



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 402 T2** 2006.06.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 973 819 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 402.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/04966**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 910 376.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/041562**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **31.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C08G 63/91** (2006.01)

C08L 89/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

821055 20.03.1997 US

(73) Patentinhaber:

Enzon, Inc., Piscataway, N.J., US

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**GREENWALD, B., Richard, Somerset, US;
MARTINEZ, J., Anthony, Hamilton Square, US**

(54) Bezeichnung: **NICHT ANTIGEN WIRKENDE VERZWEIGTE POLYMERKONJUGATE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft verzweigte Polymere, die beim Verlängern der Zirkulationslebensdauer in vivo von biologisch aktiven Materialien nützlich sind. Die Erfindung betrifft auch Konjugate, die mit den Polymeren hergestellt wurden.

[0002] Einige der anfänglichen Konzepte des Kuppelns von Peptiden oder Polypeptiden an Poly(ethylenglycol) PEG und ähnlichen wasserlöslichen Poly(alkylenoxiden) sind im US-Patent Nr. 4,179,337 offenbart, wobei die Offenbarung davon hier unter Bezugnahme eingebracht ist. Polypeptide, die mit diesen Polymeren modifiziert sind, weisen eine reduzierte Immunogenität/Antigenität auf und zirkulieren im Blutstrom länger als unmodifizierte Versionen.

[0003] Zum Konjugieren von Poly(alkylenoxiden) wird eine der Hydroxyendgruppen in eine reaktive funktionelle Gruppe umgewandelt. Dieser Prozess wird häufig als „Aktivierung“ bezeichnet und das Produkt „aktiviertes Poly(alkylenoxid)“ genannt. Andere im Wesentlichen nicht antigene Polymere werden gleichermaßen „aktiviert“ oder funktionalisiert.

[0004] Die aktivierten Polymere werden mit einem therapeutischen Mittel mit nukleophilen funktionellen Gruppen, die als Anlagerungsstellen dienen, umgesetzt. Bei einer nukleophilen funktionellen Gruppe, die allgemein als Anlagerungsstelle verwendet wird, handelt es sich um die ϵ -Aminogruppen von Lysinen. Freie Carbonsäuregruppen, geeigneterweise aktivierte Carbonylgruppen, oxidierte Kohlenhydrateinheiten und Mercaptogruppen wurden ebenso als Anlagerungsstellen verwendet.

[0005] Insulin und Hämoglobin wurden unter den ersten therapeutischen Mitteln konjugiert. Diese relativ großen Polypeptide enthalten mehrere freie ϵ -Aminanlagerungsstellen. Eine ausreichende Anzahl an Polymeren könnte angelagert werden, um die Immunogenität zu reduzieren und die Zirkulationslebensdauer ohne deutlichen Verlust an biologischer Aktivität zu erhöhen.

[0006] Eine übermäßige Polymerkonjugation und/oder Konjugation unter Beteiligung einer aktiven Stelle einer therapeutischen Einheit, wobei Gruppen mit Bioaktivität gebunden sind, sind zu finden, führen jedoch häufig zum Verlust an Aktivität und folglich therapeutischer Nützlichkeit. Dies ist häufig der Fall mit Peptiden mit niedrigerem Molekulargewicht, die wenige Anlagerungsstellen aufweisen, die nicht mit Bioaktivität verbunden sind. Vielen therapeutischen Mitteln, bei welchen es sich um keine Peptide handelt, fehlt auch eine ausreichende Anzahl an Anlagerungsstellen, um die Nutzen der Polymermodifikation zu erhalten.

[0007] Bei einem Vorschlag zum Bewältigen dieser vorstehend erörterten Probleme handelt es sich darum, längere Polymere mit höherem Molekulargewicht zu verwenden. Diese Materialien sind jedoch schwierig herzustellen und teuer zu verwenden. Des Weiteren stellen sie wenig Verbesserung gegenüber leicht erhältlichen Polymeren bereit.

[0008] Bei einer anderen vorgeschlagenen Alternative handelt es sich darum, zwei Polymerstränge über einen Triazinring von Aminogruppen eines Proteins anzulagern. Siehe z.B. Enzyme, 26, 49–53 (1981) und Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 188, 364–9 (1988). Triazin ist jedoch eine toxische Substanz, die auf akzeptable Gehalte nach der Konjugation schwierig zu reduzieren ist. Zudem ist Triazin eine planare Gruppe und kann nur zweifach polymersubstituiert sein. Die planare Struktur sperrt die zwei Polymerketten fest an Stelle. Dies beschränkt den Nutzen der Polymerkonjugation auf etwa denselben, wie denjenigen, der durch Erhöhen der Polymerkettenlänge erhalten wird. Folglich würden aktivierte Polymere, die nicht auf Triazinbasis vorliegen, wesentliche Nutzen auf dem Fachgebiet bieten.

[0009] In den vorstehend erwähnten Quellen wurden jedoch die biologisch aktiven Polymerkonjugate mit im Wesentlichen hydrolyseresistenten Bindungen (Verbindungen) zwischen dem Polymer und der parentalen biologisch aktiven Einheit gebildet. Folglich wurden langlebige Konjugate hergestellt, die von eher dauerhafter Natur als Prodrugs an sich (wo das parentale Molekül letztendlich in vivo freigesetzt wird) sind.

[0010] Zudem wurden im Laufe der Jahre auch mehrere Verfahren zur Herstellung von Prodrugs vorgeschlagen. Prodrugs schließen chemische Derivate einer biologisch aktiven parentalen Verbindung ein, die durch Verabreichung letztendlich die aktive parentale Verbindung in vivo freisetzt. Die Verwendung von Prodrugs gewährt es dem Fachmann, den Einsatz und/oder die Dauer der Wirkung einer biologisch aktiven Verbindung in

vivo zu modifizieren. Prodrugs sind häufig biologisch inerte oder im Wesentlichen inaktive Formen der parentalen oder aktiven Verbindung. Die Freisetzungsgeschwindigkeit des aktiven Arzneimittels wird durch mehrere Faktoren, einschließlich der Hydrolysegeschwindigkeit der Verbindungsgruppe, die die parentale biologisch aktive Verbindung mit dem Prodrugträger verbindet, beeinflusst.

[0011] Prodrugs auf der Basis von Ester- oder Phosphatverbindungen wurden erörtert. In den meisten Fällen stellt der jeweilige Typ der zum Bilden der Prodrug verwendeten Esterverbindung $T_{1/2}$ für eine Hydrolyse von bis zu mehreren Tagen in wässrigen Umgebungen bereit. Obwohl es zu erwarten wäre, dass eine Prodrug gebildet wird, wird der Hauptteil des Konjugats eliminiert, bevor eine ausreichende Hydrolyse in vivo erzielt wurde. Es wäre deshalb bevorzugt, Prodrugs bereitzustellen, die Verbindungen aufweisen, die eine derart schnellere Hydrolyse der Polymer-Arzneimittelverbindung in vivo gewähren, dass die Arzneimittelverbindung schneller gebildet wird.

[0012] Es wurde auch überraschend gefunden, dass dann, wenn nur ein oder zwei Polymere mit einem Molekulargewicht von weniger als 10.000 (jeweils) an biologisch aktiven Verbindungen wie organischen Einheiten konjugiert werden, die resultierenden Konjugate häufig schnell in vivo eliminiert werden. Tatsächlich werden derartige Konjugate häufig so schnell von dem Körper entfernt, dass sogar Bei Verwendung einer im Wesentlichen hydrolysebeständigen Esterverbindung nicht genug des parentalen Moleküls regeneriert wird.

[0013] Wenn auch die vorstehenden Prodrugs auf der Basis von Konjugaten einer parentalen Arzneimittelverbindung auf einem wasserlöslichen Polymer aus vielen Gründen, einschließlich einer übermäßig langsamen Hydrolyse der Bindung, nicht erfolgreich war, wurden die Arbeiten auf diesem Gebiet fortgesetzt. Es besteht immer noch Bedarf nach Verbesserungen in Prodrugs auf Polymerbasis und insbesondere Wegen der deutlichen Erhöhung der Nutzlast des Polymerteils der Prodrug. Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich mit diesen Unzulänglichkeiten.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] In einem Aspekt der Erfindung werden verzweigte, im Wesentlichen nicht antigene Polymere bereitgestellt, entsprechend der Formel



wobei (R) ein wasserlösliches nicht-antigenes Polymer einschließt;

(n) = 2;

(L) eine aliphatische Verbindungseinheit ist, die kovalent an (R) gebunden ist, und

(A) eine aktivierende funktionelle Gruppe darstellt, die sich einer nukleophilen Substitution unterziehen kann.

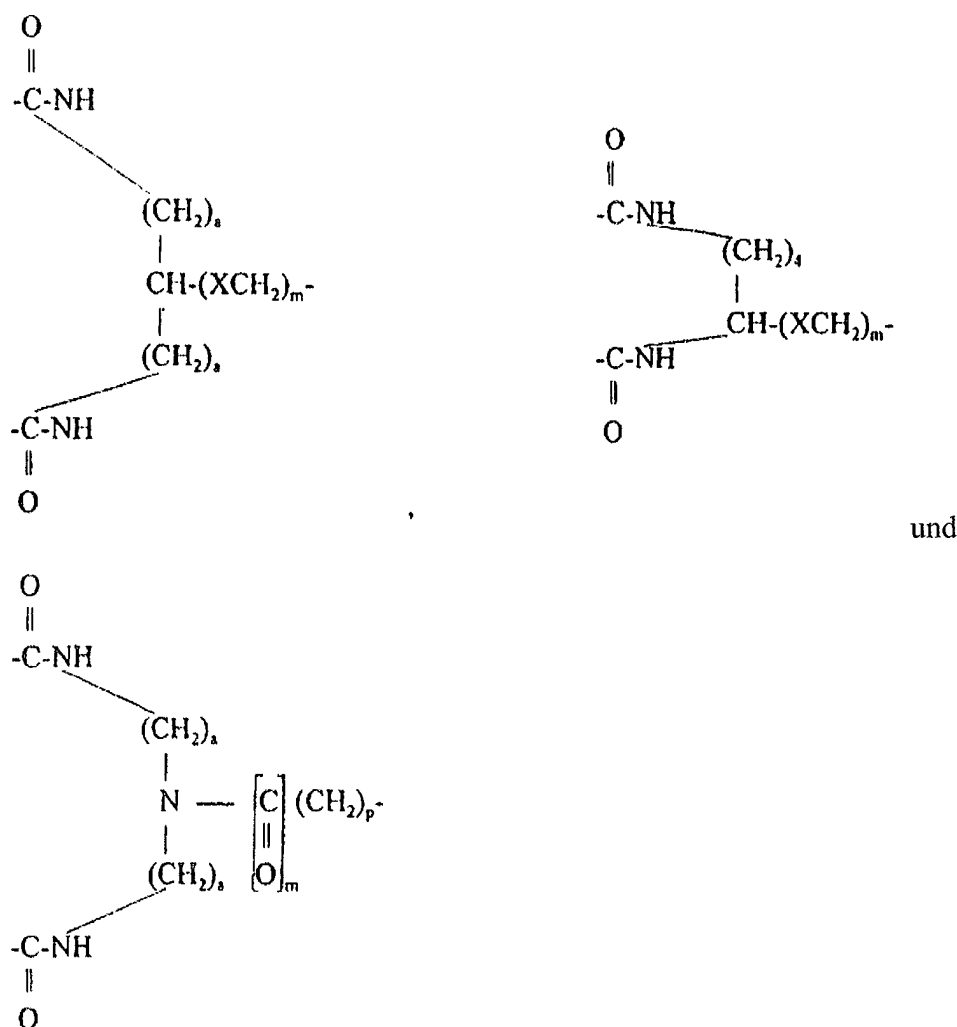
[0015] Zum Beispiel kann (A) eine Gruppe sein, die mit biologisch aktiven Nukleophilen oder Einheiten binden kann, die dasselbe tun können. In besonders bevorzugten Aspekten der Erfindung schließt (R) ein Poly(alkylenoxid) PAO wie ein Poly(ethylenglycol) (hier nachstehend PEG) ein.

[0016] Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung stellt verzweigte Polymere bereit, die eine terminale Carbonsäuregruppe enthalten, die bei der Bildung von Prodrugs auf Esterbasis nützlich ist. Die verzweigten Polymere weisen die Formel



auf, wobei (R), (n) und (L) wie vorstehend definiert sind.

