Ig

wherein each A is independently a compound of formula **IIg** below:



IIg

and wherein *q* is about 1 to about 100;

B is a polymer moiety optionally covalently attached to a carrier;

R^4 is covalently bound to a polymer moiety which optionally comprises a linker;

R^5 is selected from the group consisting of alkyl and substituted alkyl;

30

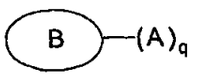
Ar^3 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl;

n is an integer equal to 0, 1 or 2; and

pharmaceutically acceptable salts thereof;

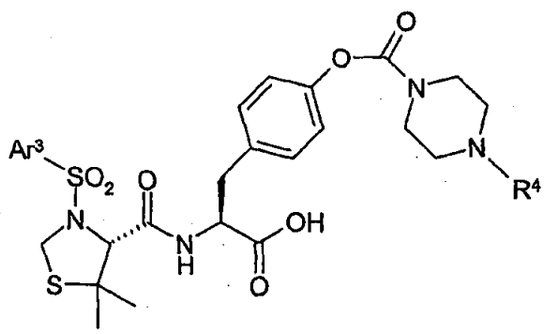
provided that the conjugate of formula Ig has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferred conjugates of formula I include those of formula Ih below:



Ih

wherein each A is independently a compound of formula IIh below:



IIh

and wherein *q* is about 1 to about 100;

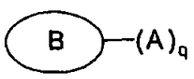
R^4 is covalently bound to a polymer moiety which optionally comprises a linker;

Ar^3 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl;

pharmaceutically acceptable salts thereof;

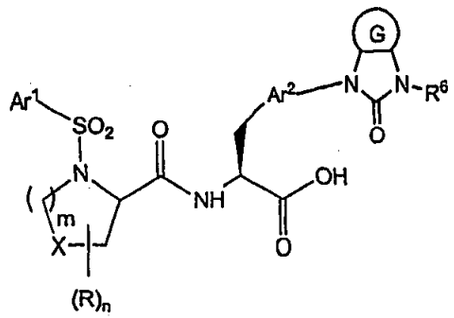
provided that the conjugate of formula Ih has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferred conjugates of formula I include those of formula Ii below:



Ii

wherein each A is independently a compound of formula IIi below:



Ili

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

and provided that the conjugate of formula II has a molecular weight of no more than 100,000.

Preferably, when Ar^1 is not bound to a polymer moiety, Ar^1 in formulae IIa -IIe and Ar^3 in formulae IIf-IIh is selected from the group consisting of:

phenyl,
4-methylphenyl,
4-*t*-butylphenyl,
2,4,6-trimethylphenyl,
2-fluorophenyl,
3-fluorophenyl,
4-fluorophenyl,
2,4-difluorophenyl,
3,4-difluorophenyl,
3,5-difluorophenyl,
2-chlorophenyl,
3-chlorophenyl,
4-chlorophenyl,
3,4-dichlorophenyl,
3,5-dichlorophenyl,
3-chloro-4-fluorophenyl,
4-bromophenyl,
2-methoxyphenyl,
3-methoxyphenyl,
4-methoxyphenyl,
3,4-dimethoxyphenyl,
4-*t*-butoxyphenyl,

4-(3'-dimethylamino-*n*-propoxy)-phenyl,
2-carboxyphenyl,
2-(methoxycarbonyl)phenyl,
4-($H_2NC(O)$-)phenyl,
4-($H_2NC(S)$-)phenyl,
4-cyanophenyl,
4-trifluoromethylphenyl,
4-trifluoromethoxyphenyl,
3,5-di-(trifluoromethyl)phenyl,
4-nitrophenyl,
4-aminophenyl,
4-($CH_3C(O)NH$-)phenyl,
4-(phenylNHC(O)NH-)phenyl,
4-amidinophenyl,
4-methylamidinophenyl,
4-[$CH_3SC(=NH)$-]phenyl,
4-chloro-3-[$H_2NS(O)_2$-]phenyl,
1-naphthyl,
2-naphthyl,
pyridin-2-yl,
pyridin-3-yl,
pyridin-4-yl,
pyrimidin-2-yl,
quinolin-8-yl,
2-(trifluoroacetyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-7-yl,
2-thienyl,
5-chloro-2-thienyl,
2,5-dichloro-4-thienyl,
1-*N*-methylimidazol-4-yl,
1-*N*-methylpyrazol-3-yl,
1-*N*-methylpyrazol-4-yl,
1-*N*-butylpyrazol-4-yl,
1-*N*-methyl-3-methyl-5-chloropyrazol-4-yl,
1-*N*-methyl-5-methyl-3-chloropyrazol-4-yl,
2-thiazolyl and
5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl.

33

Preferably, when A is of the formulae IIa, IIb, IIc, IId, and IIe, and Ar^1 is bound to a polymer moiety, then Ar^1 is of the formula:

$$-Ar^1\text{-}Z\text{-}(CH_2CHR^7O)_pR^8$$

wherein

Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl, and substituted heteroaryl,

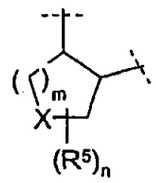
Z is selected from the group consisting of a covalent bond, a linking group of from 1 to 40 atoms, -O-, and $-NR^9-$, where R^9 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl,

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen and methyl;

R^8 is selected from the group consisting of **A**, $-(L)_w$-polymer carrier, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, and $-CH_2CHR^7NR^{10}R^{11}$ where R^7 is as defined above, R^{10} and R^{11} are independently selected from the group consisting of hydrogen and alkyl, **A** is represented by any of formulae IIa through IIh above, L is a linking group of from 1 to 40 atoms and *w* is zero or one: and

p is an integer of from about 100 to 2200, preferably from about 200-1360.

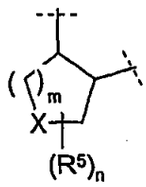
When **A** is of the Formulae IIa or IIf, and R is not bound to a polymer moiety, the substituent of the following formula:



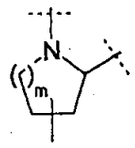
where R^5, X, *m* and *n* are as defined above, is preferably selected from the group consisting of azetidinyl, thiazolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, morpholino, thiomorpholinyl, pyrrolidinyl, 4-hydroxypyrrolidinyl, 4-oxopyrrolidinyl, 4-fluoropyrrolidinyl, 4,4-difluoropyrrolidinyl, 4-(thiomorpholin-4-ylC(O)O-)pyrrolidinyl, 4-[$CH_3S(O)_2O$-]pyrrolidinyl, 3-phenylpyrrolidinyl, 3-thiophenylpyrrolidinyl, 4-amino-pyrrolidinyl, 3-methoxypyrrolidinyl, 4,4-dimethylpyrrolidinyl, 4-*N*-Cbz-piperazinyl, 4-[$CH_3S(O)_2$-]piperazinyl, 5,5-dimethylthiazolindin-4-yl, 1,1-dioxo-thiazolidinyl, 1,1-dioxo-5,5-dimethylthiazolidin-2-yl and 1,1-dioxothiomorpholinyl.

34

Preferably, when **A** is of the formulae IIa and the substituent of the formula:



is bound to the PEG moiety, then preferably the substituent is of the formula:



wherein

m is an integer equal to zero, one or two;

Z is selected from the group consisting of a covalent bond, a linking group of from 1 to 40 atoms, -O-, and $-NR^9-$, where R^9 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl,

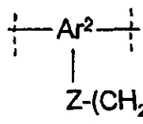
R^7 is selected from the group consisting of hydrogen and methyl;

R^8 is selected from the group consisting of **A**, $-(L)_w$-polymer carrier, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, and $-CH_2CHR^7NR^{10}R^{11}$ where R^7 is as defined above, R^{10} and R^{11} are independently selected from the group consisting of hydrogen and alkyl, **A** is represented by any of formulae IIa through IIh above, L is a linking group of from 1 to 40 atoms and *w* is zero or one: and

p is an integer of from about 100 to 2200, preferably from about 200-1360.

When A is of the formula IIa, IIb, IIc, IId, IIe and when Ar^2 is not bound to a polymer moiety, then preferably Ar^2 is selected from the group consisting of phenyl, substituted phenyl, 2-pyridinyl, 3-pyridinyl, 4-pyridinyl, and 4-pyridin-2-onyl.

When A is of the formula IIa, IIb, IIc, IId, IIe and when Ar^2 is bound to a polymer moiety, then Ar^2 is preferably represented by the formula:



where Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl;

Z is selected from the group consisting of a covalent bond, a linking group of from 1 to 40 atoms, -O-, and $-NR^9-$, where R^9 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl,

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen and methyl;

R^8 is selected from the group consisting of **A**, $-(L)_w$-polymer carrier, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, and $-CH_2CHR^7NR^{10}R^{11}$ where R^7 is as defined above, R^{10} and R^{11} are independently selected from the group consisting of hydrogen and alkyl, **A** is represented by any of formulae IIa through IIh above, L is a linking group of from 1 to 40 atoms and *w* is zero or one: and

p is an integer of from about 100 to 2200, preferably from about 200-1360.

In one preferred embodiment of conjugates prepared by the inventive process, -YC(O)W is $-OC(O)NR^2R^3$.

When A is of the formulae IIa, IIb, or IIc, -YC(O)W is $-OC(O)NR^2R^3$ and neither R^2 nor R^3 are not bound to a polymer moiety, then preferably $-OC(O)NR^2R^3$ is selected from the group consisting of:

$(CH_3)_2NC(O)O-$,
(piperidin-1-yl)-C(O)O-,
(piperidin-4-yl)-C(O)O-,
(1-methylpiperidin-4-yl)-C(O)O-,
(4-hydroxypiperidin-1-yl)-C(O)O-,
(4-formyloxypiperidin-1-yl)-C(O)O-,
(4-ethoxycarbonylpiperidin-1-yl)-C(O)O-,
(4-carboxylpiperidin-1-yl)-C(O)O-,
(3-hydroxymethylpiperidin-1-yl)-C(O)O-,
(4-hydroxymethylpiperidin-1-yl)-C(O)O-,
(4-phenyl-1-Boc-piperidin-4-yl)-C(O)O-,
(4-piperidon-1-yl ethylene ketal)-C(O)O-,
(piperazin-4-yl)-C(O)O-,

36

(1-Boc-piperazin-4-yl)-C(O)O-,
(4-methylpiperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-methylhomopiperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-phenylpiperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1]-yl)-C(O)O-,
(4-(4-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-acetylpiperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-(phenyl-C(O)-)piperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-(pyridin-4'-yl-C(O)-)piperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-(phenyl-NHC(O)-)piperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-(phenyl-NHC(S)-)piperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-methanesulfonylpiperazin-1-yl)-C(O)O-,
(4-trifluoromethanesulfonylpiperazin-1-yl)-C(O)O-,
(morpholin-4-yl)-C(O)O-,
(thiomorpholin-4-yl)-C(O)O-,
(thiomorpholin-4'-yl sulfone)-C(O)O-,
(pyrrolidin-1-yl)-C(O)O-,
(2-methylpyrrolidin-1-yl)-C(O)O-,
(2-(methoxycarbonyl)pyrrolidin-1-yl)-C(O)O-,
(2-(hydroxymethyl)pyrrolidin-1-yl)-C(O)O-,
(2-(N,N-dimethylamino)ethyl)(CH_3)NC(O)O-,
(2-(N-methyl-N-toluene-4-sulfonylamino)ethyl)(CH_3)N-C(O)O-,
(2-(morpholin-4-yl)ethyl)(CH_3)NC(O)O-,
(2-(hydroxy)ethyl)(CH_3)NC(O)O-,
bis(2-(hydroxy)ethyl)NC(O)O-,
(2-(formyloxy)ethyl)(CH_3)NC(O)O-,
($CH_3OC(O)CH_2$)HNC(O)O-, and
2-(phenylNHC(O)O-)ethyl-]HNC(O)O-.

When A is of the formulae IIa, IIb, or IIc, -YC(O)W is $-OC(O)NR^2R^3$ and R^2 and/or R^3 are/is bound to the PEG moiety, the PEG moiety is preferably represented by the formula:

$$-Z'-(CH_2CHR^7O)_pR^8$$

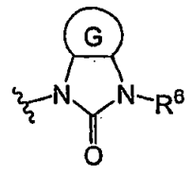
Z' is selected from the group consisting of a covalent bond and a linking group of from 1 to 40 atoms;

R^7 is selected from the group consisting of hydrogen and methyl;

R^8 is selected from the group consisting of **A**, -$(L)_w$-polymer carrier, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, and -$CH_2CHR^7NR^{10}R^{11}$ where R^7 is as defined above, R^{10} and R^{11} are independently selected from the group consisting of hydrogen and alkyl, **A** is represented by formula II above, L is a linking group of from 1 to 40 atoms and *w* is zero or one: and

p is an integer of from about 100 to 2200.

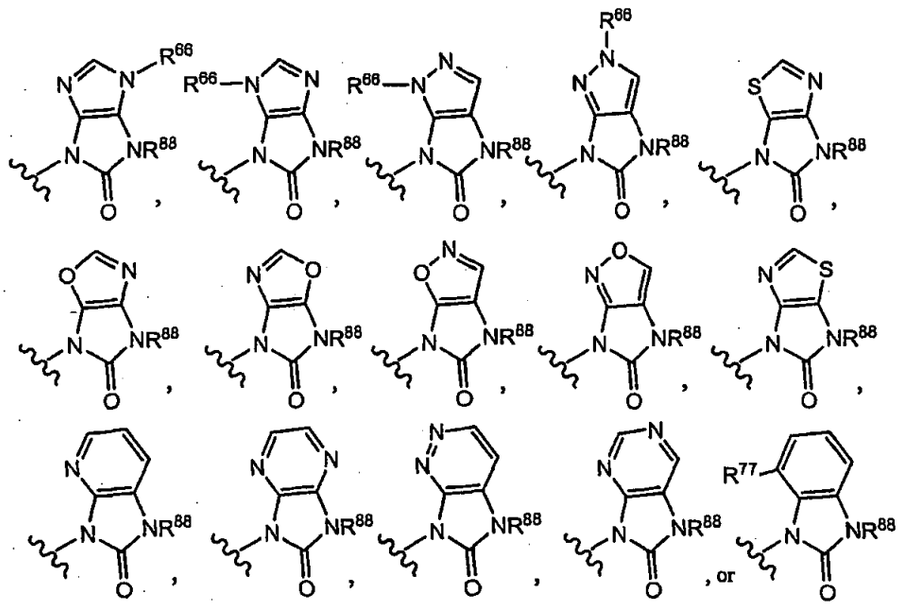
Preferred T groups in Formula II.1 have formula (d) below.



where R^6 is hydrogen.

Preferred (d) groups include those shown below in Table D.

Table D



wherein

R^{66} is a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker, or

R^{66} is hydrogen or straight or branched C_1-C_6alkyl;

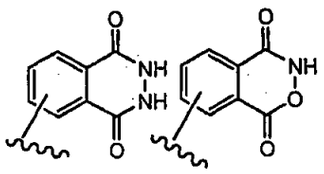
R^{77} is a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker, or

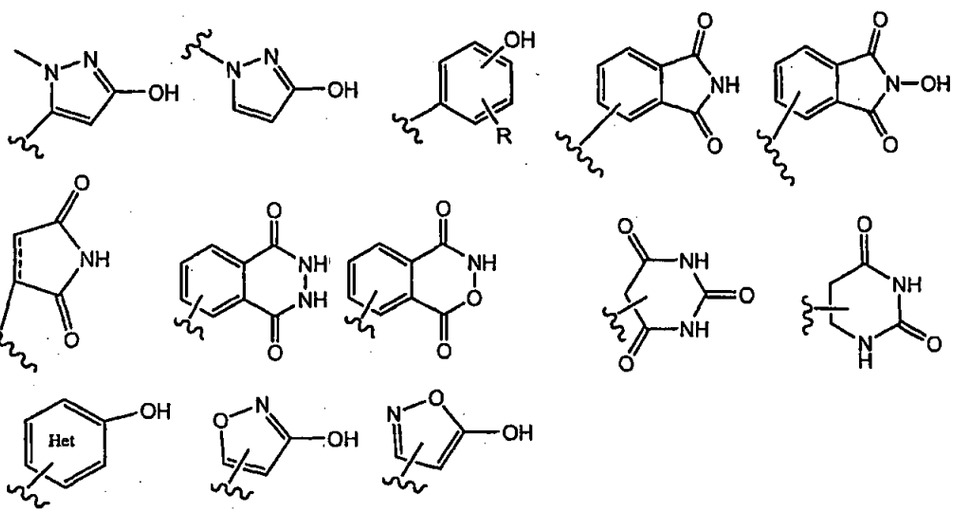
R^{77} is hydrogen, halogen or straight or branched C_1-C_6alkoxy; and

R^{88} is hydrogen.

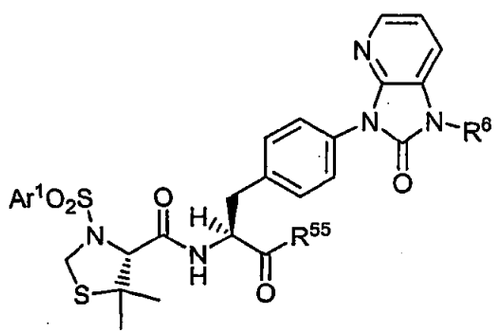
Other (d) groups useful in the invention include those shown in Table D1.

Table D1





Other preferred compounds of formula II.1 for use in the processes of the invention have formula II.1-a:



II.1-a

and pharmaceutically acceptable salts thereof, wherein

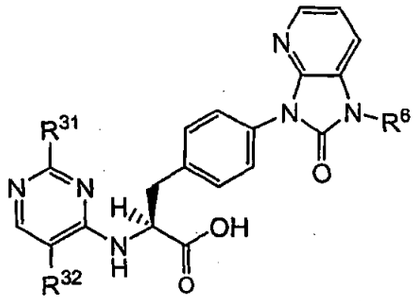
R^{55} is an acid protecting group, preferably C_1-C_6 alkoxy, more preferably C_2-C_4 alkoxy;

Ar^1 is selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heterocyclic, substituted heterocyclic, heteroaryl and substituted heteroaryl; and

R^6 is hydrogen.

Preferred compounds of Formula II.1-a include those wherein Ar^1 is phenyl or a 5- or 6-membered heteroaryl group having at least one nitrogen atom, each of which is optionally substituted with halogen, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkyl, nitro, trifluoromethyl, amino, mono- or di(C_1-C_6)alkylamino, amino(C_1-C_6)alkyl, C_2-C_6 acyl, C_2-C_6 acylamino, or amino(C_1-C_6)acyl. Ar^1 is pyridyl optionally substituted with halogen, hydroxy, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, nitro, trifluoromethyl, amino, mono- or di(C_1-C_6)alkylamino, amino(C_1-C_6)alkyl, C_2-C_6 acyl, C_2-C_6 acylamino, or amino(C_1-C_6)acyl. Particularly preferred compounds of Formula II.1-a include those where Ar^1 is pyridyl optionally substituted with C_1-C_6 alkyl, hydroxy, halogen, C_1-C_6 alkoxy, nitro, trifluoromethyl, amino, or mono- or di(C_1-C_6)alkylamino.

Still other preferred compounds of formula II.1 are also those of the formula II.2-a:



II.2-a

and pharmaceutically acceptable salts thereof, wherein

R^{55} is an acid protecting group, preferably C_1-C_6 alkoxy, more preferably C_2-C_4 alkoxy;

R^6 is hydrogen.

Preferred compounds of Formula II.2-a include those where R^{31} is amino or mono- or di(C_1-C_6)alkylamino; and R^{32} is –H, $-NO_2$ or haloalkyl, more preferably trifluoromethylmethyl.

Still other preferred compounds of Formula II.2-a are those where

R^{31} is amino or mono- or di(C_1-C_6)alkylamino; and

R^{32} is $-N(MR^{41})R^{42}$; where M is $-SO_2-$ or –CO-;

R^{41} is C_1-C_6 alkyl optionally substituted with halogen, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, amino, or mono- or di(C_1-C_6)alkylamino; or

phenyl or a 5- or 6-membered heteroaryl containing at least one nitrogen, each of

which is optionally substituted with halogen, hydroxy, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, C_3-C_7 cycloalkyl, amino, nitro, trifluoromethyl, or mono- or di(C_1-C_6)alkylamino; and

R^{42} is hydrogen, C_1-C_6alkyl, or C_3-C_7cycloalkyl.

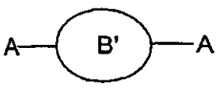
Further preferred compounds of formula II.2-a include those wherein

R^{41} groups within Formula II.2-a are C_1-C_4 alkyl optionally substituted with halogen, hydroxy, C_1-C_6 alkoxy, amino, or mono- or di(C_1-C_6)alkylamino; or

pyridyl or pyrimidinyl, each of which is optionally substituted with halogen, hydroxy, C_1-C_3 alkyl, C_1-C_3 alkoxy, amino, or mono- or di(C_1-C_4)alkylamino; and

R^{42} is hydrogen, C_1-C_4alkyl, or C_3-C_7cycloalkyl.

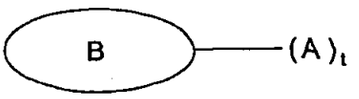
In one example, the conjugates of this invention are divalent and are represented by formula III:



III

where each A is independently as defined above and B' is -Z'-$(CH_2CHR^7O)_p$-Z'- where each Z' is independently a covalent bond or a linking group, R^7 is hydrogen or methyl and p is an integer of from about 100 to 1360.

In another example, the conjugates of this invention are trivalent to decavalent and are preferably represented by formula IV:



IV

where each A is independently as defined above and t is an integer from 3 to 10.

The process of the instant invention employs the Mitsunobu reaction, a condensation reaction of alcohols in the presence of a triaryl- or trialkylphosphine and an appropriate azodicarboxylate. In preferred reactions, polymer alcohols, e.g, polyethylene glycol, are reacted with nucleophiles in the presence of a triaryl- or trialkylphosphine and the diazo reagent to afford the conjugates. Nucleophiles are compounds having an acidic hydrogen, i.e., a moiety suitable to donate electrons. The bond formed by reacting a polymeric alcohol with a nucleophile can be diverse, such as, for example, carbon-oxygen bond formation,

carbon-nitrogen bond formation, carbon-sulfur bond formation, carbon-halogen bond formation, and carbon-carbon bond formation.

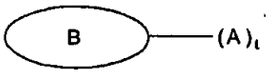
Thus, non-derivatized active compounds can have a wide variety of functional groups that can react with the polymer alcohols. Examples include carboxylic acids, alcohols, β-ketoesters, amines, thiols, alkyl halides, acyl halides, β-diketones and the like. Other examples of nucleophiles that can be utilized in the process of the present invention can be found in *Organic Reactions*, **1992**, *42*, 335-656, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Examples of triaryl- or trialkylphosphines are described in *Synthesis*, **2003**, *3*, 317-334; *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 7787; *Chem. Commun.* **1997**, 759; and *Nucleosides Nucleotides*, **1999**, *18*, 727, all incorporated herein by reference and include triphenylphosphine, trimethylphosphine, triethylphosphine, tributylphosphine, and 1,2-bis-(diphenylphosphino)ethane. The phosphines can also be polymer supported or water soluble. A preferred triarylphosphine is triphenylphosphine.

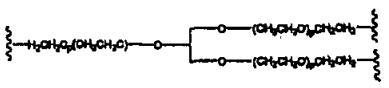
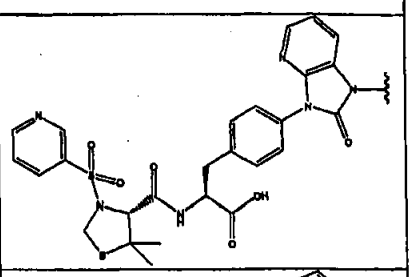
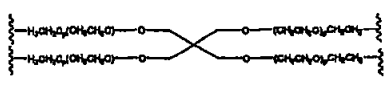
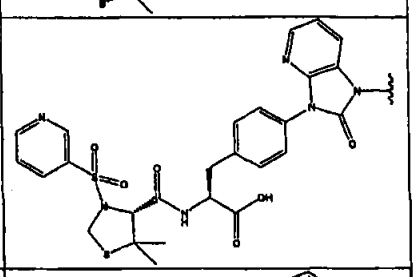
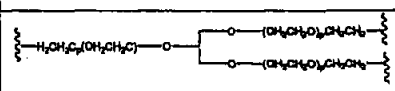
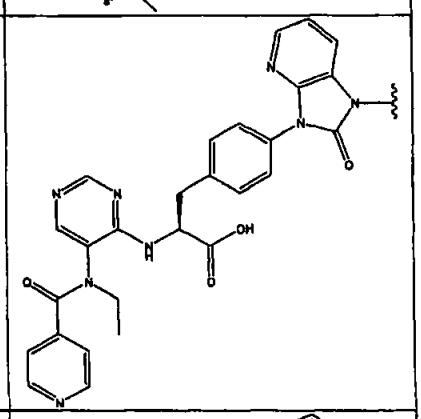
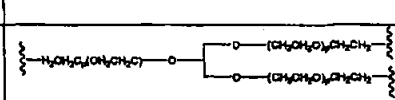
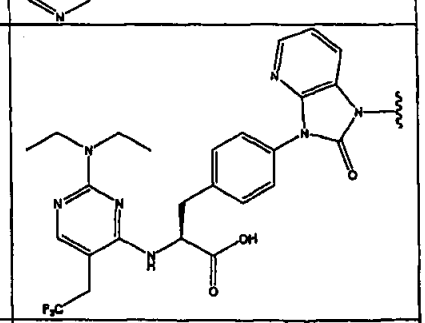
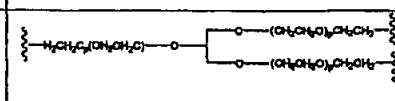
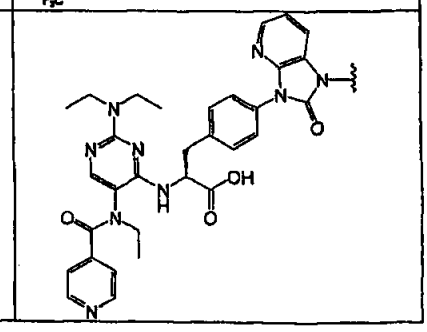
The diazo reagents are generally esters or amides of azodicarboxylic acids, and include those found in *Synthesis*, **2003**, *3*, 317-334; *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 7359; and *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1984**, *57*, 2675. Specific examples of such diazo compounds are diethyldiazocarboxylate, diisopropylazodicarboxylate, 4-methyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione, N,N,N',N'-tetramethylazodicarboxamide, azodicarboxylic acid dipiperidide, bis(N-4 -methylpiperazin-1-yl)azodicarboxamide, dimorpholinoazodicarboxamide and di-tert-butyl azodicarboxylate.

Representative conjugates prepared by the process of the instant invention, including pharmaceutically acceptable salts thereof, are set forth in the following table:

TABLE I



42

Comp.	B	A
A		
B		
C		
D		
E		

cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic and substituted heterocyclic are as defined herein.

"Acyloxy" refers to the groups alkyl-C(O)O-, substituted alkyl-C(O)O-, alkenyl-C(O)O-, substituted alkenyl-C(O)O-, alkynyl-C(O)O-, substituted alkynyl-C(O)O-, aryl-C(O)O-, substituted aryl-C(O)O-, cycloalkyl-C(O)O-, substituted cycloalkyl-C(O)O-, heteroaryl-C(O)O-, substituted heteroaryl-C(O)O-, heterocyclic-C(O)O-, and substituted heterocyclic-C(O)O- wherein alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic and substituted heterocyclic are as defined herein.

"Alkenyl" refers to alkenyl groups having from 2 to 6 carbon atoms and preferably 2 to 4 carbon atoms and having at least 1 and preferably from 1 to 2 sites of alkenyl unsaturation. Such groups are exemplified by vinyl, allyl, but-3-en-1-yl, and the like.

"Substituted alkenyl" refers to alkenyl groups having from 1 to 3 substituents, and preferably 1 to 2 substituents, selected from the group consisting of alkoxy, substituted alkoxy, acyl, acylamino, acyloxy, amino, substituted amino, aminoacyl, aryl, substituted aryl, aryloxy, substituted aryloxy, cyano, halogen, hydroxyl, nitro, carboxyl, carboxyl esters, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, and substituted heterocyclic with the proviso that any hydroxyl substitution is not attached to a vinyl (unsaturated) carbon atom.

"Alkynyl" refers to alkynyl groups having from 2 to 6 carbon atoms and preferably 2 to 3 carbon atoms and having at least 1 and preferably from 1 to 2 sites of alkynyl unsaturation.

"Substituted alkynyl" refers to alkynyl groups having from 1 to 3 substituents, and preferably 1 to 2 substituents, selected from the group consisting of alkoxy, substituted alkoxy, acyl, acylamino, acyloxy, amino, substituted amino, aminoacyl, aryl, substituted aryl, aryloxy, substituted aryloxy, cyano, halogen, hydroxyl, nitro, carboxyl, carboxyl esters, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, and substituted heterocyclic.

"Amino" refers to the group $-NH_2$.

"Cyano" refers to the group –CN.

"Substituted amino" refers to the group –NR'R" where R' and R" are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic and where R' and R" are joined, together with the nitrogen bound thereto to form a heterocyclic or substituted heterocyclic group provided that R' and R" are both not hydrogen. When R' is hydrogen and R" is alkyl, the substituted amino group is sometimes referred to herein as alkylamino. When

R' and R" are alkyl, the substituted amino group is sometimes referred to herein as dialkylamino. When referring to a monosubstituted amino, it is meant that either R' or R" is hydrogen but not both. When referring to a disubstituted amino, it is meant that neither R' or R" is hydrogen.

"Aminoacyl" refers to the groups $-NR^{11}C(O)$alkyl, $-NR^{11}C(O)$substituted alkyl, $-NR^{11}C(O)$cycloalkyl, $-NR^{11}C(O)$substituted cycloalkyl, $-NR^{11}C(O)$alkenyl, $-NR^{11}C(O)$substituted alkenyl, $-NR^{11}C(O)$alkynyl, $-NR^{11}C(O)$substituted alkynyl, $-NR^{11}C(O)$aryl, $-NR^{11}C(O)$substituted aryl, $-NR^{11}C(O)$heteroaryl, $-NR^{11}C(O)$substituted heteroaryl, $-NR^{11}C(O)$heterocyclic, and $-NR^{11}C(O)$substituted heterocyclic where R^{11} is hydrogen or alkyl and wherein alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic and substituted heterocyclic are as defined herein.

"Nitro" refers to the group $-NO_2$.

"Aryl" or "Ar" refers to a monovalent aromatic carbocyclic group of from 6 to 14 carbon atoms having a single ring (*e.g.*, phenyl) or multiple condensed rings (*e.g.*, naphthyl or anthryl) which condensed rings may or may not be aromatic (*e.g.*, 2-benzoxazolinone, 2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one-7-yl, and the like) provided that the point of attachment is at an aromatic carbon atom. Preferred aryls include phenyl and naphthyl.

"Substituted aryl" refers to aryl groups which are substituted with from 1 to 3 substituents, and preferably 1 to 2 substituents, selected from the group consisting of hydroxy, acyl, acylamino, acyloxy, alkyl, substituted alkyl, alkoxy, substituted alkoxy, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, amino, substituted amino, aminoacyl, aryl, substituted aryl, aryloxy, substituted aryloxy, carboxyl, carboxyl esters, cyano, thiol, thioalkyl, substituted thioalkyl, thioaryl, substituted thioaryl, thioheteroaryl, substituted thioheteroaryl, thiocycloalkyl, substituted thiocycloalkyl, thioheterocyclic, substituted thioheterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, halo, nitro, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, heteroaryloxy, substituted heteroaryloxy, heterocyclyloxy, substituted heterocyclyloxy, amino sulfonyl (NH_2-SO_2-), and substituted amino sulfonyl.

"Aryloxy" refers to the group aryl-O- that includes, by way of example, phenoxy, naphthoxy, and the like.

"Substituted aryloxy" refers to substituted aryl-O- groups.

"Carboxyl" refers to –COOH or salts thereof.

"Carboxyl ester" refers to the groups –C(O)O-alkyl, –C(O)O-substituted alkyl, -C(O)-aryl, and -C(O)O-substituted aryl wherein alkyl, substituted alkyl, aryl and substituted aryl are as defined herein.

"Cycloalkyl" refers to cyclic alkyl groups of from 3 to 10 carbon atoms having single or multiple cyclic rings including, by way of example, adamantyl, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclooctyl and the like.

"Cycloalkenyl" refers to cyclic alkenyl groups of from 4 to 10 carbon atoms having single or multiple cyclic rings and further having at least 1 and preferably from 1 to 2 internal sites of ethylenic or vinyl (>C=C<) unsaturation.

"Substituted cycloalkyl" and "substituted cycloalkenyl" refers to an cycloalkyl or cycloalkenyl group, having from 1 to 5 substituents selected from the group consisting of oxo (=O), thioxo (=S), alkoxy, substituted alkoxy, acyl, acylamino, acyloxy, amino, substituted amino, aminoacyl, aryl, substituted aryl, aryloxy, substituted aryloxy, cyano, halogen, hydroxyl, nitro, carboxyl, carboxyl esters, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, and substituted heterocyclic.

"Cycloalkoxy" refers to -O-cycloalkyl groups.

"Substituted cycloalkoxy" refers to -O-substituted cycloalkyl groups.

"Halo" or "halogen" refers to fluoro, chloro, bromo and iodo and preferably is fluoro or chloro.

"Hydroxy" refers to the group –OH.

"Heteroaryl" refers to an aromatic group of from 1 to 10 carbon atoms and 1 to 4 heteroatoms selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur within the ring. Such heteroaryl groups can have a single ring (*e.g.*, pyridinyl or furyl) or multiple condensed rings (*e.g.*, indolizinyl or benzothienyl) wherein the condensed rings may or may not be aromatic and/or contain a heteroatom provided that the point of attachment is through an atom of the aromatic heteroaryl group. Preferred heteroaryls include pyridinyl, pyrrolyl, indolyl, thiophenyl, and furanyl.

"Substituted heteroaryl" refers to heteroaryl groups that are substituted with from 1 to 3 substituents selected from the same group of substituents defined for substituted aryl.

"Heteroaryloxy" refers to the group -O-heteroaryl and "substituted heteroaryloxy" refers to the group -O-substituted heteroaryl.

"Heterocycle" or "heterocyclic" or "heterocycloalkyl" or "heterocyclyl" refers to a saturated or unsaturated group having a single ring or multiple condensed rings, from 1 to 10 carbon atoms and from 1 to 4 hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, sulfur or oxygen within the ring wherein, in fused ring systems, one or more the rings can be cycloalkyl, aryl or heteroaryl provided that the point of attachment is through the heterocyclic ring.

"Substituted heterocyclic" or "substituted heterocycloalkyl" or "substituted heterocyclyl" refers to heterocyclyl groups that are substituted with from 1 to 3 of the same substituents as defined for substituted cycloalkyl.

Examples of heterocyclyls and heteroaryls include, but are not limited to, azetidine, pyrrole, imidazole, pyrazole, pyridine, pyrazine, pyrimidine, pyridazine, indolizine, isoindole, indole, dihydroindole, indazole, purine, quinolizine, isoquinoline, quinoline, phthalazine, naphthylpyridine, quinoxaline, quinazoline, cinnoline, pteridine, carbazole, carboline, phenanthridine, acridine, phenanthroline, isothiazole, phenazine, isoxazole, phenoxazine, phenothiazine, imidazolidine, imidazoline, piperidine, piperazine, indoline, phthalimide, 1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline, 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophene, thiazole, thiazolidine, thiophene, benzo[b]thiophene, morpholinyl, thiomorpholinyl (also referred to as thiamorpholinyl), piperidinyl, pyrrolidine, tetrahydrofuranyl, and the like.

"Thiol" refers to the group -SH.

"Thioalkyl" or "alkylthioether" or "thioalkoxy" refers to the group -S-alkyl.

"Substituted thioalkyl" or "substituted alkylthioether" or "substituted thioalkoxy" refers to the group -S-substituted alkyl.

"Thioaryl" refers to the group –S-aryl, where aryl is defined above.

"Substituted thioaryl" refers to the group –S-substituted aryl, where substituted aryl is defined above.

"Thioheteroaryl" refers to the group –S-heteroaryl, where heteroaryl is as defined above.

"Substituted thioheteroaryl" refers to the group –S-substituted heteroaryl, where substituted thioheteroaryl is defined above.

"Thioheterocyclic" refers to the group -S-heterocyclic and "substituted thioheterocyclic" refers to the group -S-substituted heterocyclic, where heterocyclic and substituted heterocyclic.

"Heterocyclyloxy" refers to the group heterocyclyl-O- and "substituted heterocyclyl-O- refers to the group substituted heterocyclyl-O- where heterocyclyl and substituted heterocyclyl are as defined above.

"Thiocycloalkyl" refers to the group –S-cycloalkyl and "substituted thiocycloalkyl" refers to the group –S-substituted cycloalkyl, where cycloalkyl and substituted cycloalkyl are as defined above.

The terms "compound" and "active compound" are used to refer to the VLA-4 antagonist portion of a conjugate of the invention or to a VLA-4 antagonist as it exists prior to conjugation to a polymer.

The terms "Linker", "linking group" or "linker of from 1 to 40 atoms" refer to a group or groups that (1) covalently links the polymer to the active compound and/or (2) covalently link the polyalkylene oxide moieties of a polymer one to another. Within any particular conjugate, the linker connecting the polyalkylene oxide moieties of a polymer together, and the linker bonding a polymer to an active compound may be the same or different (i.e., may have the same or different chemical structures). Representative functional group linkages, of which a linking group may have one or more, are amides, ethers, carbamates, thiocarbamates, ureas, thioureas, amino groups, carbonyl groups, alkoxy groups, etc. The linker may be homogenous or heterogeneous in its atom content (e.g., linkers containing only carbon atoms or linkers containing carbon atoms as well as one or more heteroatoms present on the linker. Preferably, the linker contains 1 to 25 carbon atoms and 0 to 15 heteroatoms selected from oxygen, NR^{22}, sulfur, -S(O)- and $-S(O)_2-$, where R^{22} is as defined above. The linker may also be chiral or achiral, linear, branched or cyclic.

Intervening between the functional group linkages or bonds within the linker, the linker may further contain spacer groups including, but not limited to, spacers selected from alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, and combinations thereof. The spacer may be homogenous or heterogeneous in its atom content (e.g., spacers containing only carbon atoms or spacers containing carbon atoms as well as one or more heteroatoms present on the spacer. Preferably, the spacer contains 1 to 25 carbon atoms and 0 to 15 heteroatoms selected from oxygen, NR^{22}, sulfur, -S(O)- and $-S(O)_2-$, where R^{22} is as defined above. The spacer may also be chiral or achiral, linear, branched or cyclic.

Non-limiting examples of spacers are straight or branched alkylene chains, phenylene, biphenylene, etc. rings, all of which are capable of carrying one or more than one functional group capable of forming a linkage with the active compound and one or more polyalkylene oxide moieties. One particular example of a polyfunctional linker-spacer group is lysine, which may link any of the active compounds to two polymer moieties via the two amino groups substituted on a C_4 alkylene chain. Other non-limiting examples include p-aminobenzoic acid and 3,5-diaminobenzoic acid which have 2 and 3 functional groups respectively available for linkage formation. Other such polyfunctional linkage plus spacer groups can be readily envisaged by one of skill in the art.

The term "polymer" refers to biocompatible, water-soluble, substantially non-immunogenic, polymers which are capable of being coupled to more than one VLA-4 antagonists of formula II. Preferably the polymer is non-ionic and biocompatible as measured by lack of toxicity at the doses used. Inclusive of such polymers are multiple copies of polymers coupled to a carrier.

Examples of suitable polymers include, but are not limited to: polyoxyalkylene polymers such as polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone (PVP), polyacrylamide (PAAm), polydimethylacrylamide (PDAAm), polyvinyl alcohol (PVA), dextran, poly (L-glutamic acid) (PGA), styrene maleic anhydride (SMA), poly-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA), polydivinylether maleic anhydride (DIVEMA) (Kameda, Y. et al., Biomaterials 25: 3259-3266, 2004; Thanou, M. et al, Current Opinion in Investigational Drugs 4(6): 701-709, 2003; Veronese, F.M., et al., Il Farmaco 54: 497-516, 1999).

Preferred polymers are polyoxyalkylenes. By "polyoxyalkylenes" is meant macromolecules that include at least one polyalkylene oxide portion that is optionally covalently bonded to one or more additional polyakylene oxides, wherein the polyalkylene oxides are the same or different. Non-limiting examples include polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol (PPG), polyisopropylene glycol (PIPG), PEG-PEG, PEG-PPG, PPG-PIPG, and the like. Also included within the definition of polyoxyalkylenes are macromolecules wherein the polyalkylene oxide portions are optionally connected to each other by a linker. Illustrative examples are PEG-linker-PEG, PEG-linker-PIPG, and the like. More specific examples include the commercially available poly[di(ethylene glycol)adipates, poly[di(ethylene glycol)phthalate diols, and the like. Other examples are block copolymers of oxyalkylene, polyethylene glycol, polypropylene glycol, and polyoxyethylenated polyol units.

At at least one of its termini, the polymer is covalently attached to non-polymer substituted compound of Formula II optionally through a linker using the process of the instant invention providing for covalent linkage of the polymer to the non-polymer substituted compound of Formula II.

When a linker is employed, the linker is covalently bonded to at least one of the polymer termini which, in turn, is covalently attached to the otherwise, non-polymer substituted compound of Formula II. It is understood, of course, that if the appropriate substituents are found on the non-polymer substituted compound of Formula II then the optional linker may not be needed as there can be direct linkage of the polymer to the non-polymer substituted compound of Formula II.

Preferred linkers include, by way of example, the following -O-, -NR^{22}-, -$NR^{22}C(O)O$-, -$OC(O)NR^{22}$-, -$NR^{22}C(O)$-, -$C(O)NR^{22}$-, -$NR^{22}C(O)NR^{22}$-, -alkylene-$NR^{22}C(O)O$-, -alkylene-$NR^{22}C(O)NR^{22}$-, -alkylene-$OC(O)\ NR^{22}$-, -alkylene-NR^{22}-, -alkylene-O-, -alkylene-$NR^{22}C(O)$-, -alkylene-$C(O)NR^{22}$-, -$NR^3C(O)O$-alkylene-, -$NR^{22}C(O)NR^{22}$-alkylene-, -$OC(O)\ NR^{22}$-alkylene, -NR^{22}-alkylene-, -O-alkylene-, -$NR^{22}C(O)$-alkylene-, -$C(O)NR^{22}$-alkylene-, -alkylene-$NR^{22}C(O)O$-alkylene-, -alkylene-$NR^3C(O)NR^{22}$-alkylene-, -alkylene-$OC(O)NR^{22}$-alkylene-, -alkylene-NR^{22}-alkylene-, alkylene-O-alkylene-, -alkylene-$NR^{22}C(O)$-alkylene-, -$C(O)NR^{22}$-alkylene-, and



where

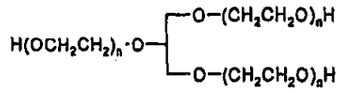
 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic and substituted heterocyclic, and D and E are independently selected from the group consisting of a bond, -O-, CO, -NR^{22}-, -NR^{22}C(O)O-, -OC(O)NR^{22}-, -NR^{22}C(O)-, -C(O)NR^{22}-, -NR^{22}C(O)NR^{22}-, -alkylene-NR^{22}C(O)O-, -alkylene-NR^{22}C(O)NR^{22}-, -alkylene-OC(O) NR^{22}-, -alkylene-NR^{22}-, -alkylene-O-, -alkylene-NR^{22}C(O)-, alkylene-C(O)NR^{22}-, -NR^{22}C(O)O-alkylene-, -NR^{22}C(O)NR^{22}-alkylene-, -OC(O) NR^{22}-alkylene-, -NR^{22}-alkylene-, -O-alkylene-, -NR^{22}C(O)-alkylene-, -C(O)NR^{22}-alkylene-, -alkylene-NR^{22}C(O)O-alkylene-, -alkylene-NR^{22}C(O)NR^{22}-alkylene-, -alkylene-OC(O) NR^{22}-alkylene-, -alkylene-NR^{22}-alkylene-, alkylene-O-alkylene-, -alkylene-NR^{22}C(O)-alkylene-, and -C(O)NR^{22}-alkylene-, where R^{22} is as defined above.

Preferred alkylene groups in the above linkers include C_1-C_{15} alkylene groups, more preferably C_1-C_6 alkylene groups, and most preferably C_1-C_3 alkylene groups. Preferred heterocyclic groups include piperazinyl, piperidinyl, homopiperazinyl, homopiperidinyl, pyrrolidinyl, and imidazolidinyl.

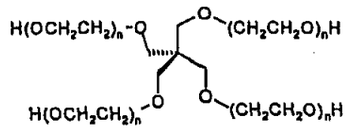
The conjugates of the invention may be incorporated into a carrier which may have from 1 to 19 additional conjugates bound thereto. The term "carrier" refers to an optional component or scaffold to which multiple conjugates can be bound and which when incorporated into the conjugates of this invention do not impart either substantial immunogenicity or toxicity. Such carriers are preferably mono- to decavalent materials containing multiple functionalities for polymer attachment. The functionalities can be homogeneous or heterogeneous; although homogeneous functionalities are preferred.

Examples of commercially available carriers comprising homogeneous functionalities include, by way of example only, catechol, resorcinol, 1,2-phenylenediamine, 1,3-phenylenediamine, 1,4-phenylenediamine; phthalic acid, isophthalic acid, 1,3-propanediol, glycerol, 1,2,4-benzenetriol, pentaerythritol, glucose (in its pyranose form), 1,3-phenylene diisocyanate, 1,4-phenylene diisocyanate, isophthalaldehyde, phthalaldehyde, 1,3-cyclopentanediol, ethylene diamine, ethylenediamine tetraacetic acid, and the like.

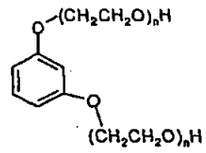
Representative structures useful as carriers or scaffolds include the following (where PEG is used for representative purposes only):



tri-PEG-glycerol



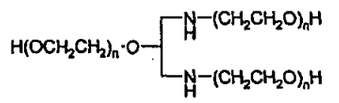
tetra-PEG-pentaerythritol



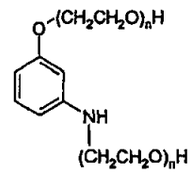
di-PEG resorcinol

Examples of commercially available carriers comprising heterogeneous functionalities include, by the way of example only, 6-hydroxycaproic acid, amino acids, salicylic acid, 3- or 4-aminosalicylic acid, 1,3-diamino-2-hydroxypropane, 2-aminoethanol, 3-aminopropanol, glucosamine, sialic acid, amino acids, and the like.

Representative structures arising from polymer attachment using such carriers or scaffolds include the following (where PEG is used for representative purposes only):

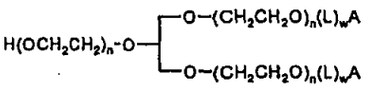


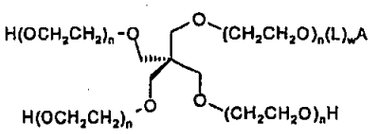
tri-PEG-1,3-diamino-2-hydroxypropane

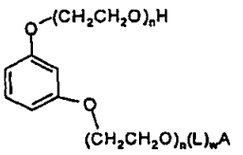


di-PEG 3-aminophenol

The carrier can optionally contain one or more copies of A bound to the carrier optionally through a linker provided that there is at least one further functional group which can bind to a further copy of A. For example, each of the following structures is deemed a carrier or scaffold because there is at least one additional functional group for binding of an additional A substituent:







where L, *w* and A are as defined above.

The term "oxyalkylene" refers to $-OCH_2CHR^d-$ where R^d is alkyl. Polymerized oxyalkylenes are referred to as polyoxyalkylenes, polyalkylene oxides or polyalkylene glycols, non-limiting examples of which include PEG, poly propylene glycol, polybutylene glycol, polyisopropylene glycol, and the like.

Such polymers are optionally mono-capped with a substituent preferably selected from alkyl, aryl, substituted alkyl, substituted aryl and a carrier as described above. Inclusive of such polymers are those diamino capped polyoxyalkylene polymers which are known in the art as Jeffamines®. Still further, such polymers can optionally contain one or more non-oxyalkylene units such as the commercially available poly[di(ethylene glycol)adipates, poly[di(ethylene glycol)phthalate diols, and the like. Also included are block copolymers of oxyalkylene, polyethylene glycol, polypropylene glycol, and polyoxyethylenated polyol units.

Polyoxyalkylenes, such as PEG, are usually provided as a water soluble, waxy solid. Generally, as the polymer's molecular weight increases, its viscosity and freezing point also

increase. Commercial preparations are usually characterized by the "average molecular weight" of the constituent polymers.

Typically, the average molecular weight of the total amount of polymer arising from single or multiple polymer moieties in the conjugates of the invention is between about 100 to 100,000; preferably from about 10,000 to 80,000; more preferably from about 20,000 to about 70,000.

Similarly, other suitable polymers such polyvinylpyrrolidone (PVP), polyacrylamide (PAAm), polydimethylacrylamide (PDAAm), polyvinyl alcohol (PVA), dextran, poly (L-glutamic acid) (PGA), styrene maleic anhydride (SMA), poly-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA), polydivinylether maleic anhydride (DIVEMA) are well known in the art and have molecular weights of from about 100 to 100,000; preferably from about 10,000 to 80,000; more preferably from about 20,000 to about 70,000.

"Pharmaceutically acceptable salt" refers to salts which retain the biological effectiveness and properties of the compounds of this invention and which are not biologically or otherwise undesirable. In many cases, the compounds of this invention are capable of forming acid and/or base salts by virtue of the presence of amino and/or carboxyl groups or groups similar thereto.

Pharmaceutically-acceptable base addition salts can be prepared from inorganic and organic bases. Salts derived from inorganic bases, include by way of example only, sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium and magnesium salts. Salts derived from organic bases include, but are not limited to, salts of primary, secondary and tertiary amines, such as alkyl amines, dialkyl amines, trialkyl amines, substituted alkyl amines, di(substituted alkyl) amines, tri(substituted alkyl) amines, alkenyl amines, dialkenyl amines, trialkenyl amines, substituted alkenyl amines, di(substituted alkenyl) amines, tri(substituted alkenyl) amines, cycloalkyl amines, di(cycloalkyl) amines, tri(cycloalkyl) amines, substituted cycloalkyl amines, disubstituted cycloalkyl amine, trisubstituted cycloalkyl amines, cycloalkenyl amines, di(cycloalkenyl) amines, tri(cycloalkenyl) amines, substituted cycloalkenyl amines, disubstituted cycloalkenyl amine, trisubstituted cycloalkenyl amines, aryl amines, diaryl amines, triaryl amines, heteroaryl amines, diheteroaryl amines, triheteroaryl amines, heterocyclic amines, diheterocyclic amines, triheterocyclic amines, mixed di- and tri-amines where at least two of the substituents on the amine are different and are selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, cycloalkenyl, substituted cycloalkenyl, aryl, heteroaryl, heterocyclic, and the like. Also included are amines where the two or three substituents, together with the amino nitrogen, form a heterocyclic or heteroaryl group.

Examples of suitable amines include, by way of example only, isopropylamine,

54

trimethyl amine, diethyl amine, tri(iso-propyl) amine, tri(n-propyl) amine, ethanolamine, 2-dimethylaminoethanol, tromethamine, lysine, arginine, histidine, caffeine, procaine, hydrabamine, choline, betaine, ethylenediamine, glucosamine, N-alkylglucamines, theobromine, purines, piperazine, piperidine, morpholine, N-ethylpiperidine, and the like. It should also be understood that other carboxylic acid derivatives would be useful in the practice of this invention, for example, carboxylic acid amides, including carboxamides, lower alkyl carboxamides, dialkyl carboxamides, and the like.

Pharmaceutically acceptable acid addition salts may be prepared from inorganic and organic acids. Salts derived from inorganic acids include hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid, and the like. Salts derived from organic acids include acetic acid, propionic acid, glycolic acid, pyruvic acid, oxalic acid, malic acid, malonic acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, mandelic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, p-toluene-sulfonic acid, salicylic acid, and the like.

The term "pharmaceutically-acceptable cation" refers to the cation of a pharmaceutically-acceptable salt.

It is understood that in all substituted groups defined herein, polymers arrived at by defining substituents with further substituents to themselves (*e.g.*, substituted aryl having a substituted aryl group as a substituent which is itself substituted with a substituted aryl group, etc.) are not intended for inclusion herein. In such cases, the maximum number of such substituents is three. That is to say that each of the above definitions is constrained by a limitation that, for example, substituted aryl groups are limited to -substituted aryl-(substituted aryl)-(substituted aryl).

Similarly, it is understood that the above definitions are not intended to include impermissible substitution patterns (*e.g.*, methyl substituted with 5 fluoro groups or a hydroxyl group alpha to ethenylic or acetylenic unsaturation). Such impermissible substitution patterns are well known to the skilled artisan.

Compound Preparation

The starting active compounds employed in the process of this invention can be prepared from readily available starting materials using known procedures and readily available starting materials or, where the starting material is not known or commercially available, such materials can readily be prepared using literature procedures. It will be appreciated that where typical or preferred process conditions (*i.e.*, reaction temperatures, times, mole ratios of reactants, solvents, pressures, etc.) are given, other process conditions can also be used unless otherwise stated. Optimum reaction conditions may vary with the

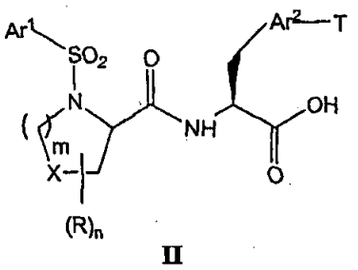
50

particular reactants or solvent used, but such conditions can be determined by one skilled in the art by routine optimization procedures.

Additionally, as will be apparent to those skilled in the art, conventional protecting groups may be necessary to prevent certain functional groups from undergoing undesired reactions. Suitable protecting groups for various functional groups as well as suitable conditions for protecting and deprotecting particular functional groups are well known in the art. For example, numerous protecting groups are described in T. W. Greene and G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, Wiley, New York, 1991, and references cited therein.

Furthermore, the compounds of this invention will typically contain one or more chiral centers. Accordingly, if desired, such compounds can be prepared or isolated as pure stereoisomers, *i.e.*, as individual enantiomers or diastereomers, or as stereoisomer-enriched mixtures. All such stereoisomers (and enriched mixtures) are included within the scope of this invention, unless otherwise indicated. Pure stereoisomers (or enriched mixtures) may be prepared using, for example, optically active starting materials or stereoselective reagents well-known in the art. Alternatively, racemic mixtures of such compounds can be separated using, for example, chiral column chromatography, chiral resolving agents and the like.

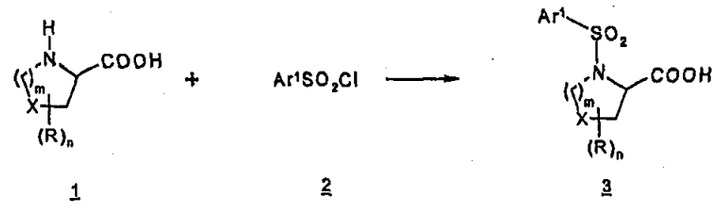
Preferred conjugates prepared according to this invention comprise a polymer moiety/optional carrier containing about 1 to about 100 substituents of Formula II:



II

Specifically, the polymer moiety can be bound through a covalent bond to the Ar^1 substituent, the R substituent, the Ar^2 substituent and/or in the T substituent wherein the polymer moiety is either directly attached or is attached via a linker. In turn, the polymer moiety may optionally be bound to a carrier having multiple copies of the polymer attached thereto.

Compounds of Formula II can be prepared by first coupling a heterocyclic amino acid, 1, with an appropriate aryl sulfonyl chloride as illustrated in Scheme 1 below:



1 2 3

Scheme 1

where R, Ar^1, X, *m* and *n* are as defined above.

Specifically, in Scheme 1 above, heterocyclic amino acid, 1, is combined with a stoichiometric equivalent or excess amount (preferably from about 1.1 to about 2 equivalents) of arylsulfonyl halide, 2, in a suitable inert diluent such as dichloromethane and the like. Generally, the reaction is conducted at a temperature ranging from about -70°C to about 40°C until the reaction is substantially complete, which typically occurs within 1 to 24 hours. Preferably, the reaction is conducted in the presence of a suitable base to scavenge the acid generated during the reaction. Suitable bases include, by way of example, tertiary amines, such as triethylamine, diisopropylethylamine, N-methyl-morpholine and the like. Alternatively, the reaction can be conducted under Schotten-Baumann-type conditions using an aqueous alkali solution such as an aqueous solution of sodium hydroxide, an aqueous phosphate solution buffered to pH 7.4, and the like. The resulting product, 3, can be recovered by conventional methods, such as chromatography, filtration, evaporation, crystallization, and the like or, alternatively, used in the next step without purification and/or isolation.

Heterocyclic amino acids, 1, employed in the above reaction are either known compounds or compounds that can be prepared from known compounds by conventional synthetic procedures. Examples of suitable amino acids for use in this reaction include, but are not limited to, L-proline, *trans*-4-hydroxyl-L-proline, *cis*-4-hydroxyl-L-proline, *trans*-3-phenyl-L-proline, *cis*-3-phenyl-L-proline, L-(2-methyl)proline, L-pipecolinic acid, L-azetidine-2-carboxylic acid, L-thiazolidine-4-carboxylic acid, L-(5,5-dimethyl)thiazolidine-4-carboxylic acid, L-thiamorpholine-3-carboxylic acid. If desired, the corresponding carboxylic acid esters of the amino acids, 1, such as the methyl esters, ethyl esters, *t*-butyl esters, and the like, can be employed in the above reaction with the arylsulfonyl chloride. Subsequent hydrolysis of the ester group to the carboxylic acid using conventional reagents and conditions, *i.e.*, treatment with an alkali metal hydroxide in an inert diluent such as methanol/water, then provides the N-sulfonyl amino acid, 3.

Similarly, the arylsulfonyl chlorides, 2, employed in the above reaction are either known compounds or compounds that can be prepared from known compounds by conventional synthetic procedures. Such compounds are typically prepared from the corresponding sulfonic acid, *i.e.*, from compounds of the formula Ar^1SO_3H where Ar^1 is as

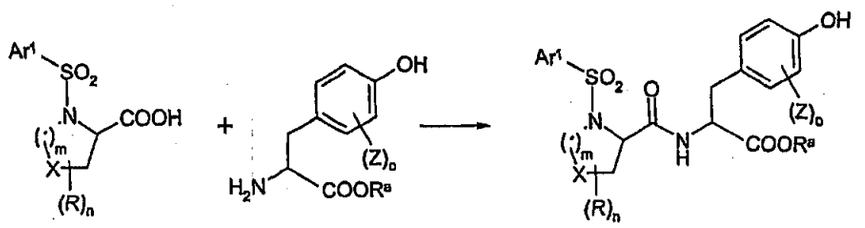
defined above, using phosphorous trichloride and phosphorous pentachloride. This reaction is generally conducted by contacting the sulfonic acid with about 2 to 5 molar equivalents of phosphorous trichloride and phosphorous pentachloride, either neat or in an inert solvent, such as dichloromethane, at temperature in the range of about 0°C to about 80°C for about 1 to about 48 hours to afford the sulfonyl chloride. Alternatively, the arylsulfonyl chlorides, 2, can be prepared from the corresponding thiol compound, *i.e.*, from compounds of the Ar^1-SH where Ar^1 is as defined herein, by treating the thiol with chlorine (Cl_2) and water under conventional reaction conditions.

