

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 967**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
C08G 69/10 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07725981 .0**
96 Fecha de presentación: **12.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2027145**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54 Título: **Un procedimiento para la preparación de ácido poli-alfa-glutámico y sus derivados**

30 Prioridad:
15.06.2006 EP 06012351
15.06.2006 US 813787 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2012

73 Titular/es:
**CELL THERAPEUTICS, INC. - SEDE
SECONDARIA
VIA ARIOSTO, 23
20091 BRESSO, IT y
CELL THERAPEUTICS, INC.**

72 Inventor/es:
**MCKENNON, Marc;
DA RE, Giovanni;
FELICIOTTI, Luca;
ARTICO, Marco;
PARDI, Gianluca y
GRUGNI, Mario**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 387 967 T3

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

DESCRIPCIÓN

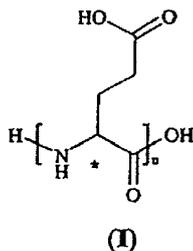
Un procedimiento para la preparación de ácido poli-alfa-glutámico y sus derivados

Campo de la invención.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ácido poli- α -glutámico y sus derivados.

5 Fundamento de la invención.

El ácido poli- α -glutámico de fórmula (I)



se utiliza actualmente como sistema de suministro de fármacos, por ejemplo para la preparación de conjugados con una amplia variedad de fármacos que contienen un grupo amino primario o secundario, así como grupos hidroxilo primarios, secundarios o terciarios. La conjugación se puede producir directamente o por medio de un enlazador adecuado, por ejemplo un aminoácido o un hidroxilácido. Véanse, por ejemplo, el documento EP0932399, Advanced Drug Delivery Reviews, Volumen 54, número 5, 2002, páginas 695-713 y Journal of Controlled Release, Volumen 74, números 1 - 3, 2001, Páginas 243 - 247.

El ácido poli- α -glutámico puede ser sintetizado por polimerización del ácido glutámico protegido adecuadamente. El documento US 3.635.909 describe, entre otras cosas, la polimerización del γ -(terc-butyl) éster de N-carboxi anhídrido del ácido D-glutámico en una mezcla de 1,2-dicloroetano/1,4-dioxano utilizando 4-metil-2-pirrolidona de sodio como iniciador.

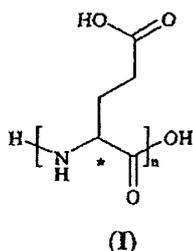
Varios métodos para la preparación de ácido poli- γ -bencil- α -glutámico se describen en el documento WO 01/94379 A2. La eliminación del grupo protector bencilo de los polímeros se realiza con ácido bromhídrico, para dar ácidos poli- α -glutámicos.

La preparación de ácido poli- α -glutámico por polimerización del N-carboxi anhídrido de γ -bencil-L-glutámico usando octadecilamina como iniciador se describe en Mol. Cryst. Liq. Cryst., 1987, Vol. 153, pp 347 - 356. El ácido poliglutámico protegido obtenido se desprotege usando hidrólisis básica. El polímero obtenido contiene un máximo de 20 aminoácidos y lleva una cadena lipófila C 18 en el extremo C-terminal, que se origina del iniciador.

La preparación de poli-alfa-aminoácidos funcionalizados N-terminalmente usando la polimerización de los N-carboxi anhídridos de aminoácidos se describe en el documento WO 99/64495 A.

Descripción de la invención.

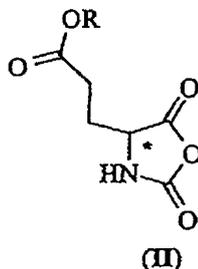
La presente descripción muestra que la elección apropiada del disolvente y del iniciador permite el control del peso molecular del ácido poli- α -glutámico preparado a partir de ésteres terciarios de N-carboxi anhídrido del ácido α -glutámico. En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ácido poli- α -glutámico (I)



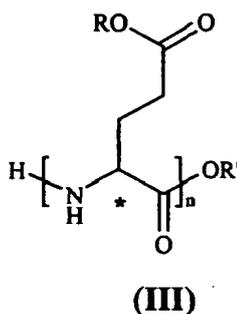
en donde n es un número entero comprendido entre 60 y 310, de forma que el ácido poli- α -glutámico tiene un peso molecular que varía en el intervalo entre 8.000 y 40.000 Da, preferentemente de 10.000 a 35.000 Da, más preferen-

temente de 13.000 a 16.000 Da, y con un índice de polidispersidad que normalmente es ≤ 2 , preferentemente $\leq 1,5$, comprendiendo dicho procedimiento:

