



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 800**

51 Int. Cl.:
C08G 65/333 (2006.01)
C08G 65/332 (2006.01)
C08G 65/329 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00986602 .1**
96 Fecha de presentación : **18.12.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1259563**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

54 Título: **Procedimiento de preparación de ésteres de 1-benzotriazolilcarbonato de polímeros solubles en agua.**

30 Prioridad: **22.12.1999 US 171834 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.06.2009

73 Titular/es: **Nektar Therapeutics AL, Corporation**
490 Discovery Drive
Huntsville, Alabama 35806-2902, US

72 Inventor/es: **Kozlowski, Antoni**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 321 800 T3

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

ES 2 321 800 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de ésteres de 1-benzotriazolilcarbonato de polímeros solubles en agua.

5 La presente invención versa acerca de ésteres de 1-benzotriazolilcarbonato de ciertos polímeros no peptídicos solubles en agua y procedimientos para prepararlos.

10 La fijación covalente del polímero hidrófilo de poli(etilenglicol), abreviado como PEG, también conocido como poli(óxido de etileno), abreviado como PEO, a moléculas y superficies es de una utilidad considerable en la biotecnología y la medicina. En su forma más común, PEG es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo:



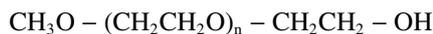
15 El anterior polímero, alfa-, omega-dihidroxilpoli(etilenglicol), puede estar representado de forma abreviada como HO-PEG-OH en la que se comprende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural:



20

en la que n varía normalmente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4000.

25 El PEG se utiliza normalmente como metoxi-PEG-OH, o abreviado a mPEG, en el que un término es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro término es un grupo hidroxilo que está sometido a una modificación química preparada. A continuación se muestra la estructura de mPEG:



30

Los copolímeros aleatorios o en bloque de óxido de etileno y de óxido de propileno, mostrados a continuación, están relacionados estrechamente al PEG en su química, y pueden ser sustituidos por PEG en muchas de sus aplicaciones.

35



en el que cada R es H o CH₃, independientemente.

40 El PEG es un polímero que tiene las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, carece de toxicidad, y carece de inmunogenicidad. Un uso del PEG es para fijar de manera covalente el polímero a moléculas insolubles para hacer que la molécula resultante de PEG soluble en "conjugado". Por ejemplo, se ha mostrado que el fármaco paclitaxel insoluble en agua, cuando está acoplado a PEG, se vuelve soluble en agua. Greenwald, *et al.*, J. Org. Chem., 60:331-336 (1995).

45

Para acoplar PEG a una molécula, tal como una proteína, es a menudo necesario "activar" el PEG al preparar un derivado del PEG que tiene un grupo funcional en un término del mismo. El grupo funcional puede reaccionar con ciertas porciones en la proteína, tal como un grupo amino, formando de esta manera un conjugado de PEG-proteína.

50 En la patente U.S. n° 5.650.234, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad, está descrito un éster de 1-benzotriazolilcarbonato de polietilenglicol. El proceso de múltiples pasos descrito en la patente 5.650.234 para formar el éster de 1-benzotriazolilcarbonato de PEG incluye la reacción de una molécula de PEG con el compuesto volátil y peligroso, fosgeno, para así formar un producto intermedio de PEG cloroformiato. El uso de fosgeno en el proceso resulta en la formación de HCl, que puede causar la degradación de la cadena principal de PEG. Debido a la naturaleza volátil del fosgeno, y los problemas de seguridad y de calidad asociados con su uso, hay una necesidad en la técnica para un procedimiento para preparar ésteres de 1-benzotriazolilcarbonato de PEG sin utilizar fosgeno.

55

60 La invención proporciona un procedimiento para la preparación de un éster de 1-benzotriazolilcarbonato de un polímero no peptídico soluble en agua al reaccionar el polímero con di(1-benzotriazolil)carbonato. Utilizando la invención, el éster de 1-benzotriazolilcarbonato puede estar formado en un único paso y sin utilizar fosgeno, evitando de ese modo los problemas de seguridad y calidad asociados con ese compuesto.

65 El procedimiento de la invención incluye proporcionar un polímero no peptídico soluble en agua que tiene al menos un grupo hidroxilo terminal y reaccionando el grupo hidroxilo terminal del polímero no peptídico soluble en agua con di(1-benzotriazolil)carbonato para formar el éster de 1-benzotriazolilcarbonato del polímero no peptídico soluble en agua. El polímero no peptídico soluble en agua está seleccionado de entre poli(alquilenglicol), poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(ácido hidroxilado), polifosfaceno, polioxazoli-

ES 2 321 800 T3

na, poli(N-acriloilmorfolina), y copolímeros, terpolímeros, y mezclas de los mismos. En una realización, el polímero es poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular medio desde aproximadamente 200 Da hasta aproximadamente 100.000 Da.