Alternatively, arylsulfonyl chlorides, 2, employed in the above reaction may be prepared by chlorosulfonylation of substituted benzene or heterocycloalkyl group using Cl-SO_3H.

Examples of arylsulfonyl chlorides suitable for use in this invention include, but are not limited to, benzenesulfonyl chloride, 1-naphthalenesulfonyl chloride, 2-naphthalenesulfonyl chloride, p-toluenesulfonyl chloride, *o*-toluenesulfonyl chloride, 4-acetamidobenzenesulfonyl chloride, 4-*tert*-butylbenzenesulfonyl chloride, 4-bromobenzenesulfonyl chloride, 2-carboxybenzenesulfonyl chloride, 4-cyanobenzenesulfonyl chloride, 3,4-dichlorobenzenesulfonyl chloride, 3,5-dichlorobenzenesulfonyl chloride, 3,4-dimethoxybenzenesulfonyl chloride, 3,5-ditrifluoromethylbenzenesulfonyl chloride, 4-fluorobenzenesulfonyl chloride, 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, 2-methoxycarbonylbenzenesulfonyl chloride, 4-methylamido-benzenesulfonyl chloride, 4-nitrobenzenesulfonyl chloride, 4-trifluoromethyl-benzenesulfonyl chloride, 4-trifluoromethoxybenzenesulfonyl chloride, 2,4,6-trimethylbenzenesulfonyl chloride, 2-thiophenesulfonyl chloride, 5-chloro-2-thiophenesulfonyl chloride, 2,5-dichloro-4-thiophenesulfonyl chloride, 2-thiazolesulfonyl chloride, 2-methyl-4-thiazolesulfonyl chloride, 1-methyl-4-imidazolesulfonyl chloride, 1-methyl-4-pyrazolesulfonyl chloride, 5-chloro-1,3-dimethyl-4-pyrazolesulfonyl chloride, 3-pyridinesulfonyl chloride, 2-pyrimidinesulfonyl chloride and the like. If desired, a sulfonyl fluoride, sulfonyl bromide or sulfonic acid anhydride may be used in place of the sulfonyl chloride in the above reaction to form the N-sulfonyl amino acid, 3.

The N-arylsulfonyl amino acid, 3, is then coupled to commercially available tyrosine esters as shown in Scheme 2 below:

58



3 4 5

Scheme 2

where R, Ar^1, X, *m* and *n* are as defined above, R^a is hydrogen or alkyl but preferably is an alkyl group such as *t*-butyl, Z represents optional substitution on the aryl ring and o is zero, one or two.

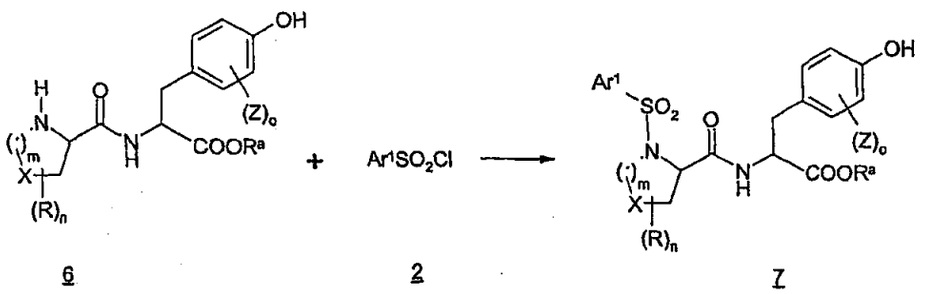
This coupling reaction is typically conducted using well-known coupling reagents such as carbodiimides, BOP reagent (benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphonate) and the like. Suitable carbodiimides include, by way of example, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC) and the like. If desired, polymer supported forms of carbodiimide coupling reagents may also be used including, for example, those described in *Tetrahedron Letters*, 34(48), 7685 (1993). Additionally, well-known coupling promoters, such as N-hydroxysuccinimide, 1-hydroxybenzotriazole and the like, may be used to facilitate the coupling reaction.

This coupling reaction is typically conducted by contacting the N-sulfonylamino acid, 3, with about 1 to about 2 equivalents of the coupling reagent and at least one equivalent, preferably about 1 to about 1.2 equivalents, of tyrosine derivative, 4, in an inert diluent, such as dichloromethane, chloroform, acetonitrile, tetrahydrofuran, N,N-dimethylformamide and the like. Generally, this reaction is conducted at a temperature ranging from about 0°C to about 37°C for about 12 to about 24 hours. Upon completion of the reaction, the compound 5 is recovered by conventional methods including neutralization, evaporation, extraction, precipitation, chromatography, filtration, and the like.

Alternatively, the N-sulfonyl amino acid, 3, can be converted into an acid halide which is then coupled with compound, 4, to provide compound 5. The acid halide can be prepared by contacting compound 3 with an inorganic acid halide, such as thionyl chloride, phosphorous trichloride, phosphorous tribromide or phosphorous pentachloride, or preferably, with oxalyl chloride under conventional conditions. Generally, this reaction is conducted using about 1 to 5 molar equivalents of the inorganic acid halide or oxalyl chloride, either neat or in an inert solvent, such as dichloromethane or carbon tetrachloride, at temperature in the range of about 0°C to about 80°C for about 1 to about 48 hours. A catalyst, such as DMF, may also be used in this reaction.

The acid halide of N-sulfonyl amino acid, 3, is then contacted with at least one equivalent, preferably about 1.1 to about 1.5 equivalents, of the tyrosine derivative, 4, in an inert diluent, such as dichloromethane, at a temperature ranging from about -70°C to about 40°C for about 1 to about 24 hours. Preferably, this reaction is conducted in the presence of a suitable base to scavenge the acid generated during the reaction. Suitable bases include, by way of example, tertiary amines, such as triethylamine, diisopropylethylamine, N-methylmorpholine and the like. Alternatively, the reaction can be conducted under Schotten-Baumann-type conditions using aqueous alkali, such as sodium hydroxide and the like. Upon completion of the reaction, compound 5 is recovered by conventional methods including neutralization, evaporation, extraction, precipitation, chromatography, filtration, and the like.

Alternatively, compound 5 can be prepared by first forming a diamino acid derivative and then coupling the diamino acid to the arylsulfonyl halide, 2, as shown in scheme 3 below:



6 2 7

Scheme 3

where R, R^a, Ar^1, X, Z, *m*, *n* and *o* are as defined above.

The diamino acid, 6, can be readily prepared by coupling amino acid, 1, with amino acid, 4, using conventional amino acid coupling techniques and reagents, such carbodiimides, BOP reagent and the like, as described above. Diamino acid, 6, can then be sulfonated using sulfonyl chloride, 2, and using the synthetic procedures described above to provide compound 7.

The tyrosine derivatives, 4, employed in the above reactions are either known compounds or compounds that can be prepared from known compounds by conventional synthetic procedures. For example, tyrosine derivatives, 4, suitable for use in the above reactions include, but are not limited to, L-tyrosine methyl ester, L-tyrosine *t*-butyl ester, L-3,5-diiodotyrosine methyl ester, L-3-iodotyrosine methyl ester, β-(4-hydroxy-naphth-1-yl)-L-alanine methyl ester, β-(6-hydroxy-naphth-2-yl)-L-alanine methyl ester, and the like. If desired, of course, other esters or amides of the above-described compounds may also be employed.

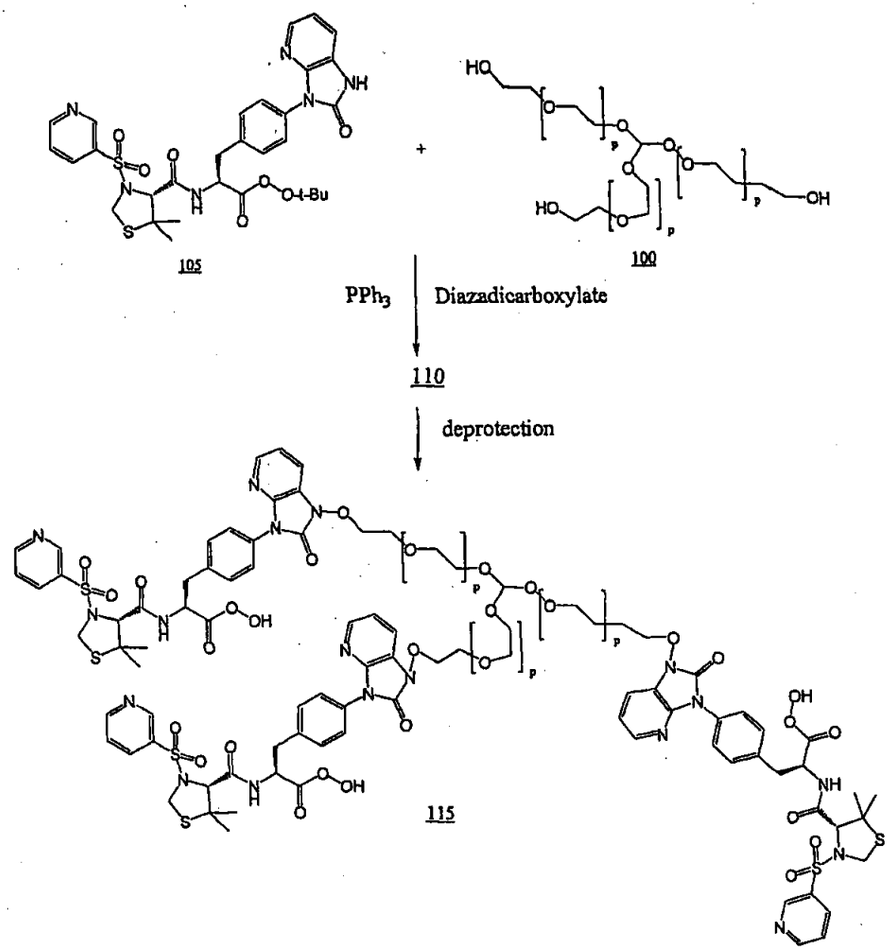
The N-arylsulfonyl-heterocyclic amino acid-tyrosine derivative, 7, can be used as a starting point to attach a polymer moiety at the Ar^2 group by employing the process of the invention.

Amine moieties located on other portions of the molecule can be employed in the manner described above to covalently link a polymer group to the molecule. For example, amines located on Ar^1, on the heterocyclic amino acid or on Ar^2 can be similarly derivatized to provide for PEG substitution using the process of the invention. The amine moieties can be included in these substituents during synthesis and appropriately protected as necessary. Alternatively, amine precursors can be employed.

Further, the amino substitution can be incorporated into the heterocyclic amino acid functionality and then derivatized to include a polymer moiety. For example, the heterocyclic amino acid functionality can be 2-carboxylpiperazine depicted in U.S. Patent No. 6,489,300. Alternatively, commercially available 3- or 4-hydroxyproline can be oxidized to the corresponding ketone and then reductively aminated with ammonia in the presence of sodium cyanoborohydride to form the corresponding amine moiety. Still further, 4-cyanoproline can be reduced to provide for a substituted alkyl group of the formula $-CH_2NH_2$ which can be derivatized through the amine.

Still further, the amine moiety can be incorporated into the Ar^2 functionality. Preferably, the amine moiety is present as an amine precursor such as a nitro or cyano group bound to Ar^2.

The non-derivatized compounds of Formula IIa-IIh are subsequently coupled to a polymer by employing the process of the invention. Scheme 4 depicts an embodiment of the invention:



Scheme 4

In Scheme 9, a PEG alcohol 100 is treated with a nucleophile 105 in the presence of a phosphine, here PPh_3, and a diazodicarboxylate, e.g., diisopropylazodicarboxylate, to form the protected ester 110. The ester is then hydrolyzed to form the desired conjugate 115.

The reaction occurs under mild and essentially neutral conditions. The reaction is preferably carried out in at least one suitable solvent. Examples include halogenated solvents such as methylene chloride, aromatic solvents such as benzene or toluene, or ether solvents such as tetrahydrofuran and diethylether. Other suitable solvents include ethylacetate, acetonitrile, and DMF. Most preferably, a chlorinated solvent or an ether solvent is employed. In a most preferred embodiment, the solvent is methylene chloride or tetrahydrofuran.

Reaction temperature is typically in the range of about -100 to 100°C, preferably in the

range of about -20 to 50°C, and even more preferably from about 0° to about room temperature. In a particularly preferred embodiment, reaction temperatures are from between about -10 to 10°C.

The reaction time is in the range of about 5 minutes to about 100 hours, preferably in the range of from between about 30 minutes to about 50 hours. More preferably, the reaction proceeds to completion of from between about 45 minutes to about 10 hours.

As mentioned above, examples of triaryl- or trialkylphosphines include triphenylphosphine, trimethylphosphine, triethylphosphine, tributylphosphine, and 1,2-bis-(diphenylphosphino)ethane. The phosphines can also be polymer supported or water soluble. A preferred triarylphosphine is triphenylphosphine.

Examples of diazo compounds are diethyldiazocarboxylate, diisopropylazodicarboxylate, 4-methyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione, N,N,N',N'-tetramethylazodicarboxamide, azodicarboxylic acid dipiperidide, bis(N-4 -methylpiperazin-1-yl)azodicarboxamide, dimorpholinoazodicarboxamide and di-tert-butyl azodicarboxylate.

It is understood that other suitable polymeric alchohols could be used in place of PEG and that one of ordinary skill in the art would readily be able to modify the reaction schemes below to incorporate such other polymers. In some cases, the PEG moiety can be directly introduced onto the Ar^2 group and, in other cases, the PEG moiety can be introduced by linkage through a linker moiety.

Other polymers suitable for conjugation to a compound of formula II include, without limitation, polyvinylpyrrolidone (PVP), polyacrylamide (PAAm), polydimethylacrylamide (PDAAm), polyvinyl alcohol (PVA), dextran, poly (L-glutamic acid) (PGA), styrene maleic anhydride (SMA), poly-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA), polydivinylether maleic anhydride (DIVEMA). By way of example, PVP, PAAm and PDAAm may be functionalized by introduction of co-monomers during radical polymerization. PVA and dextran each contain primary hydroxyl (OH) groups suitable for conjugation. Methods for synthesis of these biopolymers and for conjugating them to biological materials are well known in the art (see, for example, published U.S. Patent Application 20040043030; U.S. Patent 5,177,059; U.S. Patent 6,716,821; U.S. Patent 5,824,701; U.S. Patent 6,664,331; U.S. Patent 5,880,131; Kameda, Y. et al., Biomaterials 25: 3259-3266, 2004; Thanou, M. et al, Current Opinion in Investigational Drugs 4(6): 701-709, 2003; Veronese, F.M., et al., Il Farmaco 54: 497-516, 1999, all of which are incorporated herein in their entireties).

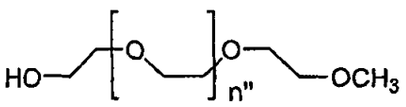
Representative polymers suitable for use in the invention include:

$HO(alkylene\text{-}O)_{pp}R^{bb}$	mono-capped mono-hydroxy PEG (mPEG)

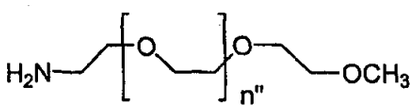
$H_2N(alkylene\text{-}O)_{pp}R^{bb}$	mono-capped mono-amino PEG
$HO(alkylene\text{-}O)_{pp}R\text{-}OH$	non-capped di-hydroxy PEG
$H_2N(alkylene\text{-}O)_{pp}R\text{-}OH$	non-capped mono-amino PEG
$HO(alkylene\text{-}O)_{pp}R^{bb}$	branched mono-hydroxy PEG
$HO(alkylene\text{-}O)_{pp}R^{bb}$	dendrimeric mono-hydroxy PEG

where *pp* and alkylene are as defined herein and R^{bb} is preferably selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, aryl and substituted aryl.

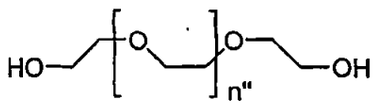
Other suitable polymers are shown below:



mono-capped mono-hydroxy PEG (mPEG)



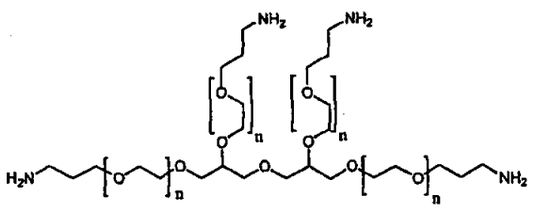
mono-capped mono-amine PEG



non-capped di-hydroxy PEG

Branched PEGs:

PEG Reagents available from NOF (20 kDa 4-arm)

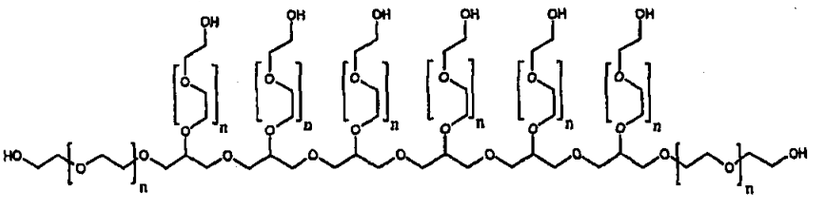


20 kDa 4-arm PEG tetra-amine

Diglycerine core

Cat # Sunbright DG-200PA

PEG Reagents available from Nektar (40 kDa 8-arm)



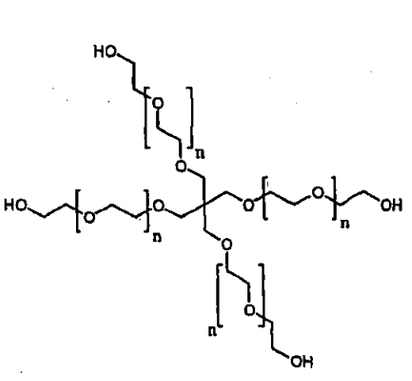
40 kDa 8-arm PEG

Hexaglycerine core

Cat # 0J000T08

Dendrimeric PEGs:

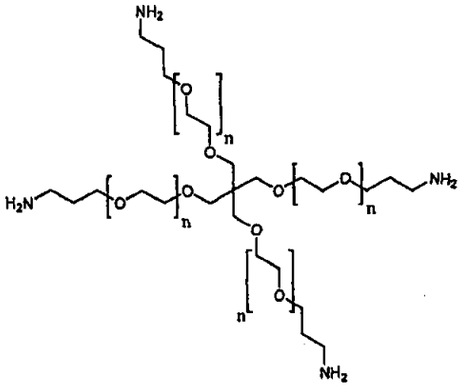
PEG Reagents available from NOF (40 kDa 4-arm)



40 kDa 4-arm PEG alcohol

pentaerythritol core

cat. # Sunbright PTE-40000



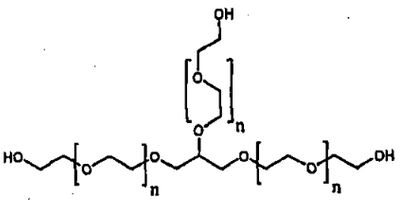
40 kDa 4-arm PEG tetra-amine

pentaerythritol core

cat. # Sunbright PTE-400PA

65

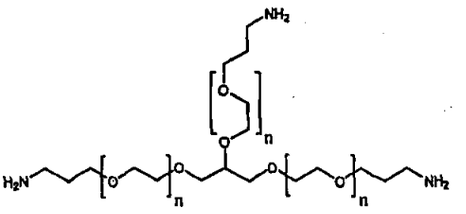
PEG Reagents available from NOF (40 kDa 3-arm)



40 kDa 3-arm PEG

glycerin core

cat # Sunbright GL-40000



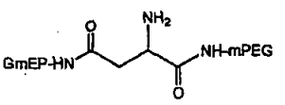
40 kDa 3-arm PEG tri-amine

glycerin core

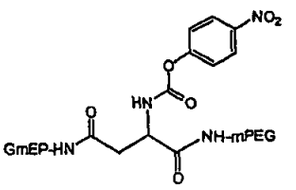
cat # Sunbright GL-400PA

PEG Reagents available from SunBio (40 and 20 kDa)

Y-PEG Series (Aspartic acid core)

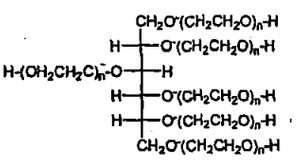


Y-PEG amine (40 kDa)
Cat# PYAM-40



Y-PEG nitrophenyl carbamate (40 kDa)
Cat# PYNPC-40

6-Arm Series (Sorbitol Core)

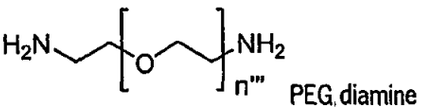


40 kDa 6-arm PEG
custom product

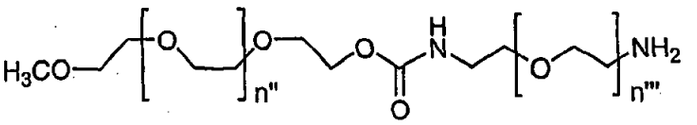
Lower molecular weights available in the sorbitol 6-arm series include 10, 15 and 20 kDa. Derivatives other than the alcohol include the 6-arm amine.

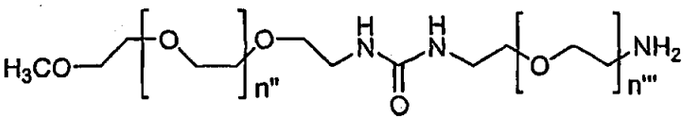
For example, the 10 kDa 6-arm amine (cat # P6AM-10) could be converted to a 40 kDa 6-arm hexa-amine (with Nektars 5 kDa BocNH-PEG-NHS ester) and then conjugated to a small molecule.

These PEG polymers may be further modified by extending the chains with PEG diamines through an appropriate linker, for example a carbamate (urethane) or a urea.



PEG diamine





A variety of nucleophilic compounds having an acidic hydrogen can be used in the process of the invention. Such compounds can be biologically active compounds, i.e., therapeutic compounds (pharmaceuticals) and agricultural chemicals (pesticides, herbicides, and plant growth stimulators such as fertilizers), or food additive compounds. Examples of groups having an acidic nitrogen that can be incorporated into such compounds are shown above; see the structures set forth in Tables D and D1.

Pharmaceutical Formulations

When employed as pharmaceuticals, the conjugates of this invention are usually administered in the form of pharmaceutical compositions. These conjugates can be administered by a variety of routes including oral, rectal, transdermal, subcutaneous, intravenous, intramuscular, sublingual, ophthalmic, or inhalation including administration by nasal or oral inhalation. Preferred administration routes include subcutaneous, intravenous, and inhalation. Such compositions are prepared in a manner well known in the pharmaceutical art and comprise at least one conjugate.

The invention also provides pharmaceutical compositions comprising a conjugate according to the invention, e.g., a conjugate of Formula I, in combination with a separate compound which is an $\alpha_4\beta_7$ inhibitor. Such compositions also comprise a pharmaceutically acceptable carrier or excipient and may be administered as discussed elsewhere herein.

This invention also includes pharmaceutical compositions which contain, as the active ingredient, one or more of the conjugate of formula I together with pharmaceutically acceptable carriers. In making the compositions of this invention, the active ingredient is usually mixed with an excipient, diluted by an excipient or enclosed within such a carrier

which can be in, sterile injectable solutions, and sterile packaged powders. For subcutaneous administration, a simple carrier may comprise a sterile solution of water, Na2HPO4, NaH2PO4, and NaCl, in proportions that provide an isotonic and physiologically acceptable pH, also know as PBS or phosphate-buffered saline. Other options are known to those of skill in the art and include mixed solvent systems that can affect the rate of absorption and total exposure. These options include mixed solvent systems containing glycerin, Polyethylene glycol 400, and cottonseed oil. Also of potential use are ethanol, N,N'-dimethylacetamide, propylene glycol and benzyl alcohol all of which may be used to manipulate permeability enhancement and hypertonicity.

In preparing a formulation, it may be necessary to mill the active compound to provide the appropriate particle size prior to combining with the other ingredients. If the active compound is substantially insoluble, it ordinarily is milled to a particle size of less than 200 mesh. If the active compound is substantially water soluble, the particle size is normally adjusted by milling to provide a substantially uniform distribution in the formulation, *e.g.* about 40 mesh.

Some examples of suitable excipients include lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, starches, gum acacia, calcium phosphate, alginates, tragacanth, gelatin, calcium silicate, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone, cellulose, water, syrup, and methyl cellulose. The formulations can additionally include: lubricating agents such as talc, magnesium stearate, and mineral oil; wetting agents; emulsifying and suspending agents; preserving agents such as methyl- and propylhydroxy-benzoates; sweetening agents; and flavoring agents. The compositions of the invention can be formulated so as to provide quick, sustained or delayed release of the active ingredient after administration to the patient by employing procedures known in the art.

Administration of therapeutic agents by subcutaneous or intravenous formulation is well known in the pharmaceutical industry. A subcutaneous or intravenous formulation should possess certain qualities aside from being just a composition in which the therapeutic agent is soluble. For example, the formulation should promote the overall stability of the active ingredient(s), also, the manufacture of the formulation should be cost effective. All of these factors ultimately determine the overall success and usefulness of an intravenous formulation.

Other accessory additives that may be included in pharmaceutical formulations of compounds of the present invention as follow: solvents: ethanol, glycerol, propylene glycol; stabilizers: EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid), citric acid; antimicrobial preservatives: benzyl alcohol, methyl paraben, propyl paraben; buffering agents: citric acid/sodium citrate, potassium hydrogen tartrate, sodium hydrogen tartrate, acetic acid/sodium acetate, maleic

acid/sodium maleate, sodium hydrogen phthalate, phosphoric acid/potassium dihydrogen phosphate, phosphoric acid/disodium hydrogen phosphate; and tonicity modifiers: sodium chloride, mannitol, dextrose.

The presence of a buffer is necessary to maintain the aqueous pH in the range of from about 4 to about 8 and more preferably in a range of from about 4 to about 6. The buffer system is generally a mixture of a weak acid and a soluble salt thereof, *e.g.*, sodium citrate/citric acid; or the monocation or dication salt of a dibasic acid, *e.g.*, potassium hydrogen tartrate; sodium hydrogen tartrate, phosphoric acid/potassium dihydrogen phosphate, and phosphoric acid/disodium hydrogen phosphate.

The amount of buffer system used is dependent on (1) the desired pH; and (2) the amount of drug. Generally, the amount of buffer used is in a 0.5:1 to 50:1 mole ratio of buffer:alendronate (where the moles of buffer are taken as the combined moles of the buffer ingredients, *e.g.*, sodium citrate and citric acid) of formulation to maintain a pH in the range of 4 to 8 and generally, a 1:1 to 10:1 mole ratio of buffer (combined) to drug present is used.

A useful buffer in the invention is sodium citrate/citric acid in the range of 5 to 50 mg per ml of sodium citrate to 1 to 15 mg per ml of citric acid, sufficient to maintain an aqueous pH of 4-6 of the composition.

The buffer agent may also be present to prevent the precipitation of the drug through soluble metal complex formation with dissolved metal ions, *e.g.*, Ca, Mg, Fe, Al, Ba, which may leach out of glass containers or rubber stoppers or be present in ordinary tap water. The agent may act as a competitive complexing agent with the drug and produce a soluble metal complex leading to the presence of undesirable particulates.

In addition, the presence of an agent, *e.g.*, sodium chloride in an amount of about of 1-8 mg/ml, to adjust the tonicity to the same value of human blood may be required to avoid the swelling or shrinkage of erythrocytes upon administration of the intravenous formulation leading to undesirable side effects such as nausea or diarrhea and possibly to associated blood disorders. In general, the tonicity of the formulation matches that of human blood which is in the range of 282 to 288 mOsm/kg, and in general is 285 mOsm/kg , which is equivalent to the osmotic pressure corresponding to a 0.9% solution of sodium chloride.

The intravenous formulation can be administered by direct intravenous injection, I.v. bolus, or can be administered by infusion by addition to an appropriate infusion solution such as 0.9% sodium chloride injection or other compatible infusion solution.

The compositions are preferably formulated in a unit dosage form, each dosage containing from about 5 to about 100 mg, more usually about 10 to about 30 mg, of the active ingredient. The term "unit dosage forms" refers to physically discrete units suitable as unitary dosages for human subjects and other mammals, each unit containing a predetermined

quantity of active material calculated to produce the desired therapeutic effect, in association with a suitable pharmaceutical excipient.

The conjugate is effective over a wide dosage range and is generally administered in a pharmaceutically effective amount. It, will be understood, however, that the amount of the conjugate actually administered will be determined by a physician, in the light of the relevant circumstances, including the condition to be treated, the chosen route of administration, the actual compound administered, the age, weight, and response of the individual patient, the severity of the patient's symptoms, and the like.

For preparing solid compositions such as tablets, the principal active ingredient is mixed with a pharmaceutical excipient to form a solid preformulation composition containing a homogeneous mixture of a compound of the present invention. When referring to these preformulation compositions as homogeneous, it is meant that the active ingredient is dispersed evenly throughout the composition so that the composition may be readily subdivided into equally effective unit dosage forms such as tablets, pills and capsules. This solid preformulation is then subdivided into unit dosage forms of the type described above containing from, for example, 0.1 to about 500 mg of the active ingredient of the present invention.

The tablets or pills of the present invention may be coated or otherwise compounded to provide a dosage form affording the advantage of prolonged action. For example, the tablet or pill can comprise an inner dosage and an outer dosage component, the latter being in the form of an envelope over the former. The two components can be separated by an enteric layer which serves to resist disintegration in the stomach and permit the inner component to pass intact into the duodenum or to be delayed in release. A variety of materials can be used for such enteric layers or coatings, such materials including a number of polymeric acids and mixtures of polymeric acids with such materials as shellac, cetyl alcohol, and cellulose acetate.

The liquid forms in which the novel compositions of the present invention may be incorporated for administration orally or by injection include aqueous solutions suitably flavored syrups, aqueous or oil suspensions, and flavored emulsions with edible oils such as cottonseed oil, sesame oil, coconut oil, or peanut oil, as well as elixirs and similar pharmaceutical vehicles.

Compositions for inhalation or insufflation include solutions and suspensions in pharmaceutically acceptable, aqueous or organic solvents, or mixtures thereof, and powders. The liquid or solid compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable excipients as described *supra*. Preferably the compositions are administered by the oral or nasal respiratory route for local or systemic effect. Compositions in preferably pharmaceutically

acceptable solvents may be nebulized by use of inert gases. Nebulized solutions may be breathed directly from the nebulizing device or the nebulizing device may be attached to a face masks tent, or intermittent positive pressure breathing machine. Solution, suspension, or powder compositions may be administered, preferably orally or nasally, from devices which deliver the formulation in an appropriate manner. For inhalation or insufflation administration, it is preferred that the total molecular weight of the conugate is between about 10,000 Daltons and 70,000 Daltons, more preferably between about 20,000 Daltonsand 45,000 Daltons.

Polymer conjugates

Compounds of this invention as formulated and administered are polymer conjugates. Polymer conjugates are anticipated to provide benefits over non-conjugated polymers, such as improved solubility and *in vivo* stability.

As such, single polymer molecule may be employed for conjugation with the compounds of the present invention, although it is also contemplated that more than one polymer molecule can be attached as well, typically through a carrier. The conjugated compounds of the present invention may find utility in both *in vivo* as well as non-*in vivo* applications. Additionally, it will be recognized that the conjugating polymer may utilize any other groups, moieties, or other conjugated species, as appropriate to the end use application. As an example, it may be advantageous in some applications to functionalize the polymer to render it reactive and enable it to conjugate to a compound of formula II and to enhance various properties or characteristics of the overall conjugated material. Accordingly, the polymer may contain any functionality, repeating groups, linkages, or other constituent structures which do not preclude the efficacy of the conjugated compounds of the present invention for its intended purpose.

Illustrative polymers that are usefully employed to achieve these desirable characteristics are described *supra*, as well as in PCT WO 01/54690 (to Zheng *et al.*) incorporated by reference herein in its entirety. The polymer may be coupled to the compounds of the present invention (preferably via a linker moiety) to form stable bonds that are not significantly cleavable by human enzymes. Generally, for a bond to be not 'significantly' cleavable requires that no more than about 20% of the bonds connecting the polymer and the compounds of the present invention to which the polymer is linked, are cleaved within a 24 hour period, as measured by standard techniques in the art including, but not limited to, high pressure liquid chromatography (HPLC).

Generally, the compounds of this invention contain at least about 2 compounds of formula II bound to a polymer. The final amount is a balance between maximizing the extent of the reaction while minimizing non-specific modifications of the product and, at the same

time, defining chemistries that will maintain optimum activity, while at the same time optimizing the half-life of the compounds of the present invention. Preferably, at least about 50% of the biological activity of the compounds of the present invention is retained, and most preferably 100% is retained.

As noted above in the preferred practice of the present invention, polyalkylene glycol residues of C_2-C_4 alkyl polyalkylene glycols, preferably polyethylene glycol (PEG), or poly(oxy)alkylene glycol residues of such glycols are advantageously incorporated in the polymer systems of interest. Thus, the polymer to which the compounds of the present invention are attached may be a homopolymer of polyethylene glycol (PEG) or is a polyoxyethylated polyol, provided in all cases that the polymer is soluble in water at room temperature. Non-limiting examples of such polymers include polyalkylene oxide homopolymers such as PEG or polypropylene glycols, polyoxyethylenated glycols, copolymers thereof and block copolymers thereof, provided that the water solubility of the block copolymer is maintained.

Examples of polyoxyethylated polyols include, but are not limited to, polyoxyethylated glycerol, polyoxyethylated sorbitol, polyoxyethylated glucose, or the like. The glycerol backbone of polyoxyethylated glycerol is the same backbone occurring naturally in, for example, animals and humans in mono-, di-, and triglycerides. Therefore, this branching would not necessarily be seen as a foreign agent in the body.

Those of ordinary skill in the art will recognize that the foregoing list is merely illustrative and that all polymer materials having the qualities described herein are contemplated. The polymer need not have any particular molecular weight, but it is preferred that the molecular weight be between about 100 and 100,000, preferably from about 10,000 to 80,000; more preferably from about 20,000 to about 70,000. In particular, sizes of 20,000 or more are most effective at preventing loss of the product due to filtration in the kidneys.

By PEG derivative is meant a polyethylene glycol polymer in which one or both of the terminal hydroxyl groups found in polyethylene glycol itself has been modified. Examples of suitable modifications include replacing one or both hydroxyl group(s) with alternative functional groups, which may be protected or unprotected, with low molecular weight ligands, or with another macromolecule or polymer. Modification of the terminal hydroxyl groups in the polyethylene glycol may be achieved by reacting the polyethylene glycol with compounds comprising complementary reactive functional groups, including functional groups which are able to undergo a reaction with the hydroxyl groups in polyethylene glycol. The PEG derivatives of the compounds of this invention may contain one or more polyethylene glycol (PEG) substituents covalently attached thereto by a linking group.

The following formulation examples illustrate the pharmaceutical compositions of the present invention.

Formulation Example 1

Hard gelatin capsules containing the following ingredients are prepared:

Ingredient	Quantity (mg/capsule)
Active Ingredient	30.0
Starch	305.0
Magnesium stearate	5.0

The above ingredients are mixed and filled into hard gelatin capsules in 340 mg quantities.

Formulation Example 2

A tablet formula is prepared using the ingredients below:

Ingredient	Quantity (mg/tablet)
Active Ingredient	25.0
Cellulose, microcrystalline	200.0
Colloidal silicon dioxide	10.0
Stearic acid	5.0

The components are blended and compressed to form tablets, each weighing 240 mg.

Formulation Example 3

A dry powder inhaler formulation is prepared containing the following components:

Ingredient	Weight %
Active Ingredient	5
Lactose	95

The active ingredient is mixed with the lactose and the mixture is added to a dry powder inhaling appliance.

Formulation Example 4

Tablets, each containing 30 mg of active ingredient, are prepared as follows:

Ingredient	Quantity (mg/tablet)
Active Ingredient	30.0 mg
Starch	45.0 mg
Microcrystalline cellulose	35.0 mg
Polyvinylpyrrolidone (as 10% solution in sterile water)	4.0 mg
Sodium carboxymethyl starch	4.5 mg
Magnesium stearate	0.5 mg
Talc	1.0 mg
Total	120 mg

The active ingredient, starch and cellulose are passed through a No. 20 mesh U.S. sieve and mixed thoroughly. The solution of polyvinylpyrrolidone is mixed with the resultant powders, which are then passed through a 16 mesh U.S. sieve. The granules so produced are dried at 50°C to 60°C and passed through a 16 mesh U.S. sieve. The sodium carboxymethyl starch, magnesium stearate, and talc, previously passed through a No. 30 mesh U.S. sieve, are then added to the granules which, after mixing, are compressed on a tablet machine to yield tablets each weighing 120 mg.

Formulation Example 5

Capsules, each containing 40 mg of medicament are made as follows:

Ingredient	Quantity (mg/capsule)
Active Ingredient	40.0 mg
Starch	109.0 mg
Magnesium stearate	1.0 mg

Total	150.0 mg

The active ingredient, starch and magnesium stearate are blended, passed through a No. 20 mesh U.S. sieve, and filled into hard gelatin capsules in 150 mg quantities.

Formulation Example 6

Suppositories, each containing 25 mg of active ingredient are made as follows:

Ingredient	Amount
Active Ingredient	25 mg
Saturated fatty acid glycerides to	2,000 mg

The active ingredient is passed through a No. 60 mesh U.S. sieve and suspended in the saturated fatty acid glycerides previously melted using the minimum heat necessary. The mixture is then poured into a suppository mold of nominal 2.0 g capacity and allowed to cool.

Formulation Example 7

Suspensions, each containing 50 mg of medicament per 5.0 ml dose are made as follows:

Ingredient	Amount
Active Ingredient	50.0 mg
Xanthan gum	4.0 mg
Sodium carboxymethyl cellulose (11%)	
Microcrystalline cellulose (89%)	50.0 mg
Sucrose	1.75 g
Sodium benzoate	10.0 mg
Flavor and Color	q.v.
Purified water to	5.0 ml

The active ingredient, sucrose and xanthan gum are blended, passed through a No. 10 mesh U.S. sieve, and then mixed with a previously made solution of the microcrystalline cellulose and sodium carboxymethyl cellulose in water. The sodium benzoate, flavor, and color are diluted with some of the water and added with stirring. Sufficient water is then added to produce the required volume.

Formulation Example 8

Ingredient	Quantity (mg/capsule)
Active Ingredient	15.0 mg
Starch	407.0 mg
Magnesium stearate	3.0 mg
Total	425.0 mg

The active ingredient, starch, and magnesium stearate are blended, passed through a No. 20 mesh U.S. sieve, and filled into hard gelatin capsules in 425.0 mg quantities.

Formulation Example 9

A subcutaneous formulation may be prepared as follows:

Ingredient	Quantity
Active Ingredient	50 mg.mL mg
Phosphate buffered saline	1.0 ml

Formulation Example 10

A topical formulation may be prepared as follows:

Ingredient	Quantity
Active Ingredient	1-10 g
Emulsifying Wax	30 g
Liquid Paraffin	20 g
White Soft Paraffin	to 100 g

The white soft paraffin is heated until molten. The liquid paraffin and emulsifying wax are incorporated and stirred until dissolved. The active ingredient is added and stirring is continued until dispersed. The mixture is then cooled until solid.

Formulation Example 11

An intravenous formulation may be prepared as follows:

Ingredient	Quantity

Active Ingredient	250 mg
Isotonic saline	100 ml

Another preferred formulation employed in the methods of the present invention employs transdermal delivery devices ("patches"). Such transdermal patches may be used to provide continuous or discontinuous infusion of the compounds of the present invention in controlled amounts. The construction and use of transdermal patches for the delivery of pharmaceutical agents is well known in the art. See, *e.g.*, U.S. Patent 5,023,252, issued June 11, 1991, herein incorporated by reference. Such patches may be constructed for continuous, pulsatile, or on demand delivery of pharmaceutical agents.

Frequently, it will be desirable or necessary to introduce the pharmaceutical composition to the brain, either directly or indirectly. Direct techniques usually involve placement of a drug delivery catheter into the host's ventricular system to bypass the blood-brain barrier. One such implantable delivery system used for the transport of biological factors to specific anatomical regions of the body is described in U.S. Patent 5,011,472 which is herein incorporated by reference.

Indirect techniques, which are generally preferred, usually involve formulating the compositions to provide for drug latentiation by the conversion of hydrophilic drugs into lipid-soluble drugs. Latentiation is generally achieved through blocking of the hydroxy, carbonyl, sulfate, and primary amine groups present on the drug to render the drug more lipid soluble and amenable to transportation across the blood-brain barrier. Alternatively, the delivery of hydrophilic drugs may be enhanced by intra-arterial infusion of hypertonic solutions which can transiently open the blood-brain barrier.

Other suitable formulations for use in the present invention can be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985).

As noted above, the compounds described herein are suitable for use in a variety of drug delivery systems described above. Additionally, in order to enhance the *in vivo* serum half-life of the administered compound, the compounds may be encapsulated, introduced into the lumen of liposomes, prepared as a colloid, or other conventional techniques may be employed which provide an extended serum half-life of the compounds. A variety of methods are available for preparing liposomes, as described in, e.g., Szoka, et al., U.S. Patent Nos. 4,235,871, 4,501,728 and 4,837,028 each of which is incorporated herein by reference.

Utility

The conjugates of this invention are VLA-4 antagonists. Some also have at least a partial affinity for alpha4 beta7 integrins. The conjugates provide enhanced in vivo retention as compared to the non-conjugated compounds. The improved retention of the conjugate within the body results in lower required dosages of the drug, which in turn results in fewer side effects and reduced likelihood of toxicity. In addition, the drug formulation may be administered less frequently to the patient while achieving a similar or improved therapeutic effect.

The conjugates of this invention have improved inhibition, in vivo, of adhesion of leukocytes to endothelial cells mediated by inhibition of alpha4 beta1 or alpha4 beta7binding to cellular receptors such as VCAM-1. fibronectin and MadCAM. Preferably, the conjugates of this invention can be used, e.g., by infusion, or by subcutaneous injection or oral administration, for the treatment of diseases mediated by alpha4 beta1 or alpha4 beta7 or, in general terms, leucocyte adhesion. The conjugates of the invention can be used to treat a variety of inflammatory brain disorders, especially central nervous system disorders in which the endothelium/leukocyte adhesion mechanism results in destruction to otherwise healthy brain tissue. Thus, the conjugates of the invention can be used for, e.g., the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), multiple sclerosis (MS), meningitis, and encephalitis.

The conjugates of the invention can also be used to treat disorders and diseases due to tissue damage in other organ systems, i.e., where tissue damage also occurs via an adhesion mechanism resulting in migration or activation of leukocytes. Examples of such diseases in mammalian patients are inflammatory diseases such as asthma, Alzheimer's disease, atherosclerosis, AIDS dementia, diabetes (including acute juvenile onset diabetes), inflammatory bowel disease (including ulcerative colitis and Crohn's disease), rheumatoid arthritis, tissue transplantation rejection, tumor metastasis, stroke, and other cerebral traumas, nephritis, retinitis, atopic dermatitis, psoriasis, myocardial ischemia and acute leukocyte-mediated lung injury such as that which occurs in adult respiratory distress syndrome.

Still other disease conditions which may be treated using conjugates of the invention include erythema nodosum, allergic conjunctivitis, optic neuritis, uveitis, allergic rhinitis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, vasculitis, Reiter's syndrome, systemic lupus erythematosus, progressive systemic sclerosis, polymyositis, dermatomyositis, Wegner's granulomatosis, aortitis, sarcoidosis, lymphocytopenia, temporal arteritis, pericarditis, myocarditis, congestive heart failure, polyarteritis nodosa, hypersensitivity syndromes, allergy, hypereosinophilic syndromes, Churg-Strauss syndrome, chronic obstructive pulmonary

disease, hypersensitivity pneumonitis, chronic active hepatitis, interstitial cystitis, autoimmune endocrine failure, primary biliary cirrhosis, autoimmune aplastic anemia, chronic persistent hepatitis and thyroiditis.

The invention also provides methods for treating a disease state caused or exacerbated at least in part by alpha 4 integrin-mediated lekocyte binding in a patient, which methods comprise co-administration of an effective amount of a conjugate of the invention, e.g., a conjugate of Formula I, and an effective amount of a separate compound which is an $\alpha_4\beta_7$ inhibitor. The co-adminstration can be carried out simultaneously or sequentially. For example, administration of the conjugate of the invention can precede adminstration of the $\alpha_4\beta_7$ inhibitor by minutes or hours. Alternatively, the $\alpha_4\beta_7$ inhibitor can be administered prior to the conjugate of the invention.

Appropriate in vivo models for demonstrating efficacy in treating inflammatory responses include EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) in mice, rats, guinea pigs or primates, as well as other inflammatory models dependent upon $\alpha 4$ integrins.

Inflammatory bowel disease is a collective term for two similar diseases referred to as Crohn's disease and ulcerative colitis. Crohn's disease is an idiopathic, chronic ulceroconstrictive inflammatory disease characterized by sharply delimited and typically transmural involvement of all layers of the bowel wall by a granulomatous inflammatory reaction. Any segment of the gastrointestinal tract, from the mouth to the anus, may be involved, although the disease most commonly affects the terminal ileum and/or colon. Ulcerative colitis is an inflammatory response limited largely to the colonic mucosa and submucosa. Lymphocytes and macrophages are numerous in lesions of inflammatory bowel disease and may contribute to inflammatory injury.

Asthma is a disease characterized by increased responsiveness of the tracheobronchial tree to various stimuli potentiating paroxysmal constriction of the bronchial airways. The stimuli cause release of various mediators of inflammation from IgE-coated mast cells including histamine, eosinophilic and neutrophilic chemotactic factors, leukotrines, prostaglandin and platelet activating factor. Release of these factors recruits basophils, eosinophils and neutrophils, which cause inflammatory injury.

Atherosclerosis is a disease of arteries (e.g., coronary, carotid, aorta and illac). The basic lesion, the atheroma, consists of a raised focal plaque within the intima, having a core of lipid and a covering fibrous cap. Atheromas compromise arterial blood flow and weaken affected arteries. Myocardial and cerebral infarcts are a major consequence of this disease. Macrophages and leukocytes are recruited to atheromas and contribute to inflammatory injury.

Rheumatoid arthritis is a chronic, relapsing inflammatory disease that primarily causes

impairment and destruction of joints. Rheumatoid arthritis usually first affects the small joints of the hands and feet but then may involve the wrists, elbows, ankles and knees. The arthritis results from interaction of synovial cells with leukocytes that infiltrate from the circulation into the synovial lining of the joints. See e.g., Paul, Immunology (3d ed., Raven Press, 1993).

Another indication for the conjugates of this invention is in treatment of organ or graft rejection mediated by VLA-4. Over recent years there has been a considerable improvement in the efficiency of surgical techniques for transplanting tissues and organs such as skin, kidney, liver, heart, lung, pancreas and bone marrow. Perhaps the principal outstanding problem is the lack of satisfactory agents for inducing immunotolerance in the recipient to the transplanted allograft or organ. When allogeneic cells or organs are transplanted into a host (i.e., the donor and donee are different individuals from the same species), the host immune system is likely to mount an immune response to foreign antigens in the transplant (host-versus-graft disease) leading to destruction of the transplanted tissue. $CD8^+$ cells, CD4 cells and monocytes are all involved in the rejection of transplant tissues. Conjugates of this invention which bind to alpha-4 integrin are useful, inter alia, to block alloantigen-induced immune responses in the donee thereby preventing such cells from participating in the destruction of the transplanted tissue or organ. See, e.g., Paul et al., Transplant International 9, 420-425 (1996); Georczynski et al., Immunology 87, 573-580 (1996); Georcyznski et al., Transplant. Immunol. 3, 55-61 (1995); Yang et al., Transplantation 60, 71-76 (1995); Anderson et al., APMIS 102, 23-27 (1994).

A related use for conjugates of this invention which bind to VLA-4 is in modulating the immune response involved in "graft versus host" disease (GVHD). See e.g., Schlegel et al., J. Immunol. 155, 3856-3865 (1995). GVHD is a potentially fatal disease that occurs when immunologically competent cells are transferred to an allogeneic recipient. In this situation, the donor's immunocompetent cells may attack tissues in the recipient. Tissues of the skin, gut epithelia and liver are frequent targets and may be destroyed during the course of GVHD. The disease presents an especially severe problem when immune tissue is being transplanted, such as in bone marrow transplantation; but less severe GVHD has also been reported in other cases as well, including heart and liver transplants. The therapeutic agents of the present invention are used, inter alia, to block activation of the donor T-cells thereby interfering with their ability to lyse target cells in the host.

The formulations of the present invention are especially useful in the treatment of multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and asthma.

A further use of the conjugates of this invention is inhibiting tumor metastasis. Several tumor cells have been reported to express VLA-4 and compounds which bind VLA-4 block adhesion of such cells to endothelial cells. Steinback et al., Urol. Res. 23, 175-83

(1995); Orosz et al., Int. J. Cancer 60, 867-71 (1995); Freedman et al., Leuk. Lymphoma 13, 47-52 (1994); Okahara et al., Cancer Res. 54, 3233-6 (1994).

Compounds having the desired biological activity may be modified as necessary to provide desired properties such as improved pharmacological properties (e.g., in vivo stability, bio-availability), or the ability to be detected in diagnostic applications. Stability can be assayed in a variety of ways such as by measuring the half-life of the proteins during incubation with peptidases or human plasma or serum. A number of such protein stability assays have been described (see, e.g., Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1990, 15(2):83-93).

A further use of the conjugates of this invention is in treating multiple sclerosis. Multiple sclerosis is a progressive neurological autoimmune disease that affects an estimated 250,000 to 350,000 people in the United States. Multiple sclerosis is thought to be the result of a specific autoimmune reaction in which certain leukocytes attack and initiate the destruction of myelin, the insulating sheath covering nerve fibers. In an animal model for multiple sclerosis, murine monoclonal antibodies directed against VLA-4 have been shown to block the adhesion of leukocytes to the endothelium, and thus prevent inflammation of the central nervous system and subsequent paralysis in the animals[16].

Pharmaceutical compositions of the invention are suitable for use in a variety of drug delivery systems. Suitable formulations for use in the present invention are found in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985).

The amount administered to the patient will vary depending upon what is being administered, the purpose of the administration, such as prophylaxis or therapy, the state of the patient, the manner of administration, and the like. In therapeutic applications, compositions are administered to a patient already suffering from a disease in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the symptoms of the disease and its complications. An amount adequate to accomplish this is defined as "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend on the disease condition being treated as well as by the judgment of the attending clinician depending upon factors such as the severity of the inflammation, the age, weight and general condition of the patient, and the like.

The compositions administered to a patient are in the form of pharmaceutical compositions described above. These compositions may be sterilized by conventional sterilization techniques, or may be sterile filtered. The resulting aqueous solutions may be packaged for use as is, or lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile aqueous carrier prior to administration.

The therapeutic dosage of the conjugates of the present invention will vary according

to, for example, the particular use for which the treatment is made, the manner of administration of the conjugate, the health and condition of the patient, and the judgment of the prescribing physician. For example, for intravenous administration, the dose will typically be in the range of about 20 µg to about 2000 µg per kilogram body weight, preferably about 20 µg to about 500 µg, more preferably about 100 µg to about 300 µg per kilogram body weight. Suitable dosage ranges for intranasal administration are generally about 0.1 pg to 1 mg per kilogram body weight. Effective doses can be extrapolated from dose-response curves derived from in vitro or animal model test systems.

Conjugates of this invention are also capable of binding or antagonizing the actions of $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_d\beta_2$, $\alpha_e\beta_7$ integrins (although $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_9\beta_1$ are preferred in this invention). Accordingly, conjugates of this invention are also useful for preventing or reversing the symptoms, disorders or diseases induced by the binding of these integrins to their respective ligands.

For example, International Publication Number WO 98/53817, published December 3, 1998 (the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety) and references cited therein describe disorders mediated by $\alpha_4\beta_7$. This reference also describes an assay for determining antagonism of $\alpha_4\beta_7$ dependent binding to VCAM-Ig fusion protein.

Additionally, compounds that bind $\alpha_d\beta_2$ and $\alpha_e\beta_7$ integrins are particularly useful for the treatment of asthma and related lung diseases. See, for example, M. H. Grayson et al., *J. Exp. Med.* **1998**, *188*(11) 2187-2191. Compounds that bind $\alpha_e\beta_7$ integrin are also useful for the treatment of systemic lupus erythematosus (see, for example, M. Pang et al., *Arthritis Rheum.* **1998**, *41*(8), 1456-1463); Crohn's disease, ulcerative colitis and inflammatory bowel disease (IBD) (see, for example, D. Elewaut et al., *Scand J. Gastroenterol* **1998**, *33*(7) 743-748); Sjogren's syndrome (see, for example, U. Kroneld et al., *Scand J. Gastroenterol* **1998**, 27(3), 215-218); and rheumatoid arthritis (see, for example, *Scand J. Gastroenterol* **1996**, *44*(3), 293-298). And compounds that bind $\alpha_6\beta_1$ may be useful in preventing fertilization (see, for example, H. Chen et al., *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 1-10).

In another aspect of the invention, the conjugates and compositions described herein can be used to inhibit immune cell migration from the bloodstream to the central nervous system in the instance of, for example, multiple sclerosis, or to areas which result in inflammatory-induced destruction of the myelin. Preferably, these reagents inhibit immune cell migration in a manner that inhibits demyelination and that further may promote remyelination. The reagents may also prevent demyelination and promote remyelination of the central nervous system for congenital metabolic disorders in which infiltrating immune cells affect the development myelin sheath, mainly in the CNS. The reagents preferably also reduce paralysis when administrered to a subject with paralysis induced by a demyelinating

disease or condition.

Inflammatory diseases that are included for treatment by the compositions, conjugates and methods disclosed herein include generally conditions relating to demyelination. Histologically, myelin abnormalities are either demyelinating or dysmyelinating. Demyelination implies the destruction of myelin. Dysmyelination refers to defective formation or maintenance of myelin resulting from dysfunction of the oligodendrocytes. Preferably, the compositions and methods disclosed herein are contemplated to treat diseases and conditions relating to demyelination and aid with remyelination. Additional diseases or conditions contemplated for treatment include meningitis, encephalitis, and spinal cord injuries and conditions generally which induce demyelination as a result of an inflammatory response. The conjugates, compositions and methods disclosed herein are not directed towards diseases and conditions wherein there is, for example, a genetic defect leading to improper myelin formation, e.g., dysmyelination.

The compositions, conjugates and cocktails disclosed herein are contemplated for use in treating conditions and diseases associated with demyelination. Diseases and conditions involving demyelination include, but are not limited to, multiple sclerosis, congenital metabolic disorders (e.g., phenylketonuria, Tay-Sachs disease, Niemann-Pick disease, Gaucher's disease, Hurler's syndrome, Krabbe's disease and other leukodystrophies), neuropathies with abnormal myelination (e.g., Guillain Barré, chronic immune demyelinating polyneuropathy (CIDP), multifocal CIDP, anti-MAG syndrome, GALOP syndrome, anti-sulfatide antibody syndrome, anti-GM2 antibody syndrome, POEMS syndrome, perineuritis, IgM anti-GD1b antibody syndrome), drug related demyelination (e.g., caused by the administration of chloroquine, FK506, perhexiline, procainamide, and zimeldine), other hereditary demyelinating conditions (e.g., carbohydrate-deficient glycoprotein, Cockayne's syndrome, congenital hypomyelinating, congenital muscular dystrophy, Farber's disease, Marinesco-Sjögren syndrome, metachromatic leukodystrophy, Pelizaeus-Merzbacher disease, Refsum disease, prion related conditions, and Salla disease) and other demyelinating conditions (e.g., meningitis, encephalitis or spinal cord injury) or diseases.

There are various disease models that can be used to study these diseases in vivo. For example, animal models include but are not limited to:

Table III

Disease Model	Species
EAE	Mouse, rat, guinea pig
Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induced EAE	Rat
TNF-α transgenic model of demyelination	Mouse

Multiple Sclerosis

The most common demyelinating disease is multiple sclerosis, but many other metabolic and inflammatory disorders result in deficient or abnormal myelination. MS is a chronic neurologic disease, which appears in early adulthood and progresses to a significant disability in most cases. There are approximately 350,000 cases of MS in the United States alone. Outside of trauma, MS is the most frequent cause of neurologic disability in early to middle adulthood.

The cause of MS is yet to be determined. MS is characterized by chronic inflammation, demyelination and gliosis (scarring). Demyelination may result in either negative or positive effects on axonal conduction. Positive conduction abnormalities include slowed axonal conduction, variable conduction block that occurs in the presence of high-but not low-frequency trains of impulses or complete conduction block. Positive conduction abnormalities include ectopic impulse generation, spontaneously or following mechanical stress and abnormal "cross-talk" between demyelinated exons.

T cells reactive against myelin proteins, either myelin basic protein (MBP) or myelin proteolipid protein (PLP) have been observed to mediate CNS inflammation in experimental allergic encephalomyelitis. Patients have also been observed as having elevated levels of CNS immunoglobulin (Ig). It is further possible that some of the tissue damage observed in MS is mediated by cytokine products of activated T cells, macrophages or astrocytes.

Today, 80% patients diagnosed with MS live 20 years after onset of illness. Therapies for managing MS include: (1) treatment aimed at modification of the disease course, including treatment of acute exacerbation and directed to long-term suppression of the disease; (2) treatment of the symptoms of MS; (3) prevention and treatment of medical complications; and (4) management of secondary personal and social problems.

The onset of MS may be dramatic or so mild as to not cause a patient to seek medical attention. The most common symptoms include weakness in one or more limbs, visual blurring due to optic neuritis, sensory disturbances, diplopia and ataxia. The course of disease may be stratified into three general categories: (1) relapsing MS, (2) chronic progressive MS, and (3) inactive MS. Relapsing MS is characterized by recurrent attacks of neurologic dysfunction. MS attacks generally evolve over days to weeks and may be followed by complete, partial or no recovery. Recovery from attacks generally occurs within weeks to several months from the peak of symptoms, although rarely some recovery may continue for 2 or more years.

Chronic progressive MS results in gradually progressive worsening without periods of stabilization or remission. This form develops in patients with a prior history of relapsing MS,

although in 20% of patients, no relapses can be recalled. Acute relapses also may occur during the progressive course.

A third form is inactive MS. Inactive MS is characterized by fixed neurologic deficits of variable magnitude. Most patients with inactive MS have an earlier history of relapsing MS.

Disease course is also dependent on the age of the patient. For example, favourable prognostic factors include early onset (excluding childhood), a relapsing course and little residual disability 5 years after onset. By contrast, poor prognosis is associated with a late age of onset (*i.e.*, age 40 or older) and a progressive course. These variables are interdependent, since chronic progressive MS tends to begin at a later age that relapsing MS. Disability from chronic progressive MS is usually due to progressive paraplegia or quadriplegia (paralysis) in patients. In one aspect of the invention, patients will preferably be treated when the patient is in remission rather then in a relapsing stage of the disease.

Short-term use of either adrenocorticotropic hormone or oral corticosteroids (*e.g.*, oral prednisone or intravenous methylprednisolone) is the only specific therapeutic measure for treating patients with acute exacerbation of MS.

Newer therapies for MS include treating the patient with interferon beta-1b, interferon beta-1a, and Copaxone® (formerly known as copolymer 1). These three drugs have been shown to significantly reduce the relapse rate of the disease. These drugs are self-administered intramuscularly or subcutaneously.