- a. la polimerización de un éster y terciario de N-carboxi anhídrido del ácido α - glutámico de fórmula (II)



- 5 en la que R se elige entre t-butilo, 1,1-dimetilpropilo y 1,1-dimetilbutilo, y es preferentemente un grupo t-butilo ya sea en agua o en un disolvente orgánico seleccionado de tetrahidrofurano (THF), 1,4-dioxano, dimetilformamida (DMF), 1,4-dioxano/DMF y mezclas de 1,4-dioxano y tetrahidrofurano con un iniciador elegido entre terc-butóxido de potasio (t-BuOK), metóxido de sodio (MeONa), diisopropiltilamina, 1,8-diazabicyclo [5,4,0]undec-7-eno (DBU), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), dimetil éster del ácido glutámico, y γ -terc-butil éster del ácido glutámico, para dar un compuesto de fórmula (III)
- 10



- 15 en la que n y R son como se definen anteriormente y R' es hidrógeno cuando el iniciador se elige entre diisopropiltilamina, 1,8-diazabicyclo [5,4,0] undec-7-eno (DBU), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), dimetil éster del ácido glutámico y γ -terc-butil éster del ácido glutámico o un grupo t-butilo o metilo cuando el iniciador es t-BuOK y MeONa, respectivamente, seguida por

- b. hidrólisis ácida de los grupos éster.

A lo largo de toda esta memoria, el símbolo * indica un centro quiral, y el término ácido glutámico abarca tanto la forma L como la D, ya sea como isómeros puros o como mezcla racémica.

- 20 La etapa a) se lleva a cabo normalmente a una temperatura que se encuentra en el intervalo entre 10 y 50 ° C, con una concentración de éster y de N-carboxi anhídrido de ácido α - glutámico que varía en el intervalo de 0,1 a 0,3 M. De acuerdo con una realización preferida, el proceso se lleva a cabo utilizando 1,4-dioxano como disolvente y DBU como iniciador.

- 25 La relación molar de éster y de N-carboxi anhídrido del ácido α - glutámico a iniciador se encuentra generalmente en el intervalo entre 2 y 25; la relación molar de éster y de N-carboxi anhídrido del ácido α - glutámico a éster y de ácido α - glutámico es 100.

- 30 La etapa b) puede llevarse a cabo utilizando cualquier reactivo utilizado convencionalmente para la eliminación de los terc-butil ésteres, como se expone en los ejemplos con que se describen en "Protective groups in organic synthesis" ("Grupos protectores en síntesis orgánica"), Tercera edición, Theodora W. Greene y Peter GM Wuts, una publicación de Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., páginas 406 – 408, y las referencias citadas en dicho texto. Las condiciones preferidas incluyen ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico y mezclas de agua y ácido fórmico, a una temperatura que se encuentra en el intervalo entre 20 y 60 °C; el TFA se utiliza en una cantidad de 100 v/p, mientras que el ácido fórmico y las mezclas de agua y ácido fórmico se utilizan en cantidades de 20 a 50 v/p.

- 35 El procedimiento de la invención es adecuado para preparar tanto la forma D como la L de los ácidos poli- α - glutámicos, en particular la forma L. Además, los ácidos poli- α - glutámicos preparados de acuerdo con la invención

se pueden convertir fácilmente en sus sales ácidas o básicas, por reacción con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido perclórico, o con bases inorgánicas tales como los hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos y el hidróxido de amonio.

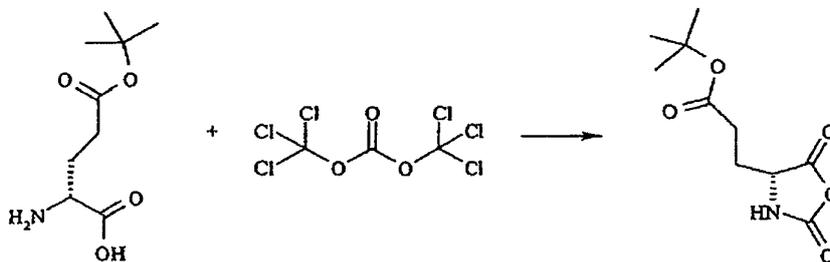
5 El procedimiento de la invención proporciona ácido poli- α -glutámico con un peso molecular medio ponderado (Mw), determinado mediante cromatografía de permeación en gel combinada con la detección de dispersión de luz láser de ángulo múltiple, que se encuentra en el intervalo dentro de los valores definidos anteriormente, preferentemente entre 13.000 y 16.000 Da y con un índice de polidispersidad 1,5. Esto es particularmente ventajoso, ya que los procedimientos descritos en la literatura, a través de diferentes grupos protectores (por ejemplo, bencilo, metilo o etilo; véase Polymer monographs, Volumen 9: H. Block, Poly (γ -bencil-L-glutamato) and other glutamic acid containing polymers (Poli (γ -bencil-L-glutamato) y otros polímeros que contienen ácido glutámico) Editado por B. Huglin, Universidad de Salford), proporciona materiales de peso molecular no controlado y muy alto, que con frecuencia requieren separación cromatográfica para aislar los ácidos poli- α -glutámicos que tienen el margen de peso molecular deseado.