5 El paso de la reacción puede ser llevado a cabo en la presencia de un disolvente orgánico y una base. Ejemplos de disolventes orgánicos incluyen metileno cloruro, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetilformamida, dimetil sulfóxido, y mezclas de los mismos. La base puede ser, por ejemplo, piridina, dimetilaminopiridina, quinolina, trialkuilaminas, y mezclas de las mismas.

10 El procedimiento de la invención puede incluir, además, reaccionar el éster de 1-benzotriazolilcarbonato del polímero no peptídico soluble en agua con los grupos amino de un segundo polímero que tiene una pluralidad de grupos amino primarios, tal como una proteína, aminopoli(etilenglicol), aminocarbohidratos o poli(vinilamina), para formar un polímero reticulado. Además, el éster de 1-benzotriazolilcarbonato puede ser reaccionado con ya sea un aminoácido, tal como lisina, para formar un derivado de aminoácido polimérico, o con un agente activo biológicamente para
15 formar un conjugado de polímero activo biológicamente.

Los términos “grupo funcional”, “porción activa”, “grupo activador”, “emplazamiento reactivo”, “grupo reactivo químicamente” y “porción reactiva químicamente” son utilizados en la técnica y en el presente documento para hacer referencia a porciones o unidades definibles precisas de una molécula. Los términos son un tanto sinónimos en las
20 técnicas químicas y son utilizados en el presente documento para indicar las porciones de las moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas. El término “activo”, cuando es utilizado en conjunto con grupos funcionales, se pretende que incluya aquellos grupos funcionales que reaccionan fácilmente con grupos electrofílicos o nucleofílicos en otras moléculas, en contraste con aquellos grupos que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción muy poco viables para reaccionar. Por ejemplo, según se entendería en la técnica, el
25 término “éster activo” incluiría aquellos ésteres que reaccionan fácilmente con grupos nucleofílicos tales como aminas. Normalmente, un éster activo reaccionará con una amina en un medio acuoso en cuestión de minutos, mientras que ciertos ésteres, tal como ésteres de metilo o etilo, requieren un catalizador fuerte para reaccionar con un grupo nucleofílico.

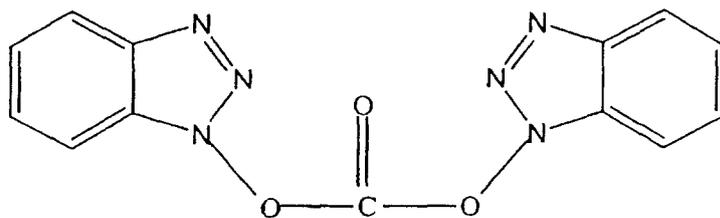
30 El término “enlace” o “enlazante” se utilizan en el presente documento para hacer referencia a grupos o enlaces que están formados normalmente como el resultado de una reacción química y normalmente son enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a pH útiles, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas durante un periodo de tiempo extendido, quizás incluso indefinidamente. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significa que los enlaces son degradables
35 en agua o en disoluciones acuosas, incluyendo, por ejemplo, sangre. Enlaces enzimáticamente inestables o degradables significa que el enlace puede ser degradado por una o más enzimas. Según se entiende en la técnica, el PEG y polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la cadena principal del polímero o en el grupo enlazante entre la cadena principal del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula polimérica.

40 El término “molécula activa biológicamente”, “porción activa biológicamente” o “agente activo biológicamente” cuando se utilizan en el presente documento significan cualquier sustancia que pueda afectar cualquier propiedad física o bioquímica de un organismo biológico, incluyendo pero sin estar limitada a virus, bacterias, hongos, plantas, animales y humanos. En particular, según se utiliza en el presente documento, las moléculas activas biológicamente
45 incluyen cualquier sustancia prevista para un diagnóstico, la mitigación de la cura, el tratamiento, o la prevención de enfermedad en humanos u otros animales, o para mejorar de otra manera el bienestar físico o mental de humanos o animales. Ejemplos de moléculas activas biológicamente incluyen, pero no están limitadas a, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, colorantes, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes activos biológicamente que son adecuadas para su uso con la invención
50 incluyen, pero no están limitadas a, antibióticos, fungicidas, agentes antivíricos, agentes antiinflamatorio, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes antiansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, y similares.