However, none of the current treatment modalities inhibit demyelination, let alone promotes or allows spontaneous remyelination or reduces paralysis. One aspect of the invention contemplates treating MS with agents disclosed herein either alone or in combination with other standard treatment modalities.

Congenital Metabolic Disorders

Congenital metabolic disorders include phenylketonuria (PKU) and other aminoacidurias, Tay-Sachs disease, Niemann-Pick disease, Gaucher's disease, Hurler's syndrome, Krabbe's disease and other leukodystrophies that impact the developing sheath as described more fully below.

PKU is an inherited error of metabolism caused by a deficiency in the enzyme phenylalanine hydroxylase. Loss of this enzyme results in mental retardation, organ damage, unusual posture and can, in cases of maternal PKU, severely compromise pregnancy. A model for studying PKU has been discovered in mice. Preferably infants identified with PKU are sustained on a phenylalanine free or lowered diet. An aspect of the invention would be to combine such diets with the conjugates and compositions disclosed herein to prevent demyelination and remyelinate cells damaged due to PKU.

Classical Tay-Sachs disease appears in the subject at about age 6 months and will eventually result in the death of the subject by age 5 years. The disease is due to the lack of the enzyme, hexoaminidase A (hex A), which is necessary for degrading certain fatty substances in the brain and nerve cells. The substances in the absence of the enzyme accumulate and lead to the destruction of nerve cells. Another form of hex A enzyme deficiency occurs later in life and is referred to as juvenile, chronic and adult onset forms of hex A deficiency. Symptoms are similar to those that characterize classical Tay-Sachs disease. There is also an adult onset form of the enzyme deficiency. Currently there is no cure or treatment for the disease/deficiency, only the preventative measure of *in utero* testing of the fetus for the disease. Thus, the conjugates and compositions disclosed herein may be useful in ameliorating or preventing the destruction of nerve cells in such patients.

Niemann-Pick disease falls into three categories: the acute infantile form, Type B is a less common, chronic, non-neurological form, and Type C is a biochemically and genetically distinct form of the disease. In a normal individual, cellular cholesterol is imported into lysosomes for processing, after which it is released. Cells taken from subjects with Niemann-Pick have been shown to be defective in releasing cholesterol from lysosomes. This leads to an excessive build-up of cholesterol inside lysosomes, causing processing errors. NPC1 was found to have known sterol-sensing regions similar to those in other proteins, which suggests it plays a role in regulating cholesterol traffic. No successful therapies have been identified for Types A and C forms of Neumann-Pick. For Type C, patients are recommended to follow a low-cholesterol diet. Thus, the conjugates and compositions disclosed herein may be useful in ameliorating or preventing the destruction of the cells.

Gaucher's disease is an inherited illness caused by a gene mutation. Normally, this gene is responsible for an enzyme called glucocerebrosidase that the body needs to break down the fat, glucocerebroside. In patients with Gaucher's disease, the body is not able to properly produce this enzyme and the fat cannot be broken down. Like Tay-Sachs disease, Gaucher's disease is considerably more common in the descendants of Jewish people from Eastern Europe (Ashkenazi), although individuals from any ethnic group may be affected. Among the Ashkenazi Jewish population, Gaucher's disease is the most common genetic disorder, with an incidence of approximately 1 in 450 persons. In the general public, Gaucher's disease affects approximately 1 in 100,000 persons.

In 1991, enzyme replacement therapy became available as the first effective treatment for Gaucher's disease. The treatment consists of a modified form of the glucocerebrosidase enzyme given intravenously. It is contemplated that the compositions and conjugates disclosed herein can be used alone or more preferably in combination with glycocerebrosidase administration to treat the disease in an afflicted subject.

Hurler's syndrome, also known as mucopolysaccharidosis type I, is a class of overlapping diseases. These genetic diseases share in common the cellular accumulation of mucopolysaccharides in fibroblasts. The diseases are genetically distinguishable. Fibroblast and bone marrow transplantation does not seem to be helpful, thus conjugates and compositions useful in ameliorating disease severity and progression are needed. The conjugates and compositions disclosed herein may be administered to a subject to ameliorate disease progression and/or severity.

Krabbe's disease (also known as Globoid cell leukodystrophy) is an autosomal recessive condition resulting from galactosylceramidase (or galactocerebrosidase) deficiency, a lysosomal enzyme that catabolises a major lipid component of myelin. Incidence in France is an estimated 1:150,000 births. The disease leads to demyelination of the central and peripheral nervous system. Onset generally occurs during the first year of life and the condition is rapidly progressive, but juvenile, adolescent or adult onset forms have also been reported, with a more variable rate of progression. Diagnosis is established from enzyme assay (galactosylceramidase deficiency). There are several natural animal models (mouse, dog, monkey). Krabbe's disease, like all leukodystrophies, has no known cures or effective treatments. One embodiment of the instant invention is to use the compositions and conjugates disclosed herein to treat or ameliorate Krabbe's disease and other leukodystrophies.

Leukodystrophies are a group of genetically determined progressive disorders that affect the brain, spinal cord and peripheral nerves. They include adrenoleukodystrophy (ALD), adrenomyeloneuropathy (AMN), Aicardi-Goutiers syndrome, Alexander's disease, CACH (*i.e.*, childhood ataxia with central nervous system hypomyelination or vanishing white matter disease), CADASIL (*i.e.*, cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy), Canavan disease (spongy degeneration), Cerebrotendinous Xanthomatosis (CTX), Krabbe's disease (discussed above), metachromatic leukodystrophy (MLD), neonatal adrenoleukodystrophy, ovarioleukodystrophy syndrome, Pelizaeus-Merzbacher disease (X-linked spastic paraglegia), Refsum disease, van der Knaap syndrome (vaculating leukodystrophy with subcortical cysts) and Zellweger syndrome. None of the diseases have effective treatments let alone cures. Consequently, means of treating or ameliorating the symptoms of the disease, such as by using the compositions and conjugates disclosed herein, is needed.

Neuropathies with Abnormal Myelination

A variety of chronic immune polyneuropathies exist which result in demyelination in the patient. The age of onset for the conditions varies by condition. Standard treatments for

these diseases exist and could be combined with the compositions and conjugates disclosed herein. Alternatively, the compositions and conjugates disclosed can be used alone. Existing standard therapies include the following:

Table IV

Neuropathy	Clinical Features	Treatment
Chronic Immune Demyelinating Polyneuropathy (CIDP)	Onset between 1-80 years. Characterized by weakness, sensory loss, and nerve hypertrophy.	T-cell immunosuppression with prednisone, cyclosporine A or methotrexate, HIG, plasma exchange
Multifocal CIDP	Onset between 28 to 58 years and characterized by asymmetric weakness, sensory loss with a course that is slowly progressive or relapsing-remitting.	T cell immunosuppression with prednisone Human immunoglobulin (HIG)
Multifocal Motor Neuropathy (MMN)	Onset ranges from 25 to 70 years, with twice as many men as women. Features include weakness, muscle atrophy, fasciculations, and cramps which are progressive over 1-30 years.	HIG B cell immunosuppression with plasma exchange cyclophosphamide, Rituxan
Neuropathy with IgM binding to Myelin-Associated Glycoprotein (MAG)	Onset is usually over age 50 and is characterized by sensory loss (100%), weakness, gain disorder, tremor which is all slowly progressive.	B-cell immunosuppression plasma exchange cyclophosphamide Rituxan α-interferon cladribine or fludarabine prednisone
GALOP Syndrome (Gait disorder, Autoantibody, Late-age, Onset, Polyneuropathy)	A gait disorder with polyneuropathy	HIG Plasma exchange cyclophosphamide
POEMS Syndrome (Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, M-Protein and Skin changes) also known as Crow-Fukase Syndrome and Takatsuki disease	Onset occurs between 27 and 80 years with weakness, sensory loss, reduced or absent tendon reflexes, skin disorders and other features.	Osteosclerotic lesions are treated with irradiation. Widespread lesions with chemotherapy (Melphalan and prednisone).

Drug and Radiation Induced Demyelination

Certain drugs and radiation can induce demyelination in subjects. Drugs that are responsible for demyelination include but are not limited to chloroquine, FK506, perhexiline, procainamide, and zimeldine.

Radiation also can induce demyelination. Central nervous system (CNS) toxicity due to radiation is believed to be cause by (1) damage to vessel structures, (2) deletion of oligodendrocyte-2 astrocyte progenitors and mature oligodendrocytes, (3) deletion of neural stem cell populations in the hippocampus, cerebellum and cortex, and generalized alterations of cytokine expression. Most radiation damage results from radiotherapies administered during the treatment of certain cancers. *See* for review Belka *et al.*, 2001 *Br. J. Cancer* 85: 1233-9. However, radiation exposure may also be an issue for astronauts (Hopewell, 1994 *Adv. Space Res.* 14: 433-42) as well as in the event of exposure to radioactive substances.

Patients who have received drugs or been exposed accidentally or intentionally to radiation may experience a benefit by administered one of the conjugates or compositions disclosed herein to prevent demyelination or to promote remyelination.

Conditions Involving Demyelination

Additional inherited syndromes/diseases that result in demyelination include Cockayne's syndrome, congenital hypomyelinating, Farber's disease, metachromatic leukodystrophy, Peliszaeus-Merzbacher disease, Refsum, prion related conditions and Salla disease.

Cockayne's syndrome (CS) is a rare inherited disorder in which people are sensitive to sunlight, have short stature and have the appearance of premature aging. In the classical form of Cockayne's syndrome (Type I), the symptoms are progressive and typically become apparent after the age of one year. An early onset or congenital form of Cockayne's syndrome (Type II) is apparent at birth. Interestingly, unlike other DNA repair diseases, Cockayne's syndrome is not linked to cancer. CS is a multi-system disorder that causes both profound growth failure of the soma and brain and progressive cachexia, retinal, cochlear, and neurologic degeneration, with a leukodystrophy and demyelinating neuropathy without an increase in cancer. After exposure to UV (*e.g.*, sunlight), subjects with Cockayne's syndrome can no longer perform transcription-coupled repair. Two genes defective in Cockayne's syndrome, CSA and CSB, have been identified so far. The CSA gene is found on chromosome 5. Both genes code for proteins that interacts with components of the transcriptional machinery and with DNA repair proteins.

To date, no cures or effective treatments for patients with this disease have been identified. Thus, one aspect of the invention is treatment of this disease with the conjugates and compositions disclosed herein.

Congenital hypomyelination has several names including congenital dysmyelinating neuropathy, congenital hypomyelinating polyneuropathy, congenital hypomyelination (Onion Bulb) polyneuropathy, congenital hypomyelination neuropathy, congenital neuropathy caused by hypomyelination, hypomyelination neuropathy and CHN. Hereditary peripheral

neuropathies, among the most common genetic disorders in humans, are a complex, clinically and genetically heterogeneous group of disorders that produce progressive deterioration of the peripheral nerves. Congenital hypomyelination is one of a group of disorders. This group includes hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, Charcot-Marie-Tooth disease, Dejerine-Sottas syndrome, and congenital hypomyelinating neuropathy. There are no known cures or effective treatments for any of these disorders.

Farber's disease has several names including: Farber lipogranulomatosis, ceremidase deficiency, acid ceramidase deficiency, AC deficiency, N-laurylsphingosine deacylase deficiency, and N-acylsphingosine amidohydrolase. As certain names reveal, the disease occurs due to a deficiency of acid ceramidase (also known as N-acylsphingosine amidohydrolase, ASAH). The lack of the enzyme results in an accumulation of non-sulfonated acid mucopolysaccharide in the neurons and glial cells. Patients with the disease usually die before the age of 2 years.

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a genetic disorder caused by a deficiency of the enzyme arylsulfatase A. It is one of a group of genetic disorders called the leukodystrophies that affect growth of the myelin sheath. There are three forms of MLD: late infantile, juvenile, and adult. In the late infantile form, which is the most common, onset of symptoms begins between ages 6 months and 2 years. The infant is usually normal at birth, but eventually loses previously gained abilities. Symptoms include hypotonia (low muscle tone), speech abnormalities, loss of mental abilities, blindness, rigidity (*i.e.*, uncontrolled muscle tightness), convulsions, impaired swallowing, paralysis, and dementia. Symptoms of the juvenile form begin between ages 4 and 14, and include impaired school performance, mental deterioration, ataxia, seizures, and dementia. In the adult form, symptoms, which begin after age 16, may include impaired concentration, depression, psychiatric disturbances, ataxia, tremor, and dementia. Seizures may occur in the adult form, but are less common than in the other forms. In all three forms mental deterioration is usually the first sign.

Peliszaeus-Merzbacher disease (also known as perinatal sudanophilic leukodystrophy) is an X-linked genetic disorder that causes an abnormality of a proteolipid protein. The abnormality results in an infant's death typically before the age of one year. There are no known treatments or cures for the disease.

Refsum disease (also referred to as phytanic acid oxidase deficiency, heredopathia atactica polyneuritiformis or hereditary motor and sensory neuropathy IV, HMSN IV) is caused by mutations in the gene, which encodes phytanoyl-CoA hydroxylase (PAHX or PHYH). The major clinical features are retinitis pigmentosa, chronic polyneuropathy and cerebellar signs. Phytanic acid, an unusual branched chain fatty acid (3,7,11,15-tetramethyl-hexadecanoic acid) accumulates in the tissues and body fluids of patients with the disease and is unable to

be metabolised due to the lack of PAHX. Plasmapheresis performed once or twice monthly effectively removes the acid from the body and permits liberalization of dietary restrictions limiting phytanic acid intake.

Prion related conditions include Gerstmann-Straussler disease (GSD), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), familial fatal insomnia and aberrant isoforms of the prion protein can act as infectious agents in these disorders as well as in kuru and scrapie (a disease found in sheep). The term prion derives from "protein infectious agent" (Prusiner, *Science* 216: 136-44, 1982). There is a proteolytic cleavage of the prion related protein (PRP) which results in an amyloidogenic peptide that polymerises into insoluble fibrils.

Salla disease and other types of sialurias are diseases involving problems with sialic acid storage. They are autosomal recessive neurodegenerative disorders that may present as a severe infantile form (*i.e.*, ISSD) or as a slowly progressive adult form that is prevalent in Finland (*i.e.*, Salla disease). The main symptoms are hypotonia, cerebellar ataxia and mental retardation. These conditions and diseases are also contemplated for palliative or ameliorating treatments.

Other conditions that result in demyelination include post-infectious encephalitis (also known as acute disseminated encephalomyelitis, ADEM), meningitis and injuries to the spinal cord. The compositions and conjugates disclosed herein are also contemplated for use in treating these other demyelinating conditions.

The following synthetic and biological examples are offered to illustrate this invention and are not to be construed in any way as limiting the scope of this invention. Unless otherwise stated, all temperatures are in degrees Celsius.

EXAMPLES

In the examples below, the following abbreviations have the following meanings. If an abbreviation is not defined, it has its generally accepted meaning.

ACN	=	acetonitrile
bs	=	broad singlet
d	=	Doublet
dd	=	doublet of doublets
Et_3N	=	triethylamine
g	=	Grams
h and hr	=	Hour
HPLC	=	High performance (or pressure) liquid chromatography

kg	=	kilogram
kDa	=	kilodalton
L	=	Liter
m	=	multiplet
M	=	Molar
mg	=	milligram
min	=	Minute
mL	=	milliliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
mmol	=	millimol
s	=	Singlet
sat.	=	saturated
t	=	Triplet
TFA	=	trifluoroacetic acid
TLC or tlc	=	thin layer chromatography
Ts	=	Tosyl
µL	=	microliter
µg	=	microgram
µm	=	micron or micrometer

General Methods: Proton (^{1}H) and carbon (^{13}C) nuclear magnetic resonance spectra (NMR) were obtained using a Gemini 2000 or Bruker Avance 300 spectrometer. The presence of the polyethylene glycol (PEG) protons can be detected by a large, broad singlet at 3.6 ppm. The integration of this signal can vary depending on the size of the PEG moiety. Presence of the conjugated VLA-4 antagonist can also be detected in the ^{1}H NMR spectra of conjugates. Thin layer chromatography was performed on pre-coated sheets of silica 60 F_{254} (EMD 15341-1) or pre-coated MKC18F silica 60 Å (Whatman 4803-110). Mass spectrometry was performed on an Agilent mass spectrometer (LC/MSD VL) in positive ion single quad mode.

HPLC Methods for PEG products and PEG conjugates:

Preparative reverse phase HPLC was performed using a Varian Prep Star (Model SD-1) module with a Varian UV detector set at 210 nm. **Method A:** Samples of PEG products and PEG conjugates were purified using reverse phase HPLC on a Vydac C18, 300 Å pore size column (250 mm x 21.2 mm), typically using a gradient of 35-50% ACN + 0.1% TFA in 100 min at 20 mL/min. **Method B:** Samples of PEG products and conjugates were purified

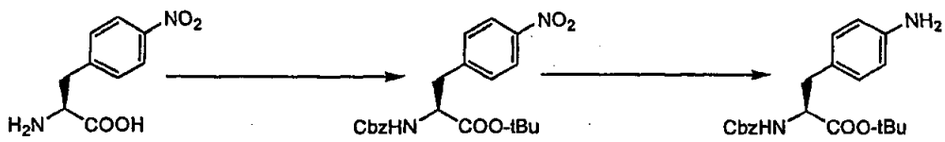
92

using reverse phase HPLC on a Vydac C18, 300 Å pore size column (250 mm x 50 mm), typically using a gradient of 35-50% ACN + 0.1% TFA in 100 min at 60 mL/min.

Method C: The purity of PEG products and conjugates was confirmed via reverse phase analytical HPLC using an Agilent Series 1100 Quaternary system equipped with a Waters Symmetry 300 Å pore size, 3.5µ C18 column (150 mm x 4.6 mm), using a gradient of 40-50% ACN w/ 0.1% TFA at a flow rate of 1.5 mL/min. and coupled to an Agilent 1100 variable wavelength detector set at 210 nm and a Sedex 75 evaporative light scattering detector (40°C, gain=5)

PEG Reagents: PEG starting materials were acquired through NOF Corporation (Yebisu Garden Place Tower, 20-3 Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokyo 150-6019) or Nektar Therapeutics (150 Industrial Road, San Carlos, CA 94070) as follows: 40 kDa 4-arm PEG alcohol (NOF Cat. Sunbright PTE-40000); 40 kDa 3-arm PEG alcohol (NOF Cat. Sunbright GL-400).

Example 1



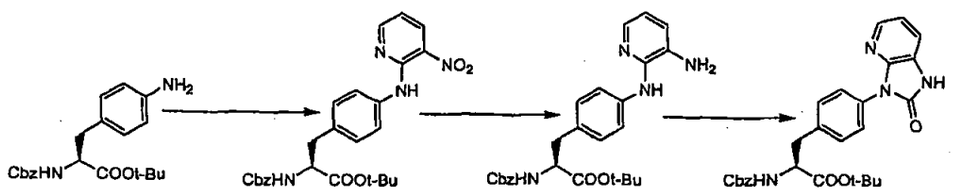
Sodium hydroxide (10 g, 0.25 m) is dissolved in water (300 ml). To this solution 4-nitrophenylalanine (50.3 g, 0.22 m) is added and stirred until complete dissolution. To the resulting solution the sodium carbonate (28.8 g, 0.26 m) is added and stirred suspension is cooled in an ice bath to +8°C. Benzyl chloroformate (44.7 g, 0.26 m) is added dropwise with vigorous stirring, maintaining internal temperature in +6° to +9°C range. The mixture is stirred at +6°C for additional 1 hr, transferred to the separatory funnel and washed with ether (2 x 150 ml). Aqueous phase is placed in a large Erlenmeyer flask (2L) and is cautiously acidified with dil. aq. HCl to pH=2 and extracted with ethyl acetate (4 x 500 ml). The combined extracts are washed with water and dried with MgSO4. The solution is filtered and filtrate evaporated, residue is dissolved in ethyl acetate (150 ml) and diluted with hexane (500 ml). Crystalline material is filtered off and rinsed with cold solvent, air dried to give Cbz-4-nitrophenylalanine, 75 g (99.5% yield). ^{1}H-NMR, DMSO-d6, (δ): 12.85 (bs, 1H), 8.12 (d, 2H, J=9Hz), 7.52 (d, 2H, J=9Hz), 7.30 (m, 5H), 4.95 (s, 2H), 4.28 (m, 1H), 3.32 (bs, 1H), 3.10 (m, 2H).^{13}C-NMR (δ): 173.1, 156.3, 146.6, 137.3, 130.8, 128.5, 128.0, 127.8, 123.5, 65.6, 55.1, 36.6. MS (m/z): 367.1 [M+23].

The Cbz-4-nitrophenylalanine (75 g, 0.22 m) is dissolved in dioxane (300 ml). The

resulted stirred solution is cooled in Dry Ice bath to -20°C (internal). The liquefied isobutylene (approx. 290 ml) is added followed by conc. sulfuric acid (35 ml) added in three equal portions, 30 min apart. The addition of acid is a very exothermic process, accompanied by substantial degree of polymerization. Efficient mechanical stirring is essential at this stage. Resulted mixture is stirred for 20 hr, allowing to warm up to ambient temperature then is cautiously poured into sat. aq. sodium carbonate solution (2L) and diluted with ethyl acetate (600 ml). Organic layer is separated and aqueous layer is extracted with ethyl acetate (2 x 200 ml). Combined extracts are washed with water and dried with sodium sulfate. The solution is filtered and evaporated to dryness. The residue is taken up in ethyl acetate/hexane mixture (500 ml; 1:1) and filtered through plug of silica gel (ca. 2x2 in). The silica is rinsed with an additional amount of the same solvent (2 L total) and the filtrates are evaporated to give fully protected 4-nitrophenylalanine as a viscous oil, 73 g (83% after two steps). ^{1}H-NMR, $CDCl_3$, (δ): 8.12 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.36 (m, 7H), 5.35 (m, 1H), 5.10 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 3.31 (m, 2H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C-NMR, $CDCl_3$, (δ): 169.7, 155.3, 146.9, 143.9, 136.0, 130.2, 128.4, 128.2, 128.0, 123.3, 82.9, 66.9, 54.7, 38.2, 31.4, 27.8, 13.9. MS (m/z): 423.1 [M+23].

Protected 4-nitrophenylalanine (73 g, 0.18 m) is dissolved in ethanol (500 ml) and platinum oxide catalyst (1.5 g) is added. The resulting solution is vigorously stirred in hydrogen atmosphere (50-60 psi) at ambient temperature until further hydrogen adsorption ceased (3 hr). The catalyst is filtered off and the filtrate is evaporated to dryness, the residue is taken up in ethyl acetate (200 ml) and filtered through plug of silica gel (2x2 in) using ethyl acetate-hexane mixture (3:2, 2L) to rinse silica. The filtrate is concentrated to approx. 200 ml and hexane (500 ml) is added. The crystalline product is filtered off, rinsed with cold solvent and air-dried. Yield – 56 g, 84%. ^{1}H-NMR, $CDCl_3$, (δ): 7.30 (bs, 5H), 6.92 (d, 2H, J=8.1Hz), 6.58 (d, 2H, J=8.1Hz), 5.21 (m, 1H), 5.10 (d, 2H, J=2.1Hz), 4.46 (m, 1H), 3.59 (bs, 2H), 2.97 (s, 2H, J=5.4Hz), 1.42 (s, 9H). ^{13}C-NMR, $CDCl_3$, (δ): 170.6, 145.1, 136.3, 130.2, 128.3, 127.9, 125.6, 115.0, 81.9, 66.6, 55.2, 37.4, 27.8 MS (m/z): 393.1 [M+23].

Example 2



The product of Example 1, 4-aminophenylalanine, (20 g, 0.054 m) was dissolved in

94

ethanol (200 ml) and treated with Hunig's base (21 g, 0.162 m, 3 eq) and 2-chloro-3-nitropyridine (10.3 g, 0.65 m, 1.2 eq). Resulted solution was stirred under nitrogen atmosphere and heated to reflux for 24 hr. LC analysis indicated presence of small amount of unreacted amine. The small additional amount of chloronitropyridine (1.1 g, 0.13 eq) was added and reflux continued for another 24 hr. Reaction mixture was cooled and evaporated to dryness. Residue was dissolved in ethyl acetate (600 ml) and obtained solution was washed with water (1 x 200 ml), dil. aq. citric acid (0.2 N, 2 x 200 ml), brine (1 x 200 ml) and dried with sodium sulfate. Solids were filtered off and filtrate evaporated to give 37 g of deep-red oil, containing expected product contaminated with excess of chloronitropyridine. Impure product was purified by flash chromatography (Biotage 75L system) eluting with ethyl acetate:hexane (3:17) mixture. Fractions containing pure product were combined and evaporated to give deep-red, viscous oil, 26 g (99%). ^{1}H-NMR, $CDCl_3$, (δ): 10.10 (s, 1H), 8.49 (m, 2H), 7.57 (d, 2H, J=9Hz), 7.35 (bs, 5H), 7.19 (d, 2H, J=9Hz), 6.84 (m, 1H), 5.30 (m, 1H), 5.13 (d, 2H, J=3Hz), 4.57 (m, 1H), 3.11 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). ^{13}C-NMR, $CDCl_3$, (δ): 170.4, 155.5, 155.1, 150.0, 136.7, 136.3, 135.4, 132.4, 129.9, 128.5, 128.3, 128.0, 127.9, 122.2, 113.7, 82.2, 66.7, 55.1, 37.7, 27.8, 20.9. MS (m/z): 493.1 [M+1], 515.1 [M+23].

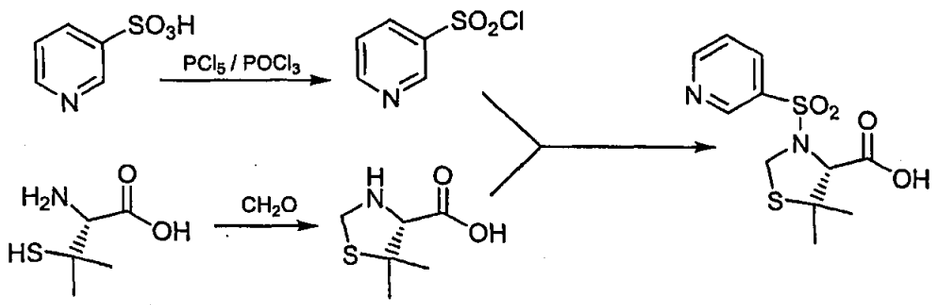
The red nitro compound (26 g, 0.054 m) was dissolved in THF (350 ml) and platinum oxide catalyst (1.35 g) was added. Resulted mixture was vigorously stirred under hydrogen atmosphere (50-60 psi) until hydrogen adsorption ceased (2 hr). Catalyst was filtered off and filtrate evaporated to dryness. Residue was dissolved in ethyl acetate (100 ml) and diluted with hexane (50 ml) till beginning of crystallization. Mixture was further diluted with ethyl acetate/hexane (1:1) mixture (300 ml) and was left standing in refrigerator for 3 hr. Crystalline solids were filtered off, rinsed with cold solvent and air-dried to give product, 23 g, 94%. ^{1}H-NMR, $CDCl_3$, (δ): 7.81 (dd, 1H, J1=1.5Hz, J2=4.8Hz), 7.33 (bs, 5H), 7.17 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.03 (d, 2H, J=8.4Hz), 6.96 (dd, 1H, J1=1.5Hz, J2=7.5Hz), 6.75 (dd, 1H, J1=5.0Hz, J2=7.7Hz), 6.22 (s, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.09 (bs, 2H), 4.50 (m, 1H), 3.41 (bs, 2H), 3.02 (m, 2H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C-NMR, $CDCl_3$, (δ): 170.6, 155.6, 145.5, 140.21, 138.8, 136.3, 130.8, 129.9, 128.5, 128.3, 127.9, 123.4, 118.2, 117.0, 82.0, 66.6, 55.2, 37.4, 27.9. MS (m/z): 407.1 [M-56], 463.1 [M+1], 485.1 [M+23].

The aminopyridine (19 g, 0.041 m) was suspended in dichloromethane (200 ml) and CDI (12 g, 0.074 m, 1.8 eq) was added. Resulted mixture was stirred at ambient temperature for 20 hr. Reaction mixture was washed with sat. aq. bicarbonate (2 x 100 ml), brine (1 x 100 ml) and dried with sodium sulfate. Solids were filtered off and filtrate evaporated to dryness. Residue was dissolved in ethyl acetate (hot, 300 ml) and set to crystallize. Crystalline product was filtered off, rinsed with cold ethyl acetate and air-dried to give 19.9 g, 81% of the imidazolone. ^{1}H-NMR, $CDCl_3$, (δ): 10.63 (s, 1H), 8.06 (d, 1H, J=3Hz), 7.66 (d, 2H, J=9Hz),

95

7.32 (m, 8H), 7.05 (m, 1H), 5.36 (m, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.59 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). ^{13}C-NMR, $CDCl_3$, (δ): 170.4, 155.6, 154.3, 143.8, 141.0, 136.2, 135.8, 131.8, 130.2, 128.3, 128.0, 125.9, 122.2, 118.3, 116.0, 82.4, 66.8, 55.0, 37.7, 27.8. MS (m/z): 433.1 [M-56], 489.2 [M+1], 511.2 [M+23].

Example 3



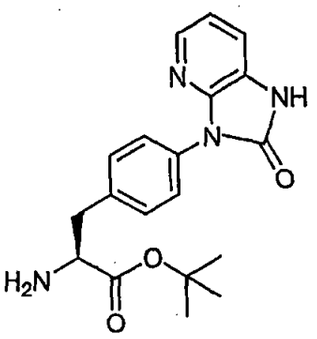
Pyridine-3-sulfonic acid (125 g, 0.78 m) was placed in a 1L, 3-necked flask equipped with mechanical stirrer, reflux condenser, thermometer and nitrogen inlet. Next, the phosphorus pentachloride (250 g, 1.19 m, 1.5 eq) was added, followed immediately by the phosphorus oxychloride (330ml, 3.8 m, 4.5 eq). The contents of flask were initially stirred at ambient temperature for 30 min, then brought slowly to gentle reflux (internal temp. approx. 110°C) over the next hour, kept at this temperature for approx. 3.5 hr then allowed over the next 12 hr to cool back to ambient temperature. Gas evolution was observed during this time. The volatiles were stripped under reduced pressure (at 12 mmHg/40°C) and yellow semi-solid residue was diluted with DCM (1L). The slurry was poured slowly into the stirred, ice-cold sat. aq. bicarbonate, maintaining pH=7. Gas evolution was observed. The organic layer was separated and aqueous layer was back-extracted with DCM. The combined extracts were washed with cold sat. aq. bicarbonate, brine and dried with magnesium sulfate. The solids were filtered off and filtrate evaporated, leaving pyridine-3-sulfonyl chloride as a pale yellow, oily liquid, 123 g (93% pure; 88% theory). ^{1}H-NMR, $CDCl_3$, (δ): 9.26 (d, 1H), 8.98 (dd, 1H), 8.34 (m, 1H), 7.62 (m, 1H). ^{13}C-NMR, $CDCl_3$, (δ): 155.3, 147.4, 140.9, 134.6, 124.2. MS (m/z): 178.0 [M+1].

L-penicillamine (150 g, 1.0 m) was dissolved with stirring in DI water (1500 ml), cooled

in ice-bath to +8°C and treated with formalin (150 ml, 37% aq.). The reaction mixture was stirred at +8°C for 2 hr, then cooling bath was removed and stirring continued for 12 hr. The clear solution was concentrated under reduced pressure (14 mmHg/50°) leaving white residue. The solids were re-suspended, then dissolved in hot MeOH (2500 ml) and left standing at ambient temperature for 12 hr. The white, fluffy precipitate was filtered off and rinsed with cold methanol. The filtrate was concentrated and set to crystallize again. The collected precipitate was combined with the first crop and dried in vacuum oven for 24 hr at 55°C at 45 mmHg. The yield of (R)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid was 138 g (>99% pure; 86% theory). ^{1}H-NMR, DMSO-d6, (δ): 4.25 (d, 1H), 4.05 (d, 1H), 3.33 (s, 1H), 1.57 (s, 3H), 1.19 (s, 3H). ^{13}C-NMR, DMSO-d6, (δ): 170.8, 74.4, 57.6, 51.8, 28.9, 27.9. MS (m/z): 162.3 [M+1].

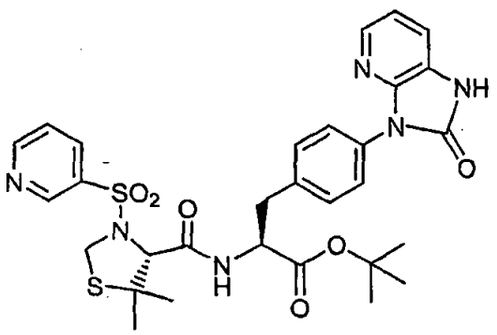
In a 4L reactor equipped with mechanical stirrer and thermometer, a buffer solution was prepared from potassium monobasic phosphate (43 g, 0.31 m) and potassium dibasic phosphate (188.7 g, 1.08 m) in DI water (2L). The (R)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid (107 g, 0.675 m) was added and stirred until complete dissolution. The solution was cooled in an ice-bath to +8°C. A separately prepared solution of pyridine-3-sulfonyl chloride (124 g, 0.695 m) in DCM (125 ml) was added dropwise to the reactor with vigorous stirring over the 1 hr. The pH of reaction mixture was monitored and after 4 hr, found to be pH=5 and adjusted to pH=6 by addition of solid bicarbonate. The mixture was allowed to warm up to ambient temperature over 18 hr. The pH was adjusted to 2 with dil. aq. sulfuric acid, stirred for 1 hr and precipitated yellow solids were filtered off, rinsed with water to neutral. The solid cake was transferred into 2L Erlenmayer flask, suspended in DCM (500 ml) with occasional swirling for 5 min and filtered off again. The filter cake was washed with DCM and air-dried. The yield of the title compound, (R)-5,5-dimethyl-3-(pyridin-3-ylsulfonyl)thiazolidine-4-carboxylic acid was 148.9 g (98% pure; 73% theory). ^{1}H-NMR, DMSO-d6, (δ): 9.05 (d, 1H), 8.89 (m, 1H), 8.32 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 4.68 (q, 2H), 4.14 (s, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.29 (s, 3H). ^{13}C-NMR, DMSO-d6, (δ): 170.0, 154.3, 147.9, 135.8, 134.1, 124.8, 72.6, 54.3, 50.2, 29.4, 25.0. MS (m/z): 303.2 [M+1].

Example 4



The product of Example 2 (52 g, 0.106 m) was slurried in MeOH (450 ml), hydrogenation catalyst (8.7 g, 5% Pd/C, Degussa) was added and the mixture was stirred under the hydrogen atmosphere (60 psi) until further absorption ceased (ca. 2 hrs). THF (150 ml) was added to dissolve precipitated solids and the solution was filtered through plug of Celite, using DCM to rinse the filter. The filtrate was evaporated to dryness, re-dissolved in DCM (300 ml) and stripped again. This operation was repeated twice. The foamy solids were kept under high vacuum for 3 hrs. The yield of title compound was 38.3 g (101% of theory). ^{1}H-NMR, $CDCl_3$, (δ): 8.08 (m, 1H), 7.56 (AB q, 4H), 7.37 (m, 1H), 7.06 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 2.03 (m, 2H), 1.49 (s, 9H). ^{13}C-NMR, $CDCl_3$, (δ): 173.8, 154.6, 143.9, 141.0, 137.4, 131.5, 130.2, 126.1, 122.3, 118.0, 116.1, 81.4, 56.0, 40.6, 27.9. MS (m/z): 299.3 [M-56], 355.4 [M+1], 377.4 [M+23].

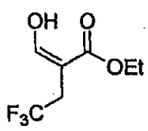
Example 5



The product of Example 4 (38.3 g, assume 0.106 m) was dissolved in DCM (500 ml) and treated successively with: N-methylmorpholine (27 g, 30 ml, 0.266 m; 2.5 eq), HOBt (17.3 g, 0.128 m, ; 1.2 eq), and the product of Example 3 (33.8 g, 0.112 m; 1.06 eq). The resulting non-homogenous solution was cooled in an ice-bath to +4°C and treated with EDC (22.5 g,

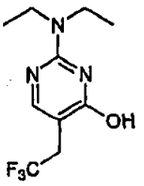
0.117 m; 1.1 eq) in one portion. The reaction mixture was stirred, allowing it to warm up to ambient temperature over the next 4 hr and then for 18 hr more. The solvent was stripped and residue dissolved in ethyl acetate (1.2L), washed with sat. aq. bicarbonate (2 x 250 ml), water (250 ml), brine (300 ml) and dried with magnesium sulfate. The solution was filtered and evaporated to dryness, leaving a light orange, viscous oil, 76 g (>>100%). The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Biotage 75L, in ethyl-acetate/methanol (3%) mixture. Fractions, containing pure product, were combined and evaporated to give 54 g of of the title compound (yield 83%). ^{1}H-NMR, $CDCl_3$, (δ): 10.37 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.87 (m, 1H), 8.19 (m, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.56 (AB q, 4H), 7.52 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.06 (m, 2H), 4.83 (m, 1H), 4.58 (AB a, 2H), 3.96 (s, 1H), 3.19 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.22 (s, 3H), 1.18 (s, 3H). ^{13}C-NMR, $CDCl_3$, (δ): 169.7, 167.6, 153.9, 148.4, 143.8, 140.9, 135.8, 135.6, 132.9, 131.9, 130.2, 125.9, 123.8, 122.1, 118.0, 115.9, 82.8, 73.6, 60.3, 54.8, 53.7, 50.6, 37.8, 29.1, 27.8, 23.9, 14.1. MS (m/z): 583.3[M-56], 639.4 [M+1], 661.3 [M+23].

Example 6



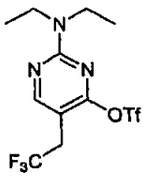
To an ice chilled solution of ethyl trifluorobutyrate (15 g, 89 mmol) and ethyl formate (36 mL, 444 mmol) in THF (200 mL) under N_2 was added a solution of 1 M KOtBu in THF (107 mmol, 107 mL) over a 25-minute period. After 15 minutes the ice bath was removed and the reaction mixture was stirred one hour at room temperature. Additional ethyl formate (18 mL, 222 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction mixture was concentrated and the residue partitioned between cold ether (100 mL) and cold water (300 mL). The pH of the aqueous phase was adjusted to 2 with concentrated HCl. The product was extracted with dichloromethane (1 x 100 mL, 45 x 75 mL) and the combined organic extracts were washed with brine (1 x 100 mL), dried ($MgSO_4$), filtered, and concentrated to yield the title compound as thick oil which solidified upon standing, 10.2 g (58.5%). MS (m/z) = 198 $(M + H)^+$.

Example 7



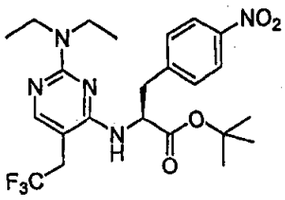
To a solution of the product of Example 6 (10 g, 51 mmol) and diethylguanidine sulfate (8.3g, 25.2 mmol) in EtOH (60 mL) under N_2, was added NaOEt, 21% solution in EtOH (20.7 mL, 55.5 mmol) over a 10-minute period. The reaction mixture was then heated at reflux for 5 hours. The heterogeneous solution was cooled and poured into cold water (100 mL) to give a homogenous solution. The pH of the solution was adjusted to approximately 3.5 with conc. HCl and 1 N HCl. A solid precipitated from solution, which was collected by filtration. The light tan solid was washed with water and air-dried, yielding 2.9 g, (23%) of the title compound. MS (m/z) = 250 $(M + H)^+$. ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.65 (br s, 1H), 3.55 (q, 4H), 3.30 (q, 2H), 1.25 (t, 6H).

Example 8



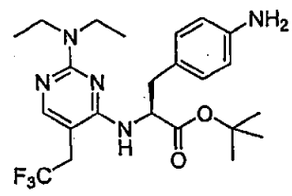
A flask was charged with the product of Example 7 (2.0 g, 8.02 mmol), DIEA (1.5 mL, 8.83 mmol), DMAP (.98 g, 0.8 mmol), and dichloromethane (30 mL). The mixture was cooled to 0°C and trifluoroacetic anhydride (1.5 mL, 8.83 mmol) was added. The reaction became homogeneous and was stirred at 0°C for 3 hours. The mixture was quenched with sat. $NaHCO_3$ and extracted with dichlorormethane. The organic phase was washed with 0.2 N citric acid, dried over Na_2SO_4, filtered, and concentrated *in vacuo* to yield 2.87 g (94%) of the title compound as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.28 (s, 1H), 3.65-3.52 (m, 4H), 3.29-3.19 (q, 2H), 1.22-1.17 (t, 6H).

Example 9



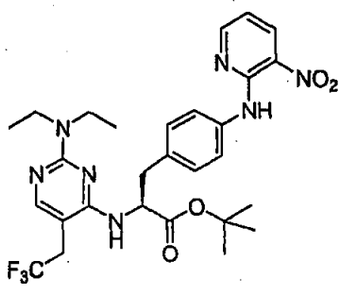
A solution of the product of Example 8 (1.3g, 3.5 mmol), H-Phe(p-NO_2)OtBu (1.1 g, 4.2 mmol), and DIEA (0.9 mL, 5.3 mmol) in CH_3CN (14 mL) under N_2 was heated to reflux overnight. The next day additional H-Phe(p-NO_2)OtBu (0.8 g, 3 mmol) was added and reflux was continued for 3 days. The reaction mixture was then cooled and concentrated The residue taken-up in EtOAc (50 mL) and the organic portion washed with 0.5 N $KHSO_4$ (3 x 50 mL), water (1 x 50 mL), brine (1 x 10 mL), dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated to a brownish gum. The crude material was purified by flash chromatography (5:1 hexanes/EtOAc) to yield 640 mg (38%) of the title compound as a golden gum. TLC: 3:1 hexanes/EtOAc, R_f = 0.30, MS (m/z) = 498 $(M+H)^+$, ^1H NMR, (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.19 (d, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.25 (d, 2H), 5.19 (br d, 1H), 4.95 (q, 1H), 3.70 –3.50 (m, 4 H), 3.45 – 3.25 (m, 2 H), 3.10 (q, 2H), 1.40 (s, 9 H), 1.05 (t, 6 H).

Example 10



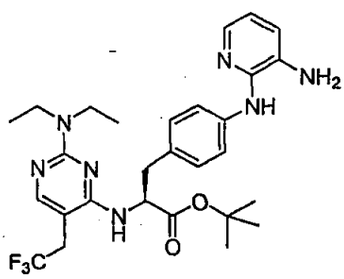
The product of Example 9 (635 mg, 1.27 mmol) was dissolved in absolute EtOH (5 mL) to which was added 35 mg of Pd/C, 10 wt%. The reaction was subjected to hydrogenation (45 psi H_2) for 2.5 hours at which time 50 mgs of Pd/C , 10 wt % was added and the reaction mixture again subjected to hydrogenation (45 psi H_2) overnight. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite and the filtrate was concentrated to give 452 mg (76%) of the title compound. MS (m/z) = 468 $(M+H)^+$, ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.75 (s, 1 H), 6.90 (d, 2 H), 6.60 (d, 2 H), 5.05 (br d, 1 H), 4.80 (q, 1 H), 3.70 – 3.45 (m, 6 H), 3.10 – 2.90 (m, 4 H), 1.40 (s, 9 H), 1.15 (t, 6H).

Example 11



A solution of the product of Example 10 (598mg, 1.28mmol), 2-chloro-3-nitropyridine (243 mg, 1.53 mmol), and DIEA (0.67 mL ,3.83 mmol) in EtOH (5 mL) under N_2 was heated at reflux. The next day the reaction was cooled and additional 2-chloro-3-nitropyridine (40 mg, 0.25 mmol) and DIEA (0.11 mL, 0.60 mmol) was added and the reaction was heated at reflux for one day. The reaction mixture was then concentrated and the residue taken-up in EtOAc (20 mL). The organic phase was washed with water (2 x 20 mL). The combined aqueous washes was back extracted with EtOAc (2 x 10 mL). The combined organic extracts were washed with 0.2 N citric acid (3 x 20 mL), water (1 x 10 mL), sat. NaHCO3 (3 x 20 mL), brine (1 x 10 mL), dried (MgSO4), filtered and stripped to an orange gum. The crude product was purified by flash chromatography eluting with 4:1 hexanes/EtOAc (R_f = 0.14) to yield 610 mg (81%) of the title compound as a red oil. MS (m/z) = 590 $(M+H)^+$, ^1H NMR (300 MHz , $CDCl_3$) δ 10.10 (s, 1H), 8.55 (d, 1H), 8.50 (m, 1H), 7.79 (s, 1 H), 7.75 (d, 2H), 7.15 (d, 2H), 6.80 (q, 1H), 5.10 (br d, 1 H), 4.90 (m, 1 H), 3.70 – 3.45 (m, 4 H), 3.25 (m, 2H), 3.10 (q, 2 H), 1.40 (s, 9H), 1.10 (t, 6 H).

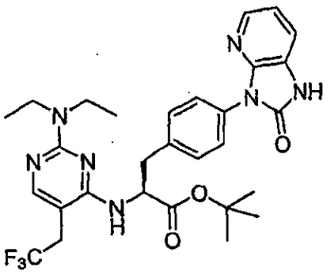
Example 12



To a solution of the product of Example 11 (610 mg, 1.03 mmol) in absolute EtOH (5 mL) was added 60 mg of Pd/C, 10 wt%. The mixture was subjected to hydrogenation (45 psi H_2) overnight. The next day the reaction mix was filtered through Celite and the filtrate

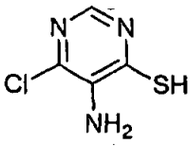
concentrated to give 500 mg (87%) of the title compound. MS (m/z) = 560 $(M+H)^+$, ^1H NMR (300 MHz , $CDCl_3$) δ 7.85 (d, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.20 (d, 2H), 7.05 (d, 2H), 7.00 (d, 1 H), 7.75 (m, 1 H), 6.20 (br s 1 H), 5.15 (br s, 1H), 4.85 (m, 1H), 3.75 – 3.45 (m, 4 H), 3.40 (br s, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.05 (q, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.15 (t, 6 H).

Example 13



A solution of the product of Example 12 (141 mg, 0.250 mmol) and CDI (62 mg, 0.378 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was stirred overnight. The next day additional CDI (30 mg, 0.185 mmol) was added and the reaction was stirred another day. The reaction mixture was then concentrated and taken-up in EtOAc (10mL) and the organic portion washed with 0.2 N citric acid (3 x 5 mL), water (1 x 5 mL), sat. $NaHCO_3$ (3 x 5 mL), brine (1 x 5 mL), dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated to yield 69 mg (47%) the title compound as a foam which was used without further purification. MS (m/z) = 586 $(M+H)^+$, ^1H NMR (300 MHz , $CDCl_3$) δ 8.20 (br s, 1 H), 8.05 (d, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.65 (d, 2 H), 7.90 (m, 3 H), 7.05 (m, 1 H), 5.15 (br d, 1H), 4.95 (m, 1H), 3.70 – 3.45 (m, 4 H), 3.25 (app d, 2 H), 3.10 (q, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.15 (t, 6 H).

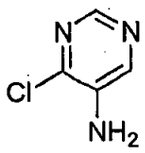
Example 14



To a solution of 4,6-dichloro-5-aminopyrimidine (5.0g , 30.7 mmol) in DMSO (30 mL) was added $Na_2S{\cdot}9H_2O$ (7.4 g, 30.8 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. Water (40 mL) was then added to the mixture and the solution evaporated under reduced pressure to approximately 6 mL. To this solution was added conc. HCl (0.5 mL) and water to precipitate the product. The solution was filtered and the orange solid was washed

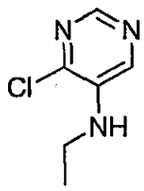
with water and dried to afford 4.3 g (86%) of the title compound. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 5.84 (2 H, s), 7.79 (1 H, s), 14.37 (1H, br s); MS(m/z): MH^+ = 162.

Example 15



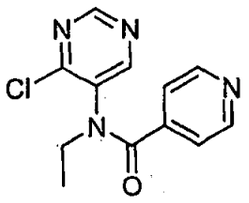
To the product of Example 14 (4.3 g , 26 mmol) dissolved in conc. NH_4OH (4 mL) was added EtOH (40 mL). To this solution, Raney Nickel (excess) was added in portions. The reaction was stirred at room temperature overnight and then heated at 80°C for 2 hrs. The mixture was filtered through Celite and the filtrate concentrated. The crude product was purified by flash chromatography on silica using EtOAc/hexanes to afford 1.6 g (47%) of the title compound as a yellow solid. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 5.90 (2 H, s), 8.20 (2 H, s); MS(m/z) MH^+ = 130.

Example 16



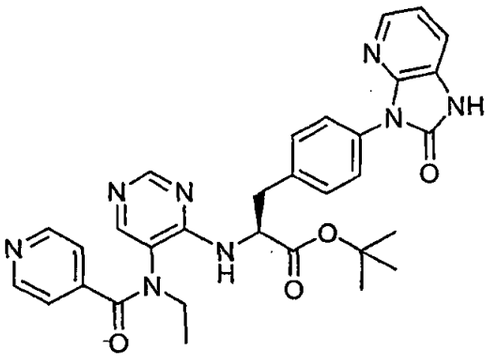
To the product of Example 15 (0.51 g, 3.9 mmol) in MeOH (20 mL) and HOAc (0.5 mL) was added CH_3CHO (0.52 mL, 9.2 mmol). Then $NaBH_3CN$ (590 mg, 9.2 mmol) was added in one portion. The reaction was stirred at room temperature overnight and additional HOAc, CH_3CHO, and $NaBH_3CN$ were added. The reaction was stirred overnight, concentrated, and the residue was taken up in EtOAc and sat. $NaHCO_3$. The separated aqueous layer was back extracted with EtOAc. The combined organic layer was dried and concentrated to a residue. The residue was dissolved in MeOH and treated with HOAc, CH_3CHO and $NaBH_3CN$ as described above. Following the work up procedure described above the crude product was purified by flash chromatography on silica using EtOAc/hexanes, to afford 0.35g (57%) of the title compound as a yellow oil. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.35 (3 H, q, J = 12 Hz), 3.29 (2 H, m), 4.21 (1H, bs), 8.04 (1 H, s), 8.36 (1H, s); MS(m/z): MH^+ = 158.

Example 17



To the product of Example 16 (70 mg, 0.45 mmol) dissolved in DMF (1 mL) was added TEA (93 uL) and isonicotinoyl chloride (0.12 g, 0.67 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 days and then partitioned between EtOAc and sat. $NaHCO_3$. The separated aqueous layer was back extracted with EtOAc. The combined organic layer was dried and concentrated to give 67 mg (57%) of the title compound which was used without further purification. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.26 (3 H), 3.65-3.69 (1 H), 4.21 (1H), 7.17 (2 H), 8.43 (1H), 8.54 (2 H), 8.86 (1 H) Note: ^1H NMR shows evidence of rotamers as demonstrated of broadness of all peaks; MS(m/z): MH^+ = 263.

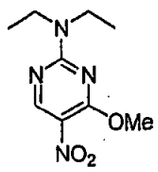
Example 18



To a solution of the product of Example 17 (0.11 g, 0.42 mmol) and the product of Example 8 (0.135 g, 0.38 mmol) in IPA (2.5 ml) was added DIEA (0.35 ml, 1.9 mmol). The reaction mixture was stirred in a sealed tube at 130°C for 2 days. The crude mixture was concentrated and the oil was purified by flash column chromatography with a solvent gradient of 0-10% MeOH in CH_2Cl_2 to yield the title compound as an oil. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.16 (1.2 H, m), 1.26-1.31 (1.8 H, m), 1.50-1.53 (9 H, d, J = 9 Hz), 3.0 (1 H, m), 3.2 (0.8 H, m), 3.36 (1.2 H, m), 4.12-4.18 (1.2 H, m), 4.96-5.10 (.8 H, m), 5.80-5.95 (1 H, m), 6.93-6.96 (1 H, m), 7.07 (1 H, m), 7.31-7.45 (5 H, m), 7.66-7.75 (3 H, m), 8.06 (1 H, m), 8.44-8.51 (2 H, m);

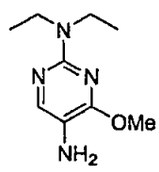
HPLC/MS: single peak at 1.29 min, MH^+ = 581.

Example 19



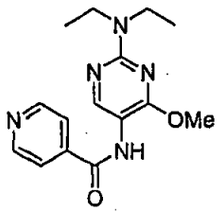
To 2,4-dichloro-5-nitropyrimidine (2.0 g, 10.3 mmol) in MeOH (7 mL) at 0°C under N_2 was added NaOMe (0.5 M in MeOH, 25 mL) dropwise. After the addition was completed, the reaction mixture was stirred at 0 C for 15 min. Then diethylamine (5 mL) was added and the mixture was stirred at rt overnight. The reaction mixture was concentrated and the residue was partitioned between EtOAc and H_2O. The organic layer was dried and concentrated to a residue which was purified by flash chromatography on silica using EtOAc/Hexanes, to afford the title compouns as an off white solid (1.1 g, 4.9 mmol, 47% yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl3) δ 1.26 (6H, t, J = 6.6 Hz), 3.70 (4 H, m), 4.08 (3 H, s), 9.01 (1H, s); HPLC/MS: MH^+ = 227.

Example 20



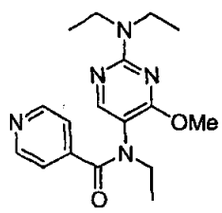
The product of Example 19 (1.1g, 4.9 mmol) in MeOH/EtOAc (1:1, 20 mL) was reduced with Pd/C (5% degussa, 0.5g) and H_2 (50 psi) in a Parr shaker overnight. The reaction mixture was filtered and the filtrated was concentrated under reduced pressure to afford the title compound as a solid (0.85g, 4.3 mmol, 88.5% yield). ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.18 (6H, t, J = 6.9 Hz), 3.03 (2 H, br), 3.57 (6H, t, J = 6.9 Hz), 3.96 (3H, s), 7.71 (1H, s); HPLC/MS: MH^+ = 197.

Example 21



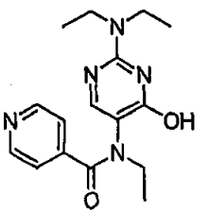
To the product of Example 20 (0.85g, 4.3 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) and TEA (1.4 mL, 10 mmol) was added isonicotinyl chloride HCl salt (1.13g, 6.3 mmol). After 15 min, TLC showed no starting material. The mixture was extracted between EtOAc and sat. $NaHCO_3$. The aqueous layer was washed with EtOAc twice. The combined organic layers were washed with sat. $NaHCO_3$ and brine. It was dried over $MgSO_4$ and filtered. The filtrate was concentrated to give the title compound as a brown solid (1.3g, 4.3 mmol, 100% yield). ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.20 (6H, t, J = 6.9 Hz), 3.60 (4 H, q, J = 6.9 Hz), 3.96 (3 H, s), 7.72 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.75 (1H, bs), 8.80 (2H, d, J = 6.0 Hz), 8.89 (1H, s); HPLC/MS: MH^+ = 302.

Example 22



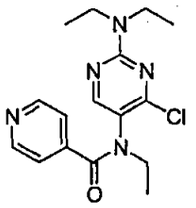
To the product of Example 21 (100 mg, 0.33 mmol) in THF (1 mL) was added KOtBu (1M in THF, 0.5 mL) slowly followed by EtI (40 □L, 0.5 mmol). The reaction mixture was stirred at rt overnight. TLC showed the disappearance of the starting material. The mixture was partitioned between EtOAc and H_2O. The aqueous layer was washed with EtOAc. The combined organic layers were washed with sat. $NaHCO_3$ and brine. It was dried and concentrated to give the title compound (90 mg, 0.27 mmol, 83%) that was used without further purification. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.10 (9H, m), 3.47 (5 H, m), 3.92 (1 H, m), 7.14 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.78 (1H, bs), 8.44 (2H, d, J = 6.0 Hz); HPLC/MS: MH^+ = 330.

Example 23



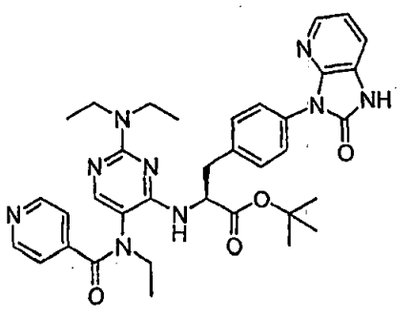
To the product of Example 22 (200 mg, 0.61 mmol) in DMF (4 mL) was added EtSNa (66 mg, 0.79 mmol) and the reaction mixture was heated at 100 C for 1 hr. LC/MS showed starting material still present. Another portion of NaSEt (66 mg, 0.79 mmol) was added and the reaction heated for another 2 hr. LC/MS showed product only. DMF was removed under reduced pressure and H_2O (10 mL) was added followed by conc. HCl (0.132 mL). Evaporating of the solvent left a residue. It was dissolved in EtOH and filtered. The filtrate was concentrated to to yield the title compound (190 mg, 100%) that was used without further purification. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.24 (9H, m), 3.60 (4 H, m), 3.60-4.00 (2 H, br), 8.12 (3H, d, J = 5.7 Hz), 8.92 (2H, d, J = 5.7 Hz); HPLC/MS: MH^+ = 316.

Example 24



To the product of Example 23 (70 mg, 0.22 mmol) in $POCl_3$ (3 mL) at rt was added diethylaniline (30 µL). The reaction mixture was heated to 100 C for 30 min. Then it was concentrated. The residue was partitioned between EtOAc and H_2O. The organic layer was washed with H_2O twice. Then it was dried and concentrated to give the title compound (50 mg, 0.15 mmol, 68%) and used for the next reaction without further purification. HPLC/MS: MH^+ = 334

Example 25

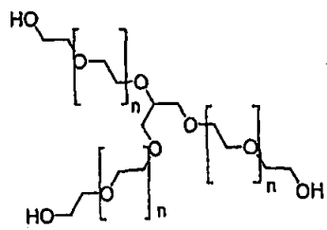


To a solution of the product of Example 24 (50 mg, 0.15 mmol) and the product of Example 8 (60 mg, 0.17 mmol) in IPA (0.75 mL) was added DIEA (0.15 mL, 0.8 mmol). The reaction mixture was stirred in a sealed tube at 130 degrees for 7 days. The crude mixture was concentrated and the residue was purified by preparative HPLC and silica gel flash chromatography to yield an off white solid (10 mg). 1H NMR (300 MHz, CDCl3) δ 1.10-1.30 (9H, m), 1.48 (4.5H, s), 1.51 (4.5H, s), 2.80-3.38 (3H, m), 3.53 (4H, m), 4.05-4.30 (1H, m), 4.83 (0.5H, m), 4.96 (0.5H, m), 5.15-5.50 (1H, m), 6.95-7.10 (2H, m), 7.25-7.50 (5H, m), 7.69 (0.5H, d, J = 8.4 Hz), 7.76 (0.5H, d, J = 8.4 Hz), 8.08 (1H, d, J = 5.1 Hz), 8.51 (2H, m), 8.83 (0.5H, br), 8.95 (0.5H, br);

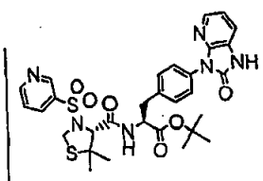
HPLC/MS: MH+ = 652.