15 Además, el procedimiento de la invención permite evitar la formación espontánea de un éster piroglutámico en el término amino, que normalmente ocurre durante la polimerización utilizando, por ejemplo, γ -bencilo, γ -metil o γ -etil éster de N-carboxi anhídrido de ácido glutámico. De hecho, los ácidos poli- α -glutámicos actualmente disponibles muestran un término piroglutámico, o bien un término amino, o una mezcla de los mismos. La supresión de la formación de un término piroglutámico se consigue, en particular, cuando se utiliza como material de partida un compuesto de fórmula (II), en la que R es un grupo t-butilo. Los γ -ésteres de ácidos poli- α -glutámicos con un término amino libre pueden entonces hacerse reaccionar bien sea con cantidades estequiométricas de ácido piroglutámico o bien con otros ácidos adecuados, para alcanzar el 100% de conversión en el ácido poli- α -glutámico N-rematado.

La invención se ilustrará con mayor detalle en lo que sigue en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1.

Etapa a - Preparación de L- α -Glu-NCA- γ -tBu éster



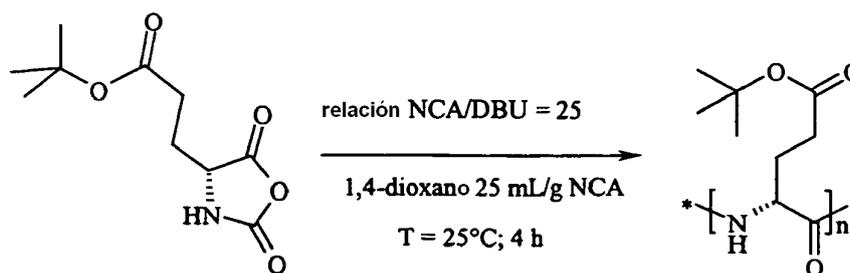
25 Se pusieron 40,17 g de trifosgeno (0,135 moles; fosgeno/éster L-Glu- γ -tBu 2,74/1) y 862,5 mL de THF, bajo nitrógeno, en un reactor de 1 L con camisa, equipado con un agitador mecánico. El reactor fue termostatzado a 20 °C y la mezcla se agitó hasta la disolución completa del trifosgeno (se necesitan unos minutos), y a continuación se añadieron 30 g de L- α -Glu- γ -tBu éster (0,148 moles) en una sola porción y de forma bastante rápida. La suspensión resultante se dejó reaccionar durante 2 horas a 20 °C. Al comienzo se observó efecto exotérmico (4 °C), después se disolvió el sólido a medida que progresaba la reacción; al cabo de aproximadamente 30 minutos se obtuvo una solución clara.

35 Al final de la reacción, el disolvente se evaporó bajo presión reducida, manteniendo la temperatura de la camisa por debajo de 20 °C; la destilación era bastante tumultuosa. La destilación continuó hasta que se obtuvo un residuo denso y oleoso, sin sólidos (se esperan aproximadamente 80 mL de residuo). Al final de la destilación se añadieron en gotas 750 mL de n-heptano a lo largo de aproximadamente 15 minutos y la mezcla se agitó bajo nitrógeno a 20/23 °C durante 1 hora, hasta la cristalización completa del producto. Normalmente, la cristalización comienza después de la adición de 150 mL de n-heptano.

40 El sólido blanco puro resultante se filtró en un embudo de Buchner y se lavó con 3 x 90 mL de n-heptano, luego se secó en estufa bajo vacío dinámico a 20/25 °C durante no más de 20 horas. El sólido ha de utilizarse lo antes posible y debe almacenarse bajo vacío estático en presencia de gel de sílice.