55 La invención proporciona un procedimiento para la preparación de un éster de 1-benzotriazolilcarbonato (también llamado un éster de BTC) de un polímero no peptídico soluble en agua, en el que un grupo hidroxilo terminal de un polímero no peptídico soluble en agua reacciona con di(1-benzotriazolil)carbonato, cuya estructura se muestra a continuación, para formar el éster de 1-benzotriazolilcarbonato.

60 El di(1-benzotriazolil)carbonato, que no debería pose problemas significativos de seguridad ni de manipulación como un reactivo y que no debería provocar la degradación de la cadena principal del polímero, puede ser adquirido como una mezcla del 70% (en peso) con 1,1,2-tricloroetano de Fluka Chemical Corporation de Milwaukee, Wisconsin.

65



di(1-benzotriazolil)carbonato (diBTC)

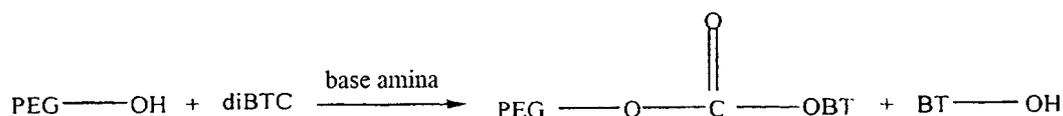
La cadena principal polimérica del polímero no peptídico soluble en agua puede ser poli(etilenglicol) (o sea, PEG). Sin embargo, se debería comprender que también son adecuados otros polímeros relacionados para su uso en la práctica de esta invención y que se pretende que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) sea inclusivo y no exclusivo en este sentido. El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG alcoxi, PEG difuncional, PEG de brazos múltiples, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG pendiente (o sea, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales pendientes a la cadena principal del polímero), o PEG con enlaces degradables en su interior.

El PEG es normalmente transparente, incoloro, inodoro, soluble en agua, estable al calor, inerte a muchos agentes químicos, no se hidroliza ni deteriora, y es normalmente no tóxico. Se considera que el poli(etilenglicol) es biocompatible, lo que significa que el PEG es capaz de coexistir con tejidos vivos u organismos sin hacerles daño. Más específicamente, el PEG es sustancialmente no inmunogénico, lo que significa que el PEG no tiende a producir una respuesta inmune en el cuerpo. Cuando se fija a una molécula que tiene alguna función deseable en el cuerpo, tal como un agente activo biológicamente, el PEG tiende a enmascarar el agente y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmune de forma que el organismo pueda tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG tienden a no producir una respuesta inmune sustancial ni provocar coagulación u otros efectos no deseables. Teniendo el PEG la fórmula $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, en la que n es desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4000, normalmente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 2000, es un polímero útil en la práctica de la invención. Los PEG que tienen un peso molecular de desde aproximadamente 200 Da hasta aproximadamente 100.000 Da son particularmente útiles como la cadena principal del polímero.

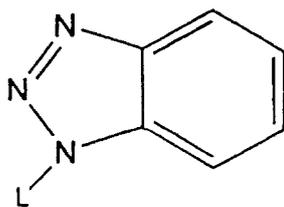
La cadena principal del polímero puede ser lineal o ramificada. Las cadenas principales ramificadas de los polímeros son normalmente conocidas en la técnica. Normalmente, un polímero ramificado tiene una porción del núcleo central ramificado y una pluralidad de cadenas lineales de polímeros enlazadas al núcleo central ramificado. El PEG se utiliza normalmente en formas ramificadas que pueden ser preparadas con la adición de óxido de etileno a diversos polioles, como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La porción central ramificada también puede estar derivada de diversos aminoácidos, tal como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado puede estar representado en forma general como $\text{R}(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ en la que R representa la porción central, como el glicerol o el pentaeritritol, y m representa el número de brazos. Las moléculas de PEG de brazos múltiples, como las descritas en la patente U.S. n° 5.932.462, que está incorporada en el presente documento a modo de referencia en su totalidad, también se pueden utilizar como la cadena principal del polímero.