Example 26

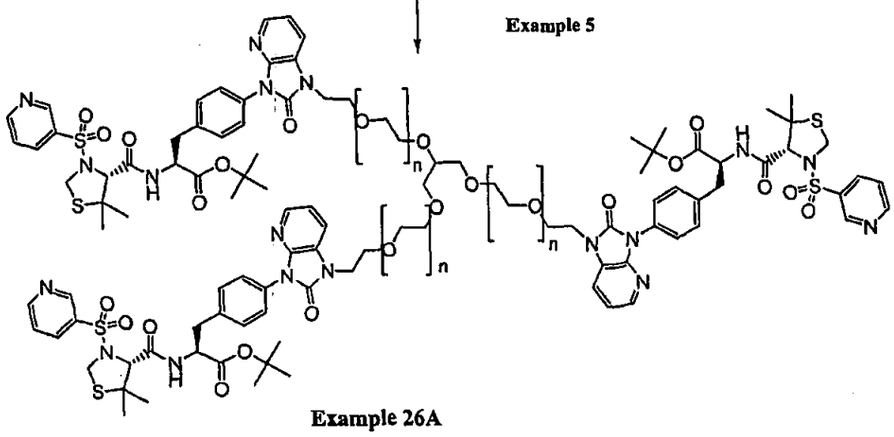
Procedure A



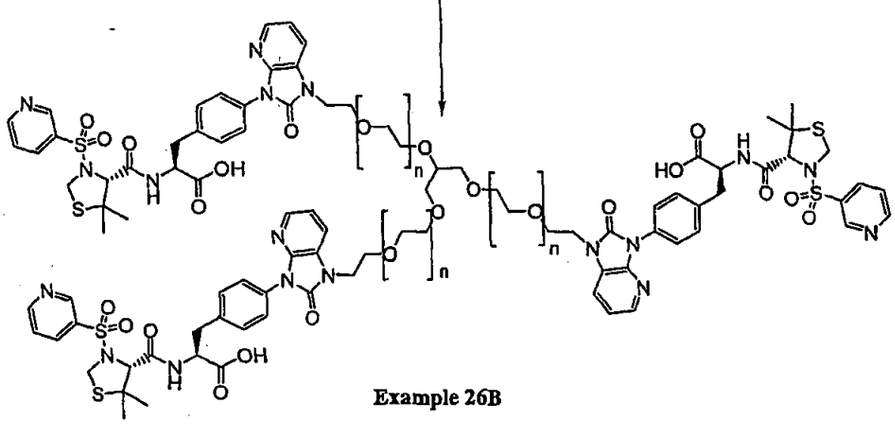
40 kDa 3-arm PEG alcohol
NOF Corporation



Example 5



Example 26A



Example 26B

110

Example 26A The 40 kDa 3-arm PEG alcohol (0.25 g, 0.00625 mmol), the product from Example 5 (0.04 g, 0.056 mmol), and triphenylphosphine (0.025 g, 0.094 mmol) were dried by azeotropic distillation from toluene (5 mL). Half of the volume was distilled over (2.5 mL), and the mixture was cooled to room temperature. CH_2Cl_2 (0.5 mL) was added to make the reaction homogeneous. Diethylazodicarboxylate (0.015 mL, 0.094 mmol) was added drop-wise and the reaction stirred for 48 hours. HPLC Method C showed the complete disappearance of the starting PEG alcohol. The reaction was concentrated *in vacuo* to yield the **t-butyl ester** Example 26A as a white solid.

Example 26B

Example 26A (0.2 g, 0.005 mmol) was dissolved in formic acid (3 mL) and heated at 40°C for 24 hours. The reaction was concentrated *in vacuo* and was purified according to HPLC Method A to yield 0.1 g (48%) of Example 26B as a white solid. HPLC Method C determined the conjugate to be >99% pure (retention time= 8.1 minutes). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 9.08 (bs, 3H), 8.84 (bs, 3H), 8.18-8.16 (d, 3H), 8.02-8.00 (d, 3H), 7.67-7.61 (m, 6H), 7.47-7.38 (m, 9H), 7.08-7.04 (m, 3H), 6.91 (m, 3H), 4.88 (m, 3H), 4.62-4.49 (dd, 6H), 4.13 (m, 6H), 3.64 (bs, 5919H PEG), 3.23 (m, 6H), 1.25-1.24 (d, 18H).

Procedure B

A mixture of GL400 Sunbright PEG (50.0 g, NOF lot# M4N594), the product from Example 5 (7.19 g, 9 eq vs. GL400, 3 eq/hydroxyl), and triphenylphosphine (2.95 g, 9 eq) was taken up in toluene (300 mL) and distilled to azeotropically remove water. The mixture was cooled to room temperature and an additional amount of the remaining toluene was removed via rotary evaporation. The mixture was re-dissolved in dry dichloromethane (180 mL) and cooled in an ice bath. Diisopropylazodicarboxylate (DIAD, 2.27 g, 2.17 mL, 9 eq) was added via syringe drive over 1 hour. The mixture was stirred in the ice batch 1.5 h whereupon HPLC analysis indicated complete conversion to Example 26A.

The viscous reaction mixture was slowly added via a narrow-necked funnel with stirring to a mixture of 75:25 MTBE/IPA (4.0 L) and allowed to stir 1 hour. The precipitate was collected via vacuum filtration, washed with MTBE (200 mL), and dried under vacuum to give purified Example 26A (51.5 g.).

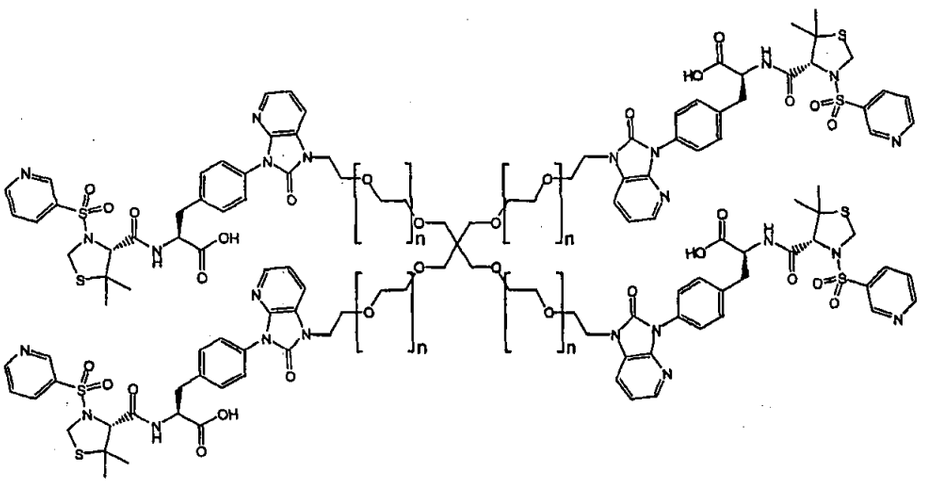
Example 26A (51.4 g) was taken up into formic acid (250 mL) and heated at near reflux for 1.0 h whereupon HPLC analysis indicated the deprotection was complete. The mixture was cooled to room temp and a portion of the formic acid (-100mL) was removed by rotary evaporation. The mixture was diluted with methylene chloride (50 mL). The viscous reaction mixture was then added with stirring to a mixture of 75:25 MTBE/IPA (4.0 L) and allowed to stir

45 min (Note 4). The precipitate was collected via vacuum filtration, washed with MTBE (300 ml) and dried under vacuum (< 1 Torr, 24 h) to yield Example 26B (50.0 g).

This material was taken up in methylene chloride (400 mL) and filtered through a sintered-glass Buchner funnel ("polish filtration"). The filtrate was concentrated via rotary evaporation to a volume of ~ 200 mL and slowly added with stirring to a 75:25 mixture of MTBE/IPA (4.0L). The precipitate was collected via vacuum filtration, washed with MTBE (300 ml) and dried under vacuum (< 1 Torr, 3d) to yield Example 26B (48.8 g, ~94%).

Similar methods were used to synthesize the following conjugates:

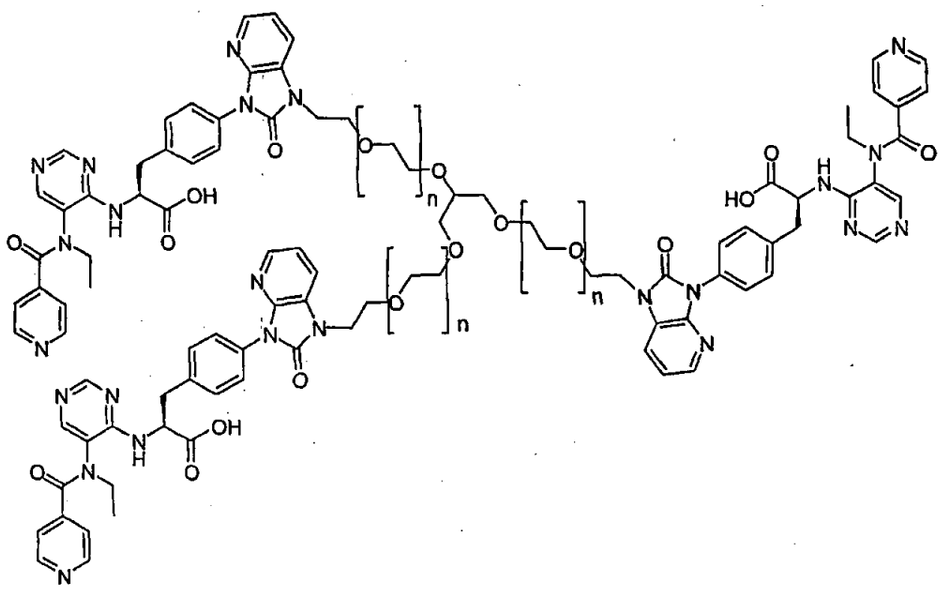
Example 27



Example 27

40 kDa 4-arm PEG alcohol was coupled to the product of Example 5 and deprotected to final product using similar methods as with Example 26. The product was purified according to HPLC Method A. HPLC Method C determined the conjugate to be >95% pure (retention time= 7.5-8.1 minutes). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 9.08 (bs, 4H), 8.84 (bs, 4H), 8.18-8.16 (d, 4H), 8.02-8.00 (d, 4H), 7.67-7.61 (m, 8H), 7.47-7.38 (m, 12H), 7.08-7.04 (m, 4H), 6.91 (m, 4H), 4.88 (m, 4H), 4.62-4.49 (dd, 8H), 4.13 (m, 8H), 3.64 (bs, 10101H PEG), 3.23 (m, 8H), 1.25-1.24 (d, 24H).

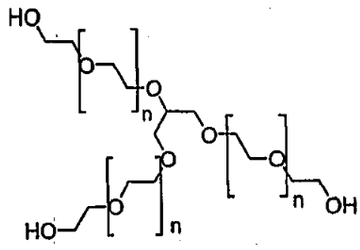
Example 28



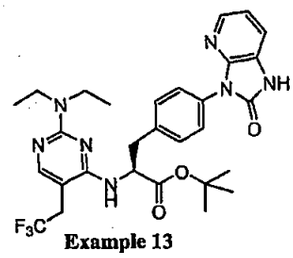
Example 28.

40 kDa 3-arm PEG alcohol was coupled to the t-butyl ester product from Example 18 (shown below) and deprotected to final product using methods similar to those of Example 26. The product was purified according to HPLC Method A. HPLC Method C determined the conjugate to be >95% pure (retention time= 7.3 minutes). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.66 (bs, 3H), 8.44 (bs, 3H), 8.04-8.02 (d, 3H), 7.75- 7.30 (m, 24H), 7.10-7.06 (m, 3H), 6.93 (s, 3H), 5.60-5.50 (m, 3H), 4.15 (m, 6H), 3.66 (bs, 4270H PEG), 3.00 (m, 3H), 3.40-3.20 (m, 6H), 1.27 (d, 9H).

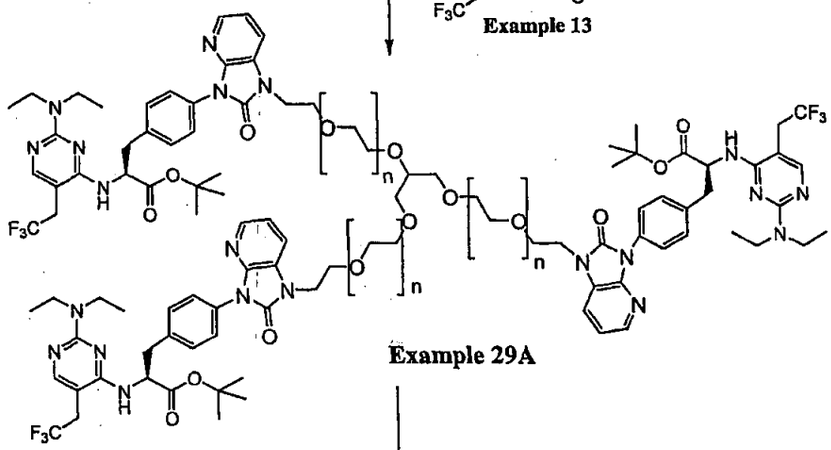
Example 29



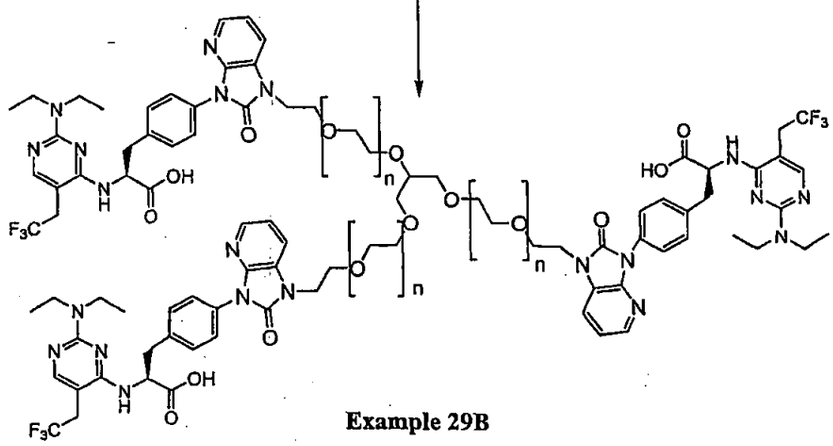
40 kDa 3-arm PEG alcohol
NOF Corporation



Example 13



Example 29A



Example 29B

Example 29

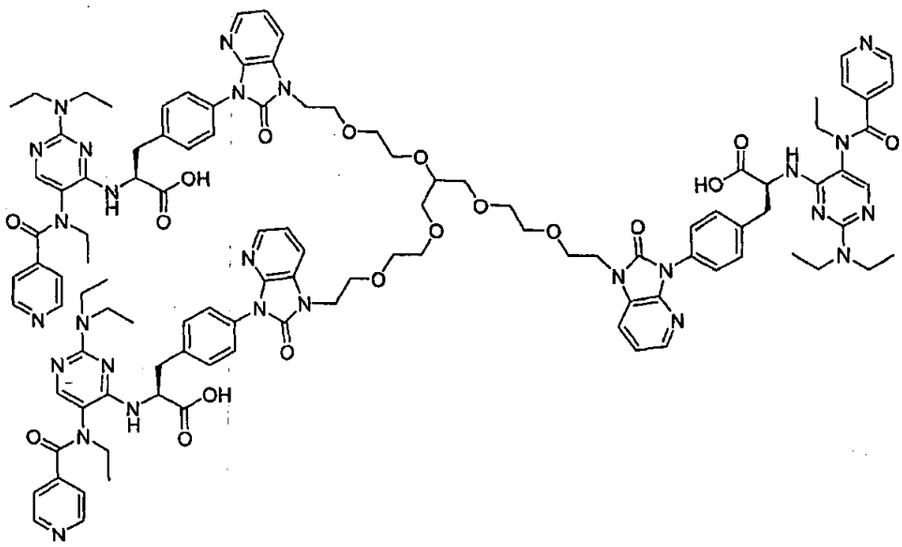
Example 29A

The **40 kDa 3-arm PEG alcohol** (0.00625 mmol), the product from Example 13 (0.056 mmol), and triphenylphosphine (0.094 mmol) are dried by azeotropic distillation from toluene (5 mL). Half of the volume is distilled over (2.5 mL), and the mixture is cooled to room temperature. CH_2Cl_2 (0.5 mL) is added to make the reaction homogeneous. Diethylazodicarboxylate (0.094 mmol) is added drop-wise and the reaction stirred for 48 hours. The reaction is concentrated *in vacuo* to yield the **t-butyl ester** Example 29A.

Example 29B

Example 29A (0.005 mmol) is dissolved in formic acid (3 mL) and heated at 40°C for 24 hours. The reaction is concentrated *In vacuo* and is purified according to HPLC Method A to yield Example 29B.

Example 30



Example 30

40 kDa 3-arm PEG alcohol is coupled to the t-butyl ester product from Example 25 and deprotected to final product using similar methods as with Example 26. The product is purified according to HPLC Method A.

115

References

The following publications, patents and patent applications are cited in this application as superscript numbers:

1 Hemler and Takada, European Patent Application Publication No. 330,506, published August 30, 1989

2 Elices, et al., Cell, 60:577-584 (1990)

3 Springer, Nature, 346:425-434 (1990)

4 Osborn, Cell, 62:3-6 (1990)

5 Vedder, et al., Surgery, 106:509 (1989)

6 Pretolani, et al., J. Exp. Med., 180:795 (1994)

7 Abraham, et al., J. Clin. Invest., 93:776 (1994)

8 Mulligan, et al., J. Immunology, 150:2407 (1993)

9 Cybulsky, et al., Science, 251:788 (1991)

10 Li, et al., Arterioscler. Thromb., 13:197 (1993)

11 Sasseville, et al., Am. J. Path., 144:27 (1994)

12 Yang, et al., Proc. Nat. Acad. Science (USA), 90:10494 (1993)

13 Burkly, et al., Diabetes, 43:529 (1994)

14 Baron, et al., J. Clin. Invest., 93:1700 (1994)

15 Hamann, et al., J. Immunology, 152:3238 (1994)

16 Yednock, et al., Nature, 356:63 (1992)

17 Baron, et al., J. Exp. Med., 177:57 (1993)

18 van Dinther-Janssen, et al., J. Immunology, 147:4207 (1991)

19 van Dinther-Janssen, et al., Annals. Rheumatic Dis., 52:672 (1993)

20 Elices, et al., J. Clin. Invest., 93:405 (1994)

21 Postigo, et al., J. Clin. Invest., 89:1445 (1991)

22 Paul, et al., Transpl. Proceed., 25:813 (1993)

23 Okarhara, et al., Can. Res., 54:3233 (1994)

24 Paavonen, et al., Int. J. Can., 58:298 (1994)

25 Schadendorf, et al., J. Path., 170:429 (1993)

26 Bao, et al., Diff., 52:239 (1993)

27 Lauri, et al., British J. Cancer, 68:862 (1993)

28 Kawaguchi, et al., Japanese J. Cancer Res., 83:1304 (1992)

29 Kogan, et al., U.S. Patent No. 5,510,332, issued April 23, 1996

30 International Patent Appl. Publication No. WO 96/01644

31 Thorsett, et al., U.S. Patent No. 6,489,300, issued December 3, 2002 and Konradi, et al., U.S. Patent No. 66,492,372, issued December 10, 2002.

All of the above publications, patents and patent applications are herein incorporated by reference in their entirety to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety.

5

(17

WHAT IS CLAIMED IS:

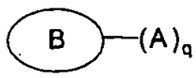
1. A process for the preparation of conjugates of active compounds comprising:

a) reacting a polymeric alcohol with a nucleophilic active compound having an acidic hydrogen under Mitsunobu conditions; and

b) isolating the conjugate.

2. A process according to claim 1, where the conditions comprise a trivalentphosphine and an azodicarbonyl compound.

3. A process for the preparing a conjugate of the formula I:

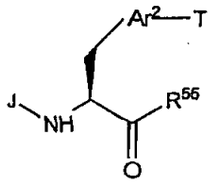


I

B is a bio-compatible polymer moiety optionally covalently attached to a branched-arm hub molecule;

q is from about 1 to about 100;

A at each occurrence is independently a compound of formula II

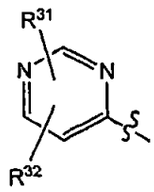


II

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein

J is selected from:

a) a group of formula (a):



(a)

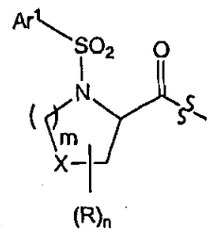
wherein R^{31} is a covalent bond to the polymer moiety which optionally comprises a linker, or R^{31} is –H, $R^{31'}$, -NH_2, -$NHR^{31'}$ or –$N(R^{31'})_2$, -NC_3-C_6cyclic, -$OR^{31'}$, -$SR^{31'}$, wherein each $R^{31'}$ is independently an optionally substituted straight or branched C_1-C_6alkyl, optionally substituted C_3-C_6cycloalkyl, optionally substituted aryl, optionally substituted heteroaryl,

and R^{32} is a covalent bond to the polymer moiety which optionally comprises a linker, or R^{32} is –H, $-NO_2$, haloalkyl or the group $-N(MR^{41})R^{42}$ wherein M is a covalent bond, –C(O)- or $-SO_2-$, R^{41} is $R^{41'}$, $N(R^{41'})_2$, or $-OR^{41'}$,

wherein each $R^{41'}$ is independently hydrogen, an optionally substituted straight or branched C_1-C_6alkyl, optionally substituted cycloalkyl, optionally substituted aryl, optionally substituted heterocyclic or an optionally substituted heteroaryl, wherein optional substitutions are halide, C_1-C_6alkyl, or $-OC_1$-C_6alkyl,

and R^{42} is hydrogen or $R^{41'}$; and

b) a group of formula (b):



(b)

wherein R is selected from the group consisting of a covalent bond to the polymer moiety, amino, hydroxyl, substituted amino, alkyl, alkyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, heterocyclyloxy, thiol, arylthio, heteroarylthio, heterocyclylthio and substituted alkyl wherein each amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein, in each case, the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety;

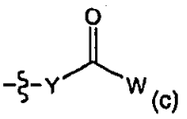
Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^1;

Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^2;

X is selected from the group consisting of $-NR^1-$, -O-, -S-, -SO-, $-SO_2$ and optionally substituted $-CH_2-$ where R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

T is selected from:

a) a group of formula (c)



(c)

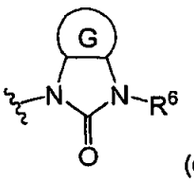
wherein Y is selected from the group consisting of -O- and -NR^1- wherein R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

W is selected from the group consisting of a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker and -NR^2R^3 wherein R^2 and R^3 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and where R^2 and R^3, together with the nitrogen atom bound thereto, form a heterocyclic ring or a substituted heterocyclic ring wherein each of alkyl, substituted alkyl, heterocyclic and substituted heterocyclic is optionally covalently bound to a polymer moiety which further optionally comprises a linker;

m is an integer equal to 0, 1 or 2;

n is an integer equal to 0, 1 or 2; and

b) a group of formula (d)



(d)

wherein G is an optionally substituted aryl or optionally substituted heteroaryl 5 or 6 membered ring containing 0 to 3 nitrogens, wherein said aryl or heteroary optionally further comprises a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker;

R^6 is a covalent bond to a polymer moiety which optionally comprises a linker, or R^6 is –H, alkyl, substituted alkyl, or -$CH_2C(O)R^{17}$, wherein R^{17} is –OH, -OR^{18}, or -NHR^{18}, wherein R^{18} is alkyl, substituted alkyl, aryl or substituted aryl;

R^{56} is selected from the group consisting of amino, substituted amino, alkoxy, substituted alkoxy, cycloalkoxy, substituted cycloalkoxy, aryloxy and substituted aryloxy, and -OH;

provided that:

A. at least one of R, Ar^1, Ar^2, and T contains a covalent bond to the polymer moiety;

B. when R is covalently bound to the polymer moiety, *n* is one and X is not -O-, -S-, -SO-, or -SO_2-;

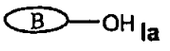
120

C. when X is -O- or -NR^1-, then *m* is two; and

D. the conjugate of formula I has a molecular weight of no more than 100,000;

comprising the steps of:

c) adding a polymeric alcohol of formula **Ia**



Ia

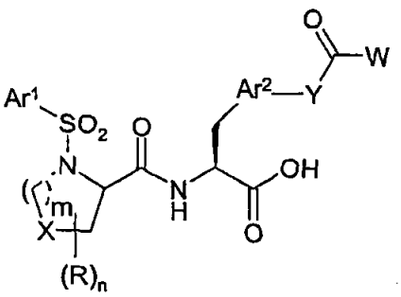
wherein B is as described above, to a nucleophile of formula H-Nu in the presence of a trivalentphosphine of the formula PR_3 and a dialkyl azodicarboxylate to form the compound of formula **I**, wherein Nu is a radical of formula **A** described above; and isolating the compound of formula **I**.

4. The process according to Claim **1**, wherein only one of J, Ar^2, and T contains a covalent bond to a polymer moiety.

5. The process according to Claim 1, wherein, *q* is an integer of from 1 to about 20.

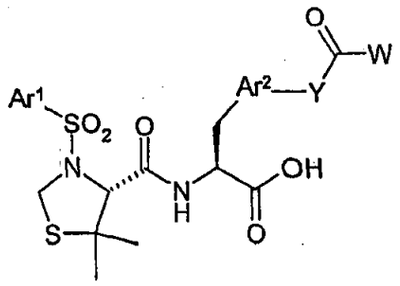
6. The process according to Claim 1, wherein *q* is an integer of from 1 to about 8.

7. The process according to Claim 1, wherein A at each occurrence is independently a compound of formula **IIa**



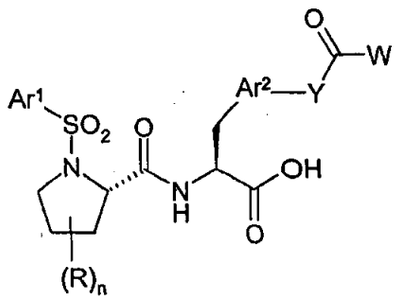
IIa

8. The process according to Claim 1, wherein **A** at each occurrence is independently a compound of formula **IIb:**



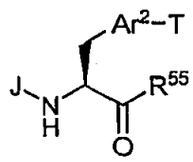
IIb

9. The process according to Claim 1, wherein A at each occurrence is independently a compound of IIc:



IIc

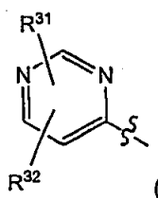
10. The process of Claim 1, wherein the nucleophilic active compound is a compound of the formula



wherein

J is selected from:

a) a group of formula (a):



(a)

wherein R^{31} is a covalent bond to the polymer moiety which optionally comprises a linker, or R^{31} is –H, $R^{31'}$, $-NH_2$, $-NHR^{31'}$ or $-N(R^{31'})_2$, $-NC_3$-C_6cyclic, $-OR^{31'}$, $-SR^{31'}$,

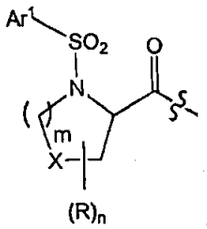
wherein each $R^{31'}$ is independently an optionally substituted straight or branched C_1-C_6alkyl, optionally substituted C_3-C_8cycloalkyl, optionally substituted aryl, optionally substituted heteroaryl,

and R^{32} is a covalent bond to the polymer moiety which optionally comprises a linker, or R^{32} is –H, -NO_2, haloalkyl or the group –N(MR^{41})R^{42} wherein M is a covalent bond, –C(O)- or -SO_2-, R^{41} is $R^{41'}$, N($R^{41'}$)$_2$, or -$OR^{41'}$,

wherein each $R^{41'}$ is independently hydrogen, an optionally substituted straight or branched C_1-C_6alkyl, optionally substituted cycloalkyl, optionally substituted aryl, optionally substituted heterocyclic or an optionally substituted heteroaryl, wherein optional substitutions are halide, C_1-C_6alkyl, or -OC_1-C_6alkyl,

and R^{42} is hydrogen or $R^{41'}$; and

b) a group of formula (b):



(b)

wherein R is selected from the group consisting of a covalent bond to the polymer moiety, amino, hydroxyl, substituted amino, alkyl, alkyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, heterocyclyloxy, thiol, arylthio, heteroarylthio, heterocyclylthio and substituted alkyl wherein each amino, substituted amino, alkyl and substituted alkyl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein, in each case, the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety;

Ar^1 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^1;

Ar^2 is selected from the group consisting of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl wherein each of aryl, substituted aryl, heteroaryl and substituted heteroaryl is optionally covalently bound to the polymer moiety wherein the polymer moiety optionally comprises a linker which covalently links the polymer moiety to Ar^2;

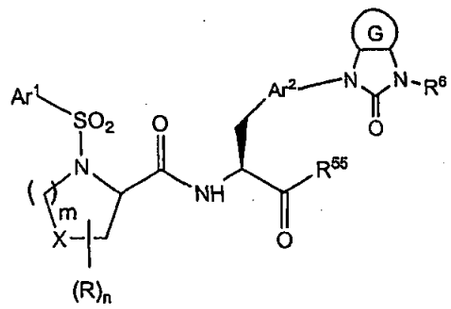
(12)

X is selected from the group consisting of -NR^1-, -O-, -S-, -SO-, -SO_2 and optionally substituted -CH_2- where R^1 is selected from the group consisting of hydrogen and alkyl;

T is a group carrying an acidic hydrogen; and

R^{55} is a acid protecting group.

11. The of Claim 10, the nucleophilic active compound has the formula:



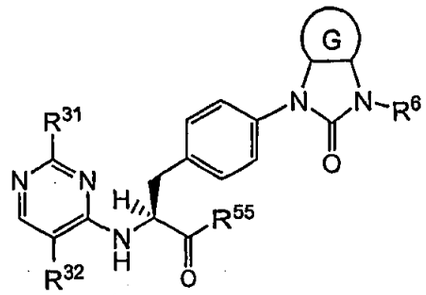
where R^{55} is an acid protecting group.

12. A process according to claim 11, where R^{55} is C_1-C_6 alkoxy.

13. The process according to Claim 11 wherein m is 1, X is S, and R at each occurrence is independently selected from hydroxyl, alkyloxy, alkyl, or a covalent bond to the polymer moiety.

14. The process according to claim 12 wherein n is 2, and R at both occurrences is methyl.

15. The processof Claim 1, wherein the nucleophilic active compound has the formula:

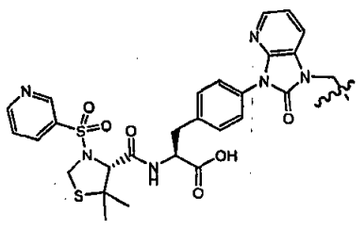


where R^{55} is an acid protecting group.

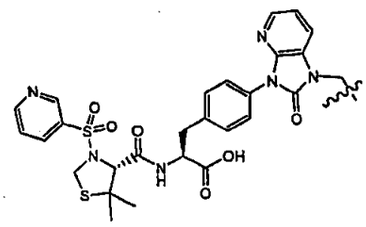
16. A process according to claim 15, where R^{55} is C_1-C_6 alkoxy.

17. The process according to claim 15 wherein G is pyridinyl, R31 is hydrogen or dialkylamino, and R32 is sulfonamide, amide, or urea.

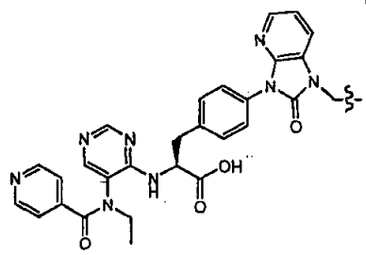
18. A process according to Claim 1, wherein the nucleophilic active compound is:



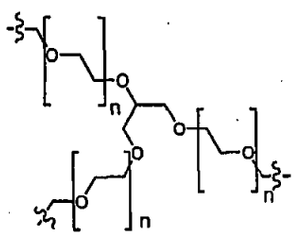
,



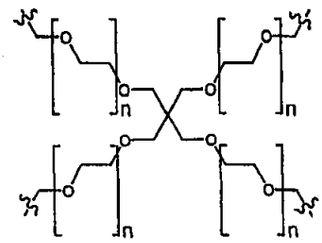
, or



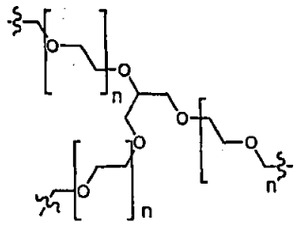
19. A process according to Claim 1, wherein the polymer alcohol is



(total Mw of conjugate is about 41,500),



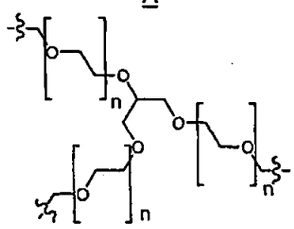
(total Mw of conjugate is about 42,000), or



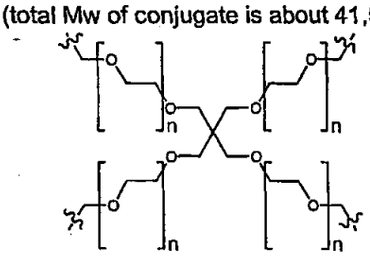
(total Mw of conjugate is about 41,500).

20. A process according to Claim 1, wherein the polymer alcohol is selected from the group in column A and the nucleophilic active compound is selected from the group in column B:

A

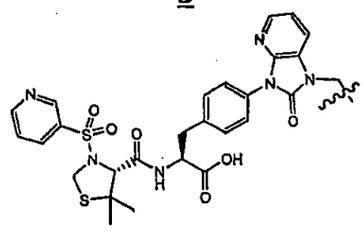


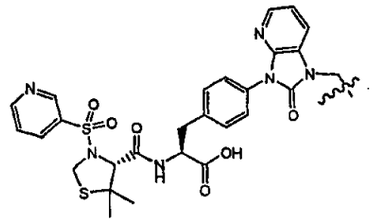
(total Mw of conjugate is about 41,500)



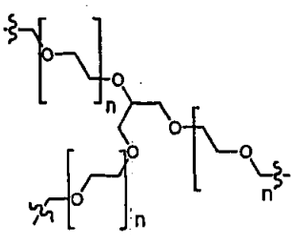
(total Mw of conjugate is about 42,000)

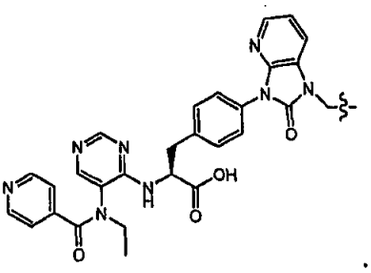
B





126





(total Mw of conjugate is about 41,500)

21. The process according to Claim 1 wherein the polymeric alcohol is added to the nucleophile of formula H-Nu in the presence of the trivalentphosphine and the dialkyl azodicarboxylate in a at least one solvent.

22. The process according to Claim 21 wherein the dialkyl azodicarboxylate is selected from the group consisting of diethyldiazocarboxylate, diisopropylazodicarboxylate, 4-methyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione, N,N,N',N'-tetramethylazodicarboxamide, azodicarboxylic acid dipiperidide, bis(N-4 -methylpiperazin-1-yl)azodicarboxamide, dimorpholinoazodicarboxamide and di-tert-butyl azodicarboxylate.

23. The process according to Claim 22 wherein the dialkyl azodicarboxylate is selected from the group consisting of diethyldiazocarboxylate, diisopropylazodicarboxylate, 4-methyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione, N,N,N',N'-tetramethylazodicarboxamide, azodicarboxylic acid dipiperidide and di-tert-butyl azodicarboxylate.

24. The process according to Claim 21 wherein the solvent is a chlorinated solvent or an ether solvent.

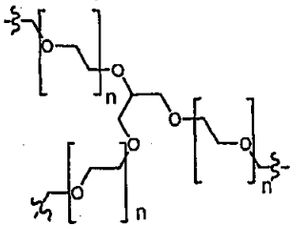
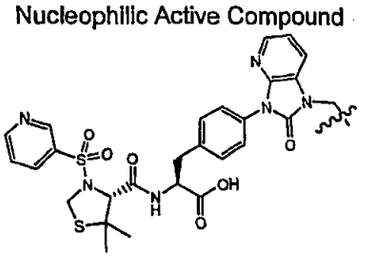
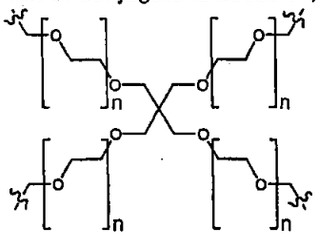
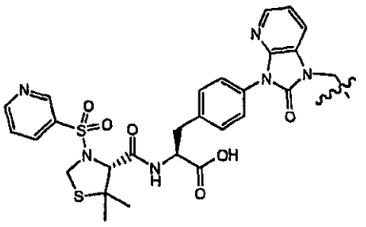
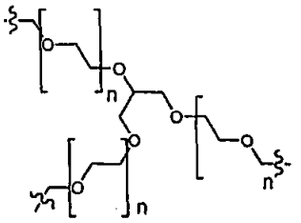
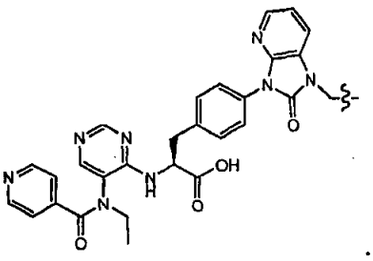
25. The process according to Claim 24 wherein the solvent is a dichloromethane or tetrahydrofuran.

26. The process according to Claim 21 wherein the trivalentphosphine is selected from the group consisting of triphenylphosphine, trimethylphosphine, triethylphosphine, tributylphosphine 1,2-bis-(diphenylphosphino)ethane, a polymer bound phosphine and a water soluble phosphine.

27. The process according to Claim 26 wherein the trivalent phosphine is triphenylphosphine.

124

28. A process according to Claim 1, wherein the conjugate is prepared using polymer alcohol/nucleophilic active compound combination 1, 2, or 3:

Combination	Polymer Alcohol	Nucleophilic Active Compound
1	 (total Mw of conjugate is about 41,500)	
2	 (total Mw of conjugate is about 42,000)	
3	 (total Mw of conjugate is about 41,500)	

PREPARACION DE CONJUGADOS POLIMERICOS DE COMPUESTOS DE ADITIVOS TERAPEUTICOS, AGRICOLAS Y ALIMENTARIOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona con procesos para elaborar conjugados poliméricos de compuestos de aditivos terapéuticos, agrícolas y alimentarios. Más específicamente, la invención se relaciona con procesos que emplean las afecciones de reacción de Mitsunobu para preparar conjugados para el uso en el tratamiento de diferentes y trastornos enfermedades en mamíferos, particularmente humanos, así como en los aditivos agrícolas y alimentarios. En algunos aspectos, la invención se relaciona con el uso de las afecciones de Mitsunobu con un alcohol, particularmente un polímero que contiene alcohol y una amina para formar el conjugado deseado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La unión de compuestos biológicamente activos a polímeros ha recibido una atención significativa y ha llegado a ser un método común para controlar diferentes características, por ejemplo, la biodistribución, farmacocinética y toxicidad de tales compuestos. Una elección frecuente del polímero para el uso en la elaboración de conjugados poliméricos de compuestos biológicamente activos es el polietilenglicol (PEG). Se usa ampliamente como un modificador covalente en las moléculas biológicamente activas pequeñas y grandes. Para las descripciones de tales conjugados, ser, Eur. Polym. J. 19, No. 12, páginas 1177-1183 (Zaplinsky et al., 1983) et al., Journal of Controlled

Release 10 (1989) 145-154 (Veronese et al., 1989) y Advanced Drug Delivery Reviews, 16, 157-182 (Zaplinsky, 1995).

Se ha descubierto últimamente que los conjugados poliméricos de, por ejemplo, antagonistas de $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) tienen una vida media sérica ampliamente mejorada. Estos compuestos poliméricos pueden prepararse usando diferentes métodos de síntesis, que incluyen formación de carboxamida haciendo reaccionar un éster de la molécula activa con una amina polimérica, formación de carbamato entre una amina de la molécula activa y un cloroformato polimérico o formación de carbamato entre un isocianato de la molécula activa y un alcohol polimérico. Los rendimientos globales de estos métodos son por lo regular menos que deseables, a menudo involucran múltiples etapas y medios de purificación. Por lo tanto, es necesario diseñar un proceso que aísle un conjugado de un inhibidor de VLA-4 en rendimientos cuantitativos o casi cuantitativos.

La importancia de tales conjugados poliméricos indica que hay una necesidad para las síntesis convenientes y eficientes de tales materiales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

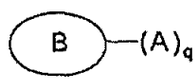
Esta invención proporciona una síntesis mejorada de los conjugados poliméricos de los compuestos de aditivos agrícolas, terapéuticos y alimentarios. El proceso de esta invención produce los productos conjugados finales en excelentes rendimientos. En un aspecto preferido, la invención proporciona un proceso para la preparación de conjugados condensando los alcoholes poliméricos con aminas usando las afecciones de reacción de Mitsunobu. En otro aspecto preferido, la invención proporciona un proceso para

la preparación de conjugados condensando aminas poliméricas con alcoholes usando las afecciones de reacción de Mitsunobu.

En un aspecto, la invención proporciona un proceso para la preparación de conjugados de compuestos activos, que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un alcohol polimérico con un nucleófilo en presencia de una fosfina trivalente y un compuesto de azodicarbonilo apropiado, por ejemplo, dietilazodicarboxilato o azodicarbonildipiperidida, para formar el conjugado; y b) aislar el conjugado.

En un aspecto específico, los compuestos activos y los conjugados resultantes exhiben propiedades antagonísticas de VLA-4

En otro aspecto, la invención proporciona un proceso para la preparación de conjugados de la siguiente fórmula I:



I

B es un radical polimérico biocompatible;

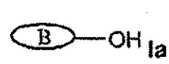
q es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

A en cada caso es independientemente un compuesto que tiene actividad biológica o agrícola o

A es un compuesto de aditivo alimenticio.

Este proceso comprende:

a) hacer reaccionar alcohol polimérico de la fórmula Ia



Ia

con un nucleófilo de la fórmula H-Nu

en presencia de una fosfina trivalente y un compuesto de

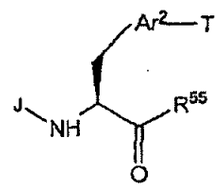
azodicarbonilo sustituido apropiadamente para formar el compuesto de la fórmula I, en donde Nu es un radical que corresponde a la fórmula A anterior y H es un hidrógeno ácido en Nu; y

b) aislar el compuesto de la fórmula I.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se observó anteriormente, esta invención proporciona procesos para la preparación de conjugados de compuestos de aditivos agrícolas, terapéuticos y alimentarios (posteriormente "compuestos activos"). Los conjugados comprenden uno o más radicales poliméricos enlazados covalentemente a uno o más compuestos activos, en donde los conjugados resultantes tienen el mismo tipo de actividad que el compuesto activo. En un aspecto, los compuestos activos y los conjugados resultantes son compuestos que inhiben la adhesión de leucocitos y, en particular, la adhesión de leucocitos mediada, por lo menos en parte, por las integrinas α_4.

En un aspecto preferido, el grupo A en los conjugados de la fórmula I puede representarse por la fórmula II:

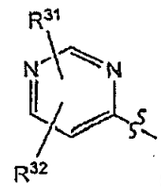


II

en donde:

J se selecciona de:

a) un grupo de la fórmula (a):



(a)

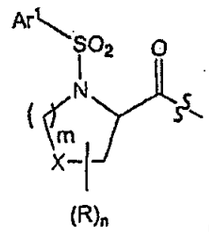
en donde R^{31} es un enlace covalente al radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^{31} es -H, $R^{31'}$, $-NH_2$, $-NHR^{31'}$, $-NH_2$, $-NHR^{31'}$ o $-N(R^{31'})_2$, $-NC_3$-C_6 cíclico, $-OR^{31'}$, $-SR^{31'}$, en donde cada $R^{31'}$ es independientemente un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_3-C_6 opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido,

y R^{32} es un enlace covalente al radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^{32} es -H, NO_2, haloalquilo o el grupo $-N(MR^{41})R^{42}$, en donde M es un enlace covalente, -C(O)- o $-SO_2-$, R^{41} es $R^{41'}$, $N(R^{41'})_2$ o $-OR^{41'}$,

en donde cada $R^{41'}$ es independientemente hidrógeno, un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterocíclico opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido, en donde las sustituciones opcionales son haluro, alquilo C_1-C_6 o alquilo -OC_1-C_6,

y R^{42} es hidrógeno o $R^{41'}$; y

b) un grupo de la fórmula (b):



(b)

en donde R se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente al radical polimérico, amino, amino sustituido,

alquilo y alquilo sustituido, en donde cada amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde, en cada caso, el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico;

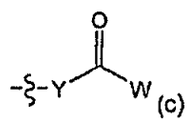
Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^1:

Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^2;

X se selecciona del grupo que consiste de $-NR^1-$, $-O-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2$ y $-CH_2-$ opcionalmente sustituido, en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

T se selecciona de:

a) un grupo de la fórmula (c)



(c)

en donde Y se selecciona del grupo que consiste de $-O-$ y $-NR^1-$ en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de

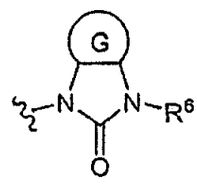
hidrógeno y alquilo;

W se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador y $-NR^2R^3$, en donde R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido y en donde R^2 y R^3, junto con el átomo de nitrógeno enlazado al mismo, forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, en donde cada uno de alquilo, alquilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico que comprende además opcionalmente un enlazador;

m es un entero igual a 0, 1 ó 2;

n es un entero igual a 0, 1 ó 2; y

b) un grupo de la fórmula (d)



(d)

en donde G es un anillo de 5 ó 6 miembros de arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido que contiene de 0 a 3 nitrógenos, en donde el arilo o heteroarilo comprende además opcionalmente un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador;

R^6 es un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^6 es -H;

R^{55} se selecciona del grupo que consiste de alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalcoxi, cicloalcoxi sustituido, ariloxi y ariloxi sustituido y -OH; con la condición de que:

1305

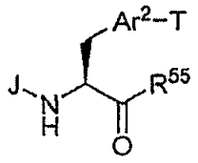
A. por lo menos uno de J, Ar^1, Ar^2 y T contiene un enlace covalente al radical polimérico;

B. cuando J se enlaza covalentemente al radical polimérico, n es uno y X no es -O-, -S-, -SO- o $-SO_2$; y

C. cuando X es -O- entonces m es dos.

En una modalidad preferida, sólo uno de J, Ar^1, Ar^2 y T contiene un enlace covalente al radical polimérico.

El compuesto H-Nu empleado en la reacción de conjugación es un compuesto que contiene un hidrógeno ácido enlazado covalentemente a Nu. Los compuestos preferidos de la fórmula H-Nu pueden representarse por la fórmula II.1



II.1

en donde:

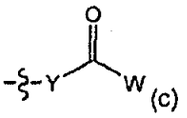
J y Ar^2 tienen las mismas definiciones como se establecieron para la Fórmula II;

T es un grupo que tiene un hidrógeno ácido; y

R^{55} es un grupo protector ácido.

Los grupos T apropiados incluyen los grupos heterocíclicos, imidas, fenoles, mono- y diésteres fosfóricos, ácidos carboxílicos, hidroxamatos, tioles, tioamidas, β-cetoésteres y 1,3-dicetonas.

Un grupo T preferido es un grupo de la fórmula (c):



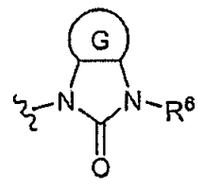
en donde Y se selecciona del grupo que consiste de -O- y -NR^1- en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de

136

hidrógeno y alquilo;

W es un grupo que contiene un hidrógeno ácido, de preferencia en un átomo de nitrógeno adyacente a un carbonilo, en donde el grupo W conectado opcionalmente a Y(CO) por un enlazador.

Otro grupo T preferido es un grupo de la fórmula (d)

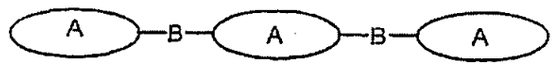


(d)

en donde G es un anillo de 5 ó 6 miembros de arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido que contiene de 0 a 3 nitrógenos; y

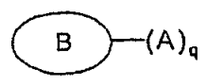
R^6 es hidrógeno.

Debería entenderse que el valor para q se calcula con base en la relación del número de radicales poliméricos y el número de radicales A. En otras palabras, cuando q es 1.5, esto contempla, por ejemplo, la siguiente fórmula I':



I'

Los conjugados preferidos de la fórmula I preparados por la invención incluyen los de la siguiente fórmula Ia:



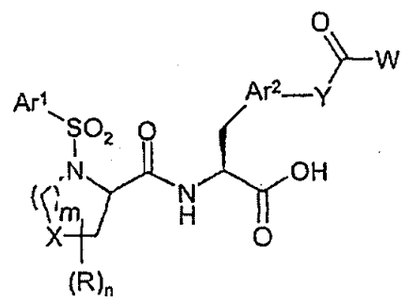
Ia

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

B es un radical polimérico enlazado opcionalmente en forma covalente a un vehículo;

q es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

A en cada caso es independientemente un compuesto de la fórmula IIa



IIa

en donde:

R se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente al radical polimérico, amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido, en donde cada amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico en donde, en cada caso, el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico;

Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^1;

Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde

cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^2;

X se selecciona del grupo que consiste de $-NR^1-$, -O-, -S-, -SO-, $-SO_2$ y $-CH_2-$ opcionalmente sustituido en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

Y se selecciona del grupo que consiste de -O- y $-NR^1-$ en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

W se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador y $-NR^2R^3$, en donde R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido y en donde R^2 y R^3, junto con el átomo de nitrógeno enlazado al mismo, forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, en donde cada uno de alquilo, alquilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico que comprende además un enlazador;

m es un entero igual a 0, 1 ó 2;

n es un entero igual a 0, 1 ó 2; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; con la condición de que:

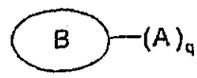
A. por lo menos uno de R, Ar^1, Ar^2, W y $-NR^2R^3$ contienen un enlace covalente al radical polimérico;

B. cuando R se enlaza covalentemente al radical polimérico, n es uno y X no es -O-, -S-, -SO- o $-SO_2$;

C. cuando X es -O- o NR^1-, entonces m es dos; y

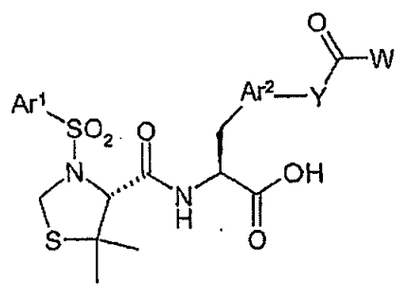
D. el conjugado de la fórmula Ia tiene un peso molecular de no más de 100,000.

Los conjugados preferidos de la fórmula I preparados por la invención incluyen los de la siguiente fórmula Ib:



Ib

en donde cada A es independientemente un compuesto de la siguiente fórmula IIb:



IIb

y en donde q es aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

B es un radical polimérico enlazado opcionalmente en forma covalente a un vehículo;

Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico, en donde el radical PEG comprende opcionalmente un enlazador que se enlaza covalentemente el radical PEG a Ar^1;

Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico, en donde el radical

polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^2;

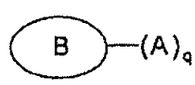
Y se selecciona del grupo que consiste de -O- y $-NR^1-$ en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

W se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador y $-NR^2R^3$, en donde R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido y en donde R^2 y R^3, junto con el átomo de nitrógeno enlazado al mismo, forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, en donde cada uno de alquilo, alquilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico que comprende además un enlazador;

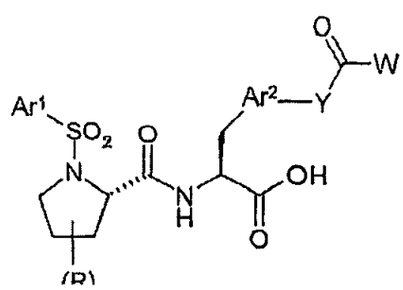
con la condición de que por lo menos uno de Ar^1, Ar^2, W y $-NR^2R^3$ se enlaza covalentemente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador;

y con la condición además de que el conjugado de la fórmula Ib tiene un peso molecular no mayor de 100,000.

Los conjugados preferidos de la fórmula I formados por el proceso de la invención incluyen los de la siguiente fórmula Ic:



en donde cada A es independientemente un compuesto de la siguiente fórmula IIc:



IIc

y en donde q es aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

B es un radical polimérico enlazado opcionalmente en forma covalente a un vehículo;

R se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente a un radical polimérico, amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido, en donde cada uno de amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde, en cada caso, el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico;

Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que se enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^1;

Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^2;

Y se selecciona del grupo que consiste de -O- y $-NR^1-$ en

donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

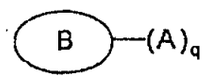
W se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador y $-NR^2R^3$, en donde R^2 y R^3, junto con el átomo de nitrógeno enlazado al mismo, forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, en donde cada uno de alquilo, alquilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico que comprende además un enlazador;

n es un entero igual a 0, 1 ó 2; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

con la condición de que por lo menos uno de R, Ar^1, Ar^2, W y $-NR^2R^3$ se enlaza covalentemente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador;

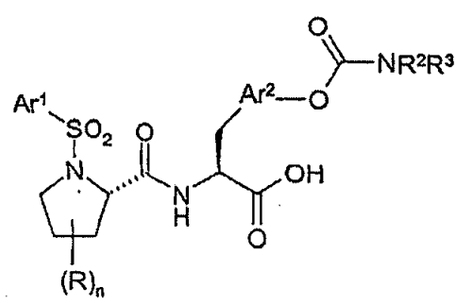
y con la condición además de que el conjugado de la fórmula Ic tiene un peso molecular no mayor de 100,000.

Los conjugados preferidos de la fórmula I incluyen los de la siguiente fórmula Id:



Id

en donde cada A es independientemente un compuesto de la siguiente fórmula IId:



IId

y en donde q es aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

B es un radical polimérico enlazado opcionalmente en

forma covalente a un vehículo;

R se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente al radical polimérico, amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido, en donde cada amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido se enlace opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde, en cada caso, el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico;

Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^1:

Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^2;

R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido y en donde R^2 y R^3, junto con el átomo de nitrógeno enlazado al mismo, forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, en donde cada uno de alquilo, alquilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico que

144

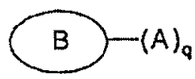
comprende además opcionalmente un enlazador;

n es un entero igual a 0, 1 ó 2; y la sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

con la condición de que por lo menos uno de R, Ar^1, Ar^2 y $-NR^2R^3$ se enlaza covalentemente a un polímero que comprende opcionalmente un enlazador;

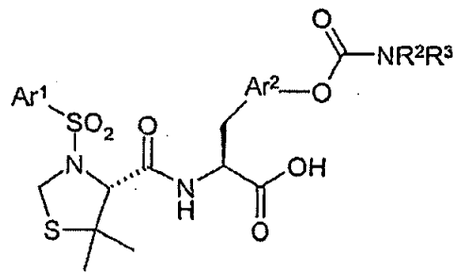
y con la condición además de que el conjugado de la fórmula Id tiene un peso molecular no mayor de 100,000.

Los conjugados preferidos de la fórmula I incluyen los de la siguiente fórmula Ie:



Ie

en donde cada A es independientemente un compuesto de la siguiente fórmula IIe:



IIe

y en donde q es aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

B es un radical polimérico enlazado opcionalmente en forma covalente a un vehículo;

Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^1:

Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo

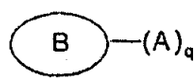
sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^2;

R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido y en donde R^2 y R^3, junto con el átomo de nitrógeno enlazado al mismo, forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, en donde cada uno de alquilo, alquilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico que comprende además opcionalmente un enlazador; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

con la condición de que por lo menos uno de Ar^1, Ar^2 y $-NR^2R^3$ se enlaza covalentemente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador;

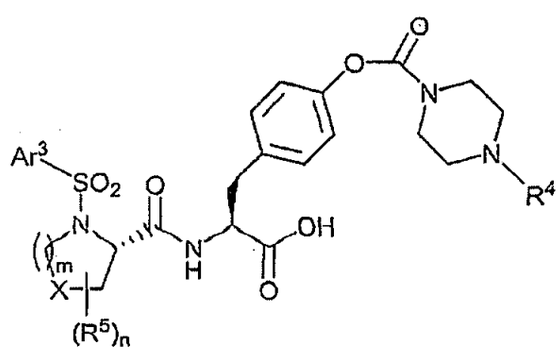
y con la condición además de que el conjugado de la fórmula Ie tiene un peso molecular no mayor de 100,000.

Los conjugados preferidos de la fórmula I incluyen los siguientes de la fórmula If:



If

en donde cada A es independientemente un compuesto de la siguiente fórmula IIf:



IIf

y en donde q es aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

B es un radical polimérico enlazado opcionalmente en forma covalente a un vehículo;

R^4 se enlaza covalentemente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador;

R^5 se selecciona del grupo que consiste de alquilo y alquilo sustituido;

Ar^3 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

X se selecciona del grupo que consiste de $-NR^1-$, $-O-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2$ y $-CH_2-$ opcionalmente sustituido, en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

m es un entero igual a 0, 1 ó 2;

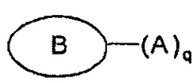
n es un entero igual a 0, 1 ó 2; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; con la condición de que:

A. cuando R se enlaza covalentemente al radical polimérico, n es uno y X no es $-O-$, $-S-$, $-SO-$ o $-SO_2$;

B. cuando X es $-O-$ o $-NR^1$, entonces m es dos; y

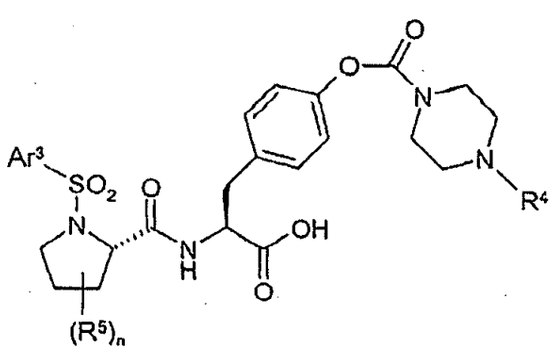
C. el conjugado de la fórmula If tiene un peso molecular no mayor de 100,000.

Los conjugados preferidos incluyen los de la siguiente fórmula Ig:



Ig

en donde cada A es independientemente un compuesto de la siguiente fórmula IIg:



IIg

y en donde q es aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

B es un radical polimérico enlazado opcionalmente en forma covalente a un vehículo;

R^4 se enlaza covalentemente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador;

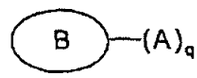
R^5 se selecciona del grupo que consiste de alquilo y alquilo sustituido;

Ar^3 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

n es un entero igual a 0, 1 ó 2; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

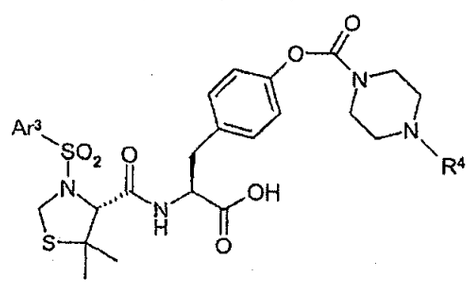
con la condición de que el conjugado de la fórmula Ig tiene un peso molecular no mayor de 100,000.