Partiendo de 30 g de éster L- α -Glu- γ -tBu, se obtuvieron 23,3 g de éster L- α -Glu-NCA- γ -tBu (68,8% de rendimiento).

Etapa b - Polimerización de N-carboxi anhídrido de γ -(terc-butil) éster de ácido α -L-glutámico (NCA) para dar γ -(terc-butil) éster de ácido poli- α -L-glutámico.



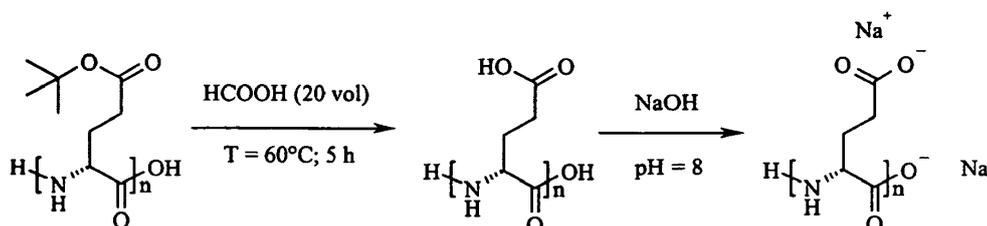
Se disolvió la base libre 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU; MW 152,24; 585 mg, 3,84 mmoles) en 1,4-dioxano (5 mL de la cantidad total) en unos pocos minutos.

- 5 En un reactor de vidrio de 1 L, dotado con camisa, se mezclaron a 25 °C 1,4-dioxano (550 mL) y N-carboxi anhídrido del γ (terc-butil) éster del ácido α -L-glutámico (NCA) (22 g, 96 mmol; NCA/DBU = 25) hasta que la disolución fue completa.

La solución resultante se añadió muy rápidamente a la solución de DBU preparada con anterioridad. Al instante apareció un precipitado y se observó un bajo efecto exotérmico (aproximadamente 3 °C).

- 10 La mezcla se agitó durante 4 horas, después se vertió agua (1100 mL) lentamente en un tiempo de 30 a 40 minutos. Después de 30 minutos más de agitación a 25 °C, el sólido precipitado se recogió mediante filtración y se lavó con agua (3 x 50 mL). El sólido blanco recuperado se secó después bajo vacío a 40 °C para dar 16,4 g de material puro, t-BuPG (92% de recuperación; DPN= 137,2, grado de polimerización medio numérico; Mn = 25.400 Da, peso molecular medio numérico, a partir de la $^1\text{H-NMR}$).

Etapa c - Hidrólisis de γ -(terc-butil) éster del ácido poli- α -L-glutámico para dar ácido poli- α -L-glutámico.



- 15 Se suspendió γ -(terc-butil) éster del ácido poli- α -L-glutámico sólido (4 g) en ácido fórmico al 99% (80 mL, 20 volúmenes) bajo una atmósfera de nitrógeno, en un reactor de vidrio de 100 mL dotado con camisa. La mezcla se agitó a 60 °C durante 5 horas. Después de calentar aproximadamente 30 minutos, la suspensión viró a solución, y después empezó a precipitar un sólido.

- 20 La mayor parte del ácido fórmico se separó después mediante destilación a presión reducida ($p = 15$ torr; temperatura interna siempre inferior a 60 °C). El ácido fórmico residual se eliminó por destilación azeotrópica con tolueno (2 x 40 mL; $T < 40$ °C).

- 25 El residuo resultante se suspendió en agua (40 mL) y la mezcla se enfrió a una temperatura de 3 a 5 °C, luego se añadió cuidadosamente NaOH al 30% w/w hasta alcanzar un pH de 8. Una vez que el pH era estable a 23 - 25 °C, la solución resultante se filtró a través de un micromicrofiltro de 0,22 μm .

La solución transparente se acidificó utilizando ácido sulfúrico, hasta un pH de 2,5, y después la suspensión resultante se agitó durante 2 horas. El sólido precipitado se separó por filtración y se secó bajo vacío (30 °C durante la noche). Se recuperó una torta blanca (2,7 g) con un Mw = 13.900 Da y una polidispersidad de 1,04 (GPC - MALLS).

Ejemplo 2

- 30 Se disolvió N-carboxi anhídrido de γ -(terc-butil) éster del ácido α -L-glutámico (3,95 g, 17,2 mmoles), bajo corriente de nitrógeno, en THF (100 mL) para llegar a una concentración de 0,039 g/mL (0,17 M). La velocidad de agitación se ajustó en 800 rpm.