[0017] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung schließt verzweigte Polymere derselben vorstehen dargelegten Formel, d.h. $(R)_nL-A$ ein, außer dass (L) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



wobei (a) eine ganze Zahl von 1–5 ist,

X O, NQ, S, SO oder SO₂ ist, wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, Aryl oder Aralkyl ist;

(m) 0 oder 1 ist

(p) eine positive ganze Zahl, vorzugsweise 1–6 ist;

(R) und (n) wie vorstehend definiert sind; und

(A) wie vorstehend definiert ist, einschließlich COOH wie in Formel (Ia) dargelegt.

[0018] Diese schirmartigen verzweigten Polymere der vorliegenden Erfindung (U-PAO's oder U-PEG's) reagieren mit biologisch aktiven Nukleophilen unter Bildung von Konjugaten. Der Punkt der Polymeranlagerung hängt von der funktionellen Gruppe (A) ab. Zum Beispiel kann (A) ein Succinimidylsuccinat oder Carbonat sein und mit ε-Aminolysinen reagieren. Alternativ dazu kann (A) eine Carbonsäure sein, die mit Hydroxygruppen, die in biologisch aktiven Nukleophilen zu finden sind, unter Bildung von Prodrugs auf Esterbasis reagieren können. Die verzweigten Polymere können auch aktiviert werden, um sich an eine beliebige primäre oder sekundäre Aminogruppe, Mercaptogruppe Carbonsäuregruppe, reaktive Carbonylgruppe oder dergleichen, die auf biologisch aktiven Materialien zu finden sind, zu binden. Andere Gruppen sind dem Fachmann klar.

[0019] Andere Aspekte der Erfindung schließen Konjugate, die biologisch aktive Materialien und ein oder mehrere der vorstehend beschriebenen verzweigten Polymere enthalten, sowie Verfahren zu deren Herstellung ein. Die biologisch aktiven Materialien schließen Proteine, Peptide, Enzyme, medizinische Chemikalien oder organische Einheiten, egal ob synthetisiert oder aus der Natur isoliert, ein. Die Verfahren schließen das Inkontaktbringen eines biologisch aktiven Materials, enthaltend ein Nukleophil, das sich einer Substitutionsreaktion unterziehen kann, mit einem vorstehend beschriebenen verzweigten Polymer unter Bedingungen, die zum Bewirken der Anlagerung ausreichend sind, während zumindest ein Teil der biologischen Aktivität beibehalten wird, ein.

[0020] Die vorliegende Erfindung schließt auch Verfahren zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten und Zuständen ein. In diesem Aspekt wird einem Säuger, der eine Behandlung benötigt, eine wirksame Menge

eines Konjugats verabreicht, das ein biologisch aktives Material, wie ein Protein, Enzym oder eine organische Einheit und ein verzweigtes Polymer der vorliegenden Erfindung enthält.

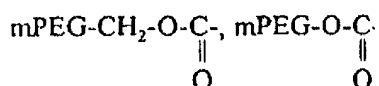
[0021] Bei einem der Hauptvorteile der vorliegenden Erfindung handelt es sich darum, dass die Verzweigung der Polymere den Materialien, mit welchen sie konjugiert werden, eine schirmartige dreidimensionale Schutzabdeckung verleiht. Dies steht im Gegensatz zu der schnurartigen Struktur von herkömmlichen Polymerkonjugaten. Außerdem gewährt die Verzweigung der Polymerketten von einer gemeinsamen Wurzel eine dynamische, nicht planare Wirkung in vivo. Folglich bieten die verzweigten Polymere gegenüber geradkettigen Polymeren mit gleichem Molekulargewicht einen wesentlichen Nutzen.

[0022] Bei einem zweiten Vorteil der verzweigten Polymere handelt es sich darum, dass sie Nutzen bereitstellen, die mit der Anlagerung von mehreren Polymersträngen an ein biowirksames Material bereitstellen, jedoch wesentlich weniger Konjugationsstellen benötigen. Die Vorteile der verzweigten Polymere sind für therapeutische Mittel mit wenig verfügbaren Anlagerungsstellen besonders drastisch. All die gewünschten Eigenschaften der Polymerkonjugation werden realisiert, und der Verlust an Bioaktivität wird minimiert.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

1. POLYMERSUBSTITUENTEN UND DEFINIERTE FORMEL (I)

[0023] Die aktivierten verzweigten Polymere der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise aus Poly(alkylenoxiden) (PAOs) hergestellt, die bei Raumtemperaturen wasserlöslich sind. In dieser Gruppe befinden sich alpha-substituierte Polyalkylenoxiderivate wie Methoxypoly(ethylenglycole) (mPEG) oder andere geeignete alkylsubstituierte PAO-Derivate wie diejenigen, die mono- oder biterminale C₁-C₄-Gruppen enthalten. Geradkettige, nicht antigene Polymere wie Monomethyl-PEG-Homopolymere, einschließlich



und mPEG-O-CH₂-CH₂-

sind bevorzugt. Alternative Polyalkylenoxide wie andere Poly(ethylenglycol)homopolymere, andere Alkylpoly(ethylenoxid)blockcopolymere und Copolymere von Blockcopolymeren von Poly(alkylenoxiden) sind ebenso nützlich.

[0024] Die Polymere der vorliegenden Erfindung sind durch die Formel (I) dargestellt:



wobei (R) ein wasserlösliches im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer einschließt;

(n) = 2;

(L) eine aliphatische Verbindungseinheit ist, die kovalent an (R) gebunden ist; und

(A) eine aktivierende funktionelle Gruppe darstellt, die sich einer nukleophilen Substitution unterziehen kann.

[0025] Jedes (R) kann eine wasserlösliche, im Wesentlichen nicht-antigene Polymerkette sein. Sind die Polymerketten PEG oder mPEG, ist es bevorzugt, dass jede Kette ein Molekulargewicht zwischen etwa 200 und etwa 80.000 Dalton und vorzugsweise zwischen etwa 2.000 und etwa 42.000 Dalton aufweist. Molekulargewichte von etwa 5.000 bis etwa 20.000 Dalton sind besonders bevorzugt.

[0026] Alternative Polymersubstanzen schließen Materialien wie Dextrane, Polyvinylpyrrolidone, Polyacrylamide oder andere ähnliche nicht-immunogene Polymere ein. Derartige Polymere können auch für den Einschluss in die Erfindung funktionalisiert oder aktiviert werden. Vorstehendes ist nur veranschaulichend und soll den Typ von nicht-antigenen Polymeren, die zur Verwendung geeignet sind, nicht einschränken.

[0027] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist (R) ein verzweigtes Polymer für eine sekundäre und tertiäre Verzweigung von einem bioaktiven Material. Bifunktionelle und heterobifunktionelle aktive Polymerester können ebenso verwendet werden. Die Polymere der vorliegenden Erfindung können auch mit bifunktionellen Materialien wie Poly(alkylenglycol)diaminen unter Bildung von gegenseitig durchdringenden Polymernetzwerken, die zur Verwendung in durchlässigen Kontaktlinsen, Wundverbänden, Arzneimittelabgabevorrichtungen und dergleichen geeignet sind, copolymerisiert werden. Die sterischen Beschränkungen und Wasserlöslichkeit derartiger Verzweigung sind dem Fachmann leicht erkenntlich. Vorzugsweise sollte das Molekular-

gewicht von mehrfach verzweigten Polymeren 80.000 Dalton nicht übersteigen.

[0028] Wie in Formel (I) oder 2 dargestellt, sind Polymerketten, bezeichnet hier als (R), an die aliphatische Verbindungseinheit (L) gebunden. Derartige aliphatische Verbindungen schließen substituierte Alkyldiamine und Triamine, Lysinester und Malonesterderivate ein. Die Verbindungseinheiten sind vorzugsweise nicht planar, sodass die Polymerketten nicht starr fixiert sind. Die Verbindungseinheit (L) ist auch das Mittel zum Anlagern der mehrfachen Polymerketten oder „Verzweigungen“ an (A), die Einheit, durch welche sich das Polymer an biowirksame Materialien anlagert.

[0029] (L) schließt vorzugsweise eine mehrfach funktionalisierte Alkylgruppe, enthaltend bis zu 18 und stärker bevorzugt zwischen 1–10 Kohlenstoffatome ein. Ein Heteroatom wie Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel kann in der Alkylkette eingeschlossen sein. Die Alkylkette kann auch am Kohlenstoff- oder Stickstoffatom verzweigt sein. In einem anderen Aspekt der Erfindung ist (L) ein einzelnes Stickstoffatom.

[0030] (L) und jedes (R) sind vorzugsweise durch eine Reaktion zwischen nukleophilen funktionellen Gruppen sowohl an (R) als auch an (L) gebunden. Jedes (R) ist geeigneterweise derart funktionalisiert, dass es sich einer nukleophilen Substitution unterzieht und an (L) bindet. Eine derartige Funktionalisierung von Polymeren ist dem Fachmann leicht verständlich.

[0031] Eine breite Vielzahl an Bindungen ist zwischen (R) und (L) erwogen. Urethan(carbamat)bindungen sind bevorzugt. Die Bindung kann z.B. durch Umsetzen einer Aminogruppe wie 1,3-Diamino-2-propanol mit Methoxypolyethylenglycolsuccinimidylcarbonat, beschrieben im US-Patent Nr. 5,122,614, wobei die Offenbarung davon hier unter Bezugnahme eingebracht ist, gebildet werden. Amidbindungen, die durch Umsetzen eines aminoterminierten, nicht-antigenen Polymers wie Methoxypolyethylenglycolamin (mPEG Amin) mit einer acylchloridfunktionellen Gruppe gebildet werden können.

[0032] Beispiele für andere Bindungen zwischen (R) und (L) schließen Ether-, Amin-, Harnstoff- und Thio- und Thiolanaloga davon sowie die Thio- und Thiolanaloga der vorstehend erörterten Urethan- und Amidbindungen ein. Die Bindungen werden durch dem Fachmann gut verständliche Verfahren gebildet. Andere geeignete Bindungen und deren Bildung kann unter Bezugnahme auf das vorstehend genannte US-Patent Nr. 4,176,337 bestimmt werden.

[0033] Die Einheit (A) der Formel (I) stellt Gruppen dar, die die verzweigten Polymere der vorliegenden Erfindung zur Konjugation mit biologisch aktiven Materialien „aktivieren“.

[0034] A) kann eine Einheit sein, ausgewählt aus:

I. funktionellen Gruppen, die mit einer Aminogruppe reagieren können, wie:

- a) Carbonaten wie p-Nitrophenyl oder Succinimidyl;
- b) Carbonylimidazol;
- c) Azlactonen;
- d) cyclischen Imidthionen; oder
- e) Isocyanaten oder Thioisocyanaten;

II. funktionellen Gruppen, die mit Carbonsäuregruppen und reaktiven Carbonylgruppen reagieren können, wie:

- a) primären Aminen; oder
- b) hydrazin- und hydrazidfunktionellen Gruppen wie die Acylhydrazinen, Carbazaten, Semicarbamaten, Thiocarbazaten usw;

III. funktionellen Gruppen die mit Mercaptosulphydrilgruppen reagieren können, wie Phenylglyoxalen, siehe z.B. US-Patent Nr. 5,093,531, wobei die Offenbarung davon hier unter Bezugnahme eingebracht ist;

IV. funktionellen Gruppen, die mit Hydroxygruppen reagieren können, wie (Carbon)säuren wie in Formel (Ia) oder anderen Nukleophilen, die mit einem elektrophilen Zentrum reagieren können. Eine nicht beschränkende Aufzählung schließt z.B. Hydroxy, Amino, Carboxyl, Thiolgruppen, aktives Methylen und dergleichen ein.