Los conjugados preferidos de la fórmula I incluyen los de la siguiente fórmula Ih:



Ih

en donde cada A es independientemente un compuesto de la siguiente fórmula IIh:



IIh

y en donde q es aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

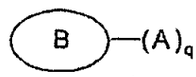
R^4 se enlaza covalentemente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador;

Ar^3 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

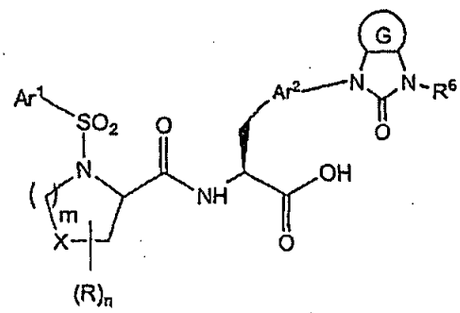
con la condición de que el conjugado de la fórmula Ih tenga un peso molecular no mayor de 100,000.

Los conjugados preferidos de la fórmula I incluyen los de la siguiente fórmula Ii:



II

en donde cada A es independientemente un compuesto de la siguiente fórmula IIi:



IIi

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,

y con la condición de que el conjugado de la fórmula Ii tenga un peso molecular no mayor de 100,000.

De preferencia, cuando Ar^1 no se enlaza a un radical polimérico, Ar^1 en las fórmulas IIa-IIe y Ar^3 en las fórmulas IIf-IIh se selecciona del grupo que consiste de:

fenilo,

4-metilfenilo,

4-t-butilfenilo,

2,4,6-trimetilfenilo,

2-fluorofenilo,

3-fluorofenilo,

4-fluorofenilo,

2,4-difluorofenilo,

3,4-difluorofenilo,

3,5-difluorofenilo,

2-clorofenilo,

3-clorofenilo,

4-clorofenilo,

3,4-diclorofenilo,

3,5-diclorofenilo,

3-cloro-4-fluorofenilo,

4-bromofenilo,

2-metoxifenilo,

3-metoxifenilo,

4-metoxifenilo,

3,4-dimetoxifenilo,

4-t-butoxifenilo,

4-(3'-dimetilamino-n-propoxi)-fenilo,

2-carboxifenilo,

2-(metoxicarbonil)fenilo,

4-($H_2NC(O)$-)fenilo,

4-($H_2NC(S)$-)fenilo,

4-cianofenilo,

4-trifluorometilfenilo,

4-trifluorometoxifenilo,

3,5-di-(trifluorometil)fenilo,

4-nitrofenilo,

4-aminofenilo,

4-($CH_3C(O)NH$-)fenilo,

4-(fenilNHC(O)NH-)fenilo,

4-amidinofenilo,

4-metilamidinofenilo,

4-[$CH_3SC(=NH)$-]fenilo,

4-cloro-3-[$H_2NS(O)_2$-]fenilo,

1-naftilo,

2-naftilo,

piridin-2-ilo,

piridin-3-ilo,

piridin-4-ilo,

pirimidin-2-ilo,

quinolin-8-ilo,

2-(trifluoroacetil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-ilo,

2-tienilo,

5-cloro-2-tienilo,

2,5-dicloro-4-tienilo,

1-N-metilimidazol-4-ilo,

1-N-metilpirazol-3-ilo,

1-N-metilpirazol-4-ilo,

1-N-butilpirazol-4-ilo,

1-N-metil-3-metil-5-cloropirazol-4-ilo,

1-N-metil-5-metil-3-cloropirazol-4-ilo,

2-tiazolilo y

5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-ilo.

De preferencia, cuando A es de las fórmulas IIa, IIb, IIc, IId y IIe y Ar^1 se enlaza a un radical polimérico, entonces Ar^1 es de la fórmula:

$$-Ar^1-Z-(CH_2CHR^7O)_pR^8$$

en donde:

Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo

sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido,

Z se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente, un grupo de enlazamiento de 1 a 40 átomos, -O- y -NR^9-, en donde R^9 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo,

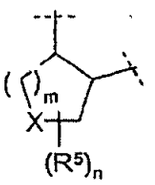
R^7 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y metilo;

R^8 se selecciona del grupo que consiste de A, vehículo polimérico -$(L)_w$-, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y -$CH_2CHR^7NR^{10}R^{11}$ en donde R^7 es como se definió anteriormente,

R^{10} y R^{11} se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo, A se representa por cualquiera de las fórmulas IIa a IIh anteriores, L es un grupo de enlazamiento de 1 a 40 átomos y w es cero o uno; y

p es un entero de aproximadamente 100 a 2200, de preferencia de aproximadamente 200-1360.

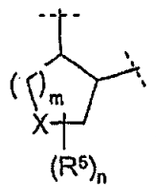
Cuando A es de las fórmulas IIa o IIf y R no se enlaza a un radical polimérico, el sustituyente de la siguiente fórmula:



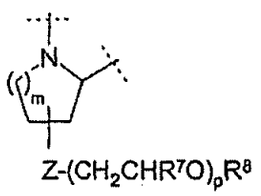
en donde R^5, X, m y n son como se definieron anteriormente, se selecciona de preferencia del grupo que consiste de azetidinilo, tiazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolino, tiomorfolinilo, pirrolidinilo, 4-hidroxipirrolidinilo, 4-oxopirrolidinilo, 4-fluoropirrolidinilo, 4,4-difluoropirrolidinilo, 4-(tiomorfolin-4-ilC(O)O-)pirrolidinilo, 4-[$CH_3S(O)_2O$-

]pirrolidinilo, 3-fenilpirrolidinilo, 3-tiofenilpirrolidinilo, 4-amino-pirrolidinilo, 3-metoxipirrolidinilo, 4,4-dimetilpirrolidinilo, 4-N-Cbz-piperazinilo, 4-[$CH_3S(O)_2$-]piperazinilo, 5,5-dimetiltiazolindin-4-ilo, 1,1-dioxo-tiazolidinilo, 1,1-dioxo-5,5-dimetiltiazolidin-2-ilo y 1,1-dioxotiomorfolinilo.

De preferencia, cuando A es de las fórmulas IIa y el sustituyente de la fórmula:



se enlaza al radical PEG, entonces, de preferencia, el sustituyente es de la fórmula:



en donde

m es un entero igual a cero, uno o dos;

Z se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente, un grupo de enlazamiento de 1 a 40 átomos, -O- y -NR^9-, en donde R^9 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo,

R^7 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y metilo;

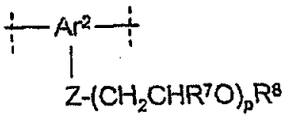
R^8 se selecciona del grupo que consiste de A, vehículo polimérico -$(L)_w$-, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y -$CH_2CHR^7NR^{10}R^{11}$ en donde R^7 es como se definió anteriormente,

R^{10} y R^{11} se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo, A se representa por cualquiera de las fórmulas IIa a IIh anteriores, L es un grupo de enlazamiento de 1 a 40 átomos y w es cero o uno; y

p es un entero de aproximadamente 100 a 2200, de preferencia de aproximadamente 200-1360.

Cuando A es de las IIa, IIb, IIc, IId, IIe y cuando Ar^2 no se enlaza a un radical polimérico, entonces de preferencia Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de fenilo, fenilo sustituido, 2-piridinilo, 3-piridinilo, 4-piridinilo y 4-piridin-2-onilo.

Cuando A es de la fórmula IIa, IIb, IIc, IId, IIe y cuando Ar^2 se enlaza a un radical polimérico, entonces Ar^2 se representa de preferencia por la fórmula:



cuando Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

Z se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente, un grupo de enlazamiento de 1 a 40 átomos, -O- y NR^9-, en donde R^9 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo,

R^7 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y metilo;

R^8 se selecciona del grupo que consiste de A, vehículo polimérico $-(L)_w-$, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y $-CH_2CHR^7NR^{10}R^{11}$ en donde R^7 es como se definió anteriormente,

R^{10} y R^{11} se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo, A se representa por cualquiera de las fórmulas IIa a IIh anteriores, L es un grupo de enlazamiento de 1 a 40 átomos y w es cero o uno; y

p es un entero de aproximadamente 100 a 2200, de preferencia de aproximadamente 200-1360.

En una modalidad preferida de los conjugados preparados por el proceso inventivo, -YC(O)W es $-OC(O)NR^2R^3$.

Cuando A es de las fórmulas IIa, IIb o IIc, -YC(O)W es $-OC(O)NR^2R^3$ y ni R^2 ni R^3 no se enlazan a un radical polimérico, entonces, de preferencia, $-OC(O)NR^2R^3$ se selecciona del grupo que consiste de:

$(CH_3)_2NC(O)O-$,

(piperidin-1-il)-C(O)O-,

(piperidin-4-il)-C(O)O-,

(1-metilpiperidin-4-il)-C(O)O-,

(4-hidroxipiperidin-1-il)-C(O)O-,

(4-formiloxipiperidin-1-il)-C(O)O-,

(4-etoxicarbonilpiperidin-1-il)-C(O)O-,

(4-carboxipiperidin-1-il)-C(O)O-,

(3-hidroximetilpiperidin-1-il)-C(O)O-,

(4-hidroximetilpiperidin-1-il)-C(O)O-,

(4-fenil-1-Boc-piperidin-4-il)-C(O)O-,

(4-piperidon-1-il etilen cetal)-C(O)O-,

(piperazin-4-il)-C(O)O-,

(1-Boc-píperazin-4-il)-C(O)O-,

(4-metilpiperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-metilhomopiperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-fenilpiperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-(piridin-2-il)piperazin-1]-il)-C(O)O-,

(4-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-acetilpiperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-(fenil-C(O)-)piperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-(piridin-4'-il-C(O)-)piperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-(fenil-NHC(O)-)piperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-(fenil-NHC(S)-)piperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-metansulfonilpiperazin-1-il)-C(O)O-,

(4-trifluorometansulfonilpiperazin-1-il)-C(O)O-,

(morfolin-4-il)-C(O)O-,

(tiomorfolin-4-il)-C(O)O-,

(tiomorfolin-4'-il sulfona)-C(O)O-,

(pirrolidin-1-il)-C(O)O-,

(2-metilpirrolidin-1-il)-C(O)O-,

(2-metoxicarbonil)pirrolidin-1-il)-C(O)O-,

(2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)-C(O)O-,

(2-(N,N-dimetilamino)etil)(CH_3)NC(O)O-,

(2-(N-metil-N-toluen-4-sulfonilamino)etil)(CH_3)N-C(O)O-,

(2-(morfolin-4-il)etil)(CH_3)NC(O)O-,

(2-(hidroxi)etil)(CH_3)NC(O)O-,

bis(2-(hidroxi)etil)NC(O)O-,

(2-(formiloxi)etil)(CH_3)NC(O)O-,

$(CH_3OC(O)CH_2)HNC(O)O-$ y

2-(fenilNHC(O)-O-)etil-]HNC(O)O-.

Cuando A es de las fórmulas IIa, IIb o IIc, -YC(O)W es -$OC(O)NR^2R^3$ y R^2 y/o R^3 se enlaza o enlazan al radical PEG, el radical PEG se representa por la fórmula:

$-Z'-(CH_2CHR^7O)_pR^8$

Z se selecciona del grupo que consiste de un enlace

covalente y un grupo de enlazamiento de 1 a 40 átomos;

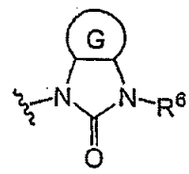
R^7 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y metilo;

R^8 se selecciona del grupo que consiste de A, vehículo polimérico $-(L)_w-$, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y $-CH_2CHR^7NR^{10}R^{11}$ en donde R^7 es como se definió anteriormente,

R^{10} y R^{11} se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo, A se representa por la fórmula II anterior, L es un grupo de enlazamiento de 1 a 40 átomos y w es cero o uno; y

p es un entero de aproximadamente 100 a 2200.

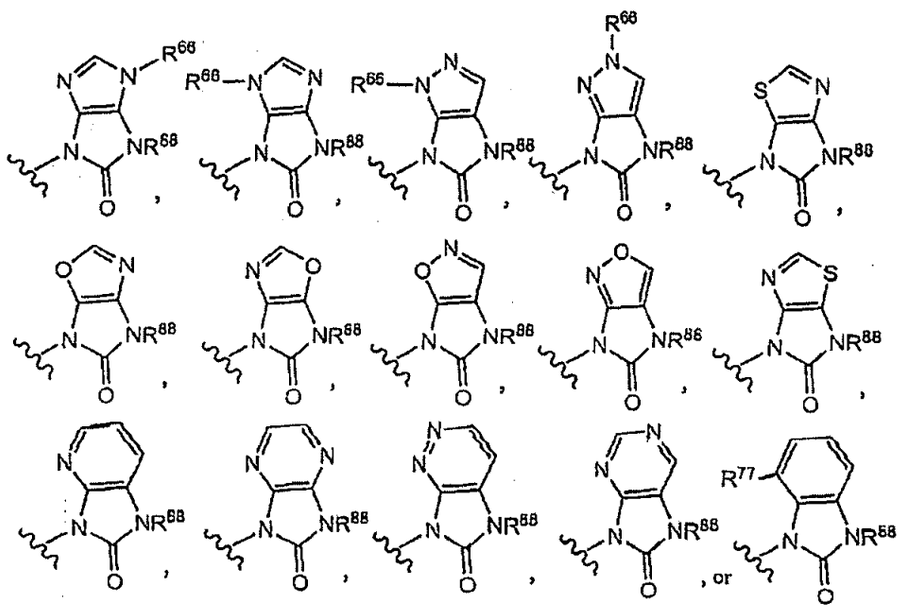
Los grupos T preferidos en la fórmula II.1 tienen la siguiente fórmula (d):



en donde R^6 es hidrógeno.

Los grupos (d) preferidos incluyen los mostrados a continuación en la Tabla D.

Tabla D



en donde

R^{66} es un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o

R^{66} es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado;

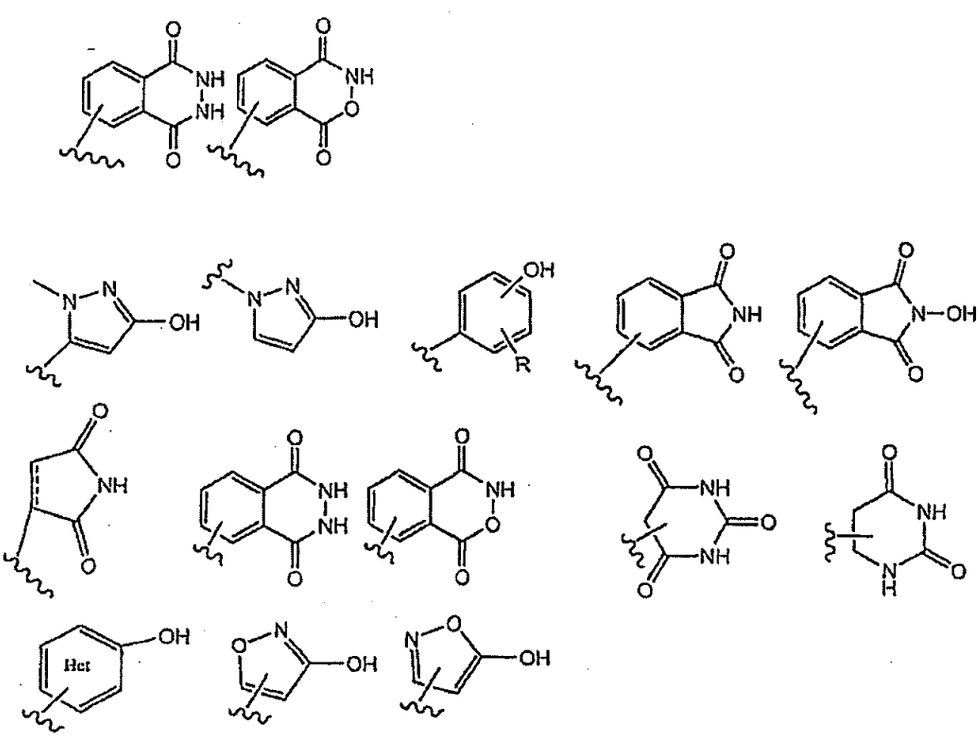
R^{77} es un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o

R^{77} es hidrógeno, halógeno o alcoxi C_1-C_6 lineal o ramificado; y

R^{88} es hidrógeno.

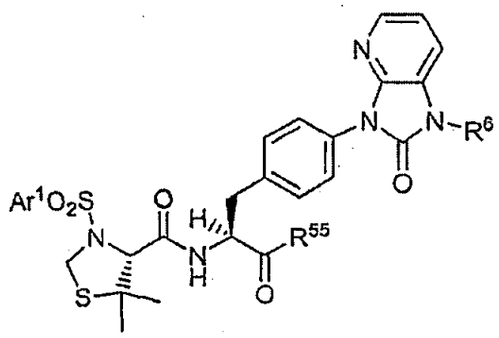
Otros grupos (d) útiles en la invención incluyen los mostrados en la Tabla D1.

Tabla D1



Otros compuestos preferidos de la fórmula II.1 para el

uso en los procesos de la invención tienen la fórmula II.1-a:



II.1-a

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde

R^{55} es un grupo protector ácido, de preferencia alcoxi C_1-C_6, más preferentemente alcoxi C_2-C_4;

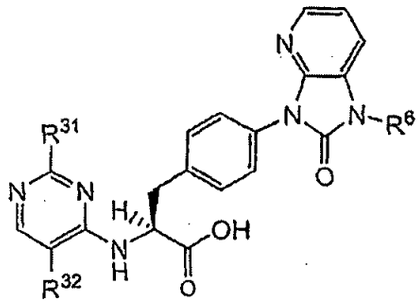
Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y

R^6 es hidrógeno.

Los compuestos preferidos de la Fórmula II-1-a incluyen aquellos en donde Ar^1 es fenilo o un grupo heteroarilo de 5 ó 6 miembros que tiene por lo menos un átomo de nitrógeno, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con halógeno, hidroxi, alcoxi C_1-C_6, alquilo C_1-C_6, nitro, trifluorometilo, amino, mono- o di(C_1-C_6)alquilamino, aminoalquilo (C_1-C_6), acilo C_2-C_6, acilamino C_2-C_6 o aminoacilo (C_1-C_6). Ar^1 es piridilo opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxi, alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, nitro, trifluorometilo, amino, mono- o dialquilamino (C_1-C_6), aminoalquilo (C_1-C_6), acilo C_2-C_6, acilamino C_2-C_6 o aminoacilo (C_1-C_6). Los compuestos particularmente preferidos de la fórmula II.1-a incluyen aquellos en donde Ar^1 es piridilo opcionalmente sustituido con alquilo C_1-C_6, hidroxi, halógeno, alcoxi C_1-C_6, nitro,

trifluorometilo, amino o mono- o dialquilamino (C_1-C_6).

Aún otros compuestos preferidos de la fórmula II.1 también son los de la fórmula II.2-a:



II.2-a

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

R^{56} es un grupo protector ácido, de preferencia alcoxi C_1-C_6, más preferentemente alcoxi C_2-C_4;

R^6 es hidrógeno.

Los compuestos preferidos de la Fórmula II.2-a incluyen aquellos en donde R^{31} es amino o mono- o dialquilamino (C_1-C_6); y R^{32} es -H, $-NO_2$ o haloalquilo, más preferentemente trifluorometilmetilo.

Aún otros compuestos preferidos de la Fórmula II.2-a son aquellos en donde:

R^{31} es amino o mono- o alquilamino (C_1-C_6); y

R^{32} es $-N(MR^{41})R^{42}$; en donde M es $-SO_2-$ o -CO-;

R^{41} es alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxi, alcoxi C_1-C_6, amino o mono- o alquilamino (C_1-C_6); o

fenilo o un heteroarilo de 5 ó 6 miembros que contiene por lo menos un nitrógeno, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con halógeno, hidroxi, alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_7, amino, nitro, trifluorometilo o mono- o alquilamino (C_1-C_6); y

R^{42} es hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_7.

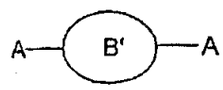
Los compuestos adicionales preferidos de la fórmula II.2-a incluyen aquellos en donde:

Los grupos R^{41} dentro de la fórmula II.2-a son alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxi, alcoxi C_1-C_6, amino o mono- o alquilamino (C_1-C_6); o

piridilo o pirimidinilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con halógeno, hidroxi, alquilo C_1-C_3, alcoxi C_1-C_3, amino o mono- o alquilamino (C_1-C_4); y

R^{42} es hidrógeno, alquilo C_1-C_4 o cicloalquilo C_3-C_7.

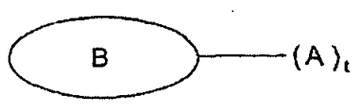
En un ejemplo, los conjugados de esta invención son divalentes y se representan por la fórmula III:



III

en donde cada A es independientemente como se definió anteriormente y B' es $-Z'-(CH_2CHR^7O)_p-Z'-$ en donde cada Z' es independientemente un enlace covalente o un grupo de enlazamiento, R^7 es hidrógeno o metilo y p es un entero de aproximadamente 100 a 1360.

En otro ejemplo, los conjugados de esta invención son trivalentes a decavalentes y se representan de preferencia por la fórmula IV:



IV

en donde cada A es independientemente como se definió anteriormente y t es un entero de 3 a 10.

Este proceso de la presente invención emplea la reacción de Mitsunobu, una reacción de condensación de alcoholes en

presencia de triaril- o trialquilfosfina y un azodicarboxilato apropiado. En las reacciones preferidas, los alcoholes poliméricos, por ejemplo, poletilenglicol, se hacen reaccionar con nucleófilos en presencia de triaril- o tralquilfosfina y el reactivo azo para proporcionar los conjugados. Los nucleófilos son compuestos que tienen un hidrógeno ácido, es decir, un radical apropiado para donar electrones. El enlace formado haciendo reaccionar un alcohol polimérico con un nucleófilo puede ser diverso, tal como, por ejemplo, la formación del enlace carbono-oxígeno, formación del enlace carbono-nitrógeno, formación del enlace carbono-azufre, formación del enlace carbono-halógeno y formación del enlace carbono-carbono.

De esta manera, los compuestos activos no derivados pueden tener una amplia variedad de grupos funcionales que pueden reaccionar con los alcoholes poliméricos. Ejemplos incluyen ácidos carboxílicos, alcoholes, β-cetoésteres, aminas, tioles, haluros de alquilo, haluros de acilo, β-dicetonas y similares. Otros ejemplos de los nucleófilos que pueden usarse en el proceso de la presente invención pueden encontrarse en *Organic Reactions*, 1992, 42, 335-656, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

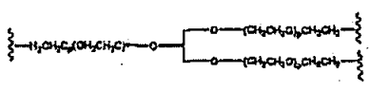
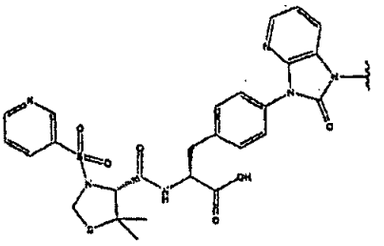
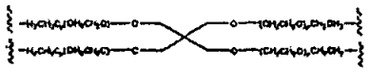
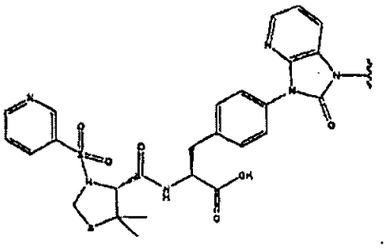
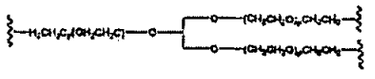
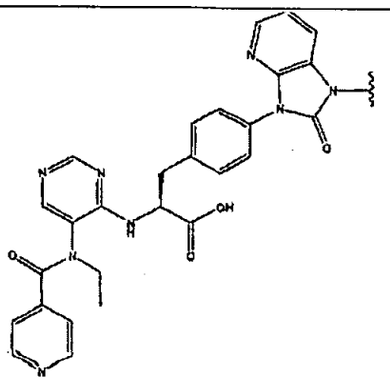
Ejemplos de las triaril- o trialquilfosfinas se describen en *Synthesis*, 2003, 3, 317-334: *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 7787; *Chem. Commun.* 1997, 759; y *Nucleosides Nucleotides*, 1999, 18, 727, todas incorporadas en la presente por referencia e incluyen trifenilfosfina, trimetilfosfina, trietilfosfina, tributilfosfina y 1,2-bis-(difenilfosfino)etano. Las fosfinas también pueden ser soportadas en polímeros o solubles en agua. Una triarilfosfina preferida es la trifenilfosfina.

En general, los reactivos diazo son ésteres o amidas de

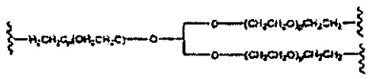
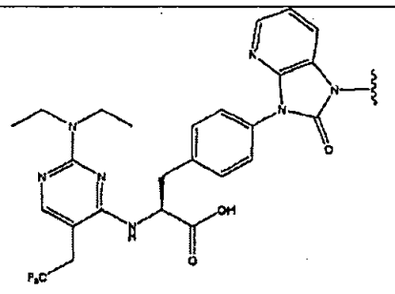
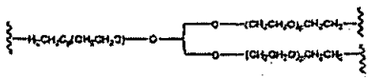
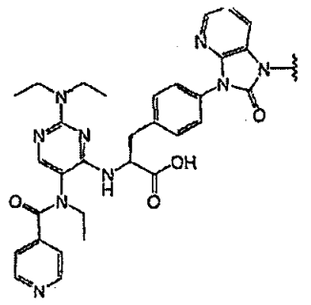
ácidos azodicarboxílicos, e incluyen los encontrados en *Synthesis*, 2003, 3, 317-334; *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40, 7359; y *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, 57, 2675. Ejemplos específicos de tales compuestos diazo son dietildiazocarboxilato, diisopropilazodicarboxilato, 4-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona, N,N,N'N'-tetrametilazodicarboxamida, dipiperidida del ácido azodicarboxílico, bis(N-4-metilpiperazin-1-il)azodicarboxamida, dimorfolinoazodicarboxamida y azodicarboxilato de di-ter-butilo.

Los conjugados representativos preparados mediante el proceso de la presente invención, incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se establecen en la siguiente tabla:

TABLA I

Comp.	B	A
A		
B		
C		

163

Comp.	B	A
D		
E		

en donde en cada uno de los sustratos la suma de todas la p es de 100 a 2200, de preferencia de aproximadamente 200-1360.

Definiciones

Como se usa en la presente, "alquilo" se refiere a los grupos de hidrocarbilo alifáticos saturados monovalentes que tienen de 1 a 5 átomos de carbono y más preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono. Este término se ejemplifica por los grupos, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo y similares.

"Alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 3, y de preferencia de 1 a 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de alcoxi, alcoxi sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, arilo, arilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro,

carboxilo, ésteres de carboxilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, espirocicloalquilo, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido.

"Alquileno" se refiere a los grupos hidrocarbilo alifáticos saturados divalentes que tienen de preferencia de 1 a 5 y más preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono que son de cadena lineal o ramificada. Este término se ejemplifica por los grupos, tales como metileno ($-CH_2-$), etileno ($-CH_2CH_2-$), n-propileno ($-CH_2CH_2CH_2-$), isopropileno ($-CH_2CH(CH_3)-$) y similares.

"Alcoxi" se refiere al grupo "alquilo-O-" que incluye, a manera de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, iso-propoxi, n-butoxi, t-butoxi, sec-butoxi, n-pentoxi y similares.

"Alcoxi sustituido" se refiere al grupo "alquilo-O-sustituido".

"Acilo" se refiere a los grupos H-C(O)-, alquilo-C(O)-, alquilo-C(O)- sustituido, alquenilo-C(O)-, alquenilo-C(O)-sustituido, alquinilo-C(O)-, alquinilo-C(O)- sustituido-cicloalquilo-C(O)-, cicloalquilo-C(O)- sustituido, arilo-C(O)-, arilo-C(O)- sustituido, heteroarilo-C(O)-, heteroarilo-C(O)- sustituido, heterocíclico-C(O)- y heterocíclico-C(O)- sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en la presente.

"Aminoacilo" se refiere al grupo $-C(O)NR^{10}R^{10}$ en donde cada R^{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquenilo

sustituido, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido y en donde cada R10 se enlaza para formar junto con el átomo de nitrógeno, un anillo heterocíclico o heterocíclico sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en la presente.

"Aciloxi" se refiere a los grupos alquilo-C(O)-, alquilo-C(O)O- sustituido, alquenilo-C(O)O-, alquenilo-C(O)O- sustituido, alquinilo-C(O)O-, alquinilo-C(O)O- sustituido, arilo-C(O)O-, arilo-C(O)O- sustituido, cicloalquilo-C(O)O-, cicloalquilo-C(O)O- sustituido, heteroarilo-C(O)O-, heteroarilo-C(O)O- sustituido, heterocíclico-C(O)O- y heterocíclico-C(O)O- sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en la presente.

"Alquenilo" se refiere a los grupos alquenilo que tienen de 2 a 6 átomos de carbono y de preferencia 2 a 4 átomos de carbono y que tienen por lo menos 1 y de preferencia de 1 a 2 sitios de insaturación alquenilo. Estos grupos se ejemplifican por vinilo, alilo, but-3-en-1-ilo y similares.

"Alquenilo sustituido" se refiere a los grupos alquenilo que tienen de 1 a 3 sustituyentes, y de preferencia 1 a 2

sustituyentes, seleccionados del grupo que consiste de alcoxi, alcoxi sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, arilo, arilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, ésteres de carboxilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido, con la condición de que cualquier sustitución hidroxilo no se enlaza a un átomo de carbono de vinilo (insaturado).

"Alquinilo" se refiere a los grupos alquinilo que tienen de 2 a 6 átomos de carbono y de preferencia de 2 a 3 átomos de carbono y que tienen por lo menos 1 y de preferencia de 1 a 2 sitios de insaturación alquinilo.

"Alquinilo sustituido" se refiere a los grupos alquinilo que tienen de 1 a 3 sustituyentes, y de preferencia 1 a 2 sustituyentes, seleccionados del grupo que consiste de alcoxi, alcoxi sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, arilo, arilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, ésteres de carboxilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido.

"Amino" se refiere al grupo $-NH_2$.

"Ciano" se refiere al grupo -CN.

"Amino sustituido" se refiere al grupo -NR'R" en donde R' y R" se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido,

heterocíclico, heterocíclico sustituido y en donde R' y R" se enlazan, junto con el nitrógeno unido a los mismos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido, con la condición de que R' y R" no sean ambos hidrógeno. Cuando R' es hidrógeno y R" es alquilo, el grupo amino sustituido se refiere a menudo en la presente como alquilamino. Cuando R' y R" son alquilo, el grupo amino sustituido se refiere a menudo en la presente como dialquilamino. Cuando se hace referencia a un amino monosustituido, se entiende que R' o R" es hidrógeno, pero no ambos. Cuando se hace referencia a un amino disustituido, se entiende que ni R' o R" son hidrógeno.

"Aminoacilo" se refiere a los grupos $-NR^{11}C(O)$alquilo, $-NR^{11}C(O)$alquilo sustituido, $-NR^{11}C(O)$cicloalquilo, $-NR^{11}C(O)$cicloalquilo sustituido, $-NR^{11}C(O)$alquenilo, $-NR^{11}C(O)$alquenilo sustituido, $-NR^{11}C(O)$alquinilo, $-NR^{11}C(O)$alquinilo sustituido, $-NR^{11}C(O)$arilo, $-NR^{11}C(O)$arilo sustituido, $-NR^{11}C(O)$heteroarilo, $-NR^{11}C(O)$heteroarilo sustituido, $-NR^{11}C(O)$heterocíclico y $-NR^{11}C(O)$heterocíclico sustituido, en donde R^{11} es hidrógeno o alquilo y en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en la presente.

"Nitro" se refiere al grupo $-NO_2$.

"Arilo" o "Ar" se refiere a un grupo carbocíclico aromático monovalente de 6 a 14 átomos de carbono que tiene un anillo simple (por ejemplo, fenilo) o anillos condensados múltiples (por ejemplo, naftilo o antrilo) en donde los anillos condensados pueden o no ser aromáticos (por ejemplo,

168

2-benzoxazolinona, 2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona-7-ilo, y similares) con la condición de que el punto de unión esté en un átomo de carbono aromático. Los arilos preferidos incluyen fenilo y naftilo.

"Arilo sustituido" se refiere a los grupos arilo que se sustituyen con 1 a 3 sustituyentes, y de preferencia 1 a 2 sustituyentes, seleccionados del grupo que consiste de hidroxi, acilo, acilamino, aciloxi, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, arilo, arilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, carboxilo, ésteres de carboxilo, ciano, tiol, tioalquilo, tiolaquilo sustituido, tioarilo, tioarilo sustituido, tioheteroarilo, tioheteroarilo sustituido, tiocicloalquilo, tiocicloalquilo sustituido, tioheterocíclico, tioheterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halo, nitro, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, heteroariloxi, heteroariloxi sustituido, heterocicliloxi, heterocicloloxi sustituido, aminosulfonilo (NH_2-SO_2-) y aminosulfonilo sustituido.

"Ariloxi" se refiere al grupo arilo-O- que incluye, a manera de ejemplo, fenoxi, naftoxi y similares.

"Ariloxi sustituido" se refiere a los grupos arilo-O- sustituidos.

"Carboxilo" se refiere a -COOH o las sales de los mismos.

"Éster de carboxilo" se refiere a los grupos -C(O)O-alquilo, -C(O)O-alquilo sustituido, -C(O)-arilo y -C(O)O-arilo sustituido en donde alquilo, alquilo sustituido y arilo

sustituido son como se definen en la presente.

"Cicloalquilo" se refiere a los grupos alquilo cíclicos de 3 a 10 átomos de carbono que tienen anillos simples o múltiples que incluyen, a manera de ejemplo, adamantilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo y similares.

"Cicloalquenilo" se refiere a los grupos alquenilo cíclicos de 4 a 10 átomos de carbono que tienen anillos cíclicos simples o múltiples y que tienen además por lo menos 1 y de preferencia de 1 a 2 sitios internos de insaturación etilénica vinilo (>C=C<).

"Cicloalquilo sustituido" y "cicloalquenilo sustituido" se refiere a un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo, que tiene de 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de oxo (=O), tioxo (=S), alcoxi, alcoxi sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, arilo, arilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, ésteres de carboxilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido.

"Cicloalcoxi" se refiere a los grupos -O-cicloalquilo.

"Cicloalcoxi sustituido" se refiere a los grupos cicloalquilo -O-sustituidos.

"Halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo y de preferencia es flúor o cloro.

"Hidroxi" se refiere al grupo -OH.

"Heteroarilo" se refiere a un grupo aromático de 1 a 10 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste de oxígeno, nitrógeno y azufre dentro del

anillo. Tales grupos heteroarilo pueden tener un anillo simple (por ejemplo, piridinilo o furilo) o anillos condensados múltiples (por ejemplo, indolizinilo o benzotienilo) en donde los anillos condensados pueden o no ser aromáticos y/o contener un heteroátomos, con la condición de que el punto de unión sea a través de un átomo del grupo heteroarilo aromático. Los heteroarilo preferidos incluyen piridinilo, pirrolilo, indolilo, tiofenilo y furanilo.

"Heteroarilo sustituido" se refiere a los grupos heteroarilo que se sustituyen con 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo de los sustituyentes definidos para el arilo sustituido.

"Heteroariloxi" se refiere al grupo -O-heteroarilo y "heteroariloxi sustituido" se refiere al grupo heteroarilo -O-sustituido.

"Heterociclo" o "heterocíclico" o "heterocicloalquilo" o "heterociclilo" se refiere a un grupo saturado o insaturado que tiene un anillo simple o anillos condensados múltiples, de 1 a 10 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste de nitrógeno, azufre u oxígeno dentro del anillo, en donde, en los sistemas de anillo fusionado, uno o más de los anillos pueden ser cicloalquilo, arilo o heteroarilo, con la condición de que el punto de unión es a través del anillo heterocíclico.

"Heterocíclico sustituido" o "heterocicloalquilo sustituido" o "heterociclilo sustituido" se refiere a los grupos heterociclilo que se sustituyen con 1 a 3 de los mismos sustituyentes como los definidos para cicloalquilo sustituido.

Ejemplos de los heterociclilos y heteroarilos incluyen,

pero no se limitan a, azetidina, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, dihidroindol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftilpiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazol, fenazina, isoxazol, fenoxazina, fenotiazina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, ftalimida, 1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina, 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno, tiazol, tiazolidina, tiofeno, benzo[b]tiofeno, morfolinilo, tiomorfolinilo (también referido como tiamorfolinilo), piperidinilo, pirrolidina, tetrahidrofuranilo y similares.

"Tiol" se refiere al grupo -SH.

"Tioalquilo" o "alquiltioéter" o "tioalcoxi" se refiere al grupo -S-alquilo.

"Tioalquilo sustituido" o "alquiltioéter sustituido" o "tioalcoxi sustituido" se refieren al grupo alquilo -S-sustituido.

"Tioarilo" se refiere al grupo -S-arilo, en donde arilo es como se definió anteriormente.

"Tioarilo sustituido" se refiere al grupo arilo -S-sustituido, en donde el arilo sustituido se definió anteriormente.

"Tioheteroarilo" se refiere al grupo -S-heteroarilo, en donde heteroarilo es como se definió anteriormente.

"Tioheteroarilo sustituido" se refiere al grupo heteroarilo -S-sustituido, en donde el tioheteroarilo sustituido se definió anteriormente.

"Tioheterocíclico" se refiere al grupo -S-heterocíclico

y "tioheterocíclico sustituido" se refiere al grupo heterocíclico -S-sustituido, en donde heterocíclico y heterocíclico sustituido se definieron anteriormente.

"Heterocicliloxi" se refiere al grupo heterociclilo-O- y "heterociclilo-O- sustituido" se refiere al grupo heterociclilo-O- sustituido en donde heterociclilo y heterociclilo sustituido son como se definieron anteriormente.

"Tiocicloalquilo" se refiere al grupo -S-cicloalquilo y "tiocicloalquilo sustituido" se refiere al grupo cicloalquilo -S-sustituido, en donde cicloalquilo y cicloalquilo sustituido son como se definieron anteriormente.

Los términos "compuesto" y "compuesto activo" se usan para referirse a la porción antagonista VLA-4 de un conjugado de la invención o con un antagonista VLA-4 conforme existe antes de la conjugación a un polímero.

Los términos "Enlazador", "grupo de enlazamiento" o "enlazador de 1 a 40 átomos" se refieren a un grupo o grupos que (1) enlaza covalentemente el polímero al compuesto activo y/o (2) enlazan covalentemente los radicales de óxido de polialquileno de un polímero entre sí. Dentro de cualquier conjugado particular, el enlazador que conecta los radicales de óxido de polialquileno de un polímero y el enlazador que enlaza un polímero a un compuesto activo puede ser el mismo o diferente (es decir, puede tener las mismas estructuras químicas o diferentes). Los enlaces del grupo funcional representativos, de los cuales un grupo de enlazamiento puede tener uno o más, son amidas, éteres, carbamatos, tiocarbamatos, ureas, tioureas, grupos amino, grupos carbonilo, grupos alcoxi, etc. El enlazador puede ser

homogéneo o heterogéneo en su contenido de átomos (por ejemplo, enlazadores que contienen sólo átomos de carbono o enlazadores que contienen átomos de carbono así como uno o más heteroátomos presentes en el enlazador. De preferencia, el enlazador contiene 1 a 25 átomos de carbono y 0 a 15 heteroátomos seleccionados de oxígeno, NR^{22}, azufre, -S(O)- y $-S(O)_2-$ en donde R^{22} es como se definió anteriormente. El enlazador también puede quiral o aquiral, lineal, ramificado o cíclico.

La intervención entre los enlaces del grupo funcional o enlaces dentro del enlazador, el enlazador también puede contener grupos espaciadores, que incluyen, pero no se limitan a, espaciadores seleccionados de alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido y combinaciones de los mismos. El espaciador puede ser homogéneo o heterogéneo en su contenido de átomos (por ejemplo, espaciadores que contienen sólo átomos de carbono o espaciadores que contienen átomos de carbono, así como uno o más heteroátomos presentes en el espaciador. De preferencia, el espaciador contiene 1 a 25 átomos de carbono y 0 a 15 heteroátomos seleccionados de oxígeno, NR^{22}, azufre, -S(O)- y $-S(O)_2$, en donde R^{22} es como se definió anteriormente. El espaciador también puede ser quiral o aquiral, lineal, ramificado o cíclico.

Ejemplos no limitantes de los espaciadores son las cadenas de anillos de alquileno lineales o ramificadas, fenileno, bifenileno, etc., todos los cuales son capaces de tener uno o más de un grupo funcional capaz de formar un enlace con el compuesto activo y uno o más radicales de óxido

de polialquileno. Un ejemplo particular de un grupo de enlazador-espaciador polifuncional es lisina, que puede enlazar cualquiera de los compuestos activos a dos radicales poliméricos por medio de dos grupos amino sustituidos en una cadena de alquileno C_4. Otros ejemplos no limitantes incluyen ácido p-aminobenzoico y ácido 3,5-diaminobenzoico que tienen 2 y 3 grupos funcionales respectivamente disponibles para la formación del enlace. Otros grupos de enlazador polifuncional más espaciador pueden visualizarse fácilmente por un experimentado en la técnica.

El término "polímero" se refiere a polímeros biocompatibles, solubles en agua, sustancialmente no inmunogénicos que son capaces de acoplarse a más de un antagonistas de VLA-4 de la fórmula II. De preferencia, el polímero es no iónico y biocompatible medido por la carencia de toxicidad a las dosis usadas. Inclusive estos polímeros son múltiples copias de los polímeros acoplados a un vehículo.

Ejemplos de los polímeros apropiados incluyen, pero no se limitan a: polímeros de polioxialquileno, tales como polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), poliacrilamida (PAAm), polidimetilacrilamida (PDDAm), alcohol polivinílico (PVA), dextrano, poli(ácido L-glutámico), anhídrido maleico y estireno (SMA), poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA), anhídrido de polidiviniléter maleico (DIVEMA) (Kameda, Y. et al., Biomaterials 25: 3259-3266, 2004; Thanou, M. et al., Current Opinion in Investigational Drugs 4(6): 701-709, 2003; Veronese, F.M., et al., II Farmaco 54: 497-516, 1999).

Los polímeros preferidos son polioxialquilenos. Por

"polioxialquilenos" se entiende macromoléculas que incluyen por lo menos una porción de óxido de polialquileno que se enlaza opcionalmente en forma covalente a uno o más óxidos de polialquileno adicionales, en donde los óxidos de polialquileno son los mismos o diferentes. Los ejemplos no limitantes incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), poliisopropilenglicol (PIPG), PEG-PEG, PEG-PPG, PPG-PIPG y similares. También se incluyen dentro de la definición de polioxialquilenos macromoléculas en donde las porciones del óxido de polialquileno se conectan opcionalmente entre sí por un enlazador. Son ejemplos ilustrativos PEG-enlazador-PEG, PEG-enlazador-PIPG, y similares. Los ejemplos más específicos incluyen los poli[di(etilenglicol)adipatos comercialmente disponibles, poli[di(etilenglicol)ftalato dioles y similares. Otros ejemplos son los copolímeros de bloque de las unidades de oxialquileno, polietilenglicol, polipropilenglicol y poliol polioxietilenado.

En por lo menos uno de sus términos, el polímero se enlaza covalentemente a un compuesto no polimérico sustituido de la Fórmula II opcionalmente a través de un enlazador usando el proceso de la presente invención, proporcionando un enlace covalente del polímero al compuesto no polimérico sustituido de la Fórmula II.

Cuando se emplea un enlazador, el enlazador se enlaza covalentemente a por lo menos uno de los términos poliméricos que, en cambio, se enlaza covalentemente al compuesto sustituido no polimérico, distinto de la Fórmula II. Se entiende, por supuesto, que si los sustituyentes apropiados se encuentran en el compuesto sustituido no polimérico de la

Fórmula II entonces el enlazador opcional no puede ser necesario ya que puede ser el enlace directo del polímero al compuesto sustituido no polimérico de la Fórmula II.

Los enlazadores preferidos incluyen, a manera de ejemplo, los siguientes -O-, $-NR^{22}-$, $-NR^{22}C(O)O-$, $-OC(O)NR^{22}-$, $-NR^{22}C(O)-$, $-C(O)NR^{22}-$, $-NR^{22}C(O)NR^{22}-$, -alquileno-$NR^{22}C(O)O-$, -alquileno-$NR^{22}C(O)NR^{22}-$, -alquileno-$OC(O)NR^{22}-$, -alquileno-$NR^{22}-$, -alquileno-O-, -alquileno-$NR^{22}C(O)-$, -alquileno-$C(O)NR^{22}-$, -$NR^3C(O)O$-alquileno-, $-NR^{22}C(O)NR^{22}$-alquileno-, $-OC(O)NR^{22}$-alquileno, $-NR^{22}$-alquileno-, -O-alquileno-, $-NR^{22}C(O)$-alquileno-, $-C(O)NR^{22}$-alquileno-, -alquileno-$NR^{22}C(O)O$-alquileno-, -alquileno-$NR^3C(O)NR^{22}$-alquileno-, -alquileno-$OC(O)NR^{22}$-alquileno-, -alquileno-NR^{22}-alquileno-, alquileno-O-alquileno-, -alquileno-$NR^{22}C(O)$-alquileno-, $-C(O)NR^{22}$-alquileno-, y



en donde



se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido y D y E se seleccionan independientemente del grupo que consiste de un enlace, -O-, CO, $-NR^{22}-$, $-NR^{22}C(O)O-$, $-OC(O)NR^{22}-$, $-NR^{22}C(O)-$, $-C(O)NR^{22}-$, $-NR^{22}C(O)NR^{22}-$, -alquileno-$NR^{22}C(O)O-$, -alquileno-$NR^{22}C(O)NR^{22}-$, -alquileno-$OC(O)NR^{22}-$, -alquileno-$NR^{22}-$, -alquileno-O-, -alquileno-$NR^{22}C(O)-$, -alquileno-$C(O)NR^{22}-$, $-NR^{22}C(O)O$-alquileno-, $-NR^{22}C(O)NR^{22}$-alquileno-, $-OC(O)NR^{22}$-alquileno, $-NR^{22}$-alquileno-, -O-alquileno-, $-NR^{22}C(O)$-alquileno-, $-C(O)NR^{22}$-alquileno-, -alquileno-$NR^{22}C(O)O$-alquileno-, -

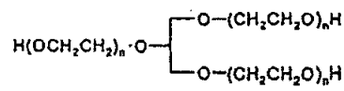
alquileno-$NR^{22}C(O)NR^{22}$-alquileno-, -alquileno-$OC(O)NR^{22}$-alquileno-, -alquileno-NR^{22}-alquileno-, alquileno-O-alquileno-, -alquileno-$NR^{22}C(O)$-alquileno- y -$C(O)NR^{22}$-alquileno- en donde R^{22} es como se definió anteriormente.

Los grupos alquileno preferidos en los enlazadores anteriores incluyen grupos alquileno C_1-C_{15}, más preferentemente grupos alquileno C_1-C_6 y más preferentemente grupos alquileno C_1-C_3. Los grupos heterocíclicos preferidos incluyen piperazininilo, piperidinilo, homopiperazinilo, homopiperidinilo, pirrolidinilo e imidazolidinilo.

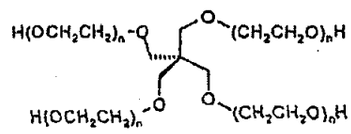
Los conjugados de la invención pueden incorporarse en un vehículo que puede tener de 1 a 19 conjugados adicionales enlazados a los mismos. El término "vehículo" se refiere a un componente o andamio opcional al que pueden unirse múltiples conjugados y que cuando se incorpora en los conjugados de esta invención no imparten una inmunogenicidad o toxicidad sustancial. Estos vehículos son de preferencia materiales mono- a decavalentes que contienen múltiples funcionalidades para la unión del polímero. Las funcionalidades pueden ser homogéneas o heterogéneas; aunque se prefieren las funcionalidades homogéneas.

Ejemplos de los vehículos comercialmente disponibles que comprenden funcionalidades homogéneas incluyen, sólo a manera de ejemplo, catecol, resorcinol, 1,2-fenilendiamina, 1,3-fenilendiamina, 1,4-fenilendiamina; ácido ftálico, ácido isoftálico, 1,3-propandiol, glicerol, 1,2,4-bencentriol, pentaeritritol, glucosa (en su forma de piranosa), 1,3-fenilendiisocianato, 1,4-fenilenfiisocianato, isoftalaldehído, ftalaldehído, 1,3-ciclopentandiol, etilendiamina, ácido etilendiamintetraacético y similares.

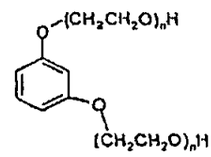
Las estructuras representativas útiles como vehículos o andamios incluyen los siguientes (en donde PEG se usa sólo para propósitos representativos):



tri-PEG-glicerol



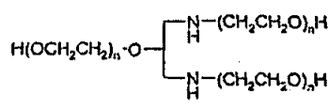
tetra-PEG-pentaeritritol



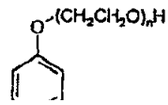
di-PEG resorcinol

Ejemplos de los vehículos comercialmente disponibles que comprenden funcionalidades heterogéneas incluyen, sólo a manera de ejemplo, ácido 6-hidroxicaproico, aminoácidos, ácido salicílico, ácido 3- ó 4-aminosalicílico, 1,3-diamino-2-hidroxipropano, 2-aminoetanol, 3-aminoetanol, glucosamina, ácido siálico, aminoácidos y similares.

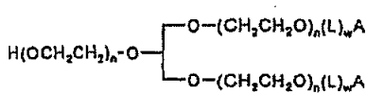
Las estructuras representativas que surgen de la unión polimérica usando tales vehículos o andamios incluyen los siguientes (en donde PEG se usa sólo para propósitos representativos):

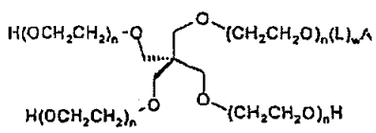


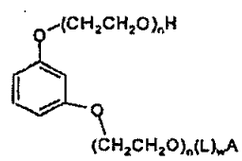
tri-PEG-1,3-diamino-2-hidroxipropano



El vehículo puede contener opcionalmente una o más copias de A unidas al vehículo opcionalmente a través de un enlazador, con la condición de que haya por lo menos un grupo funcional adicional que pueda unir a una copia adicional de A. Por ejemplo, cada una de las siguientes estructuras se parece a un vehículo o andamio porque hay un grupo funcional adicional para unir un sustituyente A adicional:







en donde L, w y A son como se definieron anteriormente.

El término "oxialquileno" se refiere a $-OCH_2CHR^d-$ en donde R^d es alquilo. Los oxialquilenos polimerizados se refieren como polioxialquilenos, óxidos de polialquileno o polialquilenglicoles, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen PEG, polipropilenglicol, polibutilenglicol, poliisopropilenglicol y similares.

Estos polímeros opcionalmente se mono-cubren con un sustituyente seleccionado de preferencia de alquilo, arilo, alquilo sustituido, arilo sustituido y un vehículo como se describió anteriormente. Inclusive estos polímeros son los

polímeros de polioxialquileno diamino cubiertos que son conocidos en la técnica como Jeffamines®. Además, estos polímeros pueden contener opcionalmente una o más unidades de no oxialquileno, tales como los poli[di(etilenglicol)adipatos, poli[di(etilenglicol)ftalato dioles comercialmente disponibles y similares. También se incluyen los copolímeros de bloque de unidades de oxialquileno, polietilenglicol, polipropilenglicol y poliol polioxietilenado.

Los polioxialquilenos, tales como PEG, se proporcionan usualmente como sólidos cerosos, solubles en agua. En general, conforme el peso molecular del polímero aumenta, su viscosidad y punto de congelación también aumentan. Las preparaciones comerciales se caracterizan usualmente por el "peso molecular promedio" de los polímeros constituyentes.

Por lo regular, el peso molecular promedio de la cantidad total del polímero que surge de radicales poliméricos simples o múltiples en los conjugados de la invención está entre aproximadamente 100 a 100,000; de preferencia de aproximadamente 10,000 a 80,000; más preferentemente de aproximadamente 20,000 a aproximadamente 70,000.

De manera similar, otros polímeros apropiados tales como polivinilpirrolidona (PVP), poliacrilamida (PPAm), polidimetilacrilamida (PDAAm), alcohol polivinílico (PVA), dextrano, poli(ácido L-glutámico), anhídrido maleico y estireno (SMA), poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA), anhídrido de polidiviniléter maleico (DIVEMA) son bien conocidos en la técnica y tienen pesos moleculares de aproximadamente 100 a 100,000; de preferencia de

aproximadamente 10,000 a 80,000; más preferentemente de aproximadamente 20,000 a aproximadamente 70,000.

La "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que mantienen la efectividad biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención y que no son biológicamente o de otra forma indeseables. En muchos casos, los compuestos de esta invención son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a éstos.

Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden prepararse de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de las bases inorgánicas, incluyen, sólo a manera de ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de las bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como alquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas, alquilaminas sustituidas, dialquilaminas (sustituidas con alquilo), triaminas (sustituidas con alquilo), alquenilaminas, dialquenilaminas, trialquenilaminas, alquenilaminas sustituidas, diaminas (sustituidas con alquenilo), triaminas (sustituidas con alquenilo), cicloalquilaminas, di(cicloalquil)aminas, tri(cicloalquil)aminas, cicloalquilaminas sustituidas, cicloalquilamina disustituida, cicloalquilaminas trisustituidas, cicloalquenilaminas, di(cicloalquenil)aminas, tri(cicloalquenil)aminas, cicloalquenilaminas sustituidas, cicloalquenilamina disustituida, cicloalquenilaminas trisustituidas, arilaminas, diarilaminas, triarilaminas, heteroarilaminas, diheteroarilaminas, triheteroarilaminas, aminas

heterocíclicas, aminas diheterocíclicas, aminas triheterocíclicas, di- y tri-aminas mezcladas en donde por lo menos dos de los sustituyentes en la amina son diferentes y se seleccionan del grupo que consiste de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo, heterocíclico y similares. También se incluyen las aminas en donde los dos o tres sustituyentes, junto con el nitrógeno amino, forman un grupo heterocíclico o heteroarilo.

Ejemplos de las aminas apropiadas incluyen, sólo a manera de ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, tri(iso-propil)amina, tri(n-propil)amina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, N-alquilglucaminas, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, morfolina, N-etilpiperidina y similares. También debería entenderse que otros derivados del ácido carboxílico serían útiles en la práctica de esta invención, por ejemplo, amidas del ácido carboxílico, que incluyen carboxamidas, carboxamidas de alquilo inferior, carboxamidas de dialquilo y similares.

Las sales de adición farmacéuticamente aceptables pueden prepararse de ácidos inorgánicos y orgánicos. Estas sales derivadas de los ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales derivadas de los ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico,

ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares.

El término "catión farmacéuticamente aceptable" se refiere al catión de una sal farmacéuticamente aceptable.

Se entiende que en todos los grupos sustituidos definidos en la presente, los polímeros que se tienen la definición de los sustituyentes con los sustituyentes adicionales a los mismos (por ejemplo, arilo sustituido que tiene un grupo arilo sustituido como un sustituyente que se sustituye por sí mismo con un grupo arilo sustituido, etc.) no se pretenden incluirlos en la presente. En tales casos, el número máximo de tales sustituyentes es tres. Esto es, cada una de las definiciones anteriores se restringe por una limitación que, por ejemplo, los grupos arilo sustituidos se limitan a -arilo sustituido-(arilo sustituido)-(arilo sustituido).

De manera similar, se entiende que las definiciones anteriores no se pretende que incluyan los patrones de sustitución no permisibles (por ejemplo, metilo sustituido con 5 grupos fluoro o un grupo hidroxilo alfa a la insaturación etilénica o acetilénica). Tales patrones de sustitución no permisibles son bien conocidos por un experimentado en la técnica.

Preparación del compuesto

Los compuestos activos iniciadores empleados en el proceso de esta invención pueden prepararse a partir de los materiales iniciadores fácilmente disponibles usando los procedimientos conocidos y los materiales iniciadores

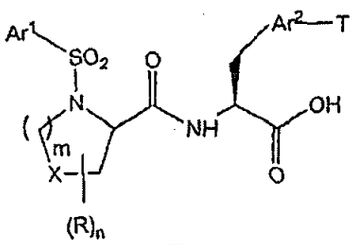
fácilmente disponibles o, cuando el material iniciador no se conoce o no comercialmente disponible, estos materiales pueden prepararse fácilmente usando los procedimientos de la literatura. Se apreciará que cuando se dan las afecciones de proceso típicas o preferidas (es decir, las temperaturas de reacción, tiempos, relaciones en mol de reactivos, solventes, presiones, etc.) otras afecciones de proceso también pueden usarse a menos que se establezca lo contrario. Las afecciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos particulares o el solvente usado, pero tales afecciones pueden determinarse por un experimentado en la técnica por los procedimientos de optimización rutinarios.

Además, como será evidente por los experimentados en la técnica, los grupos protectores convencionales pueden ser necesarios para prevenir algunos grupos funcionales de experimenta reacciones indeseadas. Los grupos protectores apropiados para los diferentes grupos funcionales así como las afecciones apropiadas para proteger y desproteger los grupos funcionales particulares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los numerosos grupos protectores se describen en T.W. Greene and G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Second Edition,, Wiley, New York, 1991, y las referencias citadas en la presente.

Además, los compuestos de esta invención contendrán típicamente uno o más centros quirales. Si se desea, tales compuestos pueden prepararse o aislarse como estereoisómeros puros, es decir, como enantiómeros o diastereómeros individuales, o como mezclas enriquecidas en estereoisómeros. Tales estereoisómeros (y las mezclas enriquecidas) se incluyen dentro del alcance de esta invención, a menos que se indique lo contrario. Los estereoisómeros puros (para las mezclas

enriquecidas) pueden prepararse usando, por ejemplo, materiales iniciadores ópticamente activos o los reactivos estereoselectivos bien conocidos en la técnica. De manera alternativa, las mezclas racémicas de tales compuestos pueden separarse usando, por ejemplo, cromatografía de columna quiral, agentes de resolución quirales y similares.

Los conjugados preferidos preparados de acuerdo con esta invención comprenden un radical polimérico/vehículo opcional que contiene aproximadamente 1 a aproximadamente 10 sustituyentes de la fórmula II:

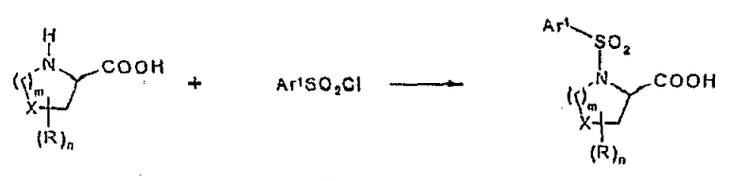


II

Específicamente, el radical polimérico puede unirse a través de un enlace covalente al sustituyente Ar^1, el sustituyente R, el sustituyente Ar^2 y/o en el sustituyente T, en donde el radical polimérico se enlaza ya sea directamente o se enlaza por medio de un enlazador. En cambio, el radical polimérico puede unirse opcionalmente a un vehículo que tiene múltiples copias del polímero unidas al mismo.

Los compuestos de la Fórmula II pueden prepararse acoplando primero un aminoácido heterocíclico 1, con un cloruro de arilsulfonilo apropiado como se ilustra en el siguiente Esquema de reacción 1:

ESQUEMA DE REACCIÓN 1



1 2 3

en donde R, Ar^1, X, m y n son como se definieron anteriormente.