También son adecuados para la invención muchos otros polímeros seleccionados de entre los mencionados anteriormente. Las cadenas principales de los polímeros que son no peptídicos y solubles en agua, con desde 2 hasta aproximadamente 300 terminaciones, son particularmente útiles en la invención. Los polímeros adecuados son otros poli(alquilenglicoles), como el poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(ácido hidroxilado), polifosfaceno, polioxazolona, poli(N-acrilolmorfolina), como se describe en la patente U.S. n° 5.629.384, y copolímeros, terpolímeros, y mezclas de los mismos. Aunque el peso molecular de cada cadena de la cadena principal del polímero puede variar, se encuentra normalmente en el rango de desde aproximadamente 100 Da hasta aproximadamente 100.000 Da, a menudo desde aproximadamente 6.000 Da hasta aproximadamente 80.000 Da.

Para fines ilustrativos, a continuación se muestra un esquema simplificado de reacción para el procedimiento de la invención.



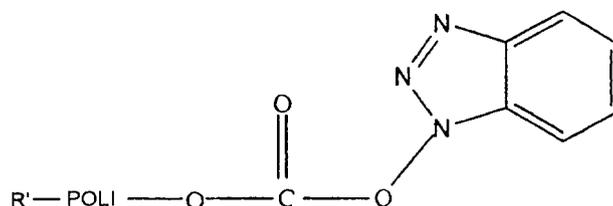
en el que BT es



10 siendo L el punto de la unión del átomo de oxígeno.

En una realización, la reacción entre el polímero y diBTC tiene lugar en un disolvente orgánico y en la presencia de una base. Ejemplos de disolventes orgánicos adecuados incluyen metileno cloruro, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetilformamida, dimetil sulfóxido, y mezclas de los mismos. Las bases amina, como piridina, dimetilaminopiridina, quinolina, trialkilaminas, incluyendo trietilamina, y mezclas de las mismas, son ejemplos de bases adecuadas. En un aspecto de la invención, la relación molar de di(1-benzotriazolil)carbonato a polímero no peptídico soluble en agua es de aproximadamente 30:1 o menos.

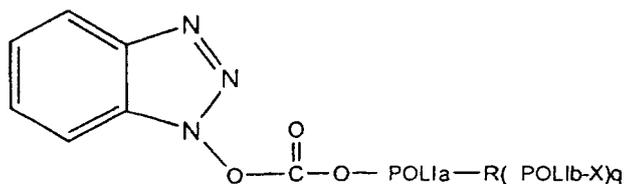
En una realización, el polímero no peptídico soluble en agua tiene la estructura R'-POLI-OH y el éster de 1-benzotriazolilcarbonato del polímero no peptídico soluble en agua tiene la estructura



en la que POLI es una cadena principal del polímero no peptídico soluble en agua, tal como PEG, y R' es un grupo terminal. R' puede ser cualquier grupo terminal adecuado conocido en la técnica para polímeros de este tipo. Por ejemplo, R' puede ser un grupo terminal relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi (por ejemplo, metoxi). De manera alternativa, R' puede ser un grupo funcional. Ejemplos de grupos funcionales incluyen hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, tal como ésteres de N-hidroxisuccinimidilo y ésteres de 1-benzotriazolilo, carbonato activo, tal como carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alqueniolo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina protegida, hidrazida protegida, tiol, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato. El grupo funcional está escogido normalmente para su fijación a un grupo funcional en un agente activo biológicamente.

Como se entendería en la técnica, el término "protegido" se refiere a la presencia de un grupo o porción protector que previene la reacción del grupo funcional reactivo químicamente bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo reactivo químicamente que está siendo protegido. Por ejemplo, si el grupo reactivo químicamente es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede estar seleccionado de entre el grupo de tert-butiloxycarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Si el grupo reactivo químicamente es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo reactivo químicamente es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser un bencilo o un grupo alquilo tal como metilo o etilo. También se pueden utilizar en la invención otros grupos protectores conocidos en la técnica.

En otra realización, el polímero no peptídico soluble en agua tiene la estructura HO-POLIIa-R(POLIIb-X)_q y el éster de 1-benzotriazolilcarbonato del polímero no peptídico soluble en agua tiene la estructura



65 en la que

POLIIa y POLIIb son cadenas principales de polímeros no peptídicos solubles en agua, tal como PEG, que pueden ser los mismos o distintos;

ES 2 321 800 T3

R es una molécula de núcleo central, tal como glicerol o pentaeritritol;