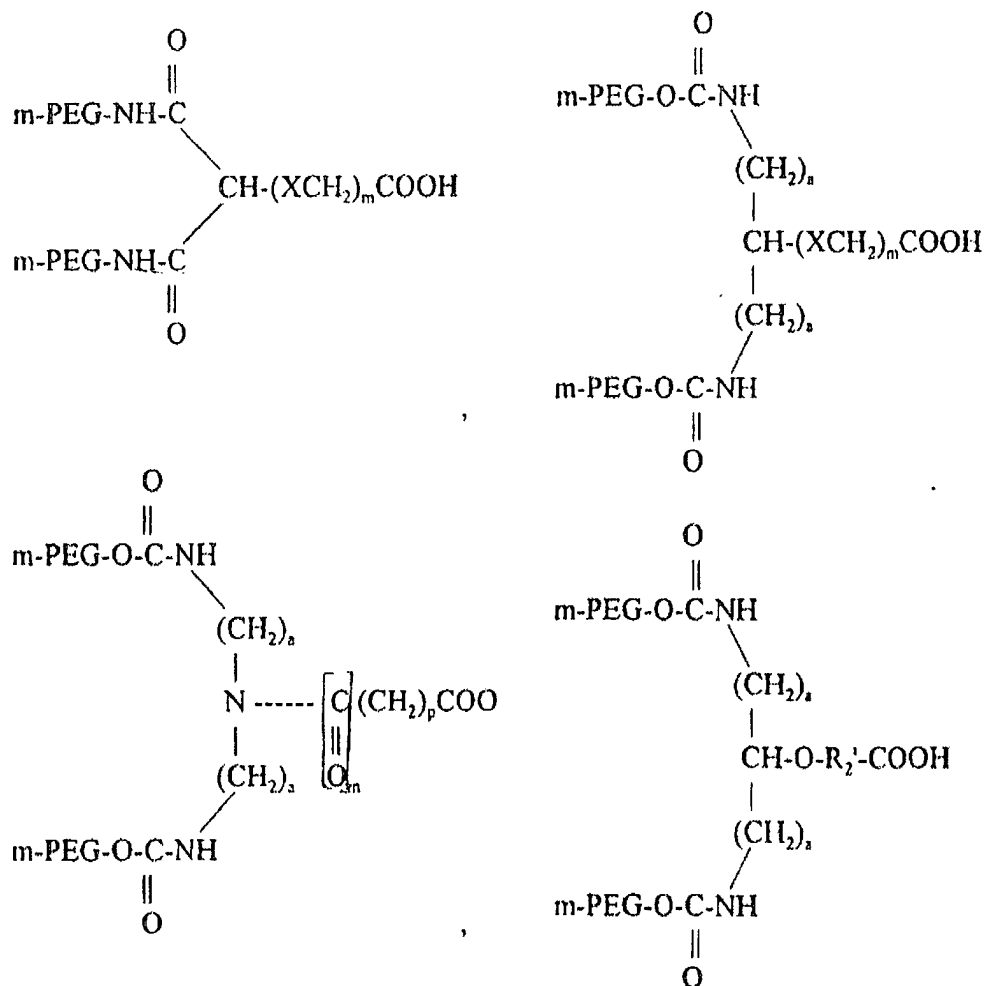
[0035] Die Einheit (A) kann auch eine Abstandhaltereinheit einschließen, die in der Nähe der aliphatischen Verbindungseinheit (L) lokalisiert ist. Die Abstandhaltereinheit kann ein Heteroalkyl, Alkoxy, Alkyl, enthaltend bis zu 18 Kohlenstoffatomen, oder sogar eine zusätzliche Polymerkette sein. Die Abstandhaltereinheiten können unter Verwendung von Standardsynthesetechniken addiert werden. Es ist klar, dass diese für (A) ausgewählten Einheiten neben biologisch aktiven Nukleophilen auch mit anderen Einheiten reagieren können.

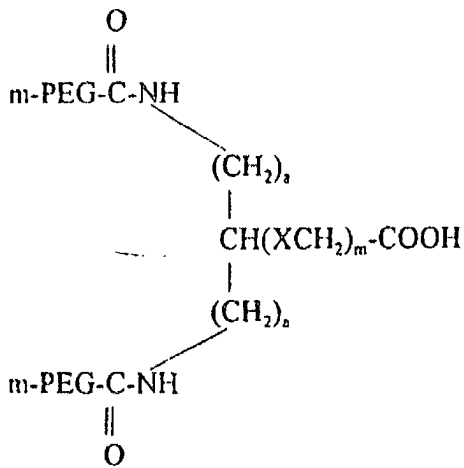
[0036] Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung stellt verzweigte Polymere bereit, die eine terminale Carbonsäuregruppe enthalten, die bei der Bildung von Prodrugs auf Esterbasis nützlich ist. Die verzweigten Polymere weisen die Formel:



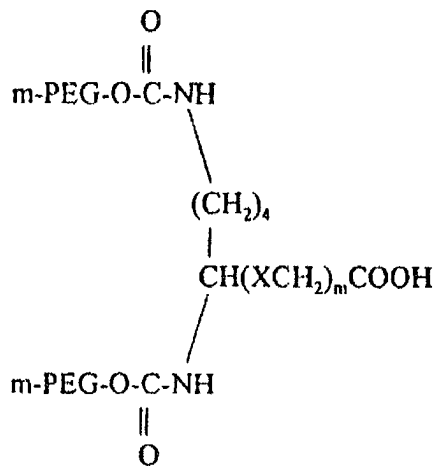
auf, wobei (R), (n) und (L) wie vorstehend definiert sind.

[0037] Einige besonders bevorzugte Verbindungen in diesem Aspekt der Erfindung schließen ein:





und



wobei (a) eine ganze Zahl von 1–5 ist;

(m) 0 oder 1 ist

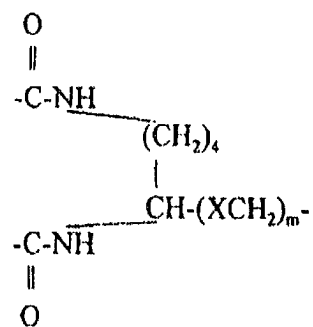
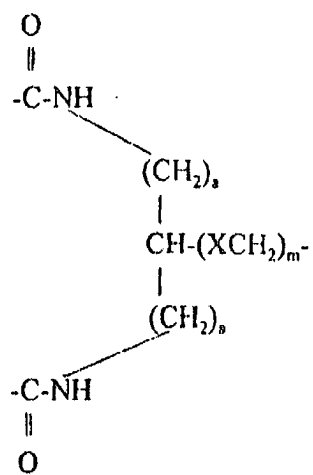
X O, NQ, S, SO oder SO₂ ist, wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, Aryl oder Aralkyl ist;

(p) eine 0 ganze Zahl von 1–6 ist; und

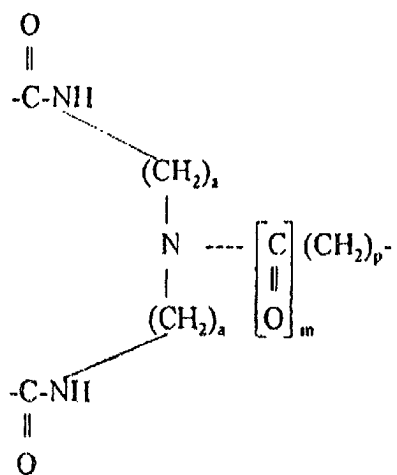
R₂ die vorstehend beschriebene entsprechende Abstandhaltereinheit R₂ darstellt, nachdem sie Substitutionsreaktionen unterzogen wurde, was zur Addition der terminalen Carbonsäuregruppe führt.

[0038] Es ist natürlich dem Fachmann leicht verständlich, dass das vorstehend dargestellte mPEG für veranschaulichende Zwecke durch jedes beliebige Polyalkylenoxid oder jedes beliebige andere im Wesentlichen hier beschriebene nicht-antigene Polymer ersetzt werden kann.

[0039] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung schließt verzweigte Polymere derselben wie vorstehend dargelegten Formel, d.h. (I) und (Ia): (R)_nL-A ein, außer dass (L) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

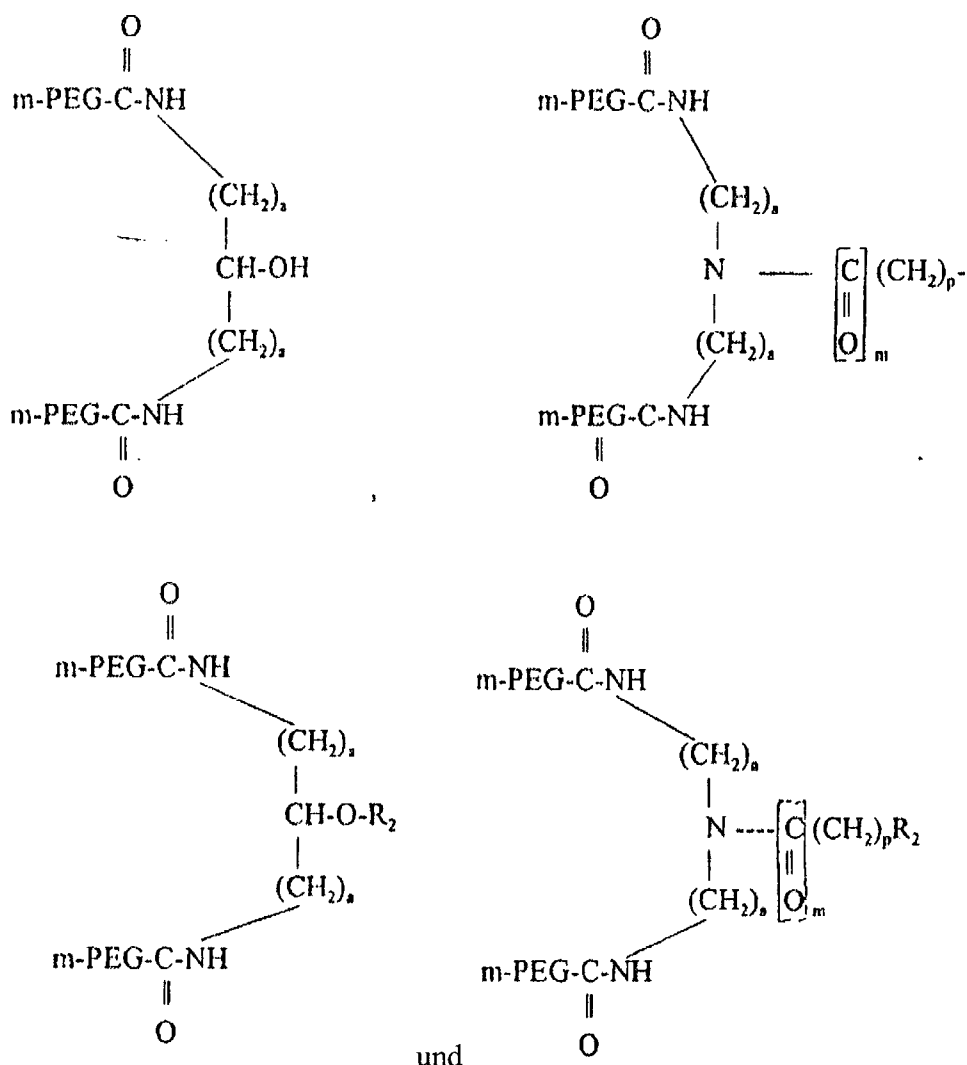


und



wobei (a), (m), (p) und X wie vorstehend dargelegt sind.

[0040] Einige besonders bevorzugte Verbindungen in diesem Aspekt der Erfindung schließen ein:



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1–5 ist;

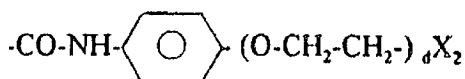
(m) 0 oder 1 ist;

(p) eine positive ganze Zahl vorzugsweise von etwa 1 bis etwa 6 ist; und

R₂ eine Abstandhaltereinheit ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polymeren -CO-NH-(CH₂)_dX₂, -CO-NH-(CH₂-CH₂-O)_dX₂,



und



wobei (d) eine ganze Zahl zwischen 1 und einschließlich 18 ist und (X₂) H, OH, NH₂ oder COOH ist.

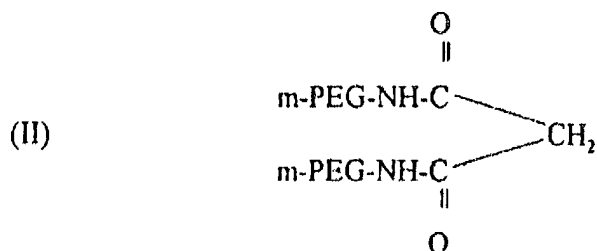
2. SYNTHESE VON VERZWEIGTEN POLYMEREN

[0041] Die verzweigten Polymere (im Allgemeinen U-PAO's oder U-PEG's) werden unter Verwendung von herkömmlichen Reaktionstechniken gebildet. Für jede angelagerte Polymerkette (R) weist die Verbindungsverbindung (L) eine Anzahl an nukleophilen funktionellen Gruppen auf, die (n) (d.h. 2 oder 3) entspricht. In einem Aspekt wird ein Succinimidylcarbonataktivester des verzweigten Polymers durch Inkontaktbringen einer wie vorstehend beschrieben hergestellten verzweigten Polymeruntereinheit (R)_nL mit p-Nitrophenylchlorformiat und anschließend mit n-Hydroxysuccinimid unter Bildung eines Succinimidylcarbonats hergestellt. Alternativ dazu kann die Hydroxyeinheit mit Bissuccinimidylcarbonat direkt umgesetzt werden. Die Polymeruntereinheit (R)_nL schließt Hydroxy-, Amino-, Carboxyl- und Thiolgruppen und dergleichen sowie Amino- oder Methylwasserstoffe ein, so dass sie an (A) angelagert werden kann.