Específicamente, en el esquema de reacción 1 anterior, el aminoácido 1, se combina con un equivalente estequiométrico o cantidad en exceso (de preferencia de aproximadamente 1.1 a aproximadamente 2 equivalentes) de haluro de arilsulfonilo 2, en un diluyente inerte apropiado, tal como diclorometano y similares. En general, la reacción se lleva a cabo a una temperatura que oscila de aproximadamente -70°C a aproximadamente 40°C hasta que la reacción se completa sustancialmente, lo que se presenta típicamente dentro de 1 a 24 horas. De preferencia, la reacción se lleva a cabo en presencia de una base apropiada para secuestrar el ácido generado durante la reacción. Las bases apropiadas incluyen, a manera de ejemplo, aminas terciarias, tales como trietilamina, diisopropiletilamina, N-metil-morfolina y similares. De manera alternativa, la reacción puede llevarse a cabo bajo afecciones de tipo Schotten-Baumann usando una solución alcalina acuosa, tal como una solución acuosa de hidróxido de sodio, una solución de fosfato acuoso amortiguada a pH 7.4 y similares. El producto resultante 3 puede recuperarse por los métodos convencionales, tales como cromatografía, filtración, evaporación, cristalización y similares, o de manera alternativa, usarse en la siguiente etapa sin purificación y/o aislamiento.

Los aminoácidos heterocíclicos 1 empleados en la reacción anterior son compuestos conocidos o compuestos que pueden prepararse a partir de los compuestos conocidos por

los procedimientos de síntesis convencionales. Ejemplos de los aminoácidos apropiados para el uso en esta reacción incluyen, pero no se limitan a, L-prolina, trans-4-hidroxil-L-prolina, cis-4-hidroxil-L-prolina, trans-3-fenil-L-prolina, cis-3-fenil-L-prolina, L-(2-metil)prolina, ácido L-pipecolínico, ácido L-azetidina-2-carboxílico, ácido L-tiazolidin-4-carboxílico, ácido L-(5,5-dimetil)tiazolidin-4-carboxílico, ácido L-tiamorfolin-3-carboxílico. Si se desea, los ésteres del ácido carboxílico correspondientes de los aminoácidos, 1, tales como los ésteres de metilo, ésteres de etilo, ésteres de t-butilo y similares, pueden emplearse en la reacción anterior con el cloruro de arilsulfonilo. La hidrólisis subsecuente del grupo éster al ácido carboxílico usando los reactivos y afecciones convencionales, es decir, el tratamiento con un hidróxido de metal alcalino en un diluyente inerte tal como metanol/agua, después proporciona el aminoácido de N-sulfonilo 3.

De manera similar, los cloruros de sulfonilo 2, empleados en la reacción anterior son compuestos conocidos o compuestos que pueden prepararse a partir de los compuestos conocidos por los procedimientos de síntesis convencionales. Estos compuestos se preparan típicamente a partir del ácido sulfónico correspondiente, es decir, de los compuestos de la fórmula Ar^1SO_3H en donde Ar^1 es como se definió anteriormente, usando tricloruro de fósforo y pentacloruro de fósforo. En general esta reacción se lleva a cabo poniendo en contacto el ácido sulfónico con aproximadamente 2 a 5 equivalentes molares de tricloruro de fósforo y pentacloruro de fósforo, ya sea puro o en un solvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 0°C a

aproximadamente 80°C durante aproximadamente 1 a aproximadamente 48 horas, para proporcionar el cloruro de sulfonilo. De manera alternativa, los cloruros de arilsulfonilo 2, pueden prepararse a partir del compuesto tiol correspondiente, es decir, a partir de los compuestos de Ar^1-SH en donde Ar^1 es como se define en la presente, mediante el tratamiento del tiol con cloro (Cl_2) y agua bajo las afecciones de reacción convencionales.

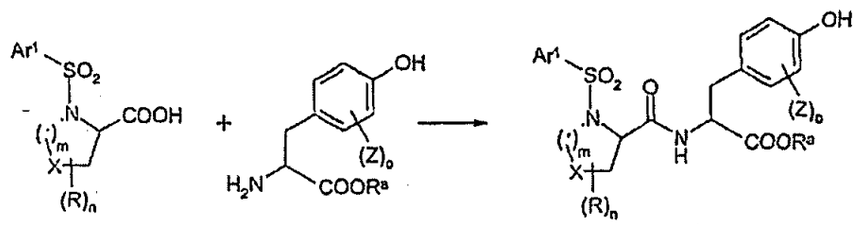
De manera alternativa, los cloruros de arilsulfonilo 2, empleados en la reacción anterior pueden prepararse por ciclosulfonilación de benceno sustituido o un grupo heterocicloalquilo usando Cl-SO_3H.

Ejemplos de los cloruros de arilsulfonilo apropiados para el uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, cloruro de bencensulfonilo, cloruro de 1-naftalensulfonilo, cloruro de 2-naftalensulfonilo, cloruro de p-toluensulfonilo, cloruro de o-toluensulfonilo, cloruro de 4-acetamidobencensulfonilo, cloruro de 4-ter-butilbencensulfonilo, cloruro de 4-bromobencensulfonilo, cloruro de 2-carboxibencensulfonilo, cloruro de 4-cianobencensulfonilo, cloruro de 3,4-diclorobencensulfonilo, cloruro de 3,5-diclorobencensulfonilo, cloruro de 3,4-dimetoxibencensulfonilo, cloruro de 3,5-difluorometilbencensulfonilo, cloruro de 4-fluorobencensulfonilo, cloruro de 4-metoxibencensulfonilo, cloruro de 2-metoxicarbonilbencensulfonilo, cloruro de 4-metilamido-bencensulfonilo, cloruro de 4-nitrobencensulfonilo, cloruro de 4-trifluorometil-bencensulfonilo, cloruro de 4-trifluorometoxibencensulfonilo, cloruro de 2,4,6-trimetilbencensulfonilo, cloruro de 2-tiofenilsulfonilo, cloruro de 5-

cloro-2-tiofensulfonilo, cloruro de 2,5-dicloro-4-tiofensulfonilo, cloruro de 2-tiazolsulfonilo, cloruro de 2-metil-4-tiazolsulfonilo, cloruro de 1-metil-4-imidazolsulfonilo, cloruro de 1-metil-4-pirazolsulfonilo, cloruro de 5-cloro-1,3-dimetil-4-pirazolsulfonilo, cloruro de 3-piridinsulfonilo, cloruro de 2-pirimidinsulfonilo y similares. Si se desea, un fluoruro de sulfonilo, bromuro de sulfonilo o anhídrido del ácido sulfónico pueden usarse en lugar del cloruro de sulfonilo en la reacción anterior para formar el aminoácido de N-sulfonilo 3.

El aminoácido de N-arilsulfonilo 3, después se acopla a los ésteres de tirosina comercialmente disponibles como se muestra en el siguiente esquema de reacción 2:

ESQUEMA DE REACCIÓN 2



3 4 5

en donde R, Ar^1, X, m y n son como se definieron anteriormente, R^a es hidrógeno o alquilo, pero de preferencia es un grupo alquilo, tal como t-butilo, Z representa una sustitución opcional en el anillo arilo y o es cero, uno o dos.

Esta reacción de acoplamiento se lleva a cabo típicamente usando los reactivos de acoplamiento bien conocidos tales como carbodiimidas, reactivo BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio) y similares. Las carbodiimidas apropiadas incluyen, a manera de ejemplo,

diciclohexilcarbodiimida (DDC), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y similares. Si se desea, las formas soportadas poliméricas de los reactivos de acoplamiento de carbodiimida también pueden usarse, incluyendo, por ejemplo, las descritas en *Tetrahedron Letters*, 34(48), 7685 (1993). Además, los promotores de acoplamiento bien conocidos, tales como N-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol y similares, pueden usarse para facilitar la reacción de acoplamiento.

Esta reacción de acoplamiento se lleva a cabo típicamente poniendo en contacto el ácido de N-sulfonilamino, 3, con aproximadamente 1 a aproximadamente 2 equivalentes del reactivo de acoplamiento y por lo menos un equivalente, de preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 1.2 equivalentes del derivado de tirosina 4, en un diluyente inerte, tal como diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, N,N-dimetilformamida y similares. En general, esta reacción se lleva a cabo a una temperatura que oscila de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas. Una vez que se completa la reacción, el compuesto 5 se recupera por los métodos convencionales que incluyen neutralización, evaporación, extracción, precipitación, cromatografía, filtración y similares.

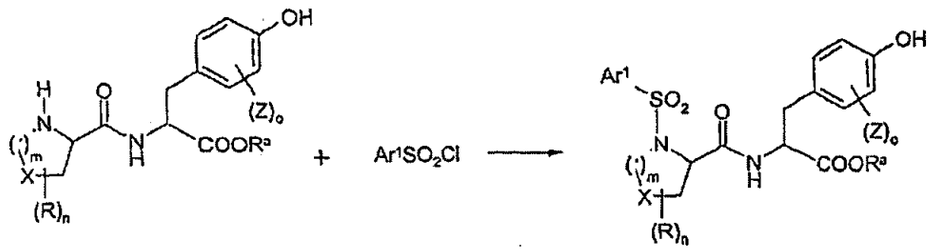
De manera alternativa, el aminoácido de N-sulfonilo 3, puede convertirse en un haluro de ácido que después se acopla con el compuesto 4, para proporcionar el compuesto 5. El haluro de ácido puede prepararse poniendo en contacto el compuesto 3 con un haluro de ácido inorgánico, tal como cloruro de tionilo, tricloruro de fósforo, tribromuro de fósforo o pentacloruro de fósforo o de preferencia, con

cloruro de oxalilo bajo las afecciones convencionales. En general, esta reacción se lleva a cabo usando aproximadamente 1 a 5 equivalentes molares de haluro de ácido inorgánico o cloruro de oxalilo, ya sea puro en un solvente inerte, tal como diclorometano o tetracloruro de carbono, a temperatura en el intervalo de aproximadamente 0°C a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 1 a aproximadamente 48 horas. Un catalizador, tal como DMF, también puede usarse en esta reacción.

El haluro de ácido del aminoácido de N-sulfonilo 3, después se pone en contacto con por lo menos un equivalente, de preferencia aproximadamente 1.1 a aproximadamente 1.5 equivalentes, del derivado de tirosina, 4, en un diluyente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura que oscila de aproximadamente -70°C a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas. De preferencia, esta reacción se lleva a cabo en presencia de una base apropiada para secuestrar el ácido generado durante la reacción. Las bases apropiadas incluyen, a manera de ejemplo, aminas terciarias, tales como trietilamina, diisopropiletilamina, N-metilmorfolina y similares. De manera alternativa, la reacción puede llevarse a cabo bajo afecciones de tipo Schotten-Baumann usando álcalis apropiadas, tales como hidróxido de sodio y similares. Una vez que se completa la reacción, el compuesto 5 se recupera por los métodos convencionales que incluyen neutralización, evaporación, extracción, precipitación, cromatografía, filtración y similares.

De manera alternativa, el compuesto 5 puede prepararse formando primero un derivado de diaminoácido y después acoplar el diaminoácido al haluro de arilsulfonilo, 2, como se muestra en el siguiente esquema de reacción 3:

ESQUEMA DE REACCIÓN 3



6 2 7

en donde R, R^a, Ar^1, X, Z, m, n y o son como se definieron anteriormente.

El diaminoácido 6, puede prepararse fácilmente acoplando el aminoácido 1, con el aminoácido 4, usando las técnicas y reactivos de acoplamiento de aminoácidos convencionales, tales como carbodiimidas, reactivo BOP y similares, como se describió anteriormente. El diaminoácido 6, después puede sulfonarse usando cloruro de sulfonilo, 2, y usando los procedimientos de síntesis descritos anteriormente para proporcionar el compuesto 7.

Los derivados de tirosina 4, empleados en las reacciones anteriores son compuestos conocidos o compuestos que pueden prepararse a partir de los compuestos conocidos por los procedimientos de síntesis convencionales. Por ejemplo, los derivados de tirosina 4, apropiados para el uso en las reacciones anteriores incluyen, pero no se limitan a, L-tirosina metil éster, L-tirosina t-butil éster, L-3,5-diyodotirosina metil éster, L-3-yodotirosina metil éster, β-(4-hidroxi-naft-1-il)-L-alanina metil éster, β-(6-hidroxi-naft-2-il)-L-alanina metil éster y similares. Si se desea, por

supuesto, también pueden emplearse otros ésteres o amidas de los compuestos descritos anteriormente.

El derivado del aminoácido de N-arilsulfonil-heterocíclico-tirosina, 7, puede usarse como un punto de inicio para unir un radical polimérico al grupo Ar^2 empleando el proceso de la invención.

Los radicales de amina localizados en otras porciones de la molécula pueden emplearse de la manera descrita anteriormente para unir covalentemente un grupo polimérico a la molécula. Por ejemplo, las aminas localizadas en Ar^1, en el aminoácido heterocíclico o en Ar^2 pueden derivarse similarmente para proporcionar la sustitución PEG usando el proceso de la invención. Los radicales amina pueden incluirse en estos sustituyentes durante la síntesis y protegerse de manera apropiada conforme sea necesario. De manera alternativa, pueden emplearse precursores de amina.

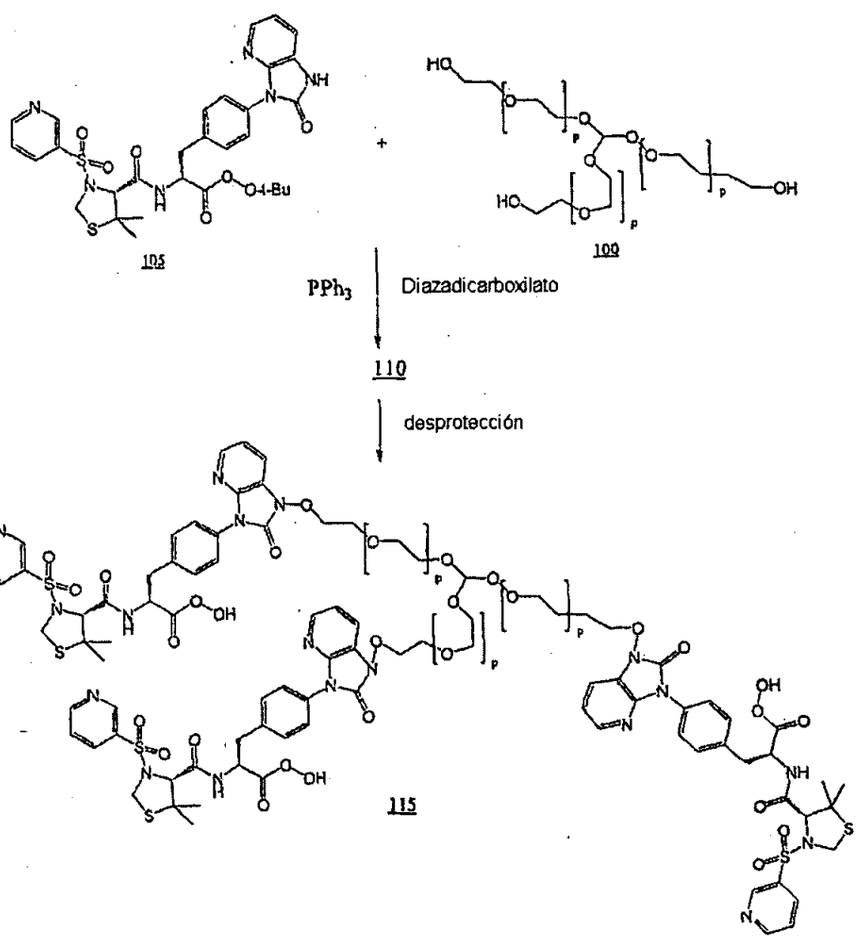
Además, la sustitución de amino puede incorporarse en la funcionalidad de aminoácido heterocíclico y después derivarse para incluir un radical polimérico. Por ejemplo la funcionalidad del aminoácido heterocíclico puede ser 2-carboxilpiperazina en la patente U.S. No. 6,489,300. De manera alternativa, la 3- ó 4-hidroxiprolina comercialmente disponible puede oxidarse a la cetona correspondiente y después amidarse reductivamente con amoníaco en presencia de cianoborohidruro de sodio para formar el radical de amina correspondiente. Además, puede reducirse 4-cianoprolina para proporcionar un grupo alquilo sustituido de la fórmula $-CH_2NH_2$ que puede derivarse a la amina.

Además, el radical amina puede incorporarse en la funcionalidad Ar^2. De preferencia, el radical amina está presente como un precursor de amina tal como un grupo nitro o ciano enlazado a Ar^2.

Los compuestos no derivados de la Fórmula IIa-IIh se acoplan

subsecuentemente a un polímero empleando el procedo de la invención. El Esquema de reacción 4 representa una modalidad de la invención:

ESQUEMA DE REACCIÓN 4



En el esquema de reacción 9, un alcohol de PEG 100 se trata con un nucleófilo 105 en presencia de una fosfina, en la presente PPh_3 y un diazodicarboxilato, por ejemplo, azodicarboxilato de diisopropilo, para formar el éster protegido 110. El éster después se hidroliza para formar el conjugado deseado 115.

La reacción se presenta bajo afecciones moderadas y esencialmente neutras. La reacción se lleva a cabo de preferencia en por lo menos un solvente apropiado. Ejemplos incluyen solventes halogenados tales como cloruro de

metileno, solventes aromáticos, tales como benceno o tolueno u otros solventes, tales como tetrahidrofurano o éter dietílico. Otros solventes apropiados incluyen acetato de etilo, acetonitrilo y DMF. Más preferentemente, se emplea un solvente clorado o un solvente de éter. En una modalidad más preferida, el solvente es cloruro de metileno o tetrahidrofurano.

La temperatura de reacción está típicamente en el intervalo de aproximadamente -100 a 100°C, de preferencia en el intervalo de aproximadamente -20 a 50°C y aún más preferentemente de aproximadamente 0° a aproximadamente la temperatura ambiente. En una modalidad particularmente preferida, las temperaturas de reacción están entre aproximadamente -10 a 10°C.

El tiempo de reacción está en el intervalo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 100 horas, de preferencia en el intervalo de entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 50 horas. Más preferentemente, la reacción procede para completarse entre aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 10 horas.

Como se mencionó anteriormente, ejemplos de las triaril- o trialquilfosfinas incluyen trifenilfosfina, trimetilfosfina, trietilfosfina, tributilfosfina y 1,2-bis-(difenilfosfino)etano. Las fosfinas también pueden soportarse en polímero o ser solubles en agua. Una triarilfosfina preferida es la trifenilfosfina.

Ejemplos de los compuestos diazo son diazocarboxilato de dietilo, azodicarboxilato de diisopropilo, 4-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona, N,N,N',N'-tetrametilazodicarboxamida, dipiperidida del ácido azodicarboxílico, bis(N-4-

metilpiperazin-1-il)azodicarboxamida, dimorfolinoazodicarboxamida y azodicarboxilato de di-ter-butilo.

Se entiende que otros alcoholes poliméricos apropiados pueden usarse en lugar del PEG y que un experimentado en la técnica sería fácilmente capaz de modificar los esquemas de reacción posteriores para incorporar estos otros polímeros. En algunos casos, el radical de PEG puede introducirse directamente en el grupo Ar^2 y, en otros casos, el radical de PEG puede introducirse por unión a un radical enlazador.

Otros polímeros apropiados para la conjugación a un compuesto de la fórmula II incluyen, sin limitación, polivinilpirrolidona (PVP), poliacrilamida (PPAm), polidimetilacrilamida (PDAAm), alcohol polivinílico (PVA), dextrano, poli(ácido L-glutámico) (PGA), anhídrido maleico y estireno (SMA), poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA), anhídrido de polidiviniléter maleico (DIVEMA). A manera de ejemplo, PVP, PAAm y PDAAm pueden funcionalizarse por introducción de co-monómeros durante la polimerización d radicales. PVA y dextrano contienen grupos hidroxilo primarios (OH) apropiados para la conjugación. Los métodos de síntesis de estos biopolímeros y para conjugarlos a materiales biológicos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la Solicitud de patente U.S. publicada 20040043030; Patente U.S. 5,177,059; Patente U.S. 6,716,821; Patente U.S. 5,824,701; Patente U.S. 6,664,331; Patente U.S. 5,880,131; Kameda, Y. et al., Biomaterials 25: 3259-3266; Thanou, M. et al., Current Opinion in Investigational Drugs 4(6): 701-709, 2003; Veronese, F.M., et al., II Farmaco 54: 497-516, 1999, todas las cuales se incorporan en la presente

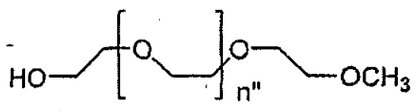
por referencia en sus totalidades).

Los polímeros representativos apropiados para el uso en la invención incluyen:

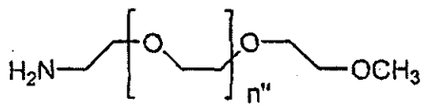
$HO(alquileno\text{-}O)_{pp}R^{bb}$	mono-hidroxi PEG mono-cubierto (mPEG)
$H_2N(alquileno\text{-}O)_{pp}R^{bb}$	mono-amino PEG mono-cubierto
$HO(alquileno\text{-}O)_{pp}R\text{-}OH$	di-hidroxi PEG no cubierto
$H_2N(alquileno\text{-}O)_{pp}R\text{-}OH$	mono-amino PEG no cubierto
$HO(alquileno\text{-}O)_{pp}R^{bb}$	mono-hidroxi ramificado
$HO(alquileno\text{-}O)_{pp}R^{bb}$	mono-hidroxi PEG dendrimérico

en donde pp y alquileno son como se definen en la presente y R^{bb} se selecciona de preferencia del grupo que consiste de alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

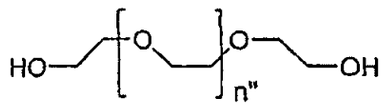
Otros polímeros apropiados se muestran a continuación:



mono-hidroxi PEG mono-cubierto (mPEG)



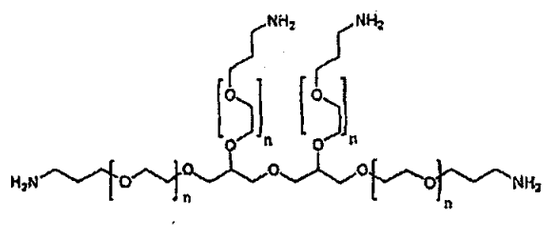
mono-amina PEG mono-cubierto



di-hidroxi PEG no cubierto

PEGs ramificados:

Reactivos de PEG disponibles en NOF (4 ramificaciones de 20 kDa)

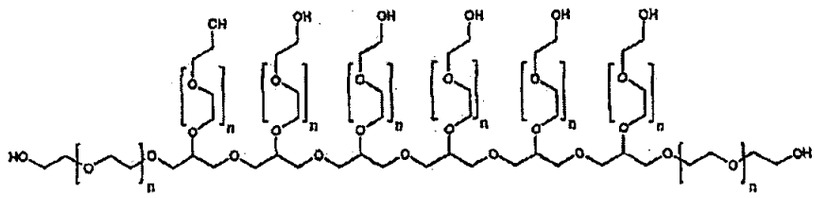


PEG tetra-amina de 4 ramificaciones de 20 kDa

Núcleo de diglicerina

Cat # Sunbright DG-200PA

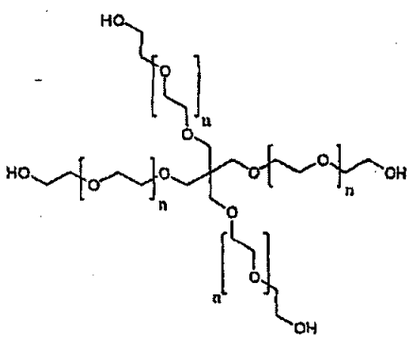
Reactivos de PEG disponibles en Nektar (8 ramificaciones de 40 kDa)



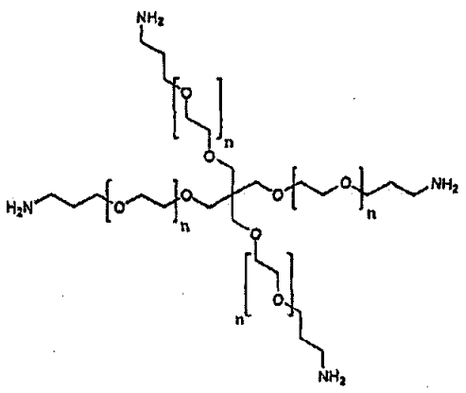
PEG de 8 ramificaciones de 40 KDa
núcleo de hexaglicerina
Cat # 0J000T08

PEGs dendriméricos:

Reactivos de PEG disponibles en NOF (4 ramificaciones de 40 kDa)

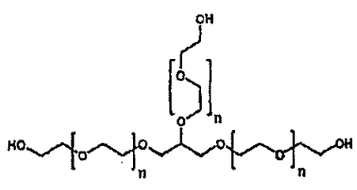


Alcohol de PEG de 4 ramificaciones de 40 kDa
núcleo de pentaeritritol
cat. # Sunbright PTE-40000

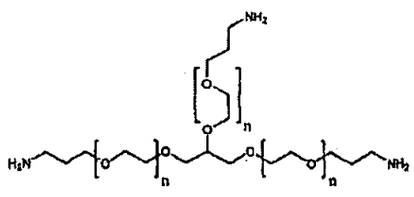


PEG tetra-amina de 4 ramificadiones de 40 KDa
núcleo de pentaeritritol
cat. # Sunbright PTE-400PA

Reactivos de PEG disponibles en NOF (3 ramificaciones de 40 kDa)



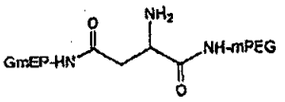
PEG de 3 ramificaciones de 40 kDa
núcleo de glicerina
cat # Sunbright GL-40000



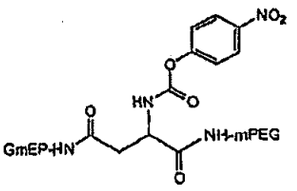
PEG tri-amina de 3 ramificaciones de 40 kDa
núcleo de glicerina
cat # Sunbright GL-400PA

Reactivos de PEG disponibles en SunBio (40 y 20 kDa)

Serie γ-PEG (núcleo de ácido aspártico)

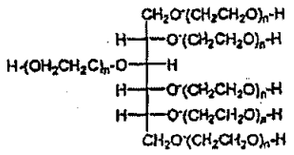


Y-PEG amina (40 kDa)
Cat# PYAM-40



Y-PEG carbamato de nitrofenilo (40 kDa)
Cat# PYNPC-40

Serie de 6 ramificaciones (Núcleo de sorbitol)

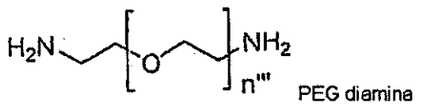


PEG de 6 ramificaciones de 40 kDa
producto acostumbrado

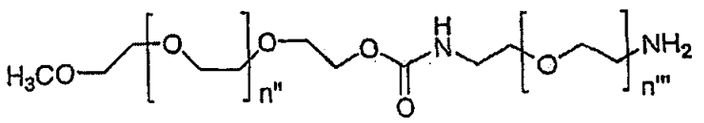
Los pesos moleculares inferiores disponibles en la serie de sorbitol de 6 ramificaciones incluyen 10, 15 y 20 kDa. Los derivados además del alcohol incluyen amina de 6 ramificaciones.

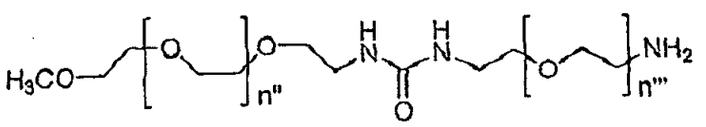
Por ejemplo, la amina de 6 ramificaciones de 10 kDa (cat# P6AM-10) pueden convertirse a una hexa-amina de 6 ramificaciones de 40 kDa (con BocNH-PEG-NHS éster de 5 kDa de Nektars) y después se conjuga a una molécula pequeña.

Estos polímeros de PEG pueden modificarse adicionalmente extendiendo las cadenas con PEG diaminas a través de un enlazador apropiado, por ejemplo, un carbamato (uretano) o una urea.



PEG diamina





Una variedad de compuestos nucleofílicos que tienen un hidrógeno ácido pueden usarse en el proceso de la invención. Tales compuestos pueden ser compuestos biológicamente activos, es decir, compuestos terapéuticos (farmacéuticos) y químicos agrícolas (pesticidas, herbicidas y estimuladores del crecimiento de plantas, tales como fertilizantes) o compuestos de aditivos alimentarios. Ejemplos de los grupos que tienen un nitrógeno ácido que pueden incorporarse en tales compuestos se muestran anteriormente; ver las estructuras establecidas en las Tablas D y D1.

Formulaciones farmacéuticas

Cuando se emplean como farmacéuticos, los conjugados de esta invención se administran usualmente en la forma de las composiciones farmacéuticas. Estos conjugados pueden administrarse mediante una variedad de rutas que incluyen la administración oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, sublingual, oftálmica o inhalación, incluyendo la administración nasal u oral. Las rutas de administración preferidas incluyen subcutánea, intravenosa e inhalación. Estas composiciones se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden por lo menos un conjugado.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de acuerdo con la invención, por ejemplo, un conjugado de la Fórmula I, en combinación con un compuesto separado que es un inhibidor $\alpha_4\beta_7$. Estas composiciones también comprenden un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y pueden administrarse

como se describe en cualquier parte de la presente.

Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, uno o más del conjugado de la fórmula I junto con los vehículos farmacéuticamente aceptables. En la elaboración de las composiciones de esta invención, el ingrediente activo se mezcla usualmente con un excipiente, diluido por un excipiente o encerrado dentro de un vehículo que puede ser en soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles. Para la administración subcutánea, un vehículo simple puede comprender una solución estéril de agua, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4 y NaCl, en proporciones que proporcionan un pH isotónico y fisiológicamente aceptable, también se conocen como PBS o solución salina amortiguada con fosfato. Otras opciones se conocen por los experimentados en la técnica e incluyen sistemas de solventes mezclados que pueden afectar la velocidad de absorción y la exposición total. Estas opciones incluyen sistemas de solventes mezclados que contienen glicerina, polietilenglicol 400 y aceite de semilla de algodón. También de uso potencial es el etanol, N,N'-dimetilacetamida, propilenglicol y alcohol bencílico los cuales pueden usarse para manipular el mejoramiento de la permeabilidad y la hipertonicidad.

En la preparación de una formulación, puede ser necesario moler el compuesto activo para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinarse con otros ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, se muele ordinariamente a un tamaño de partícula menor de malla 200. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula se ajusta normalmente

por molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, aproximadamente malla 40.

Algunos ejemplos de los incipientes apropiados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metil celulosa. Las formulaciones pueden incluir además: agentes lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsificantes y agentes de suspensión; agentes conservadores, tales como metil- y parahidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes y agentes saborizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, prolongada o retrasada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando los procedimientos conocidos en la técnica.

La administración de los agentes terapéuticos por la formulación subcutánea o intravenosa es bien conocida en la industria farmacéutica. Una formulación subcutánea o intravenosa debería poseer algunas cantidades además de sólo la composición, en la que el agente terapéutico es soluble. Por ejemplo, la formulación debería promover la estabilidad global del o los ingredientes activos, también la manufactura de la formulación debería ser de un costo efectivo. Todos estos factores determinan finalmente el éxito global y la utilidad de una formulación intravenosa.

Otros aditivos accesorios que pueden incluirse en las formulaciones farmacéuticas de los compuestos de la presente

invención son los siguientes: solventes: etanol, glicerol, propilenglicol; estabilizadores: EDTA (ácido etilendiamintetraacético), ácido cítrico; conservadores antimicrobianos: alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno; agentes amortiguadores: ácido cítrico/citrato de sodio, tartrato ácido de potasio, tartrato ácido de sodio, ácido acético/acetato de sodio, ácido maleico/maleato de sodio, ftalato ácido de sodio, ácido fosfórico/fosfato diácido de potasio, ácido fosfórico/fosfato ácido de disodio y modificadores de tonicidad: cloruro de sodio, manitol, dextrosa.

La presencia de un amortiguador es necesaria para mantener el pH acuoso en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 y más preferentemente en un intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6. El sistema amortiguador en general es una mezcla de un ácido débil y una sal soluble del mismo, por ejemplo, citrato de sodio/ácido cítrico; o la sal de mono-catión o di-catión de un ácido dibásico, por ejemplo, tartrato ácido de potasio; tartrato ácido de sodio, ácido fosfórico/fosfato diácido de potasio y ácido fosfórico/fosfato ácido de disodio.

La cantidad del sistema amortiguador usado es dependiente de (1) el pH deseado y (2) la cantidad de fármaco. En general, la cantidad de amortiguador usado está en una relación molar de 0.5:1 a 50:1 de amortiguador:alendronato (en donde los moles de amortiguador se toman como los moles combinados de los ingredientes del amortiguador, por ejemplo, citrato de sodio y ácido cítrico) de la formulación para mantener un pH en el intervalo de 4 a 8 y en general, se usa una relación molar 1:1 a 10:1 de

amortiguador (combinado) al fármaco presente.

Un amortiguador útil en la invención es citrato de sodio/ácido cítrico en el intervalo de 5 a 50 mg por mL de citrato de sodio de 1 a 15 mg por mL de ácido cítrico, suficiente para mantener un pH acuoso de 4-6 de la composición.

El agente amortiguador también puede estar presente para evitar la precipitación del fármaco a través de la formación de complejos metálicos solubles con iones metálicos disueltos, por ejemplo, Ca, Mg, Fe, Al, Ba, que pueden lixiviarse de los recipientes de vidrio o tapones de caucho o estar presentes en agua de la llave ordinaria. El agente puede actuar como un agente de acomplejamiento competitivo con el fármaco y producir un complejo metálico soluble conduciendo a la presencia de particulados indeseables.

Además, la presencia de un agente, por ejemplo, cloruro de sodio en una cantidad de aproximadamente 1-8 mg/ml, para ajustar la tonicidad al mismo valor de la sangre humana puede requerirse para evitar la hinchazón o encogimiento de eritrocitos una vez que se administra la formulación intravenosa, lo que conduce a efectos secundarios indeseables, tales como náusea o diarrea y posiblemente a trastornos sanguíneos asociados. En general, la tonicidad de la formulación iguala la de la sangre humana que está en el intervalo de 282 a 288 mOsm/kg, y en general es de 285 mOsm/kg, que es equivalente a la presión osmótica que corresponde a una solución al 0.9% de cloruro de sodio.

La formulación intravenosa puede administrarse por inyección intravenosa directa, bolo i.v. o puede administrarse por infusión mediante la adición a una solución

de infusión apropiada, tal como inyección de cloruro de sodio al 0.9% u otra solución de infusión compatible.

Las composiciones se formulan de preferencia en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg, más usualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mg, del ingrediente activo. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para los pacientes humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico apropiado.

El conjugado es efectivo sobre un amplio intervalo de dosificación y en general se administra en una cantidad farmacéuticamente efectiva. Sin embargo, se entenderá que la cantidad del conjugado en realidad administrada será determinada por un médico, desde el punto de vista de las circunstancias relevantes, incluyendo la condición que es tratada, la ruta de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

Para preparar las composiciones sólidas, tales como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se entiende que el ingrediente activo se dispersa uniformemente

a través de la composición, de modo que puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente efectivas, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida después se subdivide en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente, que contienen de, por ejemplo, 0.1 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo de la presente invención.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o de otra manera componerse para proporcionar una forma de dosificación que da la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y de dosificación externa, siendo el comprimido en la forma de una cubierta sobre la anterior. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto en el duodeno o sea de liberación retrasada. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen un número de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que las nuevas composiciones de la presente invención pueden incorporarse para la administración oralmente o por inyección incluyen jarabes saborizados convenientemente con soluciones acuosas, suspensiones acuosas o aceitosas y emulsiones saborizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de ajonjolí, aceite de coco o aceite de cacahuate, así como elíxires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes acuosos u orgánicos, farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados como se describió *supra*. De preferencia, las composiciones se administran por la ruta de respiración oral o nasal para el efecto local o sistémico. De preferencia, las composiciones en los solventes farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente del dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede unirse a una mascarilla facial o máquina de respiración a presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o pulverización pueden administrarse, de preferencia oral o nasalmente, de los dispositivos que liberan la formulación de una manera apropiada. Para la administración por inhalación o insuflación, se prefiere que el peso molecular total del conjugado esté entre aproximadamente 10,000 Daltons y 70,000 Daltons, más preferentemente entre aproximadamente 20,000 Daltons y 45,000 Daltons.

Conjugados poliméricos

Los compuestos de esta invención como se formulan y administran son conjugados poliméricos. Los conjugados poliméricos se anticipan para proporcionar beneficios sobre los polímeros no conjugados, tales como solubilidad mejorada y estabilidad *in vivo*.

Como tal, la molécula polimérica simple puede emplearse

para la conjugación con los compuestos de la presente invención, aunque también se contempla más de una molécula polimérica pueda unirse, típicamente a través de un vehículo. Los compuestos conjugados de la presente invención pueden encontrar utilidad en las aplicaciones *in vivo* así como no *in vivo*. Además, será reconocido que el polímero conjugado puede usar cualquiera de otros grupos, radicales u otras especies conjugadas, conforme sea apropiado para la aplicación de uso final. Como un ejemplo, puede ser ventajoso en algunas aplicaciones funcionalizar el polímero para hacerlo reactivo y permitir que se conjugue a un compuesto de la fórmula II y para mejorar varias propiedades o características del material conjugado global. Por lo tanto, el polímero puede contener cualquier funcionalidad, grupos repetidos, enlaces u otras estructuras constituyentes que no impiden la eficacia de los compuestos conjugados de la presente invención para su propósito destinado.

Los polímeros ilustrativos que se emplea usualmente para lograr estas características deseables se describen *supra*, así como en PCT WO 01/54690 (por Zheng et al.) incorporado en la presente por referencia en su totalidad. El polímero puede acoplarse a los compuestos de la presente invención (de preferencia por medio de un radical enlazador) para formar enlaces estables que no se cortan significativamente por las enzimas humanas. En general, para que un enlace no sea "significativamente" cortado se requiere que no más de aproximadamente 20% de los enlaces que conectan el polímero y los compuestos de la presente invención a los que se enlaza, se corten dentro de un periodo de 24 horas, medido por las técnicas estándares en la técnica, que incluyen pero no se

limitan a, cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

En general, los compuestos de esta invención contienen por lo menos 2 compuestos de la fórmula II enlazados a un polímero. La cantidad final es un balance entre maximizar el grado de reacción mientras se minimizan las modificaciones no específicas del producto y, al mismo tiempo, definir los químicos que mantendrán la actividad óptima, mientras que al mismo tiempo se optimiza la vida media de los compuestos de la presente invención. De preferencia, por lo menos aproximadamente 50% de la actividad biológica de los compuestos de la presente invención se retiene y más preferentemente se retiene el 100%.

Como se observó anteriormente en la práctica de la presente invención, los residuos de polialquilenglicol de polialquilenglicoles de alquilo C_2-C_4, de preferencia residuos de polietilenglicol (PEG) o poli(oxi)alquilenglicol de tales glicoles se incorporan ventajosamente en los sistemas poliméricos de interés. De esta manera, el polímero al que los compuestos de la presente invención se unen puede ser un homopolímero de polietilenglicol (PEG) o es un poliol polioxietilenado, proporcionado en todos los casos en que el polímero es soluble en agua a temperatura ambiente. Los ejemplos no limitantes de tales polímeros incluyen homopolímeros de óxido de polialquileno tales como PEG o polipropilenglicoles, glicoles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos, con la condición de que se mantenga la solubilidad en agua del copolímero de bloque.

Ejemplos de los polioles polioxialquilenados incluyen, pero no se limitan a, glicerol polioxietilenado, sorbitol

polioxietilenado, glucosa polioxietilenada o similares. La estructura de glicerol del glicerol polioxietilenado es la misma estructura que se presenta naturalmente en, por ejemplo, los animales y humanos en mono-, di- y triglicéridos. Por lo tanto, esta ramificación no sería necesariamente observada como un agente extraño en el cuerpo.

Los experimentados en la técnica reconocerán que la siguiente lista es exclusivamente ilustrativa y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas en la presente. El polímero no necesita tener ningún peso molecular particular, sino que se prefiere que el peso molecular esté entre aproximadamente 100 y 100,000, de preferencia de aproximadamente 10,000 a 80,000; más preferentemente de aproximadamente 20,000 a aproximadamente 70,000. En particular, los tamaños de 20,000 o más son más efectivos para prevenir la pérdida del producto debido a la filtración a los riñones.

Por derivado de PEG se entiende un polímero de polietilenglicol en el que se ha modificado uno o ambos de los grupos hidroxilo terminales encontrados en el polietilenglicol mismo. Ejemplos de las modificaciones apropiadas incluyen reemplazar uno o ambos grupos hidroxilo con grupos funcionales alternativos, que pueden ser protegidos o desprotegidos con ligandos de bajo peso molecular o con otra macromolécula o polímero. La modificación de los grupos hidroxilo terminales en el polietilenglicol puede lograrse haciendo reaccionar el polietilenglicol con compuestos que comprenden los grupos funcionales reactivos complementarios, incluyendo los grupos funcionales que son capaces de experimentar una reacción con

los grupos hidroxilo en el polietilenglicol. Los derivados de PEG de los compuestos de esta invención pueden contener uno o más sustituyentes de polietilenglicol enlazados covalentemente a los mismos mediante un grupo de enlazamiento.

Los siguientes ejemplos de formulación ilustran las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Ejemplo de formulación 1

Se preparan cápsulas de gelatina dura que contienen los siguientes ingredientes.

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Ingrediente activo	30.0
Almidón	305.0
Estearato de magnesio	5.0

Los ingredientes anteriores se mezclan y se llenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 340 mg.

Ejemplo de formulación 2

Se prepara una fórmula de tableta usando los siguientes ingredientes.

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Ingrediente activo	25.0
Celulosa microcristalina	200.0
Dióxido de silicio coloidal	10.0
Ácido esteárico	5.0

Los componentes anteriores se mezclan y se comprimen para formar comprimidos, pesando cada una 240 mg.

Ejemplo de formulación 3

Se prepara una formulación de inhalador en polvo seco que contiene los siguientes componentes:

Ingrediente	% en peso
Ingrediente activo	5
Lactosa	95

El ingrediente activo se mezcla con la lactosa y la mezcla se adiciona a un dispositivo de inhalación de polvo seco.

Ejemplo de formulación 4

Se preparan como sigue comprimidos que contienen cada una 30 mg de ingrediente activo:

Ingrediente	Cantidad (mg/tableta)
Ingrediente activo	30.0 mg
Almidón	45.0 mg
Celulosa microcristalina	35.0 mg
Polivinilpirrolidona (como solución al 10% en agua estéril)	4.0 mg
Almidón de carboximetil sódico	4.5 mg
Estearato de magnesio	0.5 mg
Talco	1.0 mg
Total	120 mg

El ingrediente activo, almidón y celulosa se pasan a través de un tamiz U.S. de malla 20 y se mezclan completamente. La solución de polivinilpirrolidona se mezcla con los polvos resultantes, que después se pasan a través de un tamiz U.S. de malla 16. Los gránulos así producidos se secan de 50°C a 60°C y se pasan a través de un tamiz U.S. de malla 16. El almidón de carboximetil sódico, estearato de magnesio y talco, pasado previamente a través de un tamiz U.S. No. 30, después se adicionan a los gránulos que, después del mezclado, se comprimen en una máquina de comprimidos para producir comprimidos que pesan cada una 120 mg.

Ejemplo de formulación 5

Se elaboran como sigue cápsulas que contienen cada una 40 mg de medicamento:

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Ingrediente activo	40.0 mg
Almidón	109.0 mg
Estearato de magnesio	1.0 mg
Total	150.0 mg

El ingrediente activo, el almidón y el estearato de magnesio se mezclan, se pasan a través de un tamiz U.S. de malla 20 y se llenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 150 mg.

Ejemplo de formulación 6

Supositorios, que contienen cada uno 25 mg de

ingrediente activo se elaboran como sigue:

Ingrediente	Cantidad
Ingrediente activo	25 mg
Glicéridos de ácidos grasos saturados a	2,000 mg

El ingrediente activo se pasa a través de un tamiz U.S. de malla 60 y se suspende en los glicéridos de ácidos grasos saturados previamente fundidos usando el mínimo de calor necesario. La mezcla después se vierte en un molde de supositorio de 2.0 g de capacidad nominal y se deja enfriar.

Ejemplo de formulación 7

Suspensiones, que contiene cada una 50 mg de medicamento por 5.0 mL de dosis se elaboran como sigue:

Ingrediente	Cantidad
Ingrediente activo	50.0 mg
Goma xantana	4.0 mg

Ingrediente	Cantidad
Carboximetilcelulosa de sodio (11%)	
Celulosa microcristalina (89%)	50.0 mg
Sacarosa	1.75 g
Benzoato de sodio	10.0 mg
Saborizante y color	c.v.
Agua purificada a	5.0 mL

El ingrediente activo, la sacarosa y la goma xantana se mezclan, se pasan a través de un tamiz U.S. de malla No. 10 y después se mezclan con una solución elaborada previamente de la celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio en agua. El benzoato de sodio, el saborizante y el colorante se diluyen con algo de agua y se adicionan con agitación. Después se adiciona suficiente agua para producir el volumen requerido.

Ejemplo de Formulación 8

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Ingrediente activo	15.0 mg

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Almidón	407.0 mg
Estearato de magnesio	3.0 mg
Total	425.0 mg

El ingrediente activo, almidón y el estearato de magnesio se mezclan, se pasan a través de un tamiz U.S. de malla No. 20 y se rellenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 425.0 mg.

Ejemplo de formulación 9

Una formulación subcutánea puede prepararse como sigue:

Ingrediente	Cantidad
Ingrediente activo	50 mg/mL mg
Solución salina amortiguada con fosfato	1.0 mL

Ejemplo de formulación 10

Una formulación tópica puede prepararse como sigue:

Ingrediente	Cantidad
Ingrediente activo	1-10 g

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Cera emulsificante	30 g
Parafina líquida	20 g
Parafina suave blanca	hasta 100 g

La parafina suave blanca se calienta hasta fundirse. La parafina líquida y la cera emulsificante se incorporan y se agitan hasta disolverse. El ingrediente activo se adiciona y la agitación se continúa hasta dispersarse. La mezcla después se enfría hasta el sólido.

Ejemplo de Formulación 11

Una formulación intravenosa puede prepararse como sigue:

Ingrediente	Cantidad
Ingrediente activo	250 mg
Solución salina isotónica	100 mL

Otra formulación preferida empleada en los métodos de la presente invención emplea los dispositivos de liberación transdérmicos ("parches"). Estos parches transdérmicos pueden usarse para proporcionar una infusión continua o discontinua de los compuestos de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y uso de los parches transdérmicos para la liberación de los agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Patente U.S. 5,023,252, presentada el 11 de junio de 1991, incorporada en la presente por referencia. Estos parches pueden construirse para la liberación continua, pulsátil o en demanda de los agentes farmacéuticos.

A menudo, será deseable o necesario introducir la composición farmacéutica al cerebro, ya sea directa o indirectamente. Las técnicas directas involucran usualmente la colocación de un catéter de liberación del fármaco en el sistema ventricular del huésped para desviar la barrera hemato-cerebral. Uno de tales sistemas de liberación implantable usado para el transporte de factores biológicos a las regiones anatómicas específicas del cuerpo se describe en la patente U.S. 5,011,472 que se incorpora en la presente por referencia.

Las técnicas indirectas, que en general se prefieren, involucran usualmente formular las composiciones para proporcionar la latenciación del fármaco mediante la conversión de fármacos hidrofílicos en fármacos liposolubles. La latenciación en general se logra a través del bloqueo de los grupos hidroxi, carbonilo, sulfato y amina primaria presentes en el fármaco para hacer al fármaco más liposoluble y sensible al transporte a través de la barrera hemato-

cerebral. De manera alternativa, la liberación de los fármacos hidrofílicos puede mejorarse por la infusión intra-arterial de soluciones hipertónicas que pueden abrir de manera transiente la barrera hemato-cerebral.

Otras formulaciones apropiadas para el uso en la presente invención pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985).

Como se observó anteriormente, los compuestos descritos en la presente son apropiados para el uso en una variedad de sistemas de liberación de fármacos descritos anteriormente. Además, para mejorar la vida media sérica *in vivo* del compuesto administrado, los compuestos pueden encapsularse, introducirse en el lumen de liposomas, prepararse como un coloide u otras técnicas convencionales pueden emplearse, las cuales proporcionan una vida media sérica prolongada de los compuestos. Una variedad de métodos están disponibles para preparar los liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka, et al., Patente U.S. Nos. 4,235,871, 4,501,728 y 4,837,028 cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia.

Utilidad

Los conjugados de esta invención son antagonistas de VLA-4. Algunos tienen por lo menos una afinidad parcial para las integrinas alfa4 beta7. Los conjugados proporcionan una retención *in vivo* mejorada comparado con los compuestos no conjugados. La retención mejorada del conjugado dentro del cuerpo resulta en menores dosificaciones requeridas del fármaco, que en cambio, resulta en menos efectos secundarios

y una probabilidad reducida de toxicidad. Además, la formulación del fármaco puede administrarse menos frecuentemente al paciente mientras se logra un efecto terapéutico similar o mejorado.

Los conjugados de esta invención tienen una inhibición mejorada, *in vivo*, de adhesión de leucocitos a las células endoteliales mediadas por la inhibición de la unión de alfa4 beta1 o alfa4 beta7 a los receptores celulares, tales como VCAM-1, fibronectina y MadCAM. De preferencia, los conjugados de esta invención pueden usarse, por ejemplo, por infusión o por inyección subcutánea o administración oral, para el tratamiento de enfermedades mediadas por alfa4 beta1 o alfa4 beta7 o, en términos generales, la adhesión de leucocitos. Los conjugados de la invención pueden usarse para tratar una variedad de trastornos cerebrales inflamatorios, especialmente trastornos del sistema nervioso central en los que el mecanismo de adhesión de endotelio/leucocito resulta en la destrucción al tejido cerebral saludable distinto. De esta manera, los conjugados de la invención pueden usarse para, por ejemplo, el tratamiento de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE, por sus siglas en inglés), esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés), meningitis y encefalitis.

Los conjugados de la invención también pueden usarse para tratar trastornos y enfermedades debido al daño del tejido en otros sistemas de órganos, es decir, cuando el daño del tejido también se presenta por medio de un mecanismo de adhesión que resulta en la migración o activación de leucocitos. Ejemplos de tales enfermedades en los pacientes mamíferos son las enfermedades inflamatorias, tales como

asma, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, demencia por SIDA, diabetes (incluyendo diabetes de inicio juvenil aguda), enfermedad de intestino inflamatorio (que incluye colitis ulcerante o enfermedad de Crohn), artritis reumatoide, rechazo por transplante de tejido, metástasis tumoral, ataque y otros traumas cerebrales, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica y daño del pulmón agudo mediado por leucocitos, tal como el que se presenta en el síndrome de dificultad respiratorio en el adulto.

Otras afecciones de enfermedades que pueden tratarse usando los conjugados de la invención incluyen eritema nudoso, conjuntivitis alérgica, neuritis óptica, uveítis, rinitis alérgica, espondilitis anquilosante, artritis psoriática, vasculitis, síndrome de Reiter, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica progresiva, polimiositis, dermatomiositis, granulomatosis de Wegner, aortitis, sarcoidosis, linfocitopenia, arteritis temporal, pericarditis, miocarditis, insuficiente cardiaca congestiva, poliarteritis nudosa, síndromes de hipersensibilidad, alergia, síndromes hipereosinofílicos, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonitis hipersensible, hepatitis activa crónica, cistitis intersticial, insuficiencia endrocrina auntoinmune, cirrosis biliar primaria, anemia aplásica autoinmune, hepatitis persistente crónica y tiroiditis.

La invención también proporciona métodos para el tratamiento de un estado de enfermedad causado o exacerbado por lo menos en parte por la unión de leucocitos mediada por la integrina alfa 4 en un paciente, en donde los métodos comprenden la co-administración de una cantidad efectiva de

un conjugado de la invención, por ejemplo, un conjugado de la fórmula I, y una cantidad efectiva de un compuesto separado que es un inhibidor de $\alpha_4\beta_7$. La co-administración puede llevarse a cabo simultánea o secuencialmente. Por ejemplo, la administración del conjugado de la invención puede preceder la administración del inhibidor de $\alpha_4\beta_7$ por minutos u horas. De manera alternativa, el inhibidor de $\alpha_4\beta_7$ puede administrarse antes del conjugado de la invención.

Apropiado en los modelos *in vivo* para demostrar la eficacia en las respuestas de tratamiento inflamatorias incluyen EAE (encefalomielitis autoinmune experimental) en ratones, ratas, cobayos o primates, así como otros modelos inflamatorios dependientes de las integrinas α_4.

La enfermedad de intestino inflamatorio es un término colectivo para dos enfermedades similares referido como enfermedad de Crohn y colitis ulcerante. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria, ulcero-constrictiva, crónica, idiopática caracterizada por la complicación típicamente transmural y fuertemente delimitad de todas las capas de la pared del intestino por una reacción inflamatoria granulomatosa. Cualquier segmento del tracto gastrointestinal, de la boca al ano, puede estar involucrado, aunque la enfermedad afecta más comúnmente el íleo terminal y/o colon. La colitis ulcerante es una respuesta inflamatoria limitada ampliamente a la mucosa y submucosa colónica. Los linfocitos y macrófagos son numerosos en las lesiones de la enfermedad de intestino inflamatorio y pueden contribuir al daño inflamatorio.

El asma es una enfermedad caracterizada por las respuestas aumentadas del árbol traqueobronquial a varios

estímulos que potencian la constricción paroxismal de los conductos bronquiales. Los estímulos causan liberación de diferentes mediadores de inflamación de células cebadas recubiertas de IgE que incluyen histamina, factores quimiotácticos eosinofílicos y neurotrofílicos, leucotrienos, prostaglandina y factor de activación de plaquetas. La liberación de estos factores recupera basófilos, eosinófilos y neutrófilos, que causan la lesión inflamatoria.

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias (por ejemplo, coronaria, carótida, aorta e iliaca). La lesión básica, el ateroma, consiste de una placa focal elevada dentro de la íntima, que tiene un centro de lípidos y una cubierta fibrosa. Los ateromas comprometen el flujo sanguíneo arterial y debilitan las arterias afectadas. Los infartos del miocardio y cerebrales son una consecuencia principal de esta enfermedad. Los macrófagos y leucocitos se acumulan a los ateromas y contribuyen a la lesión inflamatoria.

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria de recaída, crónica que causa principalmente el daño y destrucción de las articulaciones. La artritis reumatoide usualmente afecta primero las articulaciones pequeñas de las manos y los pies, pero después puede involucrar las muñecas, codos y rodillas. La artritis resulta de la interacción de las células sinoviales con los leucocitos que se infiltran desde la circulación en el recubrimiento sinovial de las articulaciones. Ver, por ejemplo Paul, Immunology (3d ed. Raven Press, 1993).

Otra indicación para los conjugados de esta invención es en el tratamiento del rechazo de órganos o injertos mediado por VLA-4. Durante los últimos años ha habido un mejoramiento

considerable en la eficiencia de las técnicas quirúrgicas para el transplante de tejidos y órganos, tales como la piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Quizá el problema fundamental principal es la carencia de agentes satisfactorios para inducir la inmunotolerancia en el destinatario al aloinjerto u órgano transplantado. Cuando las células alogénicas u órganos se transplantan en un huésped (es decir, el donante y donado son individuos diferentes de la misma especie), el sistema inmune del huésped es probable que fije una respuesta inmune hacia los antígenos extraños en el transplante (enfermedad del huésped contra injerto) conduciendo a la destrucción del tejido transplantado. Las células $CD8^+$, células CD4 y los monocitos están involucrados en el rechazo de los tejidos del transplante. Los conjugados de esta invención que se unen a la integrina alfa-4 son útiles, entre otras cosas, para bloquear las respuestas inmunes inducidas por aloantígeno en el donado, por lo que se previene que tales células participen en la destrucción del tejido u órgano transplantado. Ver, por ejemplo, Paul et al., Transplant International 9, 420-425 (1996); Georczynski et al., Immunology 87, 573-580 (1996); Georcyznski et al., Transplant. Immunol. 3, 55-61 (1995); Yang et al., Transplantation 60, 71-76 (1995); Anderson et al., APMIS 102, 23-27 (1994).

Un uso relacionado para los conjugados de esta invención que se unen a VLA-4 es en la modulación de la respuesta inmune involucrada en la enfermedad de "injerto contra huésped" (GVHD). Ver, por ejemplo, Schlegel et al., J. Immunol. 155, 3856-3865 (1995). GVHD es una enfermedad potencialmente fatal que se presenta cuando las células

inmunológicamente competentes se transfieren a un destinatario alogeneico. En esta situación, las células inmunocompetentes del donador pueden atacar los tejidos del destinatario. Los tejidos de la piel, epitelios del intestino e hígado son blancos frecuentes y pueden destruirse durante el transcurso de GVHD. La enfermedad presenta un problema especialmente grave cuando el tejido inmune está siendo transplantado, tal como en el transplante de médula ósea; pero menos la GVHD menos grave también se ha reportado en otros casos, que incluyen transplantes de corazón e hígado. Los agentes terapéuticos de la presente invención se usan, entre otras cosas, para bloquear la activación de las células T del donador por lo que interfiere con su capacidad para lisar las células blanco en el huésped.

Las formulaciones de la presente invención son especialmente útiles en el tratamiento de esclerosis múltiple, artritis reumatoide y asma.

Un uso adicional de los conjugados de esta invención es la inhibición de metástasis tumoral. Varias células tumorales se han reportado que expresan VLA-4 y los compuestos que unen VLA-4 bloquean la adhesión de tales células a las células endoteliales. Steinback et al., Urol. Res. 23, 175-83 (1995); Orosz et al., Int. J. Cancer 60, 867-71 (1995); Freedman et al., Leuk. Lymphoma 13, 47-52 (1994); Okahara et al., Cancer Res. 54, 3233-6 (1994).

Los compuestos que tienen la actividad biológica deseada pueden modificarse conforme sea necesario para proporcionar las propiedades deseadas, tales como propiedades farmacológicas mejoradas (por ejemplo, estabilidad *in vivo*, bio-disponibilidad) o la capacidad de detectarse en las

aplicaciones de diagnóstico. La estabilidad puede probarse en una variedad de maneras, tales como midiendo la vida media de las proteínas durante la incubación con peptidasas o plasma o suero humano. Un número de tales pruebas de estabilidad de proteínas se han descrito (ver, por ejemplo, Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1990, 15(2): 83-93).

Un uso adicional de los conjugados de esta invención es en el tratamiento de esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune neurológica progresiva que afecta un estimado de 250,000 a 350,000 personas en los Estados Unidos. La esclerosis múltiple se piensa que es el resultado de una reacción autoinmune específica en la que algunos leucocitos atacan e inician la destrucción de mielina, el recubrimiento aislante que cubre las fibras nerviosas. En un modelo animal de esclerosis múltiple, los anticuerpos monoclonales de murino dirigidos contra VLA-4 se ha mostrado que bloquean la adhesión de leucocitos al endotelio, y de esta manera, evitan la inflamación del sistema nervioso central y la parálisis subsecuente en los animales[16].

Las composiciones farmacéuticas de la invención son apropiadas para el uso en una variedad de sistemas de liberación de fármacos. Las formulaciones apropiadas para el uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985).

La cantidad administrada al paciente variará dependiendo de lo que está siendo administrado, el propósito de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, la forma de administración y similares. En las

aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya sufre de una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o por lo menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la condición de la enfermedad que es tratada así como del juicio del médico de atención dependiendo de factores, tales como la gravedad de la inflamación, la edad, el peso y la condición general del paciente y similares.