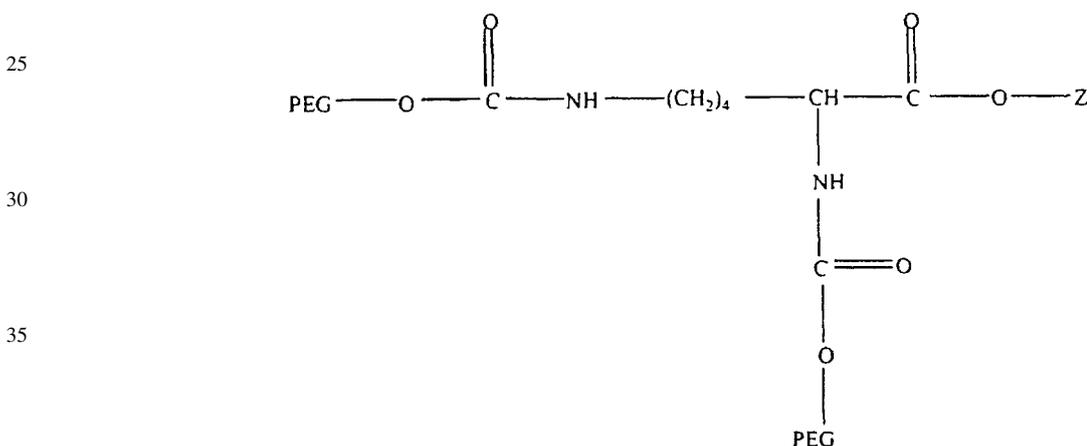
q es un número entero desde 2 hasta aproximadamente 300; y

5 siendo cada X un grupo terminal.

Los grupos terminales X pueden ser los mismos que se mencionaron anteriormente para R'.

10 En otro aspecto, un éster BTC difuncional o funcional superior del polímero no peptídico soluble en agua reacciona con al menos dos grupos amino de un segundo polímero que tiene una pluralidad de grupos amino primarios, tal como PEG amino u otros polímeros amina multifuncionales, tal como proteínas, aminocarbhidratos o poli(vinilamina), para formar polímeros reticulados. El polímero amina tendrá normalmente tres o más grupos amino disponibles. Dichos polímeros forman hidrogeles; es decir, se vuelven muy hidratados en un medio acuoso, pero no se disuelven. Dado que estos hidrogeles son normalmente biocompatibles y pueden ser degradables, son posibles muchas aplicaciones biomédicas en las zonas de administración de fármacos, cubrición de heridas y la prevención de la adhesión.

Una realización adicional de la invención supone la reacción de ésteres de BTC de polímeros no peptídicos solubles en agua con aminoácidos para formar derivados de aminoácidos. En una realización, los ésteres de PEG-BTC reaccionan con lisina para formar un derivado polimérico de lisina. Por ejemplo, dicho derivado de lisina es una lisina doblemente PEGada, en el que dos PEG están enlazados a las aminas de lisina por medio de enlaces de carbamato, como se muestra a continuación.



en la que PEG es poli(etilenglicol) y Z está seleccionado de entre el grupo que consiste en H, N-succinimidilo o 1-benzotriazolilo.

45 Dichos derivados de PEG de lisina son útiles como reactivos para la preparación de derivados PEG de proteínas. Estos derivados PEG ofrecen a menudo ventajas sobre las proteínas no PEGadas, tal como duraciones de vida *in vivo* de mayor circulación, tasas reducidas de proteólisis, y menor inmunogenicidad. En otro aspecto, los derivados PEG BTC se utilizan directamente para fijar PEG a proteínas por medio de enlaces de carbamato y pueden ofrecer ventajas similares a las descritas para los derivados PEG de lisina.

50 Los ésteres de BTC de polímeros no peptídicos solubles en agua también se pueden reaccionar con agentes activos biológicamente para formar conjugados de polímeros activos biológicamente. Ejemplos de agentes activos biológicamente incluyen péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequeña, colorantes, lípidos, nucleósidos, oligonucleótidos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas.

55 La invención también incluye ésteres de 1-benzotriazolilcarbonato de polímeros no peptídicos solubles en agua preparados conforme al proceso descrito anteriormente. Como se ha mencionado anteriormente, se cree que los derivados poliméricos preparados conforme a la invención exhiben una mayor calidad porque se evita la degradación de la cadena principal del polímero causada por el fosgeno. Además, dado que el procedimiento solamente requiere un paso y menos reactantes, se aumenta el rendimiento del proceso y se reduce el coste.

60 Se dan los siguientes ejemplos para ilustrar la invención, pero no se deberían considerar como limitantes de la invención.