[0042] Die verzweigten Polymere können auch durch Unsetzen von aliphatischen Verbindungsverbindungen, die mit nukleophilen funktionellen Gruppen substituiert sind, wie Di- oder Triamino, Mercaptoalkoholen oder Alkyltrien mit einer aktivierten oder funktionalisierten Polymerkette wie SC-PEG, PEG-NCO, PEG-NSC, SS-PEG, PEG-Säuren oder Säurederivaten gebildet werden. Derartige Verfahren sind bevorzugt, da die funktionalisierten Polymerketten und geeigneten aliphatischen Verbindungsgruppen entweder im Handel erhältlich sind oder leicht synthetisiert werden können.

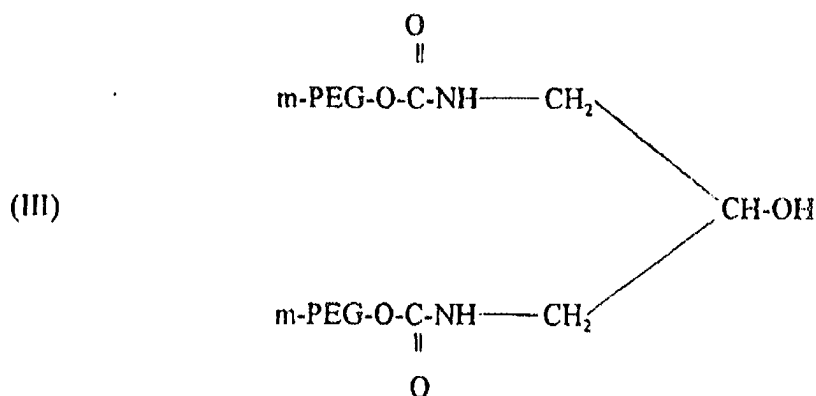
[0043] Andere Aspekte der Synthese schließen das Umsetzen eines Polymers, das mit einer nukleophilen Einheit funktionalisiert ist, wie PEG-Alkohol, PEG-Amin oder PEG-Mercaptan mit bifunktionellen Molekülen wie Malonsäurederivaten oder Glyoxalsäurederivaten ein.

[0044] Zum Beispiel können zwei mol Methoxypoly(ethylenglycol)amin mit einem substituierten oder unsubstituierten Malonylchlorid unter Bildung einer Verbindung der Formel (II) umgesetzt werden:

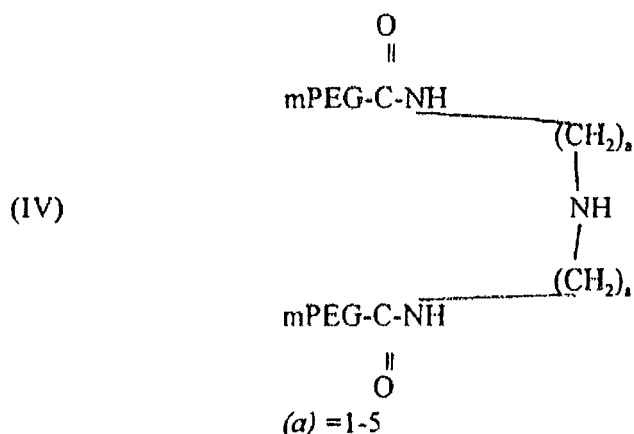


[0045] Die Umsetzung mit einer starken Base wandelt die Methylenverbindungsgruppe in ein Anion um, das weiter funktionalisiert werden kann. Zum Beispiel kann das Anion mit Diethyloxalat unter Erhalt des entsprechenden Ketoesters umgesetzt werden.

[0046] Gleichermaßen können zwei mol Methoxypoly(ethylenglycol)succinimidylcarbonat mit 1,3-Diamino-2-propanol unter Bildung einer Verbindung der Formel (III) umgesetzt werden



[0047] Gleichermaßen können zwei mol mPEG-N-Acylthiazolidin (hier nachstehend mPEG-FLAN), das gemäß US-Patent Nr. 5,349,001 hergestellt werden kann, wobei die Inhalte davon hier unter Bezugnahme eingebracht sind, mit einem Triamin wie Diethylentriamin unter Bildung einer Verbindung mit der Struktur der Formel (IV) umgesetzt werden:



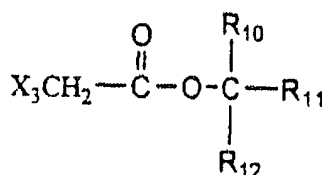
[0048] Die verzweigten Polymere (III) und (IV) können dann aktiviert werden. Eine Weise der Aktivierung von (III) schließt zuerst das Funktionalisieren mit Verbindungen, die die Hydroxygruppen aktivieren können wie p-Nitrophenylchlorformiat unter Bildung eines reaktiven p-Nitrophenylcarbonats ein. Das erhaltene p-Nitrophenylcarbonatpolymer kann direkt mit einem biologisch aktiven Nukleophil umgesetzt werden.

[0049] Das p-Nitrophenylcarbonatpolymer kann auch als Zwischenverbindung dienen. Es kann mit einem großen Überschuss an n-Hydroxysuccinimid unter Bildung eines Succinimidylcarbonat-aktivierten verzweigten Polymers umgesetzt werden. Andere Wege zu Succinimidylcarbonaten sind verfügbar und zur Verwendung hier erwogen. Alternativ dazu kann eine p-Nitrophenylcarbonatpolymerzwischenverbindung mit wasserfreiem Hydrazin umgesetzt werden, um ein verzweigtes Carbazatpolymer zu bilden.

[0050] Das verzweigte Polymer (III) kann auch durch Umsetzen mit einem Alkylhalogenacetat in Gegenwart einer Base unter Bildung einer Alkylesterzwischenverbindung der entsprechenden Polymercarbonsäure und anschließend Umsetzen der Alkylesterzwischenverbindung mit einer Säure wie Trifluoressigsäure unter Bildung der eine terminale Carbonsäure enthaltenden Polymerverbindung aktiviert werden. Vorzugsweise werden Alkylhalogenacetate verwendet. Insbesondere wird das Carbonsäurederivat gebildet durch:

- i) Inkontaktbringen eines verzweigten Polymers der Struktur $(R)_n\text{-L-A}$, wobei (R), (n), (L) und (A) wie hier vorstehend definiert sind, mit einem Alkylhalogenacetat in Gegenwart einer Base unter Bildung einer Alkylesters eines verzweigten nicht-antigenen Polymers; und
- ii) Umsetzen eines Alkylesters mit einer Säure unter Bildung des verzweigten Polymers, enthaltend eine reaktive Carbonsäure daran.

[0051] Beim Durchführen der Reaktion ist das Molverhältnis des Alkylhalogenacetats zu dem verzweigten Polymer, d.h. Polyalkylenoxid größer als 1:1. Der Reaktionsschritt ii) wird bei einer Temperatur von etwa 0 bis etwa 50°C und vorzugsweise einer Temperatur von etwa 20 bis etwa 30°C durchgeführt. Wahlweise kann der Reaktionsschritt ii) in Gegenwart von Wasser durchgeführt werden. Vorzugsweise werden tertiäre Alkylhalogenacetate der Formel



wobei

X_3 Chlor, Brom oder Iod ist; und

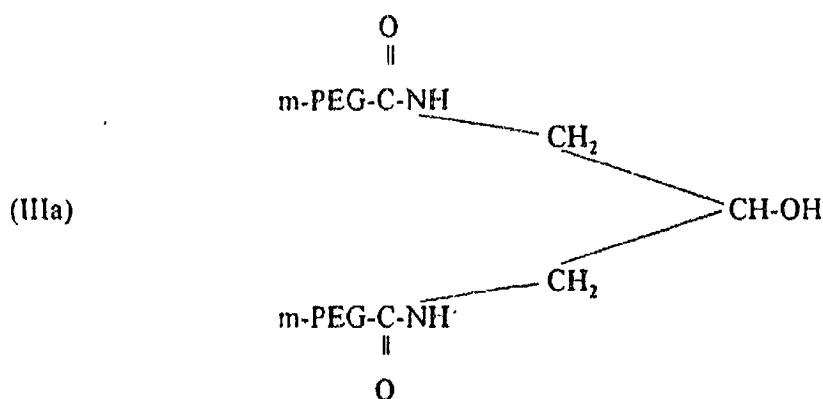
R_{10-12} unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus C_{1-8} -Alkylen, substituiertem C_{1-8} -Alkylen oder verzweigtem C_{1-8} -Alkylen und Arylen; verwendet.

[0052] Bevorzugte tertiäre Alkylhalogenacetate schließen tertiäre Butylhalogenacetate wie t-Butylbromacetat oder t-Butylchloracetat ein. Geeignete Basen schließen Kalium-t-butoxid oder Butyllithium, Natriumamid und Natriumhydrid ein. Geeignete Säuren schließen Trifluoressigsäure oder Schwefel-, Phosphor- und Salzsäuren ein.

[0053] Das verzweigte Polymer (IV) kann durch dessen Umsetzen mit einer Hydroxysäure wie Milchsäure

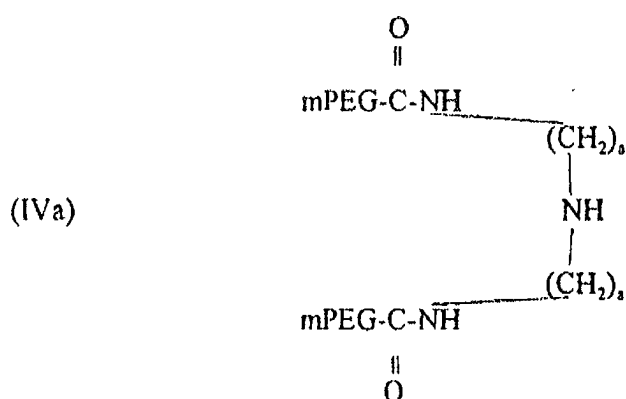
oder Glycolsäure unter Bildung des Hydroxyamids aktiviert werden. Anschließend wird das Hydroxyamid in derselben Weise wie vorstehend für (III) erörtert funktionalisiert.

[0054] In einer anderen Ausführungsform können zwei mol Methoxypoly(ethylenglycol)säure oder mPEG-FLAN mit 1,3-Diamino-2-hydroxypropan unter Bildung einer Verbindung der Formel (IIIa) umgesetzt werden:



[0055] Gleichmaßen können zwei mol mPEG-Säure oder vorzugsweise mPEG-FLAN mit einem Triamin wie Diethylentriamin unter Bildung einer Verbindung mit der Struktur der Formel (IVa) umgesetzt werden:

structure of Formula (IVa):



(a) ist in diesem Fall 2.

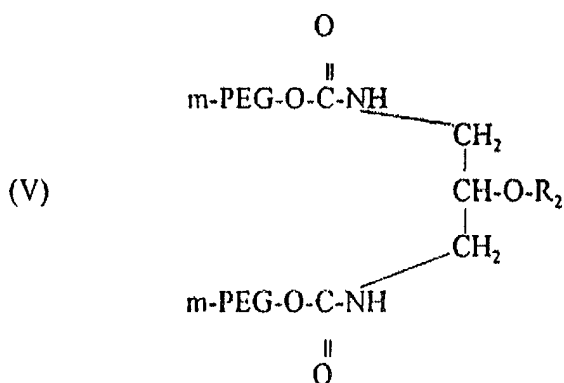
[0056] Das verzweigte Polymer (IIIa) und (IVa) kann dann in derselben Weise wie vorstehend im Hinblick auf die Verbindungen (III) und (IV) beschrieben aktiviert werden.

[0057] In dem Falle, in welchem m Null ist (d.h. die Carbonylgruppen fehlen), kann die Synthese des verzweigten Polymers mit einem Triamin (d.h. Diethylentriamin) gebildet werden, indem es mit zwei Äquivalenten eines Acylierungsmittels wie Succinimidylcarbonat-aktiviertem PEG (SC-PEG) derart umgesetzt wird, dass die terminalen Aminogruppen mit PEG funktionalisiert werden. Diese Zwischenverbindung, die ein sekundäres Amin enthält, wird dann mit Ethylbromacetat oder t-Butylbromacetat unter Erhalt des verzweigten Polymers alkylert.

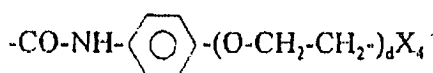
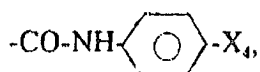
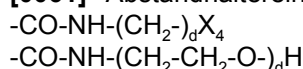
[0058] In dem Falle, in welchem n eins ist (d.h. eine Carbonylgruppe fehlt), kann die Synthese des verzweigten Polymers in ähnlicher Weise gebildet werden. Die terminalen Amine werden mit einem aktivierten PEG wie SC-PEG funktionalisiert. Dann wird das übrige sekundäre Amin mit einem anderen Alkylierungsmittel wie Bernsteinsäureanhydrid unter kräftigeren Bedingungen derart durchgeführt, dass weniger reaktives tertiäres Amin acyliert wird.