Las composiciones administradas a un paciente están en la forma de composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones pueden esterilizarse por las técnicas de esterilización convencionales o pueden filtrarse estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para el uso como están, o liofilizarse, siendo la preparación liofilizada combinada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración.

La dosificación terapéutica de los conjugados de la presente invención variará de acuerdo con, por ejemplo, el uso particular para el que se hace el tratamiento, la forma de administración del conjugado, la salud y la condición del paciente y el juicio del médico que prescribe. Por ejemplo, para la administración intravenosa, la dosis estará típicamente en el intervalo de aproximadamente 20 μg a aproximadamente 2000 μg por kilogramo de peso corporal, de preferencia aproximadamente 20 μg a aproximadamente 500 μg, más preferentemente de aproximadamente 100 μg a aproximadamente 300 μg por kilogramo de peso corporal. Los

intervalos de dosificación apropiados para la administración intranasal en general son de aproximadamente 0.1 pg a 1 mg por kilogramo de peso corporal. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las curvas de dosis-respuestas de los sistemas de prueba de modelo animal.

Los conjugados de esta invención también son capaces de unir o antagonizar las acciones de las integrinas $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_d\beta_2$, $\alpha_e\beta_7$ (aunque $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_9\beta_1$ se prefieren en esta invención). Por lo tanto, los conjugados de esta invención también son útiles para prevenir o revertir los síntomas, trastornos o enfermedades inducidos por la unión de estas integrinas a sus respectivos ligandos.

Por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 98/53817, publicada el 3 de diciembre de 1998 (la descripción de la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad) y las referencias citadas en la misma, describen los trastornos mediados por $\alpha_4\beta_7$. Esta referencia también describe una prueba para determinar el antagonismo de la unión dependiente de $\alpha_4\beta_7$ a la proteína de fusión VCAM-Ig.

Además, los compuestos que unen las integrinas $\alpha_d\beta_2$ y $\alpha_e\beta_7$ son particularmente útiles para el tratamiento de asma y las enfermedades pulmonares relacionadas. Ver, por ejemplo, M.H. Grayson, et al., *J. Exp. Med.*, 1998, 188 (11) 2187-2191. Los compuestos que unen la integrina $\alpha_e\beta_7$ también son útiles para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (ver, por ejemplo, M. Pang et al., *Arthritis Rheum.* 1998, 41(8), 1456-1463); enfermedad de Crohn, colitis ulcerante y enfermedad de intestino inflamatorio (IBD) (ver, por ejemplo, D. Elewaut et al., *Scand J. Gastroenterol* 1998, 33(7) 743-748); síndrome de Sjogren (ver, por ejemplo, U. Kroneld et al., *Scand J.*

Gastroenterol 1998, 27(3), 215-218) y artritis reumatoide (ver, por ejemplo, *Scand J. Gastroenterol* 1998, 44(3), 293-298). Y los compuestos que unen $\alpha_6\beta_1$ pueden ser útiles para la prevención de la fertilización (ver, por ejemplo, H. Chen et al., *Chem. Biol.* 1999, 6, 1-10).

En otro aspecto de la invención, los conjugados y composiciones descritos en la presente pueden usarse para inhibir la migración celular inmune de la corriente sanguínea hacia el sistema nervioso central en el caso de, por ejemplo, esclerosis múltiple, o a las áreas que resultan en la destrucción inducida inflamatoria de la mielina. De preferencia, estos reactivos inhiben la migración celular inmune de una manera que inhibe la desmielinación y que además pueden promover de re-mielinación. Los reactivos también pueden prevenir la desmielinación y promover la re-mielinación del sistema nervioso central para los trastornos metabólicos congénitos en los que las células inmunes infiltradas afectan el desarrollo del recubrimiento de mielina, principalmente en el SNC. Los reactivos también reducen, de preferencia, la parálisis cuando se administran a un paciente con parálisis inducida por una enfermedad o condición de desmielinación.

Las enfermedades inflamatorias que se incluyen para el tratamiento por las composiciones, conjugados y métodos descritos en la presente incluyen, en general, las afecciones que se relacionan con la desmielinación. Histológicamente, las anormalidades de mielina son la desmielinación o dismielinación. La desmielinación implica la destrucción de la mielina. La dismielinación se refiere a la formación defectuosa o que resulta de la disfunción de los

oligodendrocitos. De preferencia, las composiciones y métodos descritos en la presente se contemplan para tratar las enfermedades y afecciones que se refieren a la desmielinación y ayudan con la re-mielinación. Las enfermedades o afecciones adicionales contempladas para el tratamiento incluyen meningitis, encefalitis y lesiones de la médula espinal y en general las afecciones que inducen la desmielinación como resultado de una respuesta inflamatoria. Los conjugados, composiciones y métodos descritos en la presente no se dirigen hacia las enfermedades y afecciones, en donde hay, por ejemplo, un defecto genético que conduce a la formación de mielina inapropiada, por ejemplo, desmielinación.

Las composiciones, conjugados y cócteles descritos en la presente se contemplan para el uso en el tratamiento de las afecciones y enfermedades asociadas con la desmielinación. Las enfermedades y afecciones que involucran la desmielinación incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, trastorno metabólicos congénitos (por ejemplo, fenilcetonuria, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hurter, enfermedad de Krabbe y otras leucodistrofias), neuropatías con mielinación anormal (por ejemplo, Guillain Barré, polineuropatía de desmielinación inmune crónica (CIDP, por sus siglas en inglés), CIDP multifocal, síndrome de anti-MAG, síndrome de GALOP, síndrome de anticuerpo de anti-sulfátido, síndrome de anticuerpo anti-GM2, síndrome de POEMS, perineuritis, síndrome de anticuerpo IgM anti-GD1b), desmielinación relacionada con fármacos (por ejemplo, causada por la administración de cloroquina, FK506, perhexilina, procainamida y zimeldina), otras afecciones de desmielinación

hereditaria (por ejemplo, glucoproteína deficiente en carbohidratos, síndrome de Cockayne, hipomielinación congénita, distrofia muscular congénita, enfermedad de Farber, síndrome de Marinesco-Sjögren, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Refsum, las afecciones relacionadas con prion y enfermedad de Salla) y otras afecciones o enfermedades de desmielinación (por ejemplo, meningitis, encefalitis o lesión de la médula espinal).

Hay varios modelos de enfermedades que pueden usarse para estudiar estas enfermedades *in vivo*. Por ejemplo, los modelos animales incluyen, pero no se limitan a:

Tabla III

Modelo de enfermedad	Especie
EAE	Ratón, rata, cobayo
EAE inducida por la glucoproteína mielina-oligodendrocito (MOG)	Rata
Modelo transgénico de TNF-α de desmielinación	Ratón

Esclerosis múltiple

La enfermedad de desmielinación más común en la esclerosis múltiple, pero muchos otros trastornos metabólicos e inflamatorios resultan en la mielinación deficiente o anormal. La MS es una enfermedad neurológica crónica, que

aparece en la edad adulta temprana y progresa hasta una discapacidad significativa en la mayoría de los casos. Hay aproximadamente 350,000 casos de MS sólo en los Estados Unidos. Fuera del trauma, la MS es la causa más frecuente de discapacidad neurológica en la edad adulta temprana a mediados.

La causa de la MS aún no se determina. La MS se caracteriza por la inflamación crónica, desmielinación y gliosis (gliomas). La desmielinación puede resultar en efectos negativos o positivos en la conducción axonal. Las anormalidades de conducción positiva incluyen la conducción axonal disminuida, el bloqueo de la conducción variable que se presenta en presencia de trenes de impulsos de alta, pero no baja frecuencia o el bloqueo de conducción completo. Las anormalidades de conducción positiva incluyen la generación de impulso ectópico, espontáneamente o después del esfuerzo mecánico e "interferencia" anormal entre los exones desmielinados.

Las células T reactivas contra las proteínas de mielina, ya sea la proteína básica de mielina (MBP) o proteína de proteolípido de mielina (PLP) se han observado que median la inflamación del SNS en la encefalomielitis alérgica experimental. Los pacientes también se ha observado que tienen niveles elevados de inmunoglobulina del SNC (Ig). Además es posible que algún daño del tejido observado en la MS sea mediado por los productos de citosina de las células T activadas, macrófagos o astrocitos.

En la actualidad, el 80% de los pacientes diagnosticados con MS viven 20 años después del inicio de la enfermedad. Las terapias para manejar la MS incluyen: (1) tratamiento

enfocado en la modificación del transcurso de la enfermedad, que incluyen el tratamiento de la exacerbación aguda y dirigida a la supresión a largo plazo de la enfermedad; (2) tratamiento de los síntomas de la MS; (3) prevención y tratamiento de las complicaciones médicas y (4) manejo de los problemas sociales y personales secundarios.

El inicio de la MS puede ser dramático o tan moderado como para no causar que un paciente busque atención médica. Los síntomas más comunes incluyen debilidad en uno o más miembros, empañamiento visual debido a neuritis óptica, disturbios sensoriales, diplopía y ataxia. El transcurso de la enfermedad puede ser estratificado en tres categorías generales: (1) MS de recaída, (2) MS progresiva crónica y (3) MS inactiva. La MS de recaída se caracteriza por ataques recurrentes de la disfunción neurológica. Los ataques de la MS en general evolucionan durante días a semanas y pueden continuarse por la recuperación completa o parcial o sin recuperación. En general, la recuperación de los ataques se presenta dentro de semanas a varios meses desde el pico de los síntomas, aunque raramente alguna recuperación puede continuar durante 2 o más años.

La MS progresiva crónica resulta en el empeoramiento gradualmente progresivo sin periodos de estabilización o remisión. Esta forma se desarrolla en pacientes con una historia previa de MS de recaída, aunque en 20% de los pacientes, no pueden retirarse las recaídas. Las recaídas agudas también se pueden presentar durante el transcurso progresivo.

Una tercera forma es la MS inactiva. La MS inactiva se caracteriza por déficits neurológicos fijados de magnitud

variable. La mayoría de los pacientes con MS inactiva tienen una historia previa de MS de recaída.

El transcurso de la enfermedad también es dependiente de la edad del paciente. Por ejemplo, los factores de diagnóstico favorables incluyen el inicio temprano (excluyendo la niñez), un transcurso de recaída y poca discapacidad residual 5 años después del inicio. Por el contrario, un pronóstico pobre se asocia con una edad tardía del inicio (es decir, edad de 40 o más) y un transcurso progresivo. Estas variables son interdependientes, dado que la MS progresiva crónica tiende a comenzar en una edad tardía que la de la MS de recaída. La discapacidad para la MS progresiva crónica usualmente es debida a la paraplejia o cuadriplejia progresiva (parálisis) en pacientes. En un aspecto de la invención, los pacientes serán tratados de preferencia cuando el paciente está en remisión en lugar de una etapa de recaída de la enfermedad.

El uso a corto plazo de la hormona adrenocorticotrópica o corticosteroides orales (por ejemplo, prednisona oral o metilprednisolona intravenosa) es la única medida terapéutica específica para tratar a los pacientes con la exacerbación aguda de la MS.

Las nuevas terapias para la MS incluyen el tratamiento del paciente con interferón beta-1b, interferón beta-1a y Copaxone® (anteriormente conocido como el copolímero 1). Estos tres fármacos se han mostrado que reducen significativamente la velocidad de recaída de la enfermedad. Estos fármacos se auto-administran intramuscular o subcutáneamente.

Sin embargo, ninguna de las modalidades de tratamiento

actuales inhibe la desmielinación, sólo promueve o permite la re-mielinación espontánea o reduce la parálisis. Un aspecto de la invención contempla el tratamiento de la MS con los agentes descritos en la presente ya sea sólo o en combinación con otras modalidades de tratamiento estándares.

Trastornos metabólicos congénitos

Los trastornos metabólicos congénitos incluyen fenilcetonuria (PKU) y otras aminoacidurias, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hurler, enfermedad de Krabbe y otras leucodistrofias que impactan el desarrollo del recubrimiento como se describe más completamente a continuación.

La PKU es un error hereditario del metabolismo causado por una deficiencia en la enzima fenilalanina hidroxilasa. La pérdida de esta enzima resulta en el retardo mental, daño de órganos, postura inusual, y puede, en los casos de PKU maternal, comprometer gravemente el embarazo. Un modelo para estudiar la PKU se ha descubierto en los ratones. De preferencia, los niños identificados con PKU son prolongados en una dieta de fenilalanina libre o disminuida. Un aspecto de la invención sería combinar tales dietas con los conjugados y composiciones descritas en la presente para prevenir la desmielinación y las células re-mielinadas dañadas debido a PKU.

La enfermedad de Tay-Sachs clásica aparece en el paciente a aproximadamente la edad de 6 meses y resultará eventualmente en la muerte del paciente a la edad de 5 años. La enfermedad es debida a la carencia de la enzima, hexoaminidasa A (hex A), que es necesaria para degradar

ciertas sustancias grasas en el cerebro y las células nerviosas. Las sustancias en ausencia de la enzima se acumulan y conducen a la destrucción de las células nerviosas. Otra forma de la deficiencia de la enzima hex A se presenta después en la vida y se refieren como las formas del inicio juvenil, crónico y adulto de la deficiencia de hex A. Los síntomas son similares a los que caracterizan la enfermedad de Tay-Sachs. También hay una forma de inicio en el adulto de la deficiencia de la enzima. Actualmente no hay cura o tratamiento contra la enfermedad/deficiencia, sólo la medida preventiva de la prueba *in utero* del feto para la enfermedad. De esta manera, los conjugados y composiciones descritas en la presente pueden ser útiles para mejorar o prevenir la destrucción de las células nerviosas en tales pacientes.

La enfermedad de Niemann-Pick cae en tres categorías: la forma infantil aguda, Tipo B es una forma menos común, crónica, no neurológica y Tipo C es una forma bioquímica y genéticamente distinta de la enfermedad. En un individuo normal, el colesterol celular está implicado en lisosomas para el procesamiento, después de lo cual se libera. Las células tomadas de los pacientes con Niemann-Pick se ha mostrado que son defectuosas en la liberación de colesterol de los lisosomas. Esto conduce a una acumulación excesiva del colesterol dentro de los lisosomas, causando errores de procesamiento. NPC1 se encontró que tenía regiones sensibles a esterol similares a las de otras proteínas, lo que sugiere que juega un papel en la regulación del tráfico de colesterol. No se han identificado terapias exitosas para las formas de los Tipos A y C de Neumann-Pick. Para el Tipo C, se

recomienda a los pacientes que sigan una dieta baja en colesterol. De esta manera, los conjugados y composiciones descritos en la presente pueden ser útiles para mejorar o prevenir la destrucción de las células.

La enfermedad de Gaucher es una enfermedad hereditaria causada por una mutación génica. Normalmente, este gen es responsable de que una enzima llamada glucocerebrosidasa que el cuerpo necesita, rompa la grasa, glucocerebrosida. En pacientes con enfermedad de Gaucher, el cuerpo no es capaz de producir apropiadamente esta enzima y la grasa no puede romperse. Como la enfermedad de Tay-Sachs, la enfermedad de Gaucher es considerablemente más común en los descendientes de personas judías de Europa del este (Ashkenazi), aunque los individuos de cualquier grupo étnico pueden ser afectados. Entre la población judía Ashkenazi, la enfermedad de Gaucher es el trastorno genético más común, con una incidencia de aproximadamente 1 en 450 personas. En el público general, la enfermedad de Gaucher afecta aproximadamente 1 en 100,000 personas.

En 1991 la terapia de reemplazamiento de enzimas llegó a ser disponible como el primer tratamiento efectivo para la enfermedad de Gaucher. El tratamiento consiste de una forma modificada de la enzima glucocerebrosidasa dada intravenosamente. Se contempla que las composiciones y conjugados descritos en la presente puedan usarse solos o más preferentemente en combinación con la administración de glicocerebrosidasa para tratar la enfermedad en un paciente afligido.

El síndrome de Hurler, también conocido como mucopolisacaridosis de tipo I, es una clase de enfermedades

de traslape. Estas enfermedades genéticas comparten en común la acumulación celular de los mucopolisacáridos en los fibroblastos. Las enfermedades son genéticamente distinguibles. El fibroblasto y el transplante de médula ósea no parece que sea de ayuda, de esta manera son necesarios los conjugados y composiciones útiles para mejorar la gravedad y progreso de la enfermedad. Los conjugados y composiciones descritos en la presente pueden administrarse a un paciente para mejorar la progresión y/o gravedad de la enfermedad.

La enfermedad de Krabbe (también conocida como leucodistrofia celular Globoid) es una condición recesiva autosómica que resulta de la deficiencia de galactosilceramidasa (o galactocerebrosidasa), una enzima lisosómica que cataboliza un componente de lípido principal de la mielina. La incidencia en Francia es un estimado de 1:150,000 nacimientos. La enfermedad conduce a la desmielinación del sistema nervioso central y periférico. En general el inicio se presenta durante el primer año de vida y la condición es rápidamente progresiva, pero también se han reportado las formas de inicio juvenil, adolescente y adulto, con una velocidad de progresión más variable. El diagnóstico se establece de la prueba enzimática (deficiencia de galactosilceramidasa). Hay varios modelos de animales naturales (ratón, perro, mono). La enfermedad de Krabbe, como todas las leucodistrofias, no tiene curas conocidas o tratamientos efectivos. Una modalidad de la presente invención es usar las composiciones y los conjugados descritos en la presente para tratar o mejorar la enfermedad de Krabbe y otras leucodistrofias.

Las leucodistrofias son un grupo de trastornos

progresivos determinados genéticamente que afectan el cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos. Incluyen la adrenoleucodistrofia (ALD), adrenomieloneuropatía (AMN), síndrome de Aicardi-Goutiers, enfermedad de Alexander, CACH (es decir, ataxia infantil con hipomielinación del sistema nervioso central o desaparición de la enfermedad de materia blanca), CADASIL (es decir, arteriopatía dominante autosómica cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía), enfermedad de Canavan (degeneración esponjosa), Xantomatosis cerebrotendinosa (CTX), enfermedad de Krabbe (descrita anteriormente), leucodistrofia metacromática (MLD), adrenoleucodistrofia neonatal, síndrome de ovarioleucodistrofia, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (paraplejia espástica enlazada X), enfermedad de Refsum, síndrome de van der Knaap (leucodistrofia vaculante con quistes subcorticales) y síndrome de Zellweger. Ninguna de estas enfermedades tiene tratamientos efectivos aún menos curas. En consecuencia, son necesarios los medios de tratamiento o mejoramiento de los síntomas de la enfermedad, tales como mediante el uso de las composiciones y conjugados descritos en la presente.

Neuropatías con mielinación anormal

Existe una variedad de polineuropatías inmunes crónicas que resulta en la desmielinación en el paciente. La edad de inicio para las afecciones varía por la condición. Los tratamientos estándares para estas enfermedades existen y pueden combinarse con las composiciones y los conjugados descritos en la presente. De manera alternativa, las composiciones y conjugados descritos pueden usarse solos. Las

239

terapias estándares existentes incluyen las siguientes:

Tabla IV

Neuropatía	Características clínicas	Tratamiento
Polineuropatía de desmielinación inmune crónica (CIDP)	Inicio entre 1-80 años. Caracterizado por debilidad, pérdida sensorial e hipertrofia nerviosa	Inmunosupresión de células T con prednisona, ciclosporina A o metotrexato, HIG, intercambio de plasma
CIDP multifocal	Inicio entre 28 a 58 años y caracterizado por debilidad asimétrica, pérdida sensorial con un transcurso que es progresivo lentamente o de recaída-alivio	Inmunosupresión de células B HIG con ciclofosfamida de intercambio de plasma, Rituxan

Neuropatía	Características clínicas	Tratamiento
Neuropatía con IgM de unión a la glucoproteína asociada a mielina (MAG)	El inicio es usualmente por encima de 50 años y se caracteriza por la pérdida sensorial (100%), debilidad, trastorno de ganancia, temblor que es lentamente progresivo	Ciclofosfamida de intercambio de plasma de inmunosupresión de células B Rituxan α-interferón cladribina o fludarabina prednisona
Síndrome de GALOP (Polineuropatía de inicio de edad tardía de anticuerpos del	Un trastorno de la marcha con polineuropatía	Ciclofosfamida de intercambio de plasma HIG

Desmielinación inducida por fármacos y radiación

Algunos fármacos y radiación pueden inducir la desmielinación en los pacientes. Los fármacos que son responsables de la desmielinación incluyen, pero no se limitan a cloroquina, FK506, perhexilina, procainamida y zimeldina.

La radiación también puede inducir la desmielinación. La toxicidad del sistema nervioso central (SNC) debido a la radiación se cree que es causada por (1) daño a las estructuras de los vasos, (2) eliminación de los progenitores de astrocito de oligodendrocito-2 y oligodendrocitos maduros, (3) eliminación de las poblaciones de células cebadas neurales en el hipocampo, cerebelo y corteza y alteraciones generalizadas de la expresión de citosina. La mayoría del daño por radiación resulta de las radioterapias administradas

durante el tratamiento de algunos cánceres. Ver para una revisión Belka et al., 2001 Br. J. Cancer 85: 1233-9. Sin embargo, la exposición a la radiación también puede ser un problema para los astronautas (Hopewell, 1994 *Adv. Space Res.* 14: 433-42) así como en el caso de la exposición a sustancias radioactivas.

Los pacientes que han recibido fármacos o se han expuesto accidental o intencionalmente a la radiación pueden experimentar un beneficio por la administración de uno o más conjugados o composiciones descritos en la presente para evitar la desmielinación o promover la remielinación.

Afecciones que involucran la desmielinación

Los síndromes/enfermedades hereditarias adicionales que resultan en la desmielinación incluyen el síndrome de Cockayne, hipomielinación congénita, enfermedad de Farber, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Peliszaeus-Merzbacher, Refsum, afecciones relacionadas con prion y enfermedad de Salla.

El síndrome de Cockayne (CS) es un trastorno hereditario raro en el que las personas son sensibles a la luz del sol, tienen una estatura corta y tienen la apariencia de envejecimiento prematuro. En la forma clásica del síndrome de Cockayne (Tipo I), los síntomas son progresivos y típicamente llegan a ser evidentes después de la edad de un año. Un inicio temprano o forma congénita del síndrome de Cockayne (Tipo II) es evidente en el nacimiento. De manera interesante, a diferencia de otras enfermedades de reparación de ADN, el síndrome de Cockayne no se liga con el cáncer. El CS es un trastorno multi-sistema que causa una insuficiencia

de crecimiento profunda de soma y cerebro y caquexia progresiva, retinal, coclear y degeneración neurológica, con una leucodistrofia y neuropatía de desmielinación sin un aumento en el cáncer. Después de la exposición a UV (por ejemplo, luz del sol), los pacientes con síndrome de Cockayne ya no pueden realizar la reparación acoplada con la transcripción. Dos genes defectuosos en el síndrome de Cockayne, CSA y CSB se han identificado hasta ahora. El gen CSA se encuentra en el cromosoma 5. Ambos genes codifican las proteínas que interactúan con los componentes de la maquinaría transcripcional y con las proteínas de reparación del ADN.

Hasta la fecha, no se han identificado curas o tratamientos efectivos para los pacientes con esta enfermedad. De esta manera, un aspecto de la invención es el tratamiento de esta enfermedad con los conjugados y composiciones descritos en la presente.

La hipomielinación congénita tiene varios nombres que incluyen neuropatía de desmielinación congénita, polineuropatía de hipomielinación congénita, polineuropatía de hipomielinación congénita (bulbo de cebolla), neuropatía de hipomielinación congénita, neuropatía congénita causada por hipomielinación, neuropatía de hipomielinación y CHN. Las neuropatías periféricas hereditarias, entre los trastornos genéticos más comunes en los humanos, son un grupo complejo, clínica y genéticamente heterogéneo de los trastornos que producen la deterioración progresiva de los nervios periféricos. La hipomielinación congénita es uno de un grupo de trastornos. Este grupo incluye la neuropatía hereditaria con tendencia a parálisis por presión, enfermedad de Charcot-

Marie-Tooth, síndrome de Dejerine-Sottas y neuropatía de hipomielinación congénita. No hay curas conocidas o tratamientos efectivos para ninguno de estos trastornos.

La enfermedad de Farber tiene varios nombres que incluyen: lipogranulomatosis de Farber, deficiencia de ceremidasa, deficiencia de ceramidasa ácida, deficiencia de AC, deficiencia de N-laurilesfingosina desacilasa y N-acilesfingosina amidohidrolasa. Como algunos nombres revelan, la enfermedad se presenta debido a una deficiencia de la ceramidasa ácida (también conocida como N-acilesfingosina amidohidrolasa, ASAH). La carencia de la enzima resulta en una acumulación de mucopolisacárido ácido no sulfonado en las neuronas y las células gliales. Los pacientes con la enfermedad mueren antes de la edad de 2 años.

La leucodistrofia metacromática (MLD) es un trastorno genético causado por una deficiencia de la enzima arilsulfatasa A. Es uno de un grupo de trastornos genéticos llamados leucodistrofias que afectan el crecimiento del recubrimiento de mielina. Hay tres formas de MLD: infantil tardía, juvenil y adulta. En la forma infantil tardía, que es la más común, el inicio de los síntomas comienza entre las edades de 6 y 2 años. El infante usualmente es normal en el nacimiento, pero eventualmente pierde las capacidades previamente adquiridas. Los síntomas incluyen hipotonía (tono muscular bajo), anormalidades del habla, pérdida de las capacidades mentales, ceguera, rigidez (es decir, rigidez muscular no controlada), convulsiones, ingestión dañada, parálisis y demencia. Los síntomas de la forma juvenil comienzan entre los 4 y 14 años, e incluyen desempeño escolar deteriorado, deterioro mental, ataxia, ataques y demencia. En

la forma adulta, los síntomas, que comienzan después de la edad de 16, pueden incluir una concentración dañada, depresión, disturbios psiquiátricos, ataxia, temblor y demencia. Los ataques se pueden presentar en la forma adulta, pero son menos comunes que en las otras formas. En las tres formas el deterioro mental usualmente es el primer signo.

La enfermedad de Peliszaeus-Merzbacher (también conocida como leucodistrofia sudanofílica perinatal) es un trastorno genético enlazado X que causa una anormalidad de una proteína proteolípida. Esta anormalidad resulta en la muerte del infante típicamente antes de la edad de un año. No hay tratamientos o curas conocidos para la enfermedad.

La enfermedad de Refsum (también referida como deficiencia de oxidasa ácida fitánica, polineuritiformis atáctica heredopatía o neuropatía motora hereditaria y sensorial IV, HMSN IV) es causada por mutaciones en el gen, que codifica la fitanoil-CoA hidroxilasa (PAHX o PHYH). Las características clínicas principales son la retinitis pigmentosa, polineuropatía crónica y signos cerebelares. El ácido fitánico, un ácido graso de cadena ramificada inusual (ácido 3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoico) se acumula en los tejidos y los fluidos corporales de los pacientes con la enfermedad y es incapaz de ser metabolizado debido a la carencia de PAHX. Las plasmaféresis realizada una vez o dos veces al mes remueven efectivamente la forma ácida del cuerpo y permite la liberación de las restricciones dietéticas que limitan la captación de ácido fitánico.

Las afecciones relacionadas con prion incluyen la enfermedad de Gerstmann-Straussier (GSD), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), insomnio fatal familiar y las

isoformas aberrantes de la proteína prion pueden actuar como agentes infecciosos en estos trastornos así como en kuru y prurito lumbar (enfermedad encontrada en las ovejas). El término prion deriva de "agente infeccioso proteínico" (Prusiner, *Science* 216: 136-44, 1982). Hay un corte proteolítico de la proteína relacionada con prion (PRP) que resulta en un péptido amiloidogénico que se polimeriza en los fibrilos insolubles.

La enfermedad de Salla y otros tipos de sialurias, son enfermedades que involucran problemas con el almacenamiento del ácido siálico. Hay trastornos neurodegenerativos recesivos autosómicos que se pueden presentar como la forma infantil grave (es decir, ISSD) o como una forma de adulto lentamente progresiva que prevalece en Finlandia (es decir, enfermedad de Salla). Los síntomas principales son hipotonía, ataxia cerebelar y retardo mental. Estas afecciones y enfermedades también se contemplan para los tratamientos paliativo o de mejoramiento.

Otras afecciones que resultan en la desmielinación incluyen encefalitis post-infecciosa (también conocida como encefalomielitis diseminada aguda, ADEM), meningitis y lesiones a la médula espinal. Las composiciones y conjugados descritos en la presente también se contemplan para el uso en el tratamiento de estas otras afecciones de desmielinación.

Los siguientes ejemplos sintéticos y biológicos se ofrecen para ilustrar esta invención y no se construyen de ninguna manera para limitar el alcance de esta invención. A menos que se establezca lo contrario, todas las temperaturas están en grados Celsius.

EJEMPLOS

En los siguientes ejemplos, las siguientes abreviaciones tienen los siguientes significados. Si no se define una abreviación, en general tiene un significado aceptado.

ACN = acetonitrilo

bs = singulete ancho

d = doblete

dd = doblete de dobletes

Et_3N = trietilamina

g = gramos

h y hr = hora

HPLC = cromatografía líquida de alta resolución (o presión)

kg = kilogramo

kDa = kilodalton

L = litro

m = multiplete

M = molar

mg = miligramo

min = minuto

mL = mililitro

mm = milímetro

mM = milimolar

mmol = milimol

s = singulete

sat. = saturado

t = triplete

TFA = ácido trifluoroacético

TLC o tlc = cromatografía de capa fina

Ts = tosilo

μL = microlitro

μg = microgramo

μm = micra o micrómetro.

Métodos generales: Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (^{1}H) y carbono (^{13}C) se obtuvieron usando un espectrómetro Gemini 2000 o Bruker Avance 300. La presencia de los protones de polietilenglicol (PEG) pueden detectarse por un singulete largo, ancho a 3.6 ppm. La integración de esta señal puede variar dependiendo del tamaño del radical de PEG. La presencia del antagonista de VLA-4 conjugado también puede detectarse en los espectros de ^{1}H RMN de los conjugados. La cromatografía de capa fina se realizó en láminas pre-cubiertas de sílice 60 F_{254} (EMD 15341-1) o pre-cubiertas con sílice MKC 18F de 60 Å (Whatman 4803-110). La espectrometría de masa se realizó en un espectrómetro de masa Agilent (LC/MSD VL) en el modo de cuadrete simple de iones positivos.

Métodos de HPLC para los productos de PEG y conjugados de PEG:

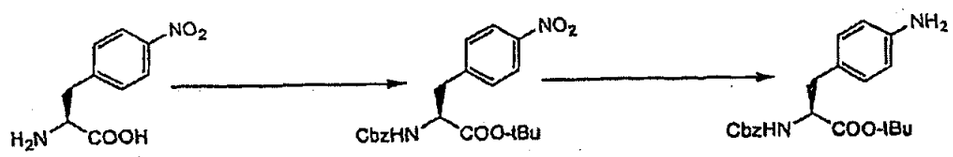
La HPLC de fase inversa preparativa se realizó usando un módulo Varian Prep Star (modelo SD-1) con un detector UV Varian ajustado a 210 nm. **Método A**: Las muestras de los productos de PEG y los conjugados de PEG se purificaron usando la HPLC de fase inversa en una columna de tamaño de poro de 300 Å, Vydac C18 (250 mm x 21.2 mm), usando típicamente un gradiente de 35-50% de ACN + 0.1% de TFA en 100 min a 20 mL/min. **Método B**: Las muestras de los productos

y conjugados de PEG se purificaron usando HPLC de fase inversa en una columna de tamaño de poro de 300 Å, Vydac C18 (250 mm x 50 mm), usando típicamente un gradiente de 35-50% de ACN + 0.1% de TFA en 100 min a 60 mL/min.

Método C: La pureza de los productos y conjugados de PEG se confirmó por medio de HPLC analítica de fase inversa usando un sistema Quaternary Serie 1100 Agilent equipado con una columna C18 3.5 μ, tamaño de poro 300 Å, Waters Symmetry (150 mm x 4.6 mm), usando un gradiente de 40-50% de ACN p/0.1% de TFA a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min y acoplada a un detector de longitud de onda variable Agilent 1100 establecido a 210 nm y un detector de dispersión de luz evaporativa Sedex 75 (40°C, ganancia = 5).

Reactivos de PEG: Los materiales iniciadores del PEG se adquirieron por medio de la NOF Corporation (Yebisu Garden Place Tower, 20-3 Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokio 150-6019) o Nektar Therapeutics (150 Industrial Road, San Carlos, CA 94070) como sigue: alcohol de PEG de 4 ramificaciones de 40 kDa (NOF Cat. Sunbright PTE-40000); alcohol de PEG de 3 ramificaciones de 40 kDa (NOF Cat. Sunbright GL-400).

Ejemplo 1



Hidróxido de sodio (10 g, 0.25 m) se disuelve en agua (300 ml). A esta solución se adiciona 4-nitrofenilanilina (50.3 g, 0.22 m) y se agita hasta la disolución completa. A la solución resultante se adiciona carbonato de sodio (28.8 g, 0.26 m) y la suspensión agitada se enfría en un baño de hielo a +8°C. Se adiciona gota a gota cloroformato de bencilo (44.7 g, 0.26 m) con agitación vigorosa, manteniendo la temperatura interna en el intervalo de +6°C a +9°C. La mezcla se agita a +6°C durante 1 h adicional, se transfiere a un embudo de separación y se lava con éter (2 x 150 mL). Una fase acuosa se coloca en un matraz Erlenmeyer grande (2 L) y se acidifica con precaución con HCl acuoso, diluido a pH = 2 y se extrae con acetato de etilo (4 x 500 mL). Los extractos combinados se lavan con agua y se secan con $MgSO_4$. La solución se filtra y el filtrado se evapora, el residuo se disuelve en acetato de etilo (150 mL) y se diluye con hexano (500 mL). El material cristalino se filtra y se enjuaga con solvente frío, se seca con aire para dar Cbz-nitrofenilalanina, 75 g (rendimiento 99.5%). ^{1}H-RMN, DMSO-d6, (δ): 12.85 (bs, 1H), 8.12 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.52 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.30 (m, 5H), 4.95 (s, 2H), 4.28 (m, 1H), 3.32 (bs, 1H), 3.10 (m, 2H). ^{13}C-RMN (δ): 173.1, 156.3, 146.6, 137.3, 130.8, 128.5, 128.0, 127.8, 123.5, 65.6, 55.1, 36.6. MS (m/z): 367.1 [M+23].

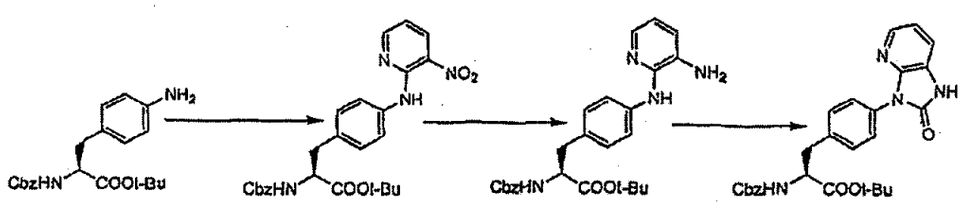
La Cbz-4-nitrofenilalanina (75 g, 0.22 m) se disuelve en

dioxano (300 mL). La solución agitada resultante se enfría en un baño de hielo seco a -20°C (interna). El isobutileno licuado (aproximadamente 290 mL) se adiciona seguido de ácido sulfúrico concentrado (35 mL) en tres porciones iguales, separadas 30 minutos. La adición del ácido es un proceso muy exotérmico, acompañado por el grado sustancial de polimerización. La agitación mecánica eficiente es esencial en esta etapa. La mezcla resultante se agita durante 20 h, se deja calentar hasta la temperatura ambiente, después se vierte cuidadosamente en solución de bicarbonato de sodio acuoso, saturado (2 L) y se diluye con acetato de etilo (600 mL). La capa orgánica se separa y la capa acuosa se extrae con acetato de etilo (2 x 200 mL). Los extractos combinados se lavan con agua y se secan con sulfato de sodio. La solución se filtra y se evapora a sequedad. El residuo se coloca en una mezcla de acetato de etilo/hexano (500 mL; 1:1) y se filtra a través de un tapón de gel de sílice (ca. 2x2 in, 5.08x5.08 cm). La sílice se enjuaga con una cantidad adicional del mismo solvente (2 L total) y los filtrados se evaporan para dar la 4-nitrofenilalanina completamente protegida como un aceite viscoso, 73 g (83% después de dos etapas). ^{1}H-RMN, $CDCl_3$, (δ): 8.12 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.36 (m, 7H), 5.35 (m, 1H), 5.10 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 3.31 (m, 2H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C-RMN, $CDCl_3$, (δ): 169.7, 155.3, 146.9, 143.9, 136.0, 130.2, 128.4, 128.2, 128.0, 123.3, 82.9, 66.9, 54.7, 38.2, 31.4, 27.8, 13.9. MS (m/z): 423.1 [M+23].

La 4-nitrofenilalanina protegida (73 g, 0.18 m) se disuelve en etanol (500 ml) y se adiciona el catalizador de óxido de platino (1.5 g). La solución resultante se agita vigorosamente en una atmósfera de hidrógeno (50-60 psi,

344.73-413.68 kPa) a temperatura ambiente hasta que cesó la absorción de hidrógeno adicional (3 h). El catalizador se filtra y el filtrado se evapora a sequedad, el residuo se coloca en acetato de etilo (200 mL) y se filtra a través de un tapón de gel de sílice (2 x 2 in, 5.08 x 5.08 cm) usando una mezcla de acetato de etilo-hexano (3:2, 2L) para enjuagar la sílice. El filtrado se concentra a aproximadamente 200 mL y se adiciona hexano (500 mL). El producto cristalino se filtra, se enjuaga con solvente frío y se seca con aire. Rendimiento 56 g, 84%. ^{1}H-RMN, $CDCl_3$, (δ): 7.30 (bs, 5H), 6.92 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 6.58 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 5.21 (m, 1H), 5.10 (d, 2H, J = 2.1 Hz), 4.46 (m, 1H), 3.59 (bs, 2H), 2.97 (s, 2H, J = 5.4 Hz), 1.42 (s, 9H). ^{13}C-RMN, $CDCl_3$, (δ): 170.6, 145.1, 136.3, 130.2, 128.3, 127.9, 125.6, 115.0, 81.9, 66.6, 55.2, 37.4, 27.8 MS (m/z): 393.1 [M+23].

Ejemplo 2



El producto del Ejemplo 1, 4-aminofenilalanina, (20 g, 0.054 m) se disolvió en etanol (200 mL) y se trató con la base de Hunig (21 g, 0.162 m, 3 eq) y 2-cloro-3-nitropiridina (10.3 g, 0.65 m, 1.2 eq). La solución resultante se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno y se calentó a reflujo durante 24 h. El análisis de LC indicó la presencia de una pequeña cantidad de amina sin reaccionar. La pequeña cantidad adicional de cloronitropiridina (1.1 g, 0.13 eq) se adicionó y el reflujo se continuó durante otras 22 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se evaporó a sequedad. El residuo se

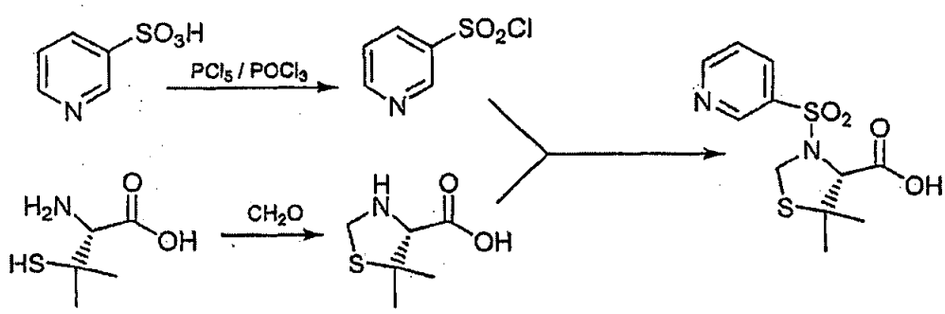
disolvió en acetato de etilo (600 ml) y la solución obtenida se lavó con agua (1 x 200 mL), ácido cítrico acuoso, diluido (0.2 N, 2 x 200 ml), salmuera (1 x 200 ml) y se secó con sulfato de sodio. Los sólidos se filtraron y el filtrado se evaporó para dar 37 g de un aceite rojo intenso, que contiene el producto esperado contaminado con exceso de cloronitropiridina. El producto impuro se purificó por cromatografía instantánea (sistema Biotage 75L) eluyendo con una mezcla de acetato de etilo-hexano (3:17). Las fracciones que contienen el producto puro se combinaron y se evaporaron para dar un aceite viscoso, rojo intenso, 26 g (99%). ^{1}H-RMN, $CDCl_3$, (δ): 10.10 (s, 1H), 8.49 (m, 2H), 7.57 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.35 (bs, 5H), 7.19 (d, 2H, J = 9 Hz), 6.84 (m, 1H), 5.30 (m, 1H), 5.13 (d, 2H, J = 3 Hz), 4.57 (m, 1H), 3.11 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). ^{13}C-RMN, $CDCl_3$, (δ): 170.4, 155.5, 155.1, 150.0, 136.7, 136.3, 135.4, 132.4, 129.9, 128.5, 128.3, 128.0, 127.9, 122.2, 113.7, 82.2, 66.7, 55.1, 37.7, 27.8, 20.9. MS (m/z): 493.1 [M+1], 515.1 [M+23].

El compuesto rojo (26 g, 0.054 m) se disolvió en THF (350 mL) y se adicionó catalizador de óxido de platino (1.35 g). La mezcla resultante se agitó vigorosamente bajo una atmósfera de hidrógeno (50-60 psi, 344.73-413.68 kPa) hasta que la absorción de hidrógeno cesó (2 hr). El catalizador se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en acetato de etilo (100 mL) y se diluyó con hexano (50 mL) hasta el comienzo de la cristalización. La mezcla se diluyó adicionalmente con una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:1) (300 mL) y se dejó en reposo en el refrigerador durante 3 h. Los sólidos cristalinos se filtraron, se enjuagaron con solvente frío y se secaron con

aire para dar el producto, 23 g, 94%. ^{1}H-RMN, $CDCl_3$, (δ): 7.81 (dd, 1H, J1 = 1.5 Hz, J 2 = 4.8 Hz), 7.33 (bs, 5H), 7.17 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.03 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 6.96 (dd, 1H, J1 = 1.5 Hz, J2 = 7.5 Hz), 6.75 (dd, 1H, J1 = 5.0 Hz, J2 = 7.7 Hz), 6.22 (s, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.09 (bs, 2H), 4.50 (m, 1H), 3.41 (bs, 2H), 3.02 (m, 2H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C-RMN, $CDCl_3$, (δ): 170.6, 155.6, 145.5, 140.21, 138.8, 136.3, 130.8, 129.9, 128.5, 128.3, 127.9, 123.4, 118.2, 117.0, 82.0, 66.6, 55.2, 37.4, 27.9. MS (m/z): 407.1 [M-56], 463.1 [M+1], 485.1 [M+23].

La aminopiridina (19 g, 0.041 m) se suspendió en diclorometano (200 mL) y se adicionó CDI (12 g, 0.074 m, 1.8 eq). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se lavó con bicarbonato acuoso, saturado (2 x 100 mL), salmuera (1 x 100 mL) y se secó con sulfato de sodio. Los sólidos se filtraron y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en acetato de etilo (caliente, 300 mL) y se cristalizó. El producto cristalino se filtró, se enjuagó con acetato de etilo frío y se secó con aire para dar 19.9 g, 81% de la imidazolona. ^{1}H-RMN, $CDCl_3$, (δ): 10.63 (s, 1H), 8.06 (d, 1H, J = 3 Hz), 7.66 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.32 (m, 8H), 7.05 (m, 1H), 5.36 (m, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.59 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). ^{13}C-RMN, $CDCl_3$, (δ): 170.4, 155.6, 154.3, 143.8, 141.0, 136.2, 135.8, 131.8, 130.2, 128.3, 128.0, 125.9, 122.2, 118.3, 116.0, 82.4, 66.8, 55.0, 37.7, 27.8. MS (m/z): 433.1 [M-56], 489.2 [M+1], 511.2 [M+23].

Ejemplo 3



Se colocó ácido piridin-3-sulfónico (125 g, 0.78 m) en un matraz de 3 cuellos de 1L equipado con agitador mecánico, condensador de reflujo, termómetro y entrada de nitrógeno. Luego, el pentacloruro de fósforo (250 g, 1.19 m, 1.5 eq) se adicionó, seguido inmediatamente del oxicloruro de fósforo (330 ml, 3.8 m, 4.5 eq). Los contenidos del matraz se agitaron inicialmente a temperatura ambiente durante 30 min, después se llevaron lentamente a reflujo moderado (temperatura interna aproximadamente 110°C) durante la siguiente hora, mantenido a esta temperatura durante aproximadamente 3.5 h, después se dejaron durante las siguientes 12 h enfriar nuevamente a temperatura ambiente. El desprendimiento del gas se observó en este tiempo. Los volátiles se arrastraron bajo una presión reducida (a 12 mmHg/40°C) y el residuo semi-sólido amarillo se diluyó con DCM (1 L). La suspensión se vertió lentamente en el bicarbonato acuoso, saturado, enfriado con hielo, agitado, manteniendo el pH = 7. Se observó el desprendimiento de gas. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo nuevamente con DCM. Los extractos combinados se lavaron con bicarbonato acuoso, saturado, frío, salmuera y se secaron con sulfato de magnesio. Los sólidos se filtraron y el filtrado

se evaporó, dejando el cloruro de piridin-3-sulfonilo como un líquido aceitoso amarillo pálido, 123 g (93% puro; teoría 88%). ^{1}H-RMN, $CDCl_3$, (δ): 9.26 (d, 1H), 8.98 (dd, 1H), 8.34 (m, 1H), 7.62 (m, 1H). ^{13}C-RMN, $CDCl_3$, (δ): 155.3, 147.4, 140.9, 134.6, 124.2. MS (m/z): 178.0 [M+1].

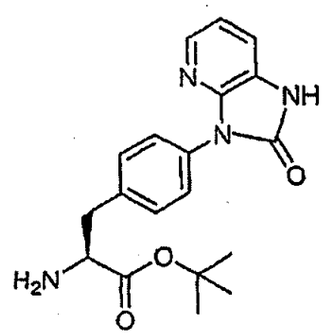
L-penicilamina (150 g, 1.0 m) se disolvió con agitación en agua DI (1500 mL), se enfrió en un baño de hielo a +8°C y se trató con formalina (150 mL, 37% ac.). La mezcla de reacción se agitó a +8°C durante 2 h, después el baño de enfriamiento se removió y la agitación se continuó durante 12 h. La solución clara se concentró a presión reducida (14 mmHg/500) dejando un residuo blanco. Los sólidos se re-suspendieron, después se disolvieron en MeOH caliente (2500 mL) y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 12 h. El precipitado blanco, esponjoso se filtró y se enjuagó con metanol frío. El filtrado se concentró y se cristalizó nuevamente. El precipitado colectado se combinó con el primer cultivo y se secó en un horno al vacío durante 24 h a 55°C a 45 mmHg. El rendimiento del ácido (R)-5,5-dimetiltiazolidin-4-carboxílico fue de 138 g (>99% puro; teoría 86%). ^{1}H-RMN, DMSO-d6, (δ): 4.25 (d, 1H), 4.05 (d, 1H), 3.33 (s, 1H), 1.57 (s, 3H), 1.19 (s, 3H). ^{13}C-RMN, DMSO-d6, (δ): 170.8, 74.4, 57.6, 51.8, 28.9, 27.9. MS (m/z): 162.3 [M+1].

En un reactor de 4L equipado con agitador mecánico y termómetro, se preparó una solución de amortiguador de fosfato monobásico de potasio (43 g, 0.31 m) y fosfato dibásico de potasio (188.7 g, 1.08 m) en agua DI (2L). El ácido (R)-5,5-dimetiltiazolidin-4-carboxílico (107 g, 0.675 m) se adicionó y se agitó hasta la disolución completa. La solución se enfrió en un baño de hielo a +8°C. Una solución

preparada separadamente de cloruro de piridin-3-sulfonilo (124 g, 0.695 m) en DCM (125 mL) se adicionó gota a gota al reactor con agitación vigorosa durante 1 h. El pH de la mezcla de reacción se monitoreó y después de 4 h, se encontró que era pH = 5 y se ajustó a pH = 6 mediante la adición de bicarbonato sólido. La mezcla se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante 18 h. El pH se ajustó a 2 con ácido sulfúrico acuoso saturado, se agitó durante 1 h y los sólidos amarillos precipitados se filtraron, se enjuagaron con agua hasta ser neutros. La torta de sólido se transfirió en un matraz Erlenmeyer de 2L, suspendido en DCM (500 mL) con bamboleo ocasional durante 5 min y se filtró nuevamente. La torta de filtrado se lavó con DCM y se secó con aire. El rendimiento del compuesto del título, ácido (R)-5,5-dimetil-3-(piridin-3-ilsulfonil)tiazolidin-4-carboxílico fue de 148.9 g (98% puro; teoría 73%). ^{1}H-RMN, DMSO-d6, (δ): 9.05 (d, 1H), 8.89 (m, 1H), 8.32 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 4.68 (q, 2H), 4.14 (s, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.29 (s, 3H).

13C-RMN, DMSO-d6, (δ): 170.0, 154.3, 147.9, 135.8, 134.1, 124.8, 72.6, 54.3, 50.2, 29.4, 25.0. MS (m/z): 303.2 [M+1].

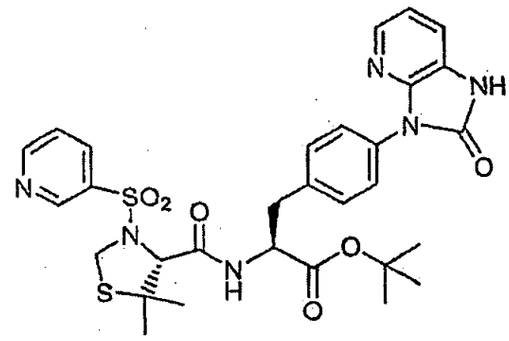
Ejemplo 4



El producto del Ejemplo 2 (52 g, 0.106 m) se suspendió

en MeOH (450 mL), se adicionó catalizador de hidrogenación (8.7 g, 5% de Pd/C, Degussa) y la mezcla se agitó bajo presión la atmósfera de hidrógeno (60 psi, 413.68 kPa) hasta que cesó la absorción adicional (ca. 2 horas). Se adicionó THF (150 mL) para disolver los sólidos precipitados la solución se filtró a través de un tapón de Celite, usando DCM para enjuagar el filtro. El filtrado se evaporó a sequedad, se re-disolvió en DCM (300 mL) y se arrastró nuevamente. Esta operación se repitió dos veces. Los sólidos espumosos se mantuvieron al alto vacío durante 3 horas. El rendimiento del compuesto del título fue de 38.3 g (101% de teoría). ^{1}H-RMN, $CDCl_3$, (δ): 8.08 (m, 1H), 7.56 (AB q, 4H), 7.37 (m, 1H), 7.06 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 2.03 (m, 2H), 1.49 (s, 9H). ^{13}C-RMN, $CDCl_3$, (δ): 173.8, 154.6, 143.9, 141.0, 137.4, 131.5, 130.2, 126.1, 122.3, 118.0, 116.1, 81.4, 56.0, 40.6, 27.9. MS (m/z): 299.3 [M-56], 355.4 [M+1], 377.4 [M+23].

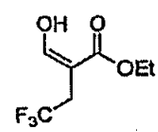
Ejemplo 5



El producto del Ejemplo 4 (38.3 g, asumir 0.106 m) se disolvió en DCM (500 mL) y se trató sucesivamente con: N-metilmorfolina (27 g, 30 ml, 0.266 m; 2.5 eq), HOBt (17.3 g, 0.128 m, 1.2 eq), y el producto del Ejemplo 3 (33.8 g, 0.112 m; 1.06 eq). La solución no homogénea resultante se enfrió en un baño de hielo a +4°C y se trató con EDC (22.5 g, 0.117 m;

1.1 eq) en una porción. La mezcla de reacción se agitó, dejándola calentar a temperatura ambiente durante las siguientes 4 horas y después durante 18 horas más. El solvente se arrastró y el residuo se disolvió en acetato de etilo (1.2 L), se lavó con bicarbonato saturado, acuoso (2 x 250 mL), agua (250 mL), salmuera (300 mL) y se secó con sulfato de magnesio. La solución se filtró y se evaporó a sequedad, dejando un aceite viscoso, anaranjado claro, 76 g (>>100%). El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea en gel de sílice {Biotage 75L, en una mezcla de acetato de etilo/metanol (3%). Las fracciones, que contienen el producto puro, se combinaron y se evaporaron para dar 54 g del compuesto del título (rendimiento 83%). ^{1}H-RMN, $CDCl_3$, (δ): 10.37 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.87 (m, 1H), 8.19 (m, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.56 (AB q, 4H), 7.52 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.06 (m, 2H), 4.83 (m, 1H), 4.58 (AB a, 2H), 3.96 (s, 1H), 3.19 (m, 2H), 1.49 (s, 9H).1.22 (s, 3H), 1.18 (s, 3H). ^{13}C-RMN, $CDCl_3$. (δ): 169.7, 167.6, 153.9, 148.4, 143.8, 140.9, 135.8, 135.6, 132.9, 131.9, 130.2, 125.9, 123.8, 122.1, 118.0, 115.9, 82.8, 73.6, 60.3, 54.8, 53.7, 50.6, 37.8, 29.1, 27.8, 23.9, 14.1. MS (m/z): 583.3 [M-56], 639.4 (M+1], 661.3 [M+23].

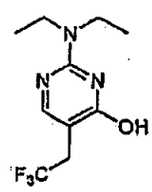
Ejemplo 6



A una solución enfriada con hielo de trifluorobutirato de etilo (15 g, 89 mmol) y formato de etilo (36 mL, 444 mmol) en THF (200 mL) bajo N_2 se adicionó una

solución de KotBu 1M en THF (107 mmol, 107 ml) durante un periodo de 25 minutos. Después de 15 minutos el baño de hielo se retiró y la mezcla de reacción se agitó una hora a temperatura ambiente. Después se adicionó formato de etilo adicional (18 ml, 222 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se dividió entre éter frío (100 mL) y agua fría (300 ml). El pH de la fase acuosa se ajustó a 2 con HCl concentrado. El producto se extrajo con diclorometano (1 x 100 ml, 45 x 75 mL) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (1 x 100 ml), se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron para producir el compuesto del título como un aceite espeso que solidificó en reposo, 10.2 g (58.5%). MS (m/z) = 198 $(M + H)^+$.

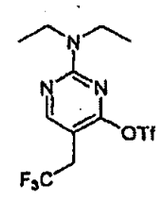
Ejemplo 7



A una solución del producto del Ejemplo 6 (10 g, 51 mmol) y sulfato de dietilguanidina (8.3 g, 25.2 mmol) en EtOH (60 ml) bajo N_2, se adicionó NaOEt, solución al 21% en EtOH (20.7 mL, 55.5 mmol) durante un periodo de 10 minutos. La mezcla de reacción después se calentó a reflujo durante 5 horas. La solución heterogénea se enfrió y se vertió en agua fría (100 mL) para dar una solución homogénea. El pH de la solución se ajustó a aproximadamente 3.5 con HCl concentrado HCl 1 N. Un sólido precipitó de la solución, que se conectó por filtración. El sólido de color canela claro se lavó con

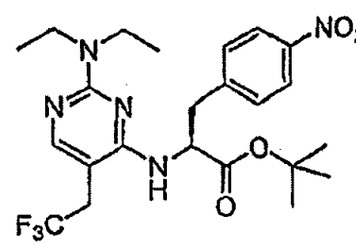
agua y se secó con aire, produciendo 2.9 g, (23%) del compuesto del título. MS (m/z) = 250 $(M + H)^+$. ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 7.65 (br s, 1H), 3.55 (q, 4H), 3.30 (q, 2H), 1.25 (t, 6H).

Ejemplo 8



Se cargó un matraz con el producto del Ejemplo 7 (2.0 g, 8.02 mmol), DIEA (1.5 mL, 8.83 mmol), DMAP (0.98 g, 0.8 mmol) y diclorometano (30 mL). La mezcla se enfrió a °C y se adicionó anhídrido trifluoroacético (1.5 ml, 8.83 mmol). La reacción llegó a ser homogénea y se agitó a 0°C durante 3 horas. La mezcla se apagó con $NaHCO_3$ saturado y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con ácido cítrico 0.2 N, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró *in vacuo* para producir 2.87 g (94%) del compuesto del título como un sólido café. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.28 (s, 1H), 3.65-3.52 (m, 4H), 3.29-3.19 (q, 2H), 1.22-1.17 (t, 6H).

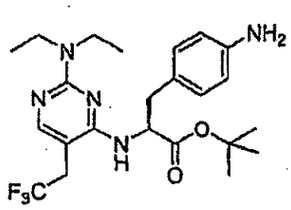
Ejemplo 9



Una solución del producto del Ejemplo 8 (1.3 g, 3.5 mmol), H-Phe(p-NO_2)OtBu (1.1 g, 4.2 mmol) y DIEA (0.9 mL, 5.3

mmol) en CH_3CN (14 mL) bajo N_2 se calentó a reflujo durante la noche. Al siguiente día se agregó H-Phe(p-NO_2)OtBu adicional (0.8 g, 3 mmol) y el reflujo se continuó durante 3 días. La mezcla de reacción después se enfrió y se concentró. El residuo se colocó en EtOAc (50 mL) y la porción orgánica se lavó con $KHSO_4$ 0.5 N (3 x 50 mL), agua (1 x 50 mL), salmuera (1 x 10 mL), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró hasta una goma café. El material crudo se purificó por cromatografía instantánea (hexanos/EtOAc 5:1) para producir 640 mg (38%) del compuesto del título como una goma dorada. TLC: hexanos/EtOAc 3:1, Rf = 0.30, MS (m/z) = 498 $(M+H)^+$, ^1H RMN, (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.19 (d, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.25 (d, 2H), 5.19 (br d, 1H), 4.95 (q, 1H), 3.70-3.50 (m, 4H), 3.45-3.25 (m, 2H), 3.10 (q, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.05 (t, 6H).

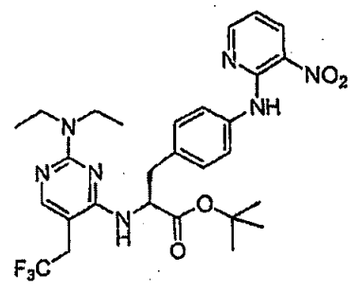
Ejemplo 10



El producto del Ejemplo 9 (635 mg, 1.27 mmol) se disolvió en EtOH absoluto (5 mL) al que se adicionó 35 mg de Pd/C, 10% en peso. La reacción se sometió a hidrogenación (45 psi de H_2, 310.26 kPa) durante 2.5 horas, tiempo en el que 50 mgs de Pd/C, 10% en peso se adicionó y la mezcla de reacción se sometió nuevamente a hidrogenación (45 psi de H_2) durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y el filtrado se concentró para dar 452 mg (76%) del compuesto del título. MS (m/z) = 468 $(M+H)^+$, ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.75 (s, 1H), 6.90 (d, 2 H), 6.60 (d,

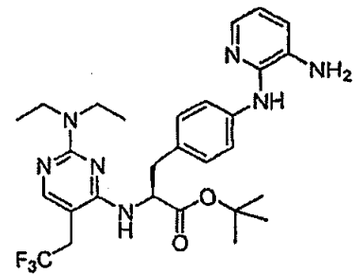
2 H), 5.05 (br d, 1H), 4.80 (q, 1H), 3.70-3.45 (m, 6H), 3.10-2.90 (m, 4H), 1.40 (s, 9H), 1.15 (t, 6H).