65

Parte experimental

Ejemplo 1

5 *Preparación de mPEG₅₀₀₀BTC*

Se agitó durante la noche una disolución de mPEG₅₀₀₀-OH (PM 5000, 15 g, 0,003 moles), di(1-benzotriazolil) carbonato (4,0 g de una mezcla 70%, 0,000945 moles), y piridina (2,2 ml) en acetonitrilo (30 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se eliminó el disolvente mediante destilación, se disolvió el residuo en 80 ml de metileno cloruro, y la disolución resultante se añadió a 850 ml de etil éter. Se enfrió la mezcla a 0-5°C y se recogió el precipitado mediante filtración. Entonces, se repitió el proceso de precipitación para obtener un sólido blanco que fue secado al vacío a temperatura ambiente para producir 13,5 g de producto que fue mostrado mediante ¹H nmr que va a ser 100% sustituido. ¹H nmr (dmso d-6): 3,23 ppm, CH₃O; 3,51 ppm, O-CH₂-CH₂-O; 4,62 ppm, m, mPEG-O-CH₂-OCO₂-; 7,41-8,21, complejo múlt., protones de benzotriazola.

15 Ejemplo 2

Preparación de mPEG_{20,000}BTC

20 Se agitó durante la noche una disolución de mPEG_{20,000}-OH (PM 20.000, 20 g, 0,001 moles), di(1-benzotriazolil) carbonato (3,4 g de mezcla 70%, 0,00803 moles), y piridina (3,0 ml) en acetonitrilo (40 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se eliminó el disolvente mediante destilación y se disolvió el residuo en 80 ml de metileno cloruro, y la disolución resultante se añadió a 800 ml de etil éter. Se recogió el precipitado mediante filtración y fue secado al vacío a temperatura ambiente para producir 16,8 g de producto que fue mostrado mediante ¹H nmr que va a ser 100% sustituido. ¹H nmr (dmso d-6): 3,23 ppm, CH₃O; 3,51 ppm, O-CH₂-CH₂-O; 4,62 ppm, m, mPEG-O-CH₂-OCO₂-; 7,41-8,21, complejo múlt., protones de benzotriazola.

Ejemplo 3

30 *Derivación de lisina con mPEG_{20,000}BTC*

Se disolvió lisina.HCl (0,0275 g, 0,000151 moles) en 26 ml de tampón borato de 0,1 M y se ajustó el pH a 8,0 con 0,1 M de NaOH. A la disolución resultante se le añadió mPEG_{20,000}BTC (7,0 g, 0,00350 moles) a lo largo de 15 minutos y se mantuvo el pH en 8 con la adición de 0,1 M de NaOH. Después de agitar la disolución resultante durante 3 h, se añadieron 15 g de H₂O y 4 g de NaCl y se ajustó el pH a 3,0 con un 10% de ácido fosfórico. Se extrajo el producto con metileno cloruro y el extracto se secó sobre MgSO₄. Después de concentrar la disolución a 30 ml, se vertió la disolución en 300 ml de etil éter y se recogió el producto mediante filtración y se secó al vacío a temperatura ambiente para producir 5,9 g de producto como un sólido blanco. El análisis mediante cromatografía de impregnación de gel (Ultrasorb 250, temperatura de la columna de 75°C, tampón acuoso de pH 7,2) mostró que el producto era una mezcla de di-N-PEGada lisina (PM-40 KDa, 63,05%), mono-N-PEGada lisina (PM-20 KDa, 36,95%) y mPEG_{20,000}.

Ejemplo 4

Derivación de lisozima con mPEG₅₀₀₀BTC

45 Se añadieron 20,3 mg de mPEG₅₀₀₀BTC (exceso quintuple de mPEG₅₀₀₀ BTC) a 4 ml de disolución de lisozima (3 mg/ml en 50 mM de tampón de fosfato sódico, pH 7,2) y se mezcló continuamente la mezcla a temperatura ambiente. El análisis mediante electroforesis capilar (columna de 57 cm × 76 μm; 30 mM tampón fosfato; voltaje de funcionamiento de 25 kV) después de 4 horas mostró que permanecía un 6,94% de lisozima sin reaccionar, mientras que se había formado un 33,99% de mono-PEGada lisozima, un 43,11% de di-PEGada lisozima, un 13,03% de tri-PEGada lisozima y un 2,92% de tetra-PEGada lisozima.