[0059] Wie leicht verständlich, können zahlreiche Variationen und Kombinationen der Reaktion zwischen den funktionalisierten Polymerketten und der aliphatischen Verbindungsverbindung unter Bildung der Verbindungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die vorstehenden Reaktionen wurden offenbart, um die vorliegende Verbindung zu veranschaulichen.

[0060] Verzweigte Polymere, die den Formeln (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa) und dergleichen entsprechen, können auch mit einer Abstandhaltereinheit, bezeichnet hier als R_2 , zwischen der aliphatischen Verbindungseinheit und der Gruppe, die sich einer nukleophilen Substitution unterziehen kann, verlängert werden. Zum Beispiel ist das Polymer der Formel (III) mit einer Abstandhaltereinheit durch die Formel (V) dargestellt

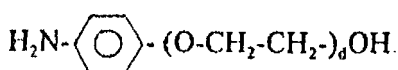
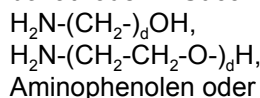


[0061] Abstandhaltereinheiten, dargestellt durch (R_2) schließen



und dergleichen, wobei (d) eine ganze Zahl zwischen 1 und einschließlich 18 ist und (X_4) OH, NH_2 oder COOH ist, ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Abhängig von den Umständen wird eine -H- oder eine -OH-Gruppe am Ende der Abstandhaltereinheit unter Bildung der terminalen Hydroxygruppe angelagert. Folglich gilt die Abstandshaltergruppe als in der Nähe zu L.

[0062] Die Synthese von Verbindungen, die (V) entsprechen, schließt das Umsetzen des p-Nitrophenylcarbonat- oder N-Succinimidylcarbonataktivesters der Verbindungen der Formel (III) mit Reagenzien wie



ein. Die Verbindungen der Formeln (IIIa) und (IVa) können auch in die entsprechenden R_2 -Abstandshalter-enthaltenden Verbindungen in derselben Weise wie vorstehend dargelegt umgewandelt werden.

[0063] Die Anlagerung von Abstandhaltereinheiten an ein verzweigtes Polymer ist mit Bezug auf das Polymer von Formel (II) zum Zwecke der Veranschaulichung ohne Beschränkung beschrieben. Ähnliche Produkte würden mit beliebigen der durch die vorliegende Erfindung offenbarten verzweigten Polymere erhalten werden. Zum Beispiel können die Abstandhaltereinheiten (R_2) an eine mit anderen Gruppen als Hydroxygruppen substituierte Verbindungsgruppeneinheit (L) gebunden werden. Wird die Hydroxygruppe durch eine Aminogruppe ersetzt oder wird der mit Hydroxygruppen substituierte Kohlenstoff durch ein sekundäres Amin ersetzt, kann (L) mit geeigneten Reagenzien wie substituierten Isocyanaten oder Isothiocyanaten und dergleichen umgesetzt werden. Wie die vorstehend beschriebenen aliphatischen Verbindungseinheiten können die terminalen Gruppen der Abstandhaltereinheiten gleichermaßen funktionalisiert werden, um mit Nukleophilen zu reagieren, d.h. Anlagerung an eine geeignete (A)-Einheit, d.h. COOH oder andere „aktivierte terminale Gruppe“.

[0064] Nach der Synthese können die aktivierten, verzweigten Polymere durch herkömmliche verfahren gereinigt und mit biologisch aktiven Materialien umgesetzt werden, die Nukleophile enthalten, die sich mit dem Polymer verbinden können, während mindestens etwas der mit dem Material in unmodifizierter Form verbundene Aktivität bewahrt bleibt.

3. BIOLOGISCH AKTIVE MATERIALIEN, DIE ZUR KONJUGATION GEEIGNET SIND

[0065] Die Nukleophile, die mit verzweigten Polymeren konjugiert sind, werden als „biologisch aktiv“ beschrieben. Der Begriff ist jedoch nicht auf physiologische oder pharmakologische Aktivitäten beschränkt. Zum Beispiel können einige Nukleophilkonjugate wie diejenigen, die Enzyme enthalten, Reaktionen in organischen Lösungsmitteln katalysieren. Gleichmaßen sind auch einige erfindungsgemäße Polymerkonjugate, die Proteine enthalten, wie Concanavalin A, Immunglobulin und dergleichen als Labordiagnostika nützlich. Ein Schlüsselmerkmal aller Konjugate ist, das mindestens ein Teil der mit dem unmodifizierten bioaktiven Material verbundenen Aktivität beibehalten wird.

[0066] Die Konjugate sind biologisch aktiv und weisen zahlreiche therapeutische Anwendungen auf. Säuger, die eine ein biologisch aktives Material einschließende Behandlung benötigen können durch Verabreichen einer wirksamen Menge eines das gewünschte bioaktive Material enthaltenden Polymerkonjugats behandelt werden. Zum Beispiel kann Säugern, die eine Enzyersatztherapie oder Blutfaktoren benötigen, das gewünschte Material enthaltende verzweigte Polymerkonjugate verabreicht werden.

[0067] Biologisch aktive Nukleophile von Interesse der vorliegenden Erfindung schließen Proteine, Peptide, Polypeptide, Enzyme, organische Moleküle natürlichen und synthetischen Ursprungs wie medizinische Chemikalien und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0068] Enzyme von Interesse schließen kohlenhydratspezifische Enzyme, proteolytische Enzyme, Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lysasen, Isomerasen und Ligasen ein. Ohne auf ein besonderes Enzym beschränkt zu sein, schließen Beispiele für Enzyme von Interesse Asparaginase, Arginase, Arginindeaminase, Adenosindeaminase, Superoxiddismutase, Endotoxinasen, Katalasen, Chymotrypsin, Lipasen, Uricasen, Adenosindiphosphatase, Tyrosinasen und Bilirubinoxidase ein. Kohlenhydratspezifische Enzyme von Interesse schließen Glucoseoxidasen, Glucodasen, Galactosidasen, Glucocerebrosidasen, Glucouronidasen usw. ein.

[0069] Proteine, Polypeptide und Peptide von Interesse schließen Hämoglobin, sowohl natürlich vorkommend als auch rekombinante Mutantstämme, Serumproteine wie Blutfaktoren, einschließlich Faktoren VII, VIII und IX; Immunglobuline, Cytokine wie Interleukine, α -, β - und γ -Interferone, Kolonie-stimulierende Faktoren, einschließlich Granulocytenkolonien stimulierende Faktoren, Plättchenabgeleitete Wachstumsfaktoren und Phospholipase-aktivierendes Protein (PLAP) ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Andere Proteine von allgemeinem biologischem oder therapeutischem Interesse schließen Insulin, Pflanzenproteine wie Lecitine, Ricine, Tumornekrosefaktoren und verwandte Allele, Wachstumsfaktoren wie Gewebewachstumsfaktoren wie TGF α s oder TGF β s und epidermale Wachstumsfaktoren, Hormone, Somatomedine, Erythropoietin, Pigmenthormone, hypothalamische Freisetzungsfaktoren, antidiuretische Hormone, Prolactin, chorinisches Gonadotropin, Follikel-stimulierendes Hormon, Thyroid-stimulierendes Hormon, Gewebeplasminogenaktivator und dergleichen ein. Immunglobuline von Interesse schließen IgG, IgE, IgM, IgA, IgD und Fragmente davon ein.

[0070] Einige Proteine wie die Interleukine, Interferone und Kolonie-stimulierende Faktoren liegen gewöhnlich als Ergebnis der Verwendung von rekombinanten Techniken auch in nicht-glycosylierter Form vor. Die nicht-glycosylierten Versionen befinden sich unter den biologisch aktiven Nukleophilen der vorliegenden Erfindung.

[0071] Die biologisch aktiven Nukleophilen der vorliegenden Erfindung schließen auch einen beliebigen Teil eines Polypeptids ein, das in vivo Bioaktivität zeigt. Dies schließt Aminosäuresequenzen, Antisenseeinheiten und dergleichen, Antikörperfragmente, einkettige Bindungsantigene, siehe z.B. US-Patent Nr. 4,946,778, wobei die Offenbarung davon hier unter Bezugnahme eingebracht ist, Bindungsmoleküle, einschließlich Kondensationen von Antikörpern oder Fragmenten, polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, katalytische Antikörper, Nukleotide und Oligonukleotide ein.

[0072] Die Proteine oder Teile davon können unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Techniken, wie Gewebekulturextraktion von tierischen Quellen oder durch rekombinante DNA-Methodologien hergestellt oder isoliert werden. Transgene Quellen der Proteine, Polypeptide, Aminosäuresequenzen und dergleichen sind ebenso erwogen. Derartige Materialien werden von transgenen Tieren, d.h. Mäusen, Schweinen, Kühen usw. erhalten, wobei die Proteine in Milch, Blut oder Geweben exprimiert werden. Transgene Insekten und Baculovirenexpressionssysteme sind ebenso als Quellen erwogen. Außerdem befinden sich Mutantversionen von Proteinen wie Mutant-TNFs und/oder Mutantinterferone ebenso im Umfang der Erfindung.

[0073] Andere Proteine von Interesse sind Allergenproteine wie Ambrosie, Antigen E, Honigbienengift, Milbenallergen und dergleichen.

[0074] Nützliche biologisch aktive Nukleophile sind auf Proteine und Peptide nicht beschränkt. Im Wesentlichen ist jede beliebige biologisch aktive Verbindung im Umfang der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Die vorliegende Erfindung ist besonders gut geeignet für Verbindungen, die wenige oder sogar nur eine einzige nukleophile Anlagerungsstelle zur Polymerkonjugation aufweisen, wie medizinische Chemikalien, egal ob aus der Natur isoliert oder synthetisiert. Chemotherapeutische Moleküle wie pharmazeutische Chemikalien, d.h. Antitumormittel wie Paclitaxel, Taxotere, verwandte Taxotere, Taxoidmoleküle, Camptothecin, Podophyllotoxin, Anthracycline, Methotrexat usw., cardiovaskuläre Mittel, Antineoplastika, Antiinfektionsmittel, Antiangstmittel, gastrointestinale Mittel, das zentrale Nervensystem aktivierende Mittel, Analgetika, Fruchtbarkeits- oder Verhütungsmittel, Antientzündungsmittel, steroidale Mittel, Antiurecämische Mittel, cardiovaskuläre Mittel, Gefäßverdünnungsmittel, Gefäßkontraktionsmittel und dergleichen.

[0075] Vorstehendes ist für die biologisch aktiven Nukleophile, die zur Konjugation mit den Polymeren der Erfindung geeignet sind, veranschaulichend. Es sollte klar sein, dass diese biologisch aktiven Materialien, die nicht speziell erwähnt sind, jedoch geeignete nukleophile Gruppen aufweisen, im Umfang der vorliegenden Erfindung liegen sollen.

4. SYNTHESE VON BIOLOGISCH AKTIVEN KONJUGATEN

[0076] Ein oder mehrere der aktivierten verzweigten Polymere kann (können) an ein biologisch aktives Nukleophil durch chemische Standardreaktionen angelagert werden. Das Konjugat ist durch die folgende Formel dargestellt



wobei (R) ein wasserlösliches, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer ist; $n = 2$; (L) eine aliphatische Verbindungseinheit ist; (A^1) eine Bindung zwischen (L) und dem Nukleophil darstellt und (z) eine ganze Zahl ≥ 1 ist, die die Anzahl an Polymeren darstellt, die an das biologisch aktive Nukleophil konjugiert sind. Die obere Grenze für (z) wird durch die Anzahl an verfügbaren Nukleophilanlagerungsstellen und den Grad an vom Fachmann gesuchten Polymeranlagerungsstellen bestimmt. Der Konjugationsgrad kann durch Variieren der Reaktionsstöchiometrie unter Verwendung von bekannten Techniken modifiziert werden. Mehr als ein an das Nukleophil konjugiertes Polymer kann durch Umsetzen eines stöchiometrischen Überschusses des aktivierten Polymers mit dem Nukleophil erhalten werden.