Entonces se añadió muy rápidamente DBU (105 mg, A/I = 25) mediante una jeringuilla y la mezcla se agitó durante 4 horas a 22-23 °C. Se observó un ligero efecto exotérmico poco después de la adición del iniciador.

Después de esto, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y el residuo se lavó con 1,4-dioxano fresco (100 mL). Después se añadieron dos volúmenes de agua a la mezcla de reacción, que se agitó durante 30 minutos. El sólido precipitado se recogió, se lavó con agua y se secó bajo vacío a 40 °C durante al menos 12 horas.

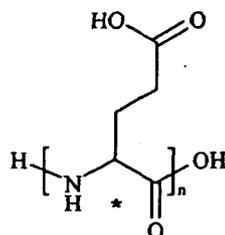
5 Se obtuvieron 2,85 g de γ -(terc-butil) éster de ácido poli- α -L-glutámico- (90% de recuperación) en forma de un polvo blanco con $M_n = 34.100$ Da y $DP_n = 184$ (por 1H -RMN).

El γ -(terc-butil) éster del ácido poli- α -L-glutámico resultante se hidrolizó después en HCOOH al 99% caliente de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa c del Ejemplo 1, dando aproximadamente 1,7 g de ácido poli- α -L-glutámico (84% de recuperación) con un $M_w = 25700$ y una polidispersidad = 1.2, $n \approx 100$, de acuerdo con la cromatografía de permeación en gel acoplada al análisis de dispersión de luz láser de ángulo múltiple.

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de ácido poli- α -glutámico de fórmula (I)

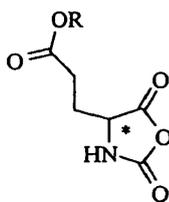


(I)

- 5 en la que el símbolo * indica un centro quiral, n es un número entre 60 y 310, de forma que el ácido poli- α -glutámico tiene un peso molecular que se encuentra en el intervalo de 8.000 a 40.000 Da,

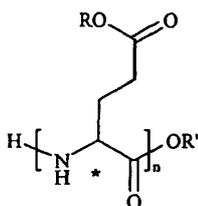
comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) polimerización de un éster y terciario del N-carboxi anhídrido del ácido α -glutámico de fórmula (II)



(II)

- 10 en la que el símbolo * es como se definió anteriormente, y R se elige entre t-butilo, 1,1-dimetilpropilo y 1,1-dimetilbutilo, en agua o en un disolvente orgánico elegido entre: tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, dimetilformamida, mezclas de 1,4-dioxano y DMF y de 1,4-dioxano y tetrahidrofurano, con un iniciador elegido entre terc-butóxido de potasio, metóxido de sodio, diisopropiletilamina, 1,8-diazabicyclo [5,4,0] undec-7-eno, dimetilaminopiridina y γ -terc-butil éster del ácido L glutámico, para dar un compuesto de fórmula (III)



(III)

- 15 en la que * y R son como se han definido anteriormente y R' es hidrógeno cuando el iniciador se elige entre diisopropiletilamina, 1,8-diazabicyclo [5,4,0] undec-7-eno, 4-dimetilaminopiridina, dimetil éster del ácido glutámico y γ -terc-butil éster del ácido glutámico, o R' es un grupo t-butilo o metilo cuando el iniciador es el terc-butóxido de potasio y metóxido de sodio, respectivamente, y seguida por

- b) la hidrólisis ácida de los grupos éster γ - y α - para dar un compuesto de fórmula (I).

- 20 2. El procedimiento según la reivindicación 1^a, en el que el disolvente es 1,4-dioxano y el iniciador es 1,8-diazabicyclo [5,4,0] undec-7-eno.

3. El procedimiento según la reivindicación 1^a o 2^a, en el que la temperatura se encuentra en el intervalo de 10 a 50°C.

- 25 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 3^a, en el que la concentración del éster terciario del N-carboxi anhídrido del ácido α -glutámico se encuentra en el intervalo de 0,1 a 0,3 M.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 4^a, en el que la etapa b) se lleva a cabo en un ácido elegido entre ácido trifluoroacético, ácido fórmico y mezclas de agua y ácido fórmico, a una temperatura en el intervalo de 20 a 60 ° C.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 5^a, en el que R es t-butilo.
- 5 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 6^a, en el que el peso molecular del ácido poli- α -glutámico (I) se encuentra en el intervalo de 13.000 a 16.000 Da y el índice de polidispersidad es $\leq 1,5$.