Ejemplo 5

55 *Éster bencílico de ácido PEG_{2KDa}-α-hidroxi-ω-propiónico*

Se añadieron 1-hidroxibenzotriazola (0,30 g), 4-(dimetilamino)piridina (1,0 g), alcohol bencílico (10,8 g, 0,100 moles) y 1,3-diciclohexilcarbodiimida (1,0 M de disolución en metileno cloruro, 7,5 ml, 0,0075 moles) a una disolución de ácido PEG_{2KDa}-α-hidroxi-ω-propiónico (10 g, 0,0050 moles) (Shearwater Corp.) en metileno cloruro anhidro (100 ml). Se agitó durante la noche la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo argón. Entonces, se concentró la mezcla a aproximadamente 50 ml, fue filtrada y añadida a 800 ml de dietil éter frío. El producto precipitado fue filtrado y secado a una presión reducida. Producción 8,2 g. NMR (d6-DMSO): 2,60 ppm (t, -CH₂-COO-), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 4,57 ppm (t, -OH-), 5,11 ppm (s, -CH₂- (bencilo)), 7,36 ppm (m, -C₆H₅ (bencilo)).

65

ES 2 321 800 T3

Ejemplo 6

Éster bencílico de ácido PEG_{2KDa}- α -benzotriazola carbonato- ω -propiónico

5 Se añadieron piridina (0,98 ml) y di(1-benzotriazolil)carbonato (1,48 g) a una disolución de éster bencílico de ácido PEG_{2KDa}- α -hidroxi- ω -propiónico (8,2 g, 0,0025 moles) en acetonitrilo (82 ml), y se agitó durante la noche la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. Luego, se filtró la mezcla y se evaporó el disolvente hasta conseguir la sequedad. El producto crudo fue disuelto en metileno cloruro y fue precipitado con alcohol isopropilo. El producto mojado fue secado a una presión reducida. Producción 6,8 g. NMR (d₆-DMSO): 2,60 ppm (t, -CH₂-COO-), 3,51 ppm (s, cadena principal de PEG), 4,62 ppm (m, -CH₂-O(C=O)-), 5,11 ppm (s, -CH₂- (bencilo)), 7,36 ppm (m, -C₆H₅ (bencilo)), 7,60 ppm - 8,50 ppm (4 m, protones aromáticos de benzotriazola).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un éster de 1-benzotriazolilcarbonato de un polímero no peptídico soluble en agua, que comprende:

proporcionar un polímero no peptídico soluble en agua que tiene al menos un grupo hidroxilo terminal seleccionado de entre el grupo que consiste en poli(alquilenglicol), poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(ácido hidroxil- α), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfina) y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos, y

hacer reaccionar el grupo hidroxilo terminal del polímero no peptídico soluble en agua con di(1-benzotriazolil)carbonato para formar un éster de 1-benzotriazolilcarbonato del polímero no peptídico soluble en agua.

2. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico soluble en agua es poli(etilenglicol).

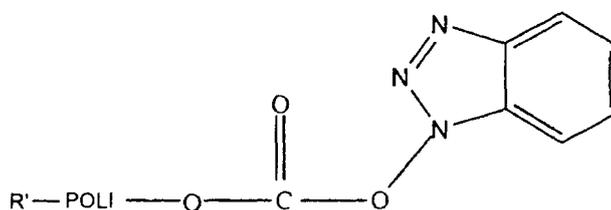
3. El procedimiento de la Reivindicación 2, en el que el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular medio desde aproximadamente 200 Da hasta aproximadamente 100.000 Da.

4. El procedimiento de la Reivindicación 2, en el que el poli(etilenglicol) tiene un número de subunidades de 3-4.000.

5. El procedimiento de la Reivindicación 2, en el que el poli(etilenglicol) tiene un número de subunidades de 3-2.000.

6. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico soluble en agua tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 300 terminaciones.

7. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico soluble en agua tiene la estructura R'-POLI-OH y el éster de 1-benzotriazolilcarbonato del polímero no peptídico soluble en agua tiene la estructura



en la que POLI es una cadena principal del polímero no peptídico soluble en agua y R' es un grupo terminal o un grupo funcional.

8. El procedimiento de la Reivindicación 7, en el que POLI es poli(etilenglicol).

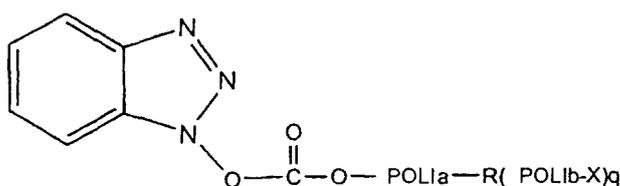
9. El procedimiento de la Reivindicación 8, en el que el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular medio desde aproximadamente 200 Da hasta aproximadamente 100.000 Da.

10. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 9, en el que R' es metoxi.

11. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 9, en el que R' es un grupo funcional seleccionado de entre el grupo que consiste en hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato acrilamida, sulfona activa, amina protegida, hidrazida protegida, tiol, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato.

12. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico soluble en agua tiene la estructura HO-POLIIa-R(POLIIb-X)q y el éster de 1-benzotriazolilcarbonato del polímero no peptídico soluble en agua tiene la estructura

ES 2 321 800 T3



10 en la que

POLIa y POLIb son cadenas principales de polímeros no peptídicos solubles en agua que pueden ser los mismos o diferentes;

15 R es una molécula de núcleo central;

q es un número entero desde 2 hasta aproximadamente 300; y

cada X es un grupo terminal o un grupo funcional.

20 13. El procedimiento de la Reivindicación 12, en el que POLIa y POLIb son poli(etilenglicol).

14. El procedimiento de la Reivindicación 13, en el que POLIa y POLIb tienen cada uno un peso molecular medio desde aproximadamente 200 Da hasta aproximadamente 100.000 Da.

25 15. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 12 a 14, en el que cada X está seleccionada de manera independiente de entre el grupo que consiste en alcoxi, hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina protegida, hidrazida protegida, tiol, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato.

16. El procedimiento de la Reivindicación 13, en el que R está derivado a partir de un poliol.

35 17. El procedimiento de la Reivindicación 16, en el que el poliol está seleccionado de entre el grupo que consiste en glicerol, pentaeritritol y sorbitol.

18. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho paso de reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico.

40 19. El procedimiento de la Reivindicación 18, en el que el disolvente orgánico está seleccionado de entre el grupo que consiste en metileno cloruro, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetilformamida, dimetil sulfóxido, y mezclas de los mismos.

45 20. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 19, en el que dicho paso de reacción se lleva a cabo en presencia de una base.

21. El procedimiento de la Reivindicación 20, en el que la base está seleccionada de entre el grupo que consiste en piridina, dimetilaminopiridina, quinolina, trialkilaminas, y mezclas de las mismas.

50 22. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 21, en el que la relación molar de di(1-benzotriazolil)carbonato al polímero no peptídico soluble en agua es de aproximadamente 30:1 o menos.

55 23. El procedimiento de la Reivindicación 6, efectivo para formar un éster de benzotriazolilcarbonato difuncional o superior del polímero no peptídico soluble en agua, que comprende además los pasos de: proporcionar un segundo polímero que tiene una pluralidad de grupos amino primarios; y

Hacer reaccionar el éster de 1-benzotriazolilcarbonato difuncional o superior del polímero no peptídico soluble en agua con al menos dos de los grupos amino del segundo polímero para formar un polímero reticulado.

60 24. El procedimiento de la Reivindicación 23, en el que el segundo polímero está seleccionado de entre el grupo que consiste en proteínas, aminopoli(etilenglicol), aminocarbhidratos y poli(vinilamina).

65 25. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 22, que comprende además el paso de hacer reaccionar el éster de 1-benzotriazolilcarbonato del polímero no peptídico soluble en agua con un aminoácido para formar un derivado del aminoácido.

26. El procedimiento de la Reivindicación 25, en el que el aminoácido es lisina.

ES 2 321 800 T3

36. El procedimiento de la Reivindicación 35, en el que R' es metoxi.

37. El procedimiento de la Reivindicación 35, en el que R' es un grupo funcional seleccionado de entre el grupo que
5 consiste en hidroxilo, hidroxilo protegido, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidrato de aldehído, alque-
nilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina protegida, hidrazida protegida, tiol, tiol protegido, ácido
carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina,
yodoacetamida, epóxido, glioxal, diona, mesilato, tosilato y tresilato.

10 38. Éster de 1-benzotriazolilcarbonato de un polímero no peptídico soluble en agua, que se puede obtener mediante
el procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 22.

39. Un polímero reticulado, que se puede obtener mediante el procedimiento de la Reivindicación 23 o 24.

15 40. Un derivado de un aminoácido, que se puede obtener mediante el procedimiento de una cualquiera de las
Reivindicaciones 25 a 28.

41. Un derivado polimérico de una proteína, que se puede obtener mediante el procedimiento de la Reivindicación
29.

20 42. Un conjugado de un polímero activo biológicamente, que se puede obtener mediante el procedimiento de una
cualquiera de las Reivindicaciones 30 a 33.

25

30

35

40

45

50

55

60

65