[0077] Die biologisch aktiven Nukleophilen können mit den aktivierten verzweigten Polymeren in einem wässrigen Reaktionsmedium umgesetzt werden, das abhängig von den pH-Anforderungen des Nukleophils gepuffert sein kann. Der optimale pH-Wert für die Reaktion liegt im Allgemeinen zwischen etwa 6,5 und etwa 8,0 und beträgt vorzugsweise etwa 7,4 für proteinhaltige Polypeptidmaterialien. Organische/chemotherapeutische Einheiten können in nicht wässrigen Systemen umgesetzt werden. Die optimalen Reaktionsbedingungen für die Stabilität des Nukleophils, die Reaktionseffizienz usw. liegen im Ermessen des durchschnittlichen Fachmanns. Der bevorzugte Temperaturbereich liegt zwischen 4 und 37°C. Die Temperatur für das Reaktionsmedium darf die Temperatur, bei welcher sich das Nukleophil entarten oder zersetzen kann, nicht übersteigen. Es ist bevorzugt, dass das umzusetzende Nukleophil mit einem Überschuss des aktivierten verzweigten Polymers umgesetzt wird. Nach der Reaktion wird das Konjugat gewonnen und durch Diafiltration, Säulenchromatographie, Kombinationen davon oder dergleichen gereinigt.

[0078] Es ist leicht verständlich, dass die aktivierten verzweigten nicht-antigenen Polymere der vorliegenden Erfindung ein neues und nützliches Werkzeug bei der Konjugation von biologisch aktiven Materialien sind, insbesondere, wenn ihnen eine Anzahl an geeigneten Polymeranlagerungsstellen fehlen.

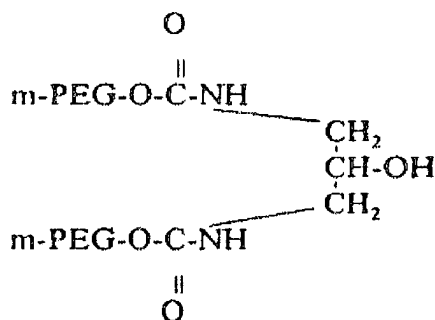
BEISPIELE

[0079] Die folgenden nicht beschränkenden Beispiele veranschaulichen bestimmte Aspekte der Erfindung. Alle Teile und Prozentanteile beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf das Gewicht, und alle Temperaturen sind in °C angegeben.

MATERIALIEN

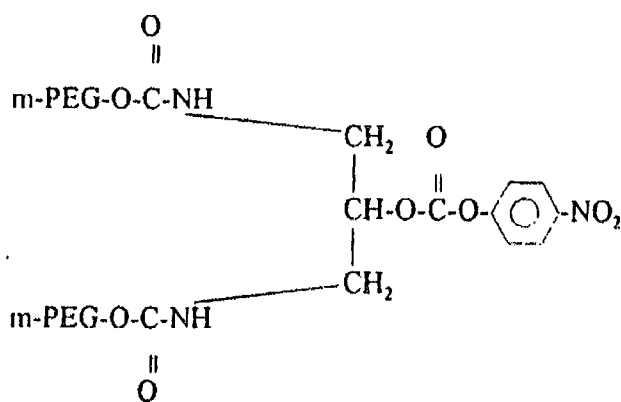
[0080] Methoxypoly(ethylenglycol) (m-PEG) (MG = 5.999) wurde von Union Carbide erhalten. Die Lösungsmittel wurden von Aldrich Chemical Milwaukee, Wisconsin erhalten. Das Methoxypoly(ethylenglycol)-N-succinimidylcarbonat (SC-PEG) wurde wie im US-Patent Nr. 5,122,614 beschrieben unter Verwendung eines m-PEGs mit einem Molekulargewicht von etwa 5.000 hergestellt. Das m-PEG-FLAN wurde wie im US-Patent Nr. 5,349,001 beschrieben hergestellt. Jedes der in den Beispielen 1–9 hergestellten Produkte wurde strukturell durch ^{13}C -NMR bestätigt.

BEISPIEL 1: U-PEG-OH



[0081] Dieses verzweigte Polymer wurde durch Zugabe von 100 mg (1,1 mmol) 1,3-Diamino-2-propanol zu einer Lösung von 10,0 g (2 mmol) SC-PEG in 50 ml Methylenchlorid hergestellt. Das Gemisch wurde für eine Dauer von 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann filtriert. Überschüssiges Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde aus 2-Propanol umkristallisiert, um 7,1 g Produkt (70%ige Ausbeute) zu erhalten.

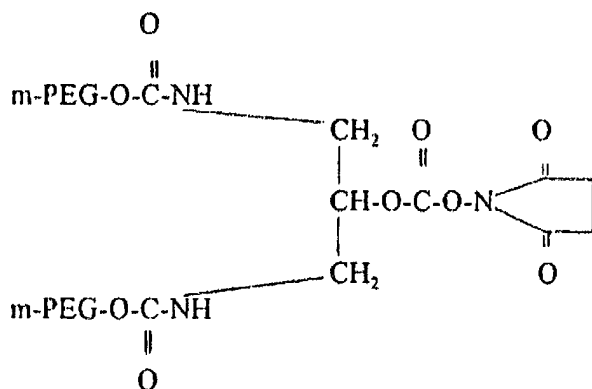
BEISPIEL 2: U-PNP-PEG



[0082] Die Verbindung von Beispiel 1 wurde mit p-Nitrophenylchlorformiat aktiviert. Zuerst wurden 5,0 g (0,5 mmol) U-PEG durch Kochen unter Rückfluss in 75 ml Toluol für eine Dauer von 2 Stunden azeotrop getrocknet, wodurch die Entfernung von 25 ml Lösungsmittel/Wasser erhalten wurde. Das Reaktionsgemisch wurde auf 30°C abgekühlt, gefolgt von der Zugabe von 120 mg (0,6 mmol) p-Nitrophenylchlorformiat und 50 mg (0,6 mmol) Pyridin. Das erhaltene Gemisch wurde für eine Dauer von 2 Stunden bei 45°C gerührt, gefolgt von Rühren über Nacht bei Raumtemperatur.

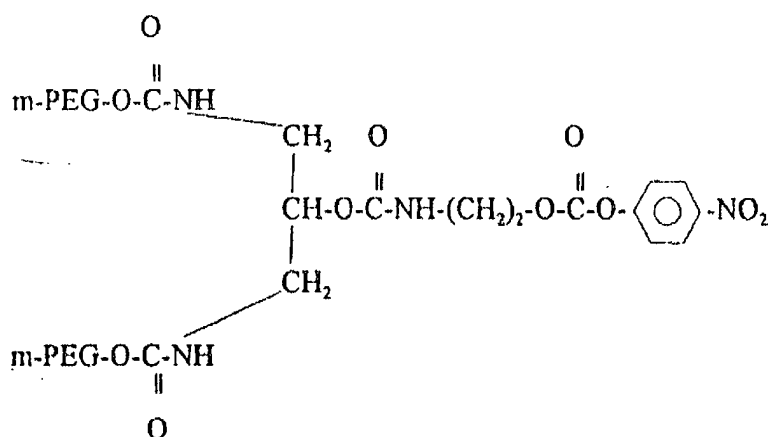
[0083] Das Reaktionsgemisch wurde dann durch CELITE™ filtriert, gefolgt von der Entfernung des Lösungsmittels von dem Filtrat durch Destillation in Vakuum. Der Rückstand wurde aus 2-Propanol umkristallisiert, um 4,2 g (81%ige Ausbeute) des Produkts zu erhalten.

BEISPIEL 3: US-PEG

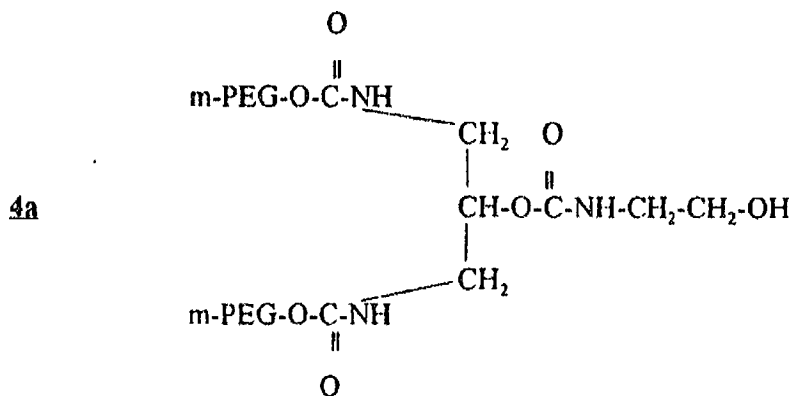


[0084] In diesem Beispiel wurde das U-PNP-PEG von Beispiel 2 mit N-Hydroxysuccinimid unter Bildung des Succinimidylcarbonates von U-PEG umgesetzt. Eine Lösung, enthaltend 5,0 g (0,5 mmol) des U-PNP-PEG's, 0,6 g (5 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 0,13 g (1 mmol) Diisopropylethylamin in 40 ml Methylenchlorid wurde für eine Dauer von 18 Stunden unter Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wurde dann im Vakuum abdestilliert und der Rückstand aus 2-Propanol umkristallisiert, um 4,2 g des Succinimidylcarbonates (82%ige Ausbeute) zu erhalten.

BEISPIEL 4: NU-PNP-PEG



[0085] Dieses vorstehende verzweigte Polymer wurde durch Umsetzen von U-PNP-PEG (Beispiel 2) mit Ethanolamin, gefolgt von p-Nitrophenylformiat hergestellt. Eine Lösung, enthaltend 5,0 g (0,5 mmol) des U-PNP-PEG in 40 ml Methylenchlorid wurde mit 60 mg (1 mmol) Ethanolamin kombiniert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde aus 2-Propanol umkristallisiert, um 4,3 g der nachstehend dargestellten Zwischenverbindung 4a (84%ige Ausbeute) zu erhalten.

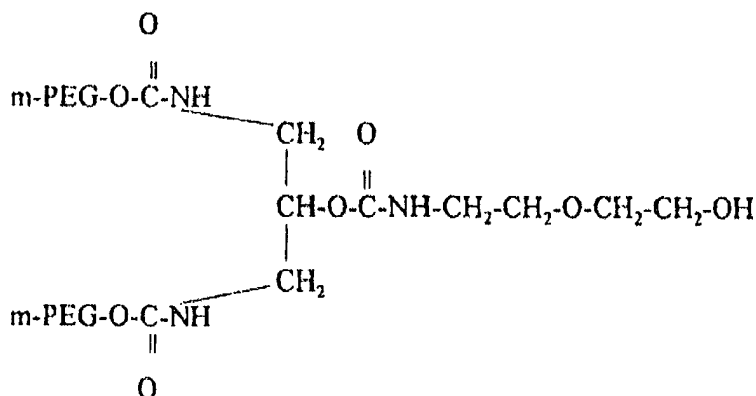


[0086] Das NU-PEG-OH wurde durch Umsetzen der vorstehenden Zwischenverbindung mit p-Nitrophenylchlorformiat hergestellt. Die Zwischenverbindung wurde durch Kochen unter Rückfluss von 2,0 g (0,2 mmol) in

40 ml Toluol für eine Dauer von 2 Stunden unter Entfernung von 25 ml Lösungsmittel/Wasser azeotrop getrocknet. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt, gefolgt von der Zugabe von 0,3 mmol p-Nitrophenylchlorformiat und 0,3 mmol Pyridin gemäß dem Verfahren von Beispiel 2. Das erhaltene Gemisch wurde für eine Dauer von 2 Stunden bei 45°C getrocknet, gefolgt von Rühren über Nacht bei Raumtemperatur.

[0087] Das NU-PEG-OH wurde auch durch das Verfahren in Beispiel 2 gewonnen, um 1,5 g (71%ige Ausbeute) zu erhalten.

BEISPIEL 5: XU-PEG-OH

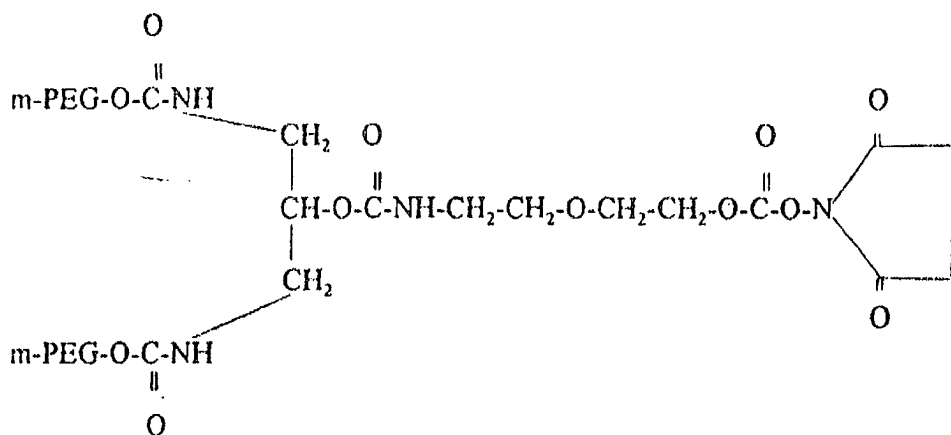


[0088] Dieses verzweigte Polymer wurde durch Umsetzen des U-PNP-PEGs von Beispiel 2 mit 2-(2-Aminoethoxy)ethanol gemäß dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren hergestellt (d.h. der Aminoalkohol wurde mit p-Nitrophenylcarbonat umgesetzt). Die Ausbeute des umkristallisierten Produkts betrug 86%.