Ejemplo 11



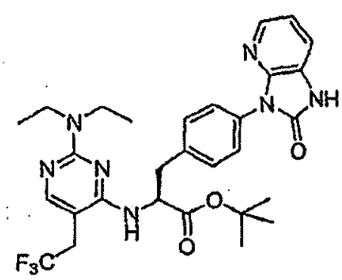
Una solución del producto del Ejemplo 10 (598 mg, 1.28 mmol), 2-cloro-3-nitropiridina (243 mg, 1.53 mmol) y DIEA (0.67 mL, 3.83 mmol) en EtOH (5 mL) bajo N_2 se calentó a reflujo. Al siguiente día la reacción se enfrió y se agregó 2-cloro-3-nitropiridina adicional (40 mg, 0.25 mmol) y DIEA (0.11 mL, 0.60 mmol) y la reacción se calentó a reflujo durante un día. La mezcla de reacción después se concentró y el residuo se colocó en EtOAc (20 mL). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 20 mL). El lavado acuoso combinado se extrajo nuevamente con EtOAc (2 x 10 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con ácido cítrico 0.2 N (3 x 20 mL), agua (1 x 10 mL), $NaHCO_3$ saturado (3 x 20 mL), salmuera (1 x 10 mL), se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se arrastraron hasta una goma anaranjada. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con hexanos/EtOAc 4:1 (Rf= 0.14) para dar 610 mg (81%) del compuesto del título como un aceite rojo. MS (m/z) = 590 $(M+H)^+$, ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.10 (s, 1H), 8.55 (d, 1H), 8.50 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.75 (d, 2H), 7.15 (d, 2H), 6.80 (q, 1H), 5.10 (br d, 1H), 4.90 (m, 1H), 3.70-3.45 (m, 4H), 3.25 (m, 2H), 3.10 (q, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.10 (t, 6H).

Ejemplo 12



A una solución del producto del Ejemplo 11 (610 mg, 1.03 mmol) en EtOH absoluto (5 mL) se adicionó 60 mg de Pd/C, 10% en peso. La mezcla se sometió a hidrogenación (45 psi de H_2, 310.26 kPa) durante la noche. Al siguiente día la mezcla de reacción se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró para dar 500 mg (87%) del compuesto del título. MS (m/z) = 560 $(M+H)^+$ ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.85 (d, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.20 (d, 2H), 7.05 (d, 2H), 7.00 (d, 1H}, 7.75 (m, 1H), 6.20 (br s 1H), 5.15 (br s, 1H), 4.85 (m, 1H), 3.75-3.45 (m, 4H), 3.40 (br s, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.05 (q, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.15 (t, 6H).

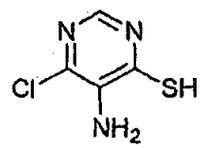
Ejemplo 13



Una solución del producto del Ejemplo 12 (141 mg, 0.250 mmol) y CDI (62 mg, 0.378 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml) se agitó durante la noche. Al siguiente día, se agregó CDI adicional (30 mg, 0.185 mmol) y la reacción se agitó otro día. La mezcla de reacción después se concentró y se colocó en EtOAc

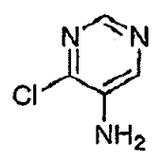
(10 mL) y la porción orgánica se lavó con ácido cítrico 0.2 N (3 x 5 mL), agua (1 x 5 ml), $NaHCO_3$ saturado (3 x 5 mL), salmuera (1 x 5 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró para producir 69 mg (47%) del compuesto del título como una espuma que se usó sin purificación adicional. MS (m/z) = 586 $(M+H)^+$ ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.20 (br s, 1H), 8.05 (d, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.65 (d, 2H), 7.90 (m, 3H), 7.05 (m, 1H), 5.15 (br d, 1H), 4.95 (m, 1H), 3.70-3.45 (m,4 H), 3.25 (app d, 2H), 3.10 (q, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.15 (t, 6H).

Ejemplo 14



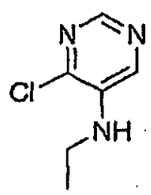
A una solución de 4,6-dicloro-5-aminopirimidina (5.09, 30.7 mmol) en DMSO (30 ml) se adicionó $Na_2S \cdot 9H_2O$ (7.4 g, 30.8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después se adicionó agua (40 ml) a la mezcla y la solución se evaporó a presión reducida a aproximadamente 6 mL. A esta solución se adicionó HCl concentrado (0.5 mL) y agua para precipitar el producto. La solución se filtró y el sólido anaranjado se lavó con agua y se secó para proporcionar 4.3 g (86%) del compuesto del título. ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 5.84 (2H, s), 7.79 (1H, s), 14.37 (1H, br s); MS (m/z): MH^+ = 162.

Ejemplo 15



Al producto del Ejemplo 14 (4.3 g, 26 mmol) disuelto en NH_4OH concentrado (4 mL) se adicionó EtOH (40 ml). A esta solución, se adicionó níquel Raney (exceso) en porciones. La reacción se agitó temperatura ambiente durante la noche y después se calentó a 80°C durante 2 horas. La mezcla se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea en sílice usando EtOAc/hexanos para proporcionar 1.6 g (47%) del compuesto del título como un sólido amarillo. ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 5.90 (2H, s), 8.20 (2H, s); MS (m/z) MH^+ = 130.

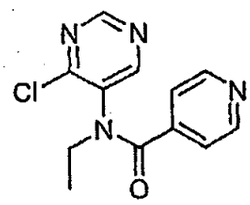
Ejemplo 16



Al producto del Ejemplo 15 (0.51 g, 3.9 mmol) en MeOH (20 ml) y HOAc (0.5 ml) se adicionó CH_3CHO (0.52 ml, 9.2 mmol). Luego se adicionó $NaBH_3CN$ (590 mg, 9.2 mmol) en una porción. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche se agregaron HOAc, CH_3CHO y $NaBH_3CN$ adicionales. La reacción se agitó durante la noche, se concentró y el residuo se colocó en EtOAc y $NaHCO_3$ saturado. La capa acuosa separada se extrajo nuevamente con EtOAc. La capa orgánica combinada se secó y se concentró hasta un residuo. El residuo se

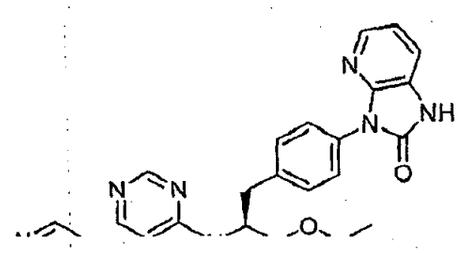
disolvió en MeOH y se trató con HOAc, CH_3CHO y $NaBH_3CN$ como se describió anteriormente. Después del procedimiento de elaboración descrito anteriormente el producto crudo se purificó por cromatografía instantánea en sílice usando EtOAc/hexanos, para proporcionar 0.35 g (57%) del compuesto del título como un aceite amarillo. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.35 (3H, q, J = 12 Hz), 3.29 (2H, m), 4.21 (1H, bs), 8.04 (1H, s), 8.36 (1H, s); MS (m/z): MH^+ = 158.

Ejemplo 17



Al producto del Ejemplo 16 (70 mg, 0.45 mmol) disuelto en DMF (1 mL) se adicionó TEA (93 uL) y cloruro de isonicotinoilo (0.12 g, 0.67 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y después se dividió entre EtOAc y $NaHCO_3$ saturado. La capa acuosa separada se extrajo nuevamente con EtOAc. La capa orgánica combinada se secó y se concentró para dar 67 mg (57%) del compuesto del título que se usó sin purificación adicional. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.26 (3H), 3.65-3.69 (1H), 4.21 (1H), 7.17 (2H), 8.43 (1H), 8.54 (2H), 8.86 (1H) Comentario: ^1H RMN muestra evidencia de rotámeros como se demuestra por el ancho de todos los picos; MS (m/z): MH^+ = 263.

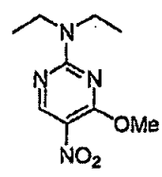
Ejemplo 18



A una solución del producto del Ejemplo 17 (0.11 g, 0.42 mmol) y el producto del Ejemplo 8 (0.135 g, 0.38 mmol) en IPA (2.5 mL) se adicionó DIEA (0.35 ml, 1.9 mmol). La mezcla de reacción se agitó en un tubo sellado a 130°C durante 2 días. La mezcla cruda se concentró y el aceite se purificó por cromatografía de columna instantánea con un gradiente de solvente de 0-10% de MeOH en CH_2Cl_2 para producir el compuesto del título como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.16 (1.2H, m), 1.26-1.31 (1.8H, m), 1.50-1.53 (9H, d, J = 9 Hz), 3.0 (1H, m), 3.2 (0.8H, m), 3.36 (1.2H, m), 4.12-4.18 (1.2H, m), 4.96-5.10 (0.8H, m), 5.80-5.95 (1H, m), 6.93-6.96 (1H, m), 7.07 (1H, m), 7.31-7.45 (5H, m), 7.66-7.75 (3H, m), 8.06 (1H, m), 8.44-8.51 (2H, m);

HPLC/MS: un sólo pico a 1.29 min, MH^+ = 581.

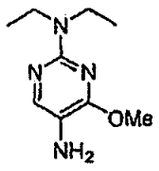
Ejemplo 19



A 2,4-dicloro-5-nitropirimidina (2.0 g, 10.3 mmol) en MeOH (7 ml) a 0°C bajo N_2 se adicionó NaOMe (0.5 M en MeOH, 25 ml) gota a gota. Después de que se completó la adición, la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15 minutos. Después se adicionó dietilamina (5 ml) y la mezcla se agitó a RT

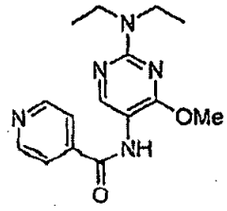
(temperatura ambiente) durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se dividió entre EtOAc y H_2O. La capa orgánica se secó y se concentró hasta un residuo que se purificó por cromatografía instantánea en sílice usando EtOAc/Hexanos, para proporcionar los compuestos del título como un sólido casi blanco (1.1 g, 4.9 mmol, 47% de rendimiento). ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.26 (6H, t, J = 6.6 Hz), 3.70 (4H, m), 4.08 (3H, s), 9.01 (1H, s); HPLC/MS: MH^+ = 227.

Ejemplo 20



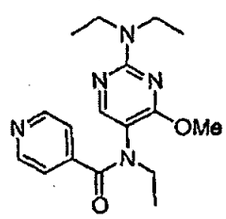
El producto del Ejemplo 19 (1.1 g, 4.9 mmol) en MeOH/EtOAc (1:1, 20 mL) se redujo con Pd/C (5% Degussa, 0.5 g) y H_2 (50 psi, 344.73 kPa) en un agitador Parr durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido (0.85 g, 4.3 mmol, 88.5% de rendimiento). ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.18 (6H, t, J = 6.9 Hz), 3.03 (2H, br), 3.57 (6H, t, J = 6.9 Hz), 3.96 (3H, s), 7.71 (1H, s); HPLC/MS: MH^+ = 197.

Ejemplo 21



Al producto del Ejemplo 20 (0.85 g, 4.3 mmol) en CH_2Cl_2 (15 mL) y TEA (1.4 mL, 10 mmol) se adicionó la sal de HCl de cloruro de isonicotinilo (1.13 g, 6.3 mmol). Después de 15 minutos, la TLC no mostró material iniciador. La mezcla se extrajo entre EtOAc y $NaHCO_3$ saturado. La capa acusa se lavó con EtOAc dos veces. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con $NaHCO_3$ saturado y salmuera. Se secó sobre $MgSO_4$ y se filtró. El filtrado se concentró para dar el compuesto del título como un sólido café (1.3 g, 4.3 mmol, 100% de rendimiento). ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.20 (6H, t, J = 6.9 Hz), 3.60 (4H, q, J = 6.9 Hz), 3.96 (3H, s), 7.72 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.75 (1H, bs), 8.80 (2H, d = 6.0 Hz), 8.89 (1H, s); HPLC/MS: MH^+ = 302.

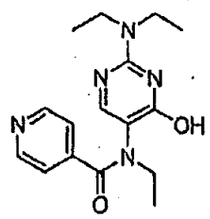
Ejemplo 22



Al producto del Ejemplo 21 (100 mg, 0.33 mmol) en THF (1 mL) se adicionó KOtBu (1M en THF, 0.5 mL) seguido lentamente por EtI (40 µL, 0.5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. La TLC mostró la desaparición del material iniciador. La mezcla se dividió entre EtOAc y H_2O. La capa acuosa se lavó con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con $NaHCO_3$ saturado y salmuera. Se secó y se concentró para dar el compuesto del título (90 mg, 0.27 mmol, 83%) que se usó sin purificación adicional. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.10 (9H, m), 3.47 (5H, m), 3.92 (1H, m), 7.14

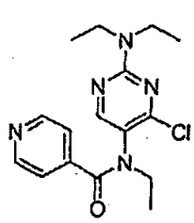
(2H, d, J = 6.0 Hz), 7.78 (1H, bs), 8.44 (2H, d, J = 6.0 Hz); HPLC/MS: MH^+ = 330.

Ejemplo 23



Al producto del Ejemplo 22 (200 mg, 0.61 mmol) en DMF (4 mL) se adicionó EtSNa (66 mg, 0.79 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 1 h. La LC/MS mostró el material iniciador aún presente. Otra porción de NaSEt (66 mg, 0.79 mmol) se adicionó y la reacción se calentó durante otras 2 h. La LC/MS mostró sólo producto. La DMF se removió bajo presión reducida y se adicionó H_2O (10 mL) seguido de HCl concentrado (0.132 mL). La evaporación del solvente dejó un residuo. Se disolvió en EtOH y se filtró. El filtrado se concentró para producir el compuesto del título (190 mg, 100%), que se usó sin purificación adicional. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.24 (9H, m), 3.60 (4H, m), 3.60-4.00 (2H, br), 8.12 (3H, d, J = 5.7 Hz), 8.92 (2H, d, J = 5.7 Hz); HPLC/MS: MH^+ = 316.

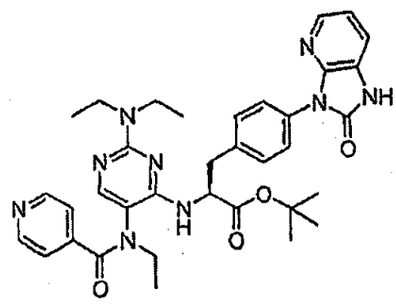
Ejemplo 24



Al producto del Ejemplo 23 (70 mg, 0.22 mmol) en $POCl_3$ (3 mL) a RT se adicionó dietilanilina (30 µL). La mezcla de

reacción se calentó a 100°C durante 30 minutos. Después se concentró. El residuo se dividió entre EtOAc y H_2O. La capa orgánica se lavó con H_2O dos veces. Después se secó y se concentró para dar el compuesto del título (50 mg, 0.15 mmol, 68%) y se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional. HPLC/MS: MH^+ = 334.

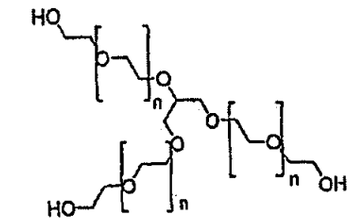
Ejemplo 25



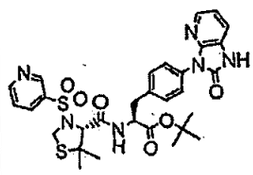
A una solución del producto del Ejemplo 24 (50 mg, 0.15 mmol) y el producto del Ejemplo 8 (60 mg, 0.17 mmol) en IPA (0.75 mL) se adicionó DIEA (0.15 mL, 0.8 mmol). La mezcla de reacción se agitó en un tubo sellado a 130 grados durante 7 días. La mezcla cruda se concentró y el residuo se purificó por HPLC preparativa y cromatografía instantánea en gel de sílice para proporcionar un sólido casi blanco (10 mg). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.10-1.30 (9H, m), 1.48 (4.5H, s), 1.51 (4.5H, s), 2.80-3.38 (3H, m), 3.53 (4H, m), 4.05-4.30 (1H, m), 4.83 (0.5H, m), 4.96 (0.5H, m), 5.15-5.50 (1H, m), 6.95-7.10 (2H, m), 7.25-7.50 (5H, m), 7.69 (0.5H, D, J = 8.4 Hz), 7.76 (0.5H, d, J = 8.4 Hz), 8.08 (1H, d, J = 5.1 Hz), 8.51 (2H, m), 8.83 (0.5H, br), 8.95 (0.5H, br); HPLC/MS: MH^+ = 652.

Ejemplo 26

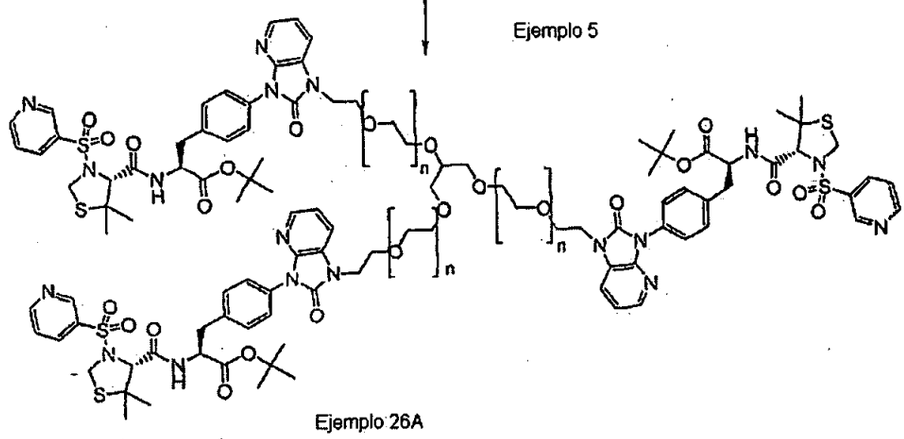
Procedimiento A



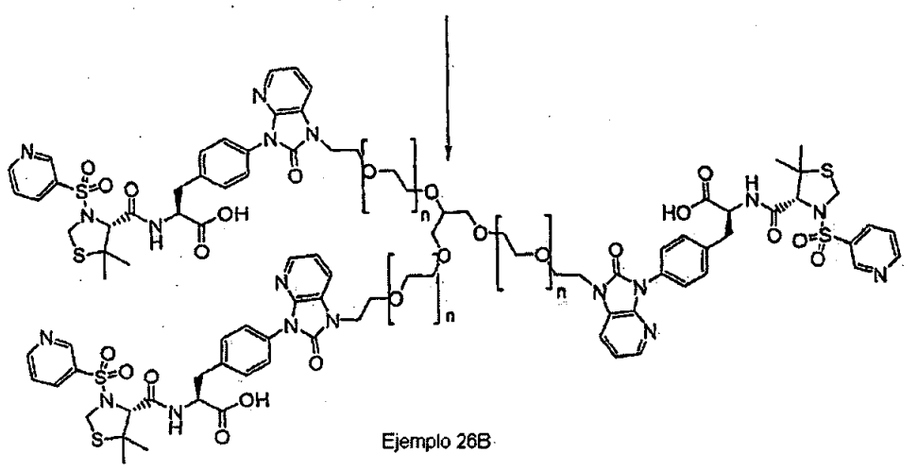
Alcohol de PEG de 3 ramificaciones de 40 kDa
Corporación NOF



Ejemplo 5



Ejemplo 26A



Ejemplo 26B

Ejemplo 26A

El alcohol de PEG de 3 ramificaciones de 40 kDa (0.25 g, 0.00625 mmol), el producto del Ejemplo 5 (0.04 g, 0.056 mmol) y trifenilfosfina (0.025 g, 0.094 mmol) se secaron por destilación azeotrópica a partir de tolueno (5 mL). La mitad

del volumen se destiló (2.5 mL) y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionó CH_2Cl_2 (0.5 mL) para hacer la reacción homogénea. Se adicionó azodicarboxilato de dietilo (0.015 mL, 0.094 mmol) gota a gota y la reacción se agitó durante 48 horas. El método C de HPLC mostró la desaparición completa del alcohol de PEG iniciador. La reacción se concentró *in vacuo* para producir el t-butil éster del Ejemplo 26A como un sólido blanco.

Ejemplo 26B

El Ejemplo 26A (0.2 g, 0.005 mmol) se disolvió en ácido fórmico (3 mL) y se calentó a 40°C durante 24 horas. La reacción se concentró *in vacuo* y se purificó de acuerdo con el método A de HPLC para producir 0.1 g (48%) del Ejemplo 26B como un sólido blanco. El método C de HPLC determinó que el conjugado era >99% puro (tiempo de retención = 8.1 minutos). ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ 9.08 (bs, 3H), 8.84 (bs, 3H), 8.18-8.16 (d, 3H), 8.02-8.00 (d, 3H), 7.67-7.61 (m, 6H), 7.47-7.38 (m, 9H), 7.08-7.04 (m, 3H), 6.91 (m, 3H), 4.88 (m, 3H), 4.62-4.49 (dd, 6H), 4.13 (m, 6H), 3.64 (bs, 5919H PEG), 3.23 (m, 6H), 1.25-1.24 (d, 18H).

Procedimiento B

Una mezcla de GL400 Sunbright PEG (50.0 g, NOF lote # M4N594), el producto del Ejemplo 5 (7.19 g, 9 eq vs. GL400, 3 eq/hidroxilo) y trifenilfosfina (2.95 g, 9 eq) se colocó en tolueno (300 mL) y se destiló para remover azeotrópicamente el agua. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y una cantidad adicional del tolueno restante se removió por medio del rotavapor. La mezcla se re-disolvió en diclorometano seco

(180 mL) y se enfrió en un baño de hielo. Se adicionó azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD, 2.27 g, 2.17 mL, 9 eq) por medio de una jeringa durante 1 hora. La mezcla se agitó en el baño de hielo 1.5 h, tras lo cual el análisis de HPLC indicó la conversión completa al Ejemplo 26A.

La mezcla de reacción viscosa se adicionó lentamente por medio de un embudo de cuello estrecho con agitación a una mezcla de MTBE/IPA 75:25 (4.0 L) y se dejó agitar 1 hora. el precipitado se colectó por filtración al vacío, se lavó con MTBE (200 mL) y se secó al vacío para dar el Ejemplo 26A purificado (51.5 g).

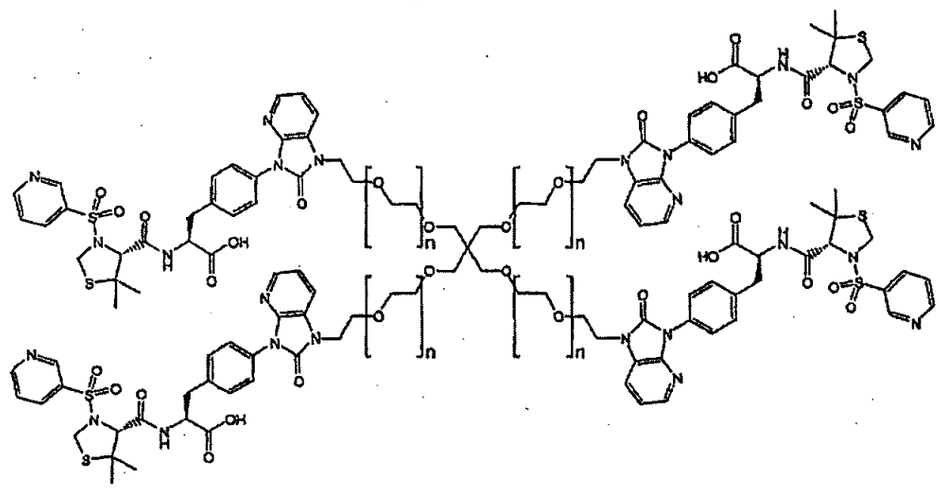
El Ejemplo 26A (51.4 g) se colocó en ácido fórmico (250 mL) y se calentó casi a reflujo durante 1.0 h, tras lo cual el análisis de HPLC indicó que la desprotección se completó. la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y una porción del ácido fórmico (~100 mL) se retiró por evaporación rotatoria. La mezcla se diluyó con cloruro de metileno (50 mL). La mezcla de reacción viscosa después se adicionó con agitación a una mezcla de MTBE/IPA 75:25 (4.0 L) y se dejó agitar 45 min (Comentario 4). El precipitado se colectó por filtración al vacío, se lavó con MTBE (300 mL) y se secó al vacío (<1 Torr, 24 h), para producir el Ejemplo 26B (50.0 g).

Este material se colocó en cloruro de metileno (400 mL) y se filtró a través de un embudo Buchner de vidrio sinterizado ("filtración limpia"). El filtrado se concentró por medio de evaporación rotatoria a un volumen de ~ 200 mL y se adicionó lentamente con agitación a una mezcla 75:25 de MTBE/IPA (4.0 L). El precipitado se colectó por filtración al vacío, se lavó con MTBE (300 mL) y se secó al vacío (<1 Torr, 3d) para producir el Ejemplo 26B (48.8 g, ~94%).

Los métodos similares se usaron para sintetizar los

siguientes conjugados:

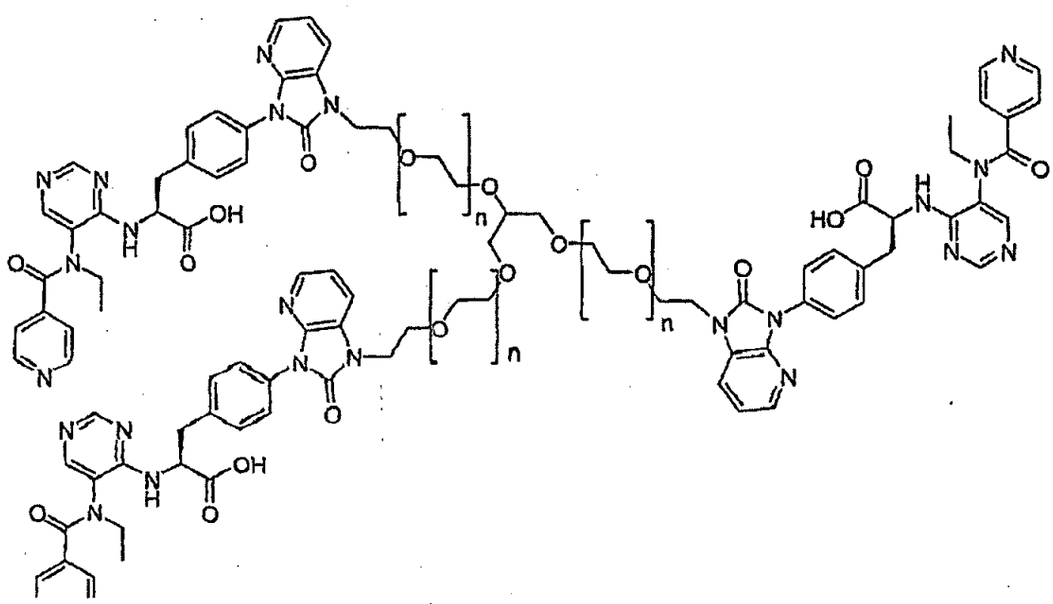
Ejemplo 27



Ejemplo 27

El alcohol de PEG de 4 ramificaciones de 40 kDa se acopló al producto del Ejemplo 5 y se desprotegió al producto final usando los métodos similares que el Ejemplo 26. El producto se purificó de acuerdo con el Método A de HPLC. El método C de HPLC determinó que el conjugado era >95% puro (tiempo de retención = 7.5-8.1 minutos). ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ 9.08 (bs, 4H), 8.84 (bs, 4H), 8.18-8.16 (d, 4H), 8.02-8.00 (d, 4H), 7.67-7.61 (m, 8H), 7.47-7.38 (m, 12H), 7.08-7.04 (m, 4H), 6.91 (m, 4H), 4.88 (m, 4H), 4.62-4.49 (dd, 8H), 4.13 (m, 8H), 3.64 (bs, 10101H PEG), 3.23 (m, 8H), 1.25-1.24 (d, 24H).

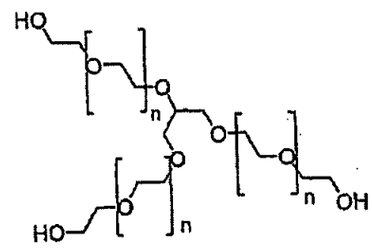
Ejemplo 28



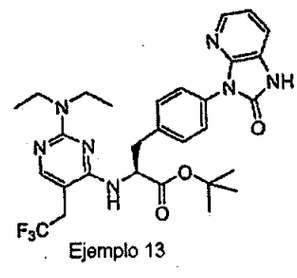
Ejemplo 28

El alcohol de PEG de 3 ramificaciones de 40 kDa se acopló al producto de t-butil éster del Ejemplo 18 (mostrado a continuación) y se desprotegió al producto final usando los métodos similares a los del Ejemplo 26. El producto se purificó de acuerdo con el método A de HPLC. El método C de HPLC determinó que el conjugado era >95% puro (tiempo de retención = 7.3 minutos). ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ 8.66 (bs, 3H), 8.44 (bs, 3H), 8.04-8.02 (d, 3H), 7.75-7.30 (m, 24H), 7.10-7.06 (m, 3H), 6.93 (s, 3H), 5.60-5.50 (m, 3H), 4.15 (m, 6H), 3.66 (bs, 4207H PEG), 3.00 (m, 3H), 3.40-3.20 (m, 6H), 1.27 (d, 9H).

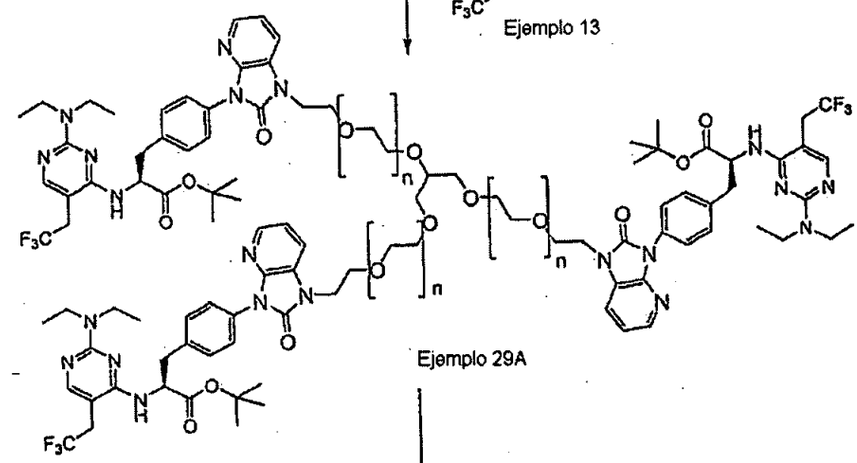
Ejemplo 29



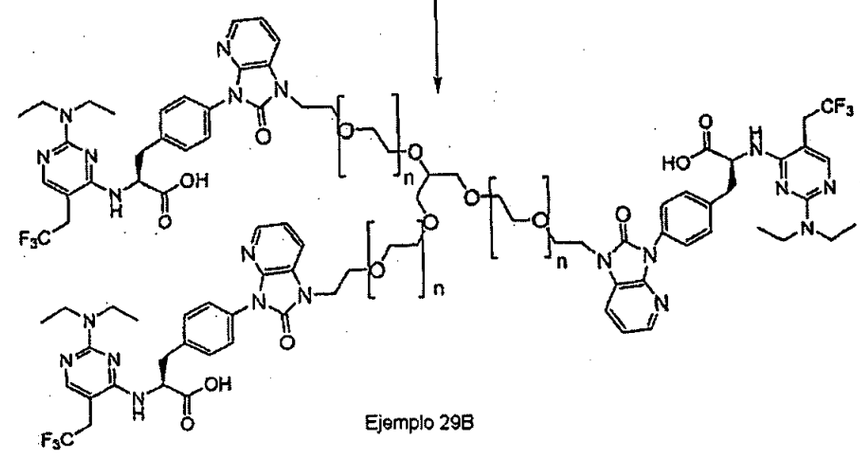
Alcohol de PEG de 3 ramificaciones de 40 kDa
Corporación NOF



Ejemplo 13



Ejemplo 29A



Ejemplo 29B

Ejemplo 29

Ejemplo 29A

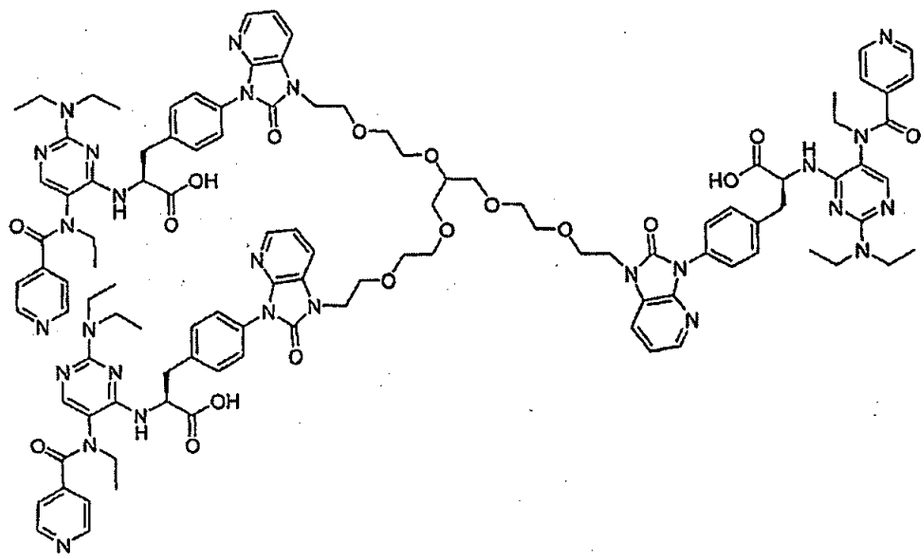
El alcohol de PEG de 3 ramificaciones de 40 kDa (0.00625 mmol), el producto del Ejemplo 13 (0.056 mmol) y trifenilfosfina (0.094 mmol) se secan por destilación

azeotrópica de tolueno (5 mL). La mitad del volumen se destila (2.5 mL) y la mezcla se enfría a temperatura ambiente. Se adiciona CH_2Cl_2 (0.5 mL) para hacer la reacción homogénea. Se adiciona azodicarboxilato de dietilo (0.094 mmol) gota a gota y la reacción se agita durante 48 horas. La reacción se concentra *in vacuo* para producir t-butil éster Ejemplo 29A.

Ejemplo 29B

El Ejemplo 29 B (0.005 mmol) se disuelve en ácido fórmico (3 mL) y se calienta a 40°C durante 24 horas. La reacción se concentra *in vacuo* y se purifica de acuerdo con el método A de HPLC para producir 29B.

Ejemplo 30



Ejemplo 30

El alcohol de PEG de 3 ramificaciones de 40 kDa se acopla al producto del éster t-butílico del Ejemplo 25 y se desprotege al producto final usando los métodos similares a los del Ejemplo 26. El producto se purifica de acuerdo con el método A de HPLC.

Referencias

Las siguientes publicaciones, patentes y solicitudes de patente se citan en esta solicitud como los números de superíndice:

1. Hemler and Takada, Publicación de solicitud de patente Europea No. 330,506, publicada el 30 de agosto de 1989.

2. Elices, et al., Cell, 60:577-584 (1990)

3. Springer, Nature, 346:425-434 (1990)

4. Osborn, Cell, 62:3-6 (1990)

5. Vedder, et al., Surgery, 106:509 (1989)

6. Pretolani, et al., J. Exp. Med., 180:795 (1994)

7. Abraham, et al., J. Clin. Invest., 93:776 (1994)

8. Mulligan, et al., J. Immunology, 150:2407 (1993)

9. Cybulsky, et al., Science, 251 :788 (1991)

10. Li, et al., Arterioscler. Thromb., 13:197 (1993)

11. Sasseville, et al., Am. J. Path., 144:27 (1994)

12. Yang, et al., Proc. Nat. Acad. Science (USA), 90:10494 (1993)

13. Burkly, et al., Diabetes, 43:529 (1994)

14. Baran, et al., J. Clin. Invest., 93:1700 (1994)

15. Hamann, et al., J. Immunology, 152:3238 (1994)

16. Yednoek, et al., Nature, 356:63 (1992)

17. Baron, et al., J. Exp. Med., 177:57 (1993)

18. van Dinther-Janssen, et al., J. Immunology, 147:4207 (1991)

19. van Dinther-Janssen, et al., Annals. Rheumatic Dis., 52:672 (1993)

20. Elices, et al., J. Clin. Invest., 93:405 (1994)

21. Postigo, et al., J. Clin. Invest., 89:1445 (1991)

22. Paul, et al., Transpl. Proceed., 25:813 (1993)

23. Okarhara, et al., Can. Res., 54:3233 (1994)

24. Paavonen, et al., Int. J. Can., 58:298 (1994)

25. Schadendorf, et al., J. Path., 170:429 (1993)

26. Bao, et al., Diff., 52:239 (1993)

27. Lauri, et al., British J. Cancer, 68:862 (1993)

28. Kawaguchi, et al., Japanese J. Cancer Res., 83:1304 (1992)

29. Kogan, et al., Patente U.S. No. 5,510,332, presentada el 23 de abril de 1996

30. Publicación de solicitud de patente Internacional

No. WO 96/01644

31. Thorsett, et al., Patente U.S. No. 6,489,300, presentada el 3 de diciembre de 2002 y Konradi, et al., Patente U.S. No. 66,492,372, presentada el 10 de diciembre de 2002.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes anteriores se incorporan en la presente por referencia en su totalidad al mismo grado como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente como incorporada por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

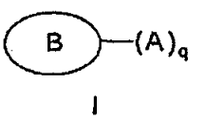
1. Un proceso para la preparación de conjugados activos, caracterizado porque comprende:

a) hacer reaccionar un alcohol polimérico con un compuesto activo nucleofílico que tiene un hidrógeno ácido bajo afecciones de Mitsunobu; y

b) aislar el conjugado.

2. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las afecciones comprenden una fosfina trivalente y un compuesto de azodicarbonilo.

3. Un proceso para preparar un conjugado de la fórmula I:

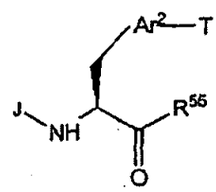


I

B es un radical polimérico biocompatible enlazado opcionalmente en forma covalente a una molécula de brazo central ramificada;

q es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

A en cada caso es independientemente un compuesto de la fórmula II

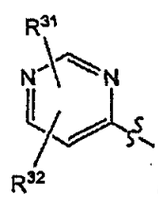


II

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, caracterizado porque:

J se selecciona de:

a) un grupo de la fórmula (a):



(a)

en donde R^{31} es un enlace covalente al radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^{31} es -H, $R^{31'}$, $-NH_2$, $-NHR^{31'}$, $-NH_2$, $-NHR^{31'}$ o $-N(R^{31'})_2$, $-NC_3$-C_6 cíclico, $-OR^{31'}$, $-SR^{31'}$, en donde cada $R^{31'}$ es independientemente un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_3-C_6 opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido,

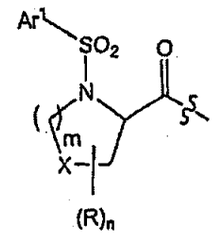
y R^{32} es un enlace covalente al radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^{32} es -H, NO_2, haloalquilo o el grupo $-N(MR^{41})R^{42}$, en donde M es un enlace covalente, -C(O)- o $-SO_2-$, R^{41} es $R^{41'}$, $N(R^{41'})_2$ o $-OR^{41'}$,

en donde cada $R^{41'}$ es independientemente hidrógeno, un

alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterocíclico opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido, en donde las sustituciones opcionales son haluro, alquilo C_1-C_6 o alquilo -OC_1-C_6,

y R^{42} es hidrógeno o $R^{41'}$; y

b) un grupo de la fórmula (b):



(b)

en donde R se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente al radical polimérico, amino, hidroxilo, amino sustituido, alquilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, heterocicliloxi, tiol, ariltio, heteroariltio, heterocicliltio y alquilo sustituido, en donde cada amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde, en cada caso, el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico;

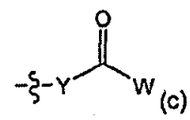
Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^1:

Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^2;

X se selecciona del grupo que consiste de $-NR^1-$, $-O-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2$ y $-CH_2-$ opcionalmente sustituido, en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

T se selecciona de:

a) un grupo de la fórmula (c)



(c)

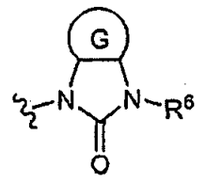
en donde Y se selecciona del grupo que consiste de $-O-$ y $-NR^1-$ en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

W se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador y $-NR^2R^3$, en donde R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido y en donde R^2 y R^3, junto con el átomo de nitrógeno enlazado al mismo, forman un anillo heterocíclico o un anillo heterocíclico sustituido, en donde cada uno de alquilo, alquilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente a un radical polimérico que comprende además opcionalmente un enlazador;

m es un entero igual a 0, 1 ó 2;

n es un entero igual a 0, 1 ó 2; y

b) un grupo de la fórmula (d)



(d)

en donde G es un anillo de 5 ó 6 miembros de arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido que contiene de 0 a 3 nitrógenos, en donde el arilo o heteroarilo comprende además opcionalmente un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador;

R^6 es un enlace covalente a un radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^6 es -H, alquilo, alquilo sustituido o $-CH_2C(O)R^{17}$, en donde R^{17} es -OH, $-OR^{18}$ o $-NHR^{18}$, en donde R^{18} es alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido;

R^{55} se selecciona del grupo que consiste de amino, amino sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalcoxi, cicloalcoxi sustituido, ariloxi y ariloxi sustituido y -OH; con la condición de que:

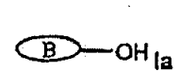
A. por lo menos uno de R, Ar^1, Ar^2 y T contiene un enlace covalente al radical polimérico;

B. cuando R se enlaza covalentemente al radical polimérico, n es uno y X no es -O-, -S-, -SO- o $-SO_2$;

C. cuando X es -O- entonces m es dos; y

D. el conjugado de la fórmula I tiene un peso molecular no mayor de 100,000; que comprende las etapas de:

c) adicionar un alcohol polimérico de la fórmula Ia



Ia

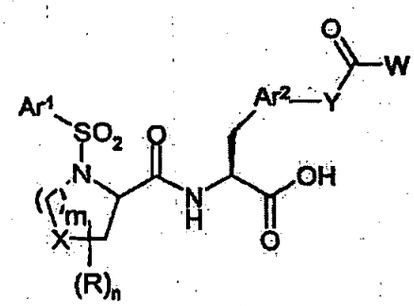
en donde B es como se describió anteriormente, a un nucleófilo de la fórmula H-Nu en presencia de una fosfina trivalente de la fórmula PR_3 y azodicarboxilato de dialquilo para formar el compuesto de la fórmula I, en donde Nu es un radical de la fórmula A descrito anteriormente; y aislar el compuesto de la fórmula I.

4. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque sólo uno de J, Ar^2 y T contiene un enlace covalente a un radical polimérico.

5. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque q es un entero de 1 a aproximadamente 20.

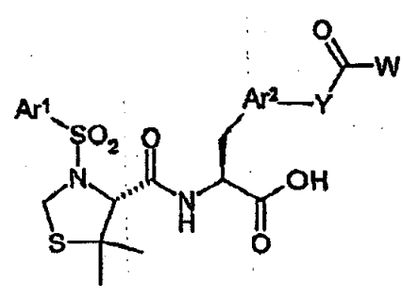
6. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque q es un entero de 1 a aproximadamente 8.

7. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque A en cada caso en independientemente un compuesto de la fórmula IIa



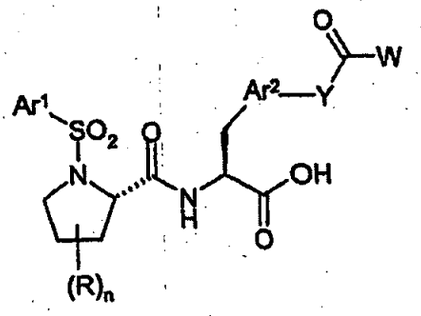
IIa

8. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque A en cada caso es independientemente un compuesto de la fórmula IIb:



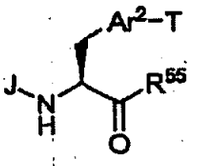
IIb

9. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque A en cada caso es independientemente un compuesto de IIc:



IIc

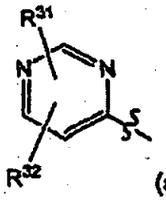
10. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto activo nucleofílico es un compuesto de la fórmula:



en donde:

J se selecciona de:

a) un grupo de la fórmula (a):



(a)

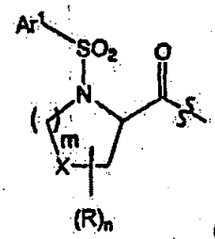
en donde R^{31} es un enlace covalente al radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^{31} es -H, $R^{31'}$, -NH_2, -$NHR^{31'}$, -NH_2, -$NHR^{31'}$ o -$N(R^{31'})_2$, -NC_3-C_6 cíclico, -$OR^{31'}$, -$SR^{31'}$, en donde cada $R^{31'}$ es independientemente un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_3-C_6 opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido,

y R^{32} es un enlace covalente al radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^{32} es -H, NO_2, haloalquilo o el grupo $-N(MR^{41})R^{42}$, en donde M es un enlace covalente, -C(O)- o $-SO_2-$, R^{41} es $R^{41'}$, $N(R^{41'})_2$ o $-OR^{41'}$,

en donde cada $R^{41'}$ es independientemente hidrógeno, un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterocíclico opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido, en donde las sustituciones opcionales son haluro, alquilo C_1-C_6 o alquilo -OC_1-C_6,

y R^{42} es hidrógeno o $R^{41'}$; y

b) un grupo de la fórmula (b):



(b)

en donde R se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente al radical polimérico, amino, hidroxilo, amino sustituido, alquilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, heterocicliloxi, tiol, ariltio, heteroariltio, heterocicliltio y alquilo sustituido, en donde cada amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde, en cada caso, el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico;

Ar^1 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde

cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^1:

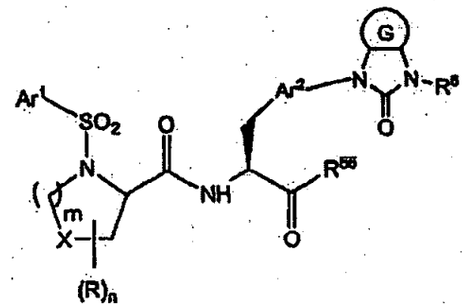
Ar^2 se selecciona del grupo que consiste de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, en donde cada uno de arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido se enlaza opcionalmente en forma covalente al radical polimérico, en donde el radical polimérico comprende opcionalmente un enlazador que enlaza covalentemente el radical polimérico a Ar^2;

X se selecciona del grupo que consiste de $-NR^1-$, $-O-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2$ y $-CH_2-$ opcionalmente sustituido, en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo;

T es un grupo que porta un hidrógeno ácido; y

R^{55} es un grupo protector ácido.

11. El proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el compuesto activo nucleofílico tiene la fórmula:



en donde R^{55} es un grupo protector ácido.

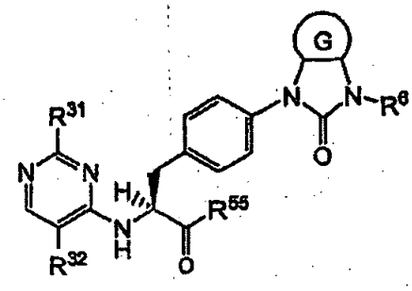
12. Proceso de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque R^{55} es alcoxi C_1-C_6.

13. Proceso de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque m es 1, X es S y R en cada caso se

selecciona independientemente de hidroxilo, alquiloxi, alquilo o un enlace covalente al radical polimérico.

14. Proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque n es 2 y R en ambos casos es metilo.

15. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto activo nucleofílico tiene la fórmula:

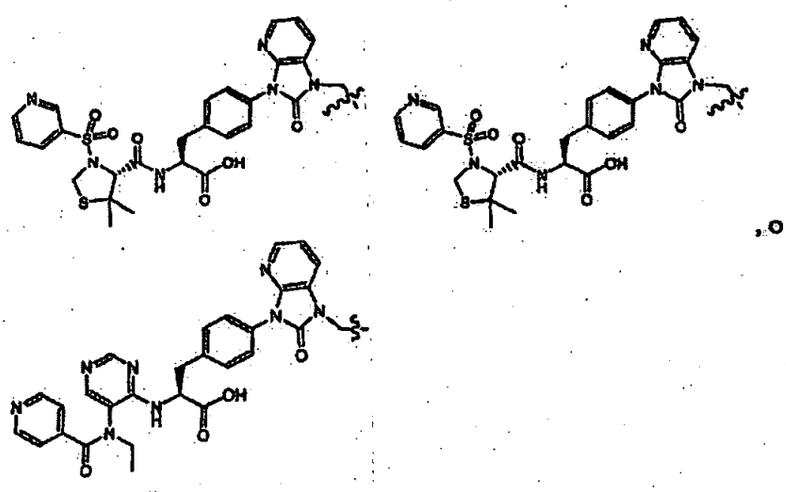


en donde R^{55} es un grupo protector ácido.

16. Proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque R^{55} es alcoxi C_1-C_6.

17. Proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque G es piridinilo, R31 es hidrógeno o dialquilamino y R32 es sulfonamida, amida o urea.

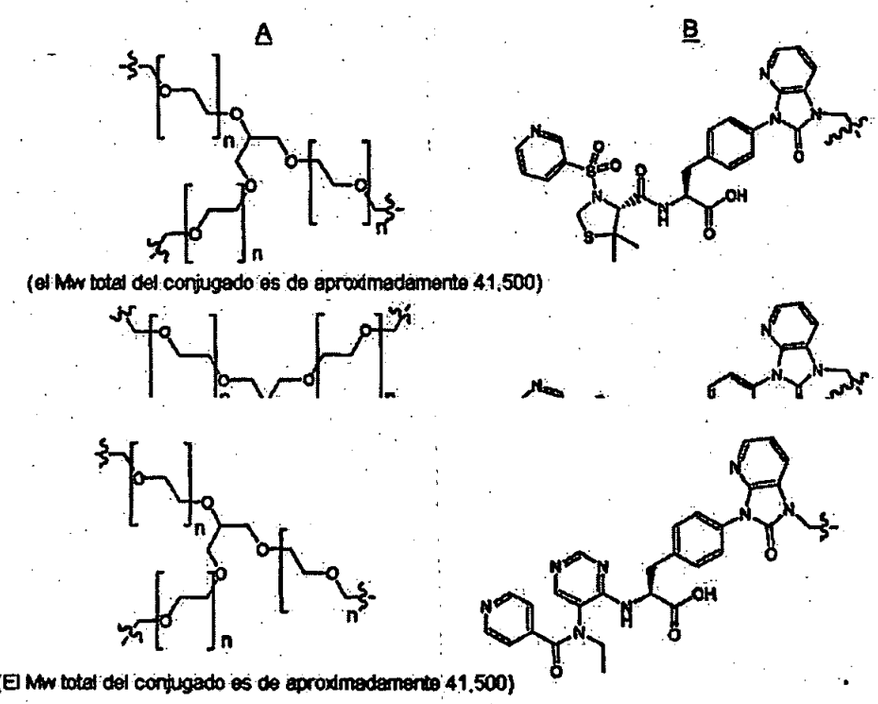
18. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto activo nucleofílico es:



19. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el alcohol polimérico es:



20. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el alcohol polimérico se selecciona del grupo en la columna A y el compuesto activo nucleofílico se selecciona del grupo en la columna B:



21. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el alcohol polimérico se adiciona al nucleófilo de la fórmula H-Nu en presencia de fosfina

trivalente y el azodicarboxilato de dialquilo es por lo menos un solvente.

22. Proceso de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el azodicarboxilato de dialquilo se selecciona del grupo que consiste de azodicarboxilato de dietilo, azodicarboxilato de diisopropilo, 4-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona, N,N,N'N'-tetrametilazodicarboxamida, dipiperidida del ácido azodicarboxílico, bis(N-4-metilpiperazin-1-il)azodicarboxamida, dimorfolinoazodicarboxamida y azodicarboxilato de di-ter-butilo.

23. Proceso de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el azodicarboxilato de dialquilo se selecciona del grupo que consiste de diazocarboxilato de dietilo, azodicarboxilato de diisopropilo, 4-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona, N,N,N',N'-tetrametilazodicarboxamida, dipiperidida del ácido azodicarboxílico y azodicarboxilato de di-ter-butilo.

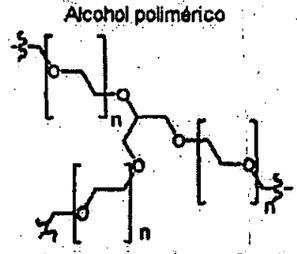
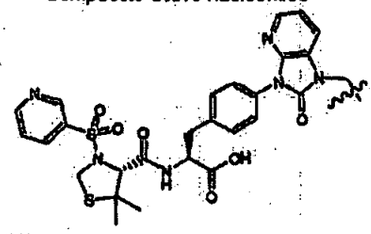
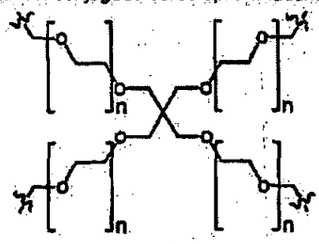
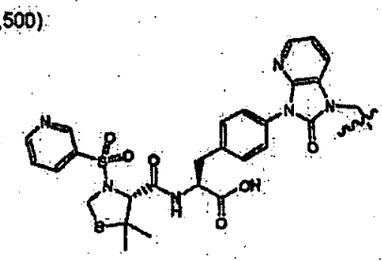
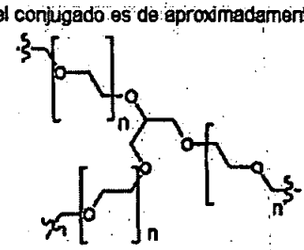
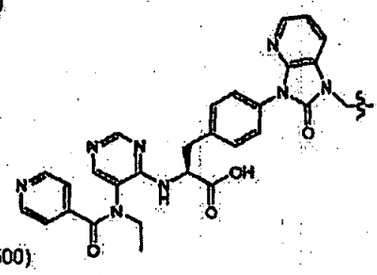
24. Proceso de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el solvente es un solvente clorado o un solvente de éter.

25. Proceso de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el solvente es un diclorometano o tetrahidrofurano.

26. Proceso de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque la fosfina trivalente se selecciona del grupo que consiste de trifenilfosfina, trimetilfosfina, trietilfosfina, tributilfosfina, 1,2-bis-(difenilfosfino)etano, un polímero enlazado a fosfina y fosfina soluble en agua.

27. Proceso de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque la fosfina trivalente es trifenilfosfina.

28. Proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el conjugado se prepara usando la combinación de alcohol polimérico/compuesto activo nucleofílico 1, 2 ó 3:

Combinación	Alcohol polimérico	Compuesto activo nucleofílico
1		
	(el Mw total del conjugado es de aproximadamente 41,500)	
2		
	(el Mw total del conjugado es de aproximadamente 42,000)	
3		
	(el Mw total del conjugado es de aproximadamente 41,500)	

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un proceso para preparar conjugados poliméricos de compuestos agrícolas, terapéuticos y aditivos alimentarios usando las afecciones de Mitsunobu.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) *Prioridad* (32) *Fecha* (33) *País*
60/697,726 08/07/2005 US

(51) Int Cl: **A61K 047/048**

(71)Solicitante(s) **ELAN PHARMACEUTICALS, INC.**

(72) Inventor(es) **ANDREL W. KONRADI**
Y OTROS

(74) Apoderado: **EMILIO FERRERO**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08/02/2008
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 07/07/2006
No. de solicitud PCT/US2006/026292

(87) Publicación internacional
Fecha: 18/01/2007
N° publicación: ***WO 2007/008563 A2***

(54) Título: **PREPARACION DE CONJUGADOS POLIMERICOS DE COMPUESTOS DE ADITIVOS TERAPEUTICOS, AGRICOLAS Y ALIMENTARIOS.**

Reivindicación(es):

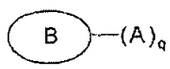
1. Un proceso para la preparación de conjugados activos, caracterizado porque comprende:

a) hacer reaccionar un alcohol polimérico con un compuesto activo nucleofílico que tiene un hidrógeno ácido bajo afecciones de Mitsunobu; y

b) aislar el conjugado.

2. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las afecciones comprenden una fosfina trivalente y un compuesto de azodicarbonilo.

3. Un proceso para preparar un conjugado de la fórmula I:

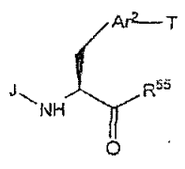


I

B es un radical polimérico biocompatible enlazado opcionalmente en forma covalente a una molécula de brazo central ramificada;

q es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100;

A en cada caso es independientemente un compuesto de la fórmula II

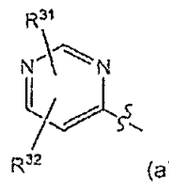


II

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, caracterizado porque:

J se selecciona de:

a) un grupo de la fórmula (a):



(a)

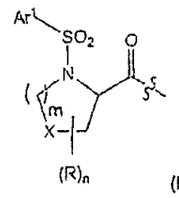
en donde R^{31} es un enlace covalente al radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^{31} es -H, $R^{31'}$, $-NH_2$, $-NHR^{31'}$, $-NH_2$, $-NHR^{31'}$ o $-N(R^{31'})_2$, $-NC_3$-C_6 cíclico, $-OR^{31'}$, $-SR^{31'}$, en donde cada $R^{31'}$ es independientemente un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_3-C_6 opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido,

y R^{32} es un enlace covalente al radical polimérico que comprende opcionalmente un enlazador, o R^{32} es -H, NO_2, haloalquilo o el grupo $-N(MR^{41})R^{42}$, en donde M es un enlace covalente, -C(O)- o $-SO_2$-, R^{41} es $R^{41'}$, $N(R^{41'})_2$ o $-OR^{41'}$,

en donde cada $R^{41'}$ es independientemente hidrógeno, un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido, en donde las sustituciones opcionales son haluro, alquilo C_1-C_6 o alquilo $-OC_1$-C_6,

y R^{42} es hidrógeno o $R^{41'}$; y

b) un grupo de la fórmula (b):



(b)

en donde R se selecciona del grupo que consiste de un enlace covalente al radical polimérico, amino, hidroxilo, amino sustituido, alquilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, heterocicliloxi, tiol, ariltio, heteroariltio, heterocicliltio y alquilo sustituido, en donde cada amino, amino sustituido, alquilo y alquilo sustituido

298

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

BO OFICIAL DE CAJA : 08 - 9,455
A : FEBRERO 4 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-012301- -00000-0000
Fecha: 2008-02-07 16:52:35 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 298

***** C O N S I G N A C I O N *****

SITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2678327	04/02/2008	51,244,000.00

***** C O N C E P T O *****

.	RENTISTICO		CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
				TOTAL : $	501,000.00

QUINIENTOS UN MIL PESOS

ONSABLE : _____

BO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

O 13170-841-003-3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-012301- -00000-0000
Fecha: 2008-02-07 16:52:35 Dep: 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 298

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQ[illegible]S PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- Descripción de la invención [X]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

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 y 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 se 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 trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Claudia M Nova Cortes
Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	8 12301
	Solicitud internacional	PCT/US2006/026292
	Fecha inicio fase nacional	08/02/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2725

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:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

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 Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 22 FEB. 2008
jfernand