BEISPIEL 6: XU-PNP-PEG

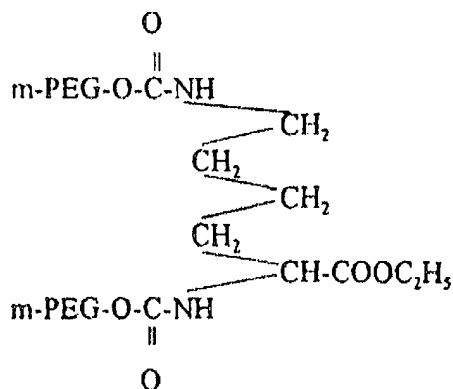
[0089] Die Verbindung von Beispiel 5 wurde mit p-Nitrophenylcarbonat wie in den Beispielen 2 und 4 funktionalisiert. Die Ausbeute des umkristallisierten Produkts betrug 83%.

BEISPIEL 7: XUS-PEG



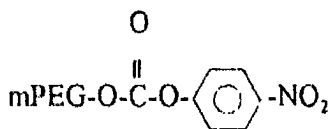
[0090] In diesem Beispiel wurde das Succinimidylcarbonatderivat der in Beispiel 5 hergestellten Verbindung gemäß dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren durch Umsetzen von N-Hydroxysuccinimid mit p-Nitrophenylcarbonatderivat von Beispiel 6 hergestellt. Die Ausbeute des gewonnenen Produkts betrug 84%.

BEISPIEL 8: U-LYS-PEG



[0091] Das vorstehend umrissene verzweigte Polymer wurde durch Umsetzen von m-PNP-PEG mit Lysine-thylester hergestellt. Insbesondere wurde ein Gemisch aus 5,0 g (1,0 mmol) des Polymers, 150 mg (0,6 mmol) Lysindihydrochlorid und 140 mg (1,8 mmol) Pyrridin für eine Dauer von 18 Stunden unter Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde aus 2-Propanol umkristallisiert, um 4,5 g (88%ige Ausbeute) des Produkts zu erhalten.

BEISPIEL 9: Synthese von m-PNP-PEG



[0092] Eine Lösung von 50 g (0,01 mol) m-PEG-OH (MG = 5.000) in 500 ml Toluol wurde für eine Dauer von 2 Stunden azeotrop getrocknet, während 100 ml Toluol/Wasser entfernt wurden. Das Reaktionsgemisch wurde auf 30°C abgekühlt, gefolgt von der Zugabe von 2,6 g (0,013 mol) p-Nitrophenylchlorformiat und 1,0 ml (0,013 mol) Pyrridin. Das erhaltene Gemisch wurde für eine Dauer von 2 Stunden bei 45°C gerührt, gefolgt von Rühren über Nacht bei Raumtemperatur.

[0093] Das Reaktionsgemisch wurde dann durch CELITE™ filtriert, gefolgt von der Abdestillation des Lösungsmittels im Vakuum. Der Rückstand wurde aus 2-Propanol umkristallisiert, um 48,2 g (93%ige Ausbeute) des Produkts zu erhalten.

BEISPIELE 10 und 11

[0094] Konjugate von Erythropoietin (EPO) mit US-PEG (Beispiel 3) wurden durch Dialysieren von zwei Proben mit 3,0 mg EPO (humane rekombinante Zellkultur des chinesischen Hamsteroariums (CHO)) in 0,1 M Phosphatpufferlösungen, pH 7,0, unter Verwendung einer Centricon-10 (Amicon Corporation, Beverly, MA) hergestellt. Die erste EPO-Lösung wurde mit 1,954 mg (zweifacher molarer Überschuss) des US-PEG kombiniert, während die zweite EPO-Lösung mit 3,908 mg (vierfacher molarer Überschuss) des US-PEG's kombiniert wurde. Die Reaktionsgemische wurden für eine Dauer von 1 Stunde bei Raumtemperatur (etwa 22–25°C) gerührt. Das überschüssige Polymer wurde abzentrifugiert, und die Reaktionsgemische wurden in 10 mM Phosphatpuffer, pH 8,0 dialysiert. Nicht umgesetztes EPO wurde auf einer Ionenaustauschssäule (2-HD-Säule, Sepracor) entfernt.

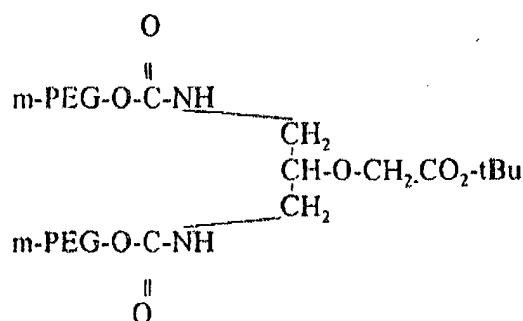
[0095] Eine SDS-PAGE-Analyse bestätigte, dass für beide Reaktionsgemische etwa zwei bis drei der verzweigten Polymere kovalent an jedes Proteinmolekül gebunden wurden. Die EPO-Aktivität der Konjugate wurde durch einen kolorimetrischen Test mit DA-1-K-Zellen einer lymphoplastischen Mäusezellreihe, abhängig von IL-3, GM-CSF und EPO zum Wachstum gemessen. Man ließ die Zellen in IMDM, enthaltend 5% FCS, wachsen und inkubierte sie bei 37°C in 5% CO₂ an Luft. Die Testzeit beträgt 72 Stunden und das Zellwachstum wird durch MTT-Farbaufnahme überwacht. In dem Test behielten beide Konjugatproben 40–50% der Aktivität des unkonjugierten EPO's bei.

[0096] Tumornekrosefaktor (TNF) wurde mit dem XUS-PEG von Beispiel 7 konjugiert. Als Vergleich wurde das TNF auch mit dem linearen SC-PEG, Methoxypoly(ethylenglycol)succinimidylcarbonat von US-Patent Nr. 5,122,614, konjugiert. Beide Konjugate wurden durch Umsetzen von 500 Mikrogramme TNF, 2,0 mg/ml, mit einem 25-fachen Überschuss des Polymers hergestellt. Jede Reaktion wurde für eine Dauer von 41 Minuten auf Eis durchgeführt.

[0097] Der ED_{50} für das verzweigte Konjugat betrug 0,29 ng/ml für die Konzentrationsansprechkurve, die durch Verdünnungen von 0,1 Mikrogramm/ml gebildet wurde, und 0,625 ng/ml für die Konzentrationsansprechkurve, die durch Verdünnungen von 0,01 Mikrogramm/ml gebildet wurde. Der ED_{50} für unmodifiziertes TNF beträgt 0,01–0,02 ng/ml. Der ED_{50} für die linearen Succinimidylcarbonatkonjugate lag im Bereich zwischen 8 und 19 ng/ml.

[0098] Tumorizide und Toxizitätsdaten in vitro wiesen darauf hin, dass das verzweigte Konjugat cytotoxischer zu sein schien als das nicht verzweigte Konjugat.

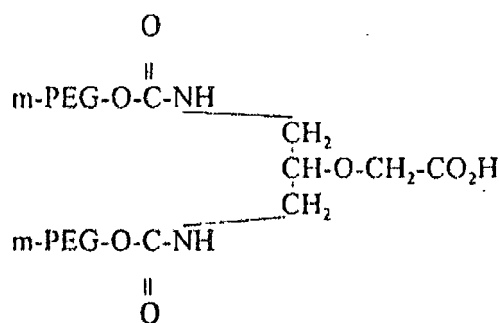
BEISPIELE 14: U-PEG Carbonsäure-t-butylester



[0099] Eine Lösung von 1,0 g (0,099 mmol) U-PEG-OH in 30 ml Toluol wurde unter Entfernung von 10 ml Destillat azeotrop getrocknet. Das Reaktionsgemisch wurde auf 30°C abgekühlt, gefolgt von der Zugabe von 50 µl (0,34 mmol) t-Butylbromacetat und 0,1 ml (1,0 mmol) 1,0 M Kalium-t-butoxid in t-Butanol. Das erhaltene Gemisch wurde bei 40°C über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde durch ein Celite-Kissen filtriert, gefolgt von der Abdestillation des Lösungsmittels im Vakuum. Der Rückstand wurde aus 2-Propanol umkristallisiert, um 0,98 g (97%ige Ausbeute) zu erhalten. Das Produkt enthielt 60% des gewünschten t-Butylesters, wie bestimmt durch ^{13}C -NMR.

^{13}C NMR: $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$, 27.54 ppm; $-\text{CH}_2\text{NH}-$, 45.31 ppm; $-\text{OCH}_3$, 58.40 ppm; $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$, 80.21 ppm; $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$, 157.20 ppm; $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, 166.89 ppm.

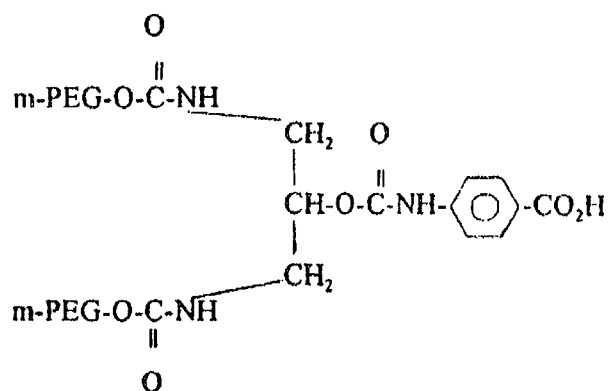
Beispiel 15: U-PEG-carbonsäure



[0100] Eine Lösung von 0,5 g (0,049 mmol) U-PEG-carbonsäure-t-butylester und 2,5 ml Trifluoressigsäure in 5 ml Methylenchlorid wird bei Raumtemperatur für eine Dauer von 3 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wird dann im Vakuum abdestilliert, gefolgt von der Umkristallisation des Rückstands aus gekühltem Methylenchlorid/Ethylether (20% V/V Methylenchlorid in Ether, insgesamt ca. 20 ml), um 0,42 g (85%ige Ausbeute) Produkt zu erhalten.

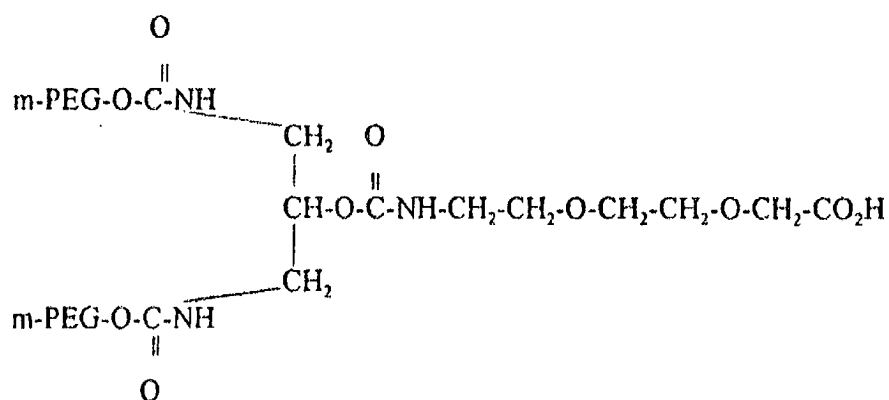
^{13}C NMR: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, 43.31 ppm; $-\text{OCH}_3$, 58.04 ppm; $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$, 156.20 ppm; $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, 169.89 ppm.

Beispiel 16: NU-PEG-carbonsäure



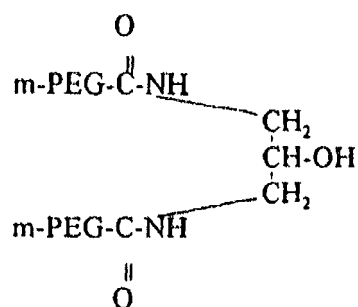
[0101] Dieses vorstehende verzweigte Polymer wurde durch Umsetzen von US-PEG (Beispiel 3) mit Methylparaaminobenzoat gefolgt von selektiver Hydrolyse unter Bereitstellung des verzweigten Polymers, enthaltend die terminale Carbonsäure, hergestellt.

Beispiel 17: XU-PEG-carbonsäure



[0102] In diesem Beispiel wurde das Carbonsäurederivat von Verbindung Beispiel 5 (XU-PEG-OH) gemäß dem Verfahren, beschrieben in den Beispielen 14 und 15, wobei das terminale Carbonsäurederivat gebildet wurde, hergestellt.

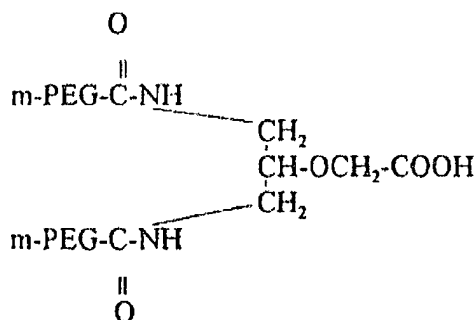
Beispiel 18: U-PEG-OH auf Aminbasis



[0103] Einer Lösung von 10,0 g (2 mmol) m-PEG-Flan, hergestellt gemäß dem vorstehend erwähnten US-Patent Nr. 5,349,001, in 50 ml Methylenchlorid werden 100 mg (1,1 mmol) 1,3-Diamino-2-propanol zugesetzt. Dieses Gemisch wird dann für eine Dauer von 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, gefolgt von Filtration und Abdestillation des Lösungsmittels im Vakuum. Der erhaltene Rückstand wird aus 2-Propanol umkristallisiert, um 7,1 g Produkt zu erhalten.

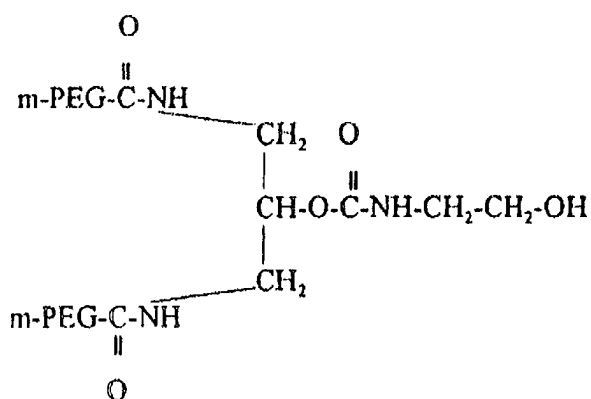
¹³C NMR assignments: CH_2NH , 43.2 ppm; OCH_3 , 58.1 ppm; CHOH , 63.0 ppm; C-O , 171.2 ppm.

Beispiel 19: U-PEG-COOH auf Aminbasis



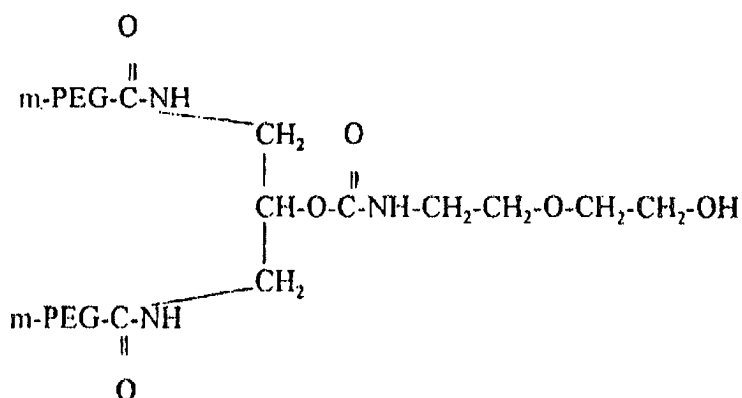
[0104] Das entsprechende Carbonsäurederivat der Verbindung von Beispiel 18 wurde unter Verwendung der in den Beispielen 14 und 15 dargelegten Verfahren gebildet.

Beispiel 20: NU-PEG-amin-OH



[0105] Dieses verzweigte Polymer wurde durch Wiederholen der Schritte von Beispiel 4 gebildet, um Verbindung 4a unter Verwendung der Verbindung von Beispiel 18 als Ausgangsverbindung zu erhalten.

Beispiel 21: XU-PEG-amin-OH



[0106] Dieses verzweigte Polymer wurde durch Wiederholen von Beispiel 5 mit der Verbindung von Beispiel 18 gebildet.

Beispiel 22: 20-S-Camptothecin-U-PEG 5.000

[0107] Ein Gemisch aus 4,0 g (0,4 mmol) U-PEG-carbonsäure, hergestellt in Beispiel 15, 0,28 g (0,8 mmol) Camptothecin, 0,10 g (0,8 mmol) Diisopropylcarbodiimid und 0,10 g (0,8 mmol) 4-Dimethylaminopyridin wird zu 50 ml wasserfreiem Dichlormethan bei 0°C zugesetzt. Man lässt dieses Gemisch auf Raumtemperatur aufwärmen, und rührt weiter für eine Dauer von 18 Stunden, gefolgt von der Abdestillation des Lösungsmittels im Vakuum. Der Rückstand wird aus 2-Propanol umkristallisiert, um 3,4 g des Titelprodukts zu erhalten.

Beispiel 23: 2'-Paclitaxel-U-PEG 5.000

[0108] Ein Gemisch aus 4,0 g (0,4 mmol) NU-PEG-carbonsäure, hergestellt in Beispiel 16, 0,68 g (0,08 mmol) Paclitaxel, 0,10 g (0,8 mmol) Diisopropylcarbodiimid und 0,10 g (0,8 mmol) 4-Dimethylaminopyridin wird zu 50 ml wasserfreiem Dichlormethan bei 0°C zugesetzt. Man lässt dieses Gemisch auf Raumtemperatur aufwärmen, und rührt weiter für eine Dauer von 18 Stunden, gefolgt von der Abdestillation des Lösungsmittels im Vakuum. Der Rückstand wird aus 2-Propanol umkristallisiert, um 3,4 g des Titelprodukts zu erhalten.

Beispiel 24: 2'-Paclitaxel-U-PEG 5.000

[0109] Ein Gemisch aus 4,0 g (0,4 mmol) der Verbindung von Beispiel 19, U-PEG, 0,68 g (0,08 mmol) Paclitaxel, 0,10 g (0,8 mmol) Diisopropylcarbodiimid und 0,10 g (0,8 mmol) 4-Dimethylaminopyridin wird zu 50 ml wasserfreiem Dichlormethan bei 0°C zugesetzt. Man lässt dieses Gemisch auf Raumtemperatur aufwärmen, und rührt weiter für eine Dauer von 18 Stunden, gefolgt von der Abdestillation des Lösungsmittels im Vakuum. Der Rückstand wird aus 2-Propanol umkristallisiert, um 3,4 g des Titelprodukts zu erhalten.

Patentansprüche

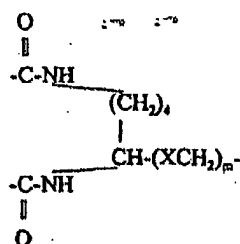
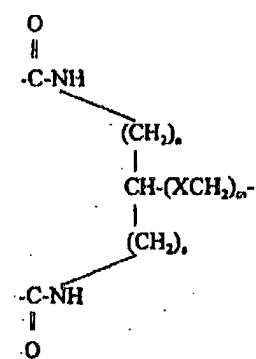
1. Verzweigtes, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer, umfassend die Formel



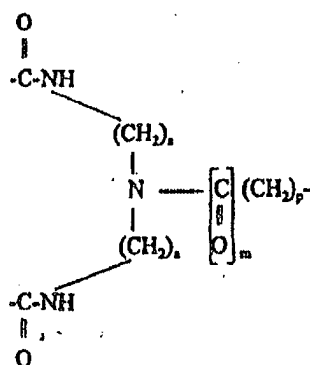
wobei (R) ein wasserlösliches, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer ist, das eine terminale C₁-C₄-Alkylgruppe enthält;

(n) = 2

(L) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



und



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

(m) 0 oder 1 ist;

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus O, NQ, S, SO, SO₂; wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, -Aryl oder -Aralkyl ist; und

(p) eine positive ganze Zahl ist.

2. Polymer nach Anspruch 1, wobei mindestens ein (R) ein geradkettiges Polymer ist.

3. Polymer nach Anspruch 1, wobei mindestens ein (R) ein Poly(alkylenoxid) ist.

4. Polymer nach Anspruch 3, wobei das Poly(alkylenoxid) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Poly(ethylenglycol)-Homopolymeren, mit endständigem Alkyl versehenen Poly(ethylenoxiden) und Copolymeren von Blockcopolymeren von Poly(alkylenoxiden).

5. Polymer nach Anspruch 4, wobei das Poly(alkylenoxid) ein Molekulargewicht zwischen etwa 200 und etwa 80.000 aufweist.

6. Polymer nach Anspruch 5, wobei das Poly(alkylenoxid) ein Molekulargewicht zwischen 2.000 und etwa 42.000 aufweist.

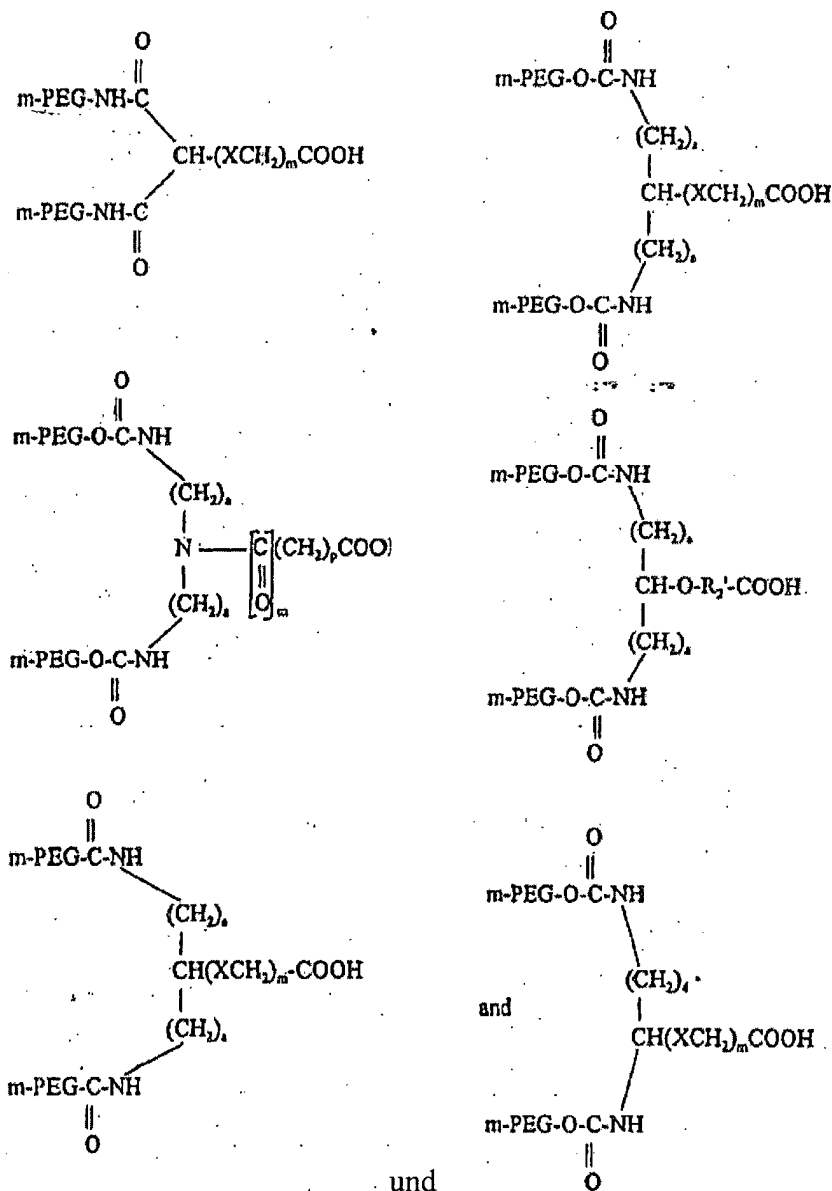
7. Polymer nach Anspruch 6, wobei das Poly(alkylenoxid) ein Molekulargewicht zwischen 5.000 und etwa 20.000 aufweist.

8. Polymer nach Anspruch 1, wobei jedes (R) ein Poly(ethylenglycol) ist.

9. Polymer nach Anspruch 1, wobei (m) Null ist

10. Polymer nach Anspruch 1, wobei die terminale C₁-C₄-Alkylgruppe Methoxy ist.

11. Verzweigtes, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

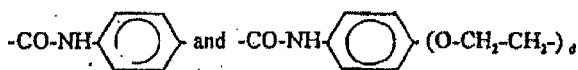
(m) 0 oder 1 ist;

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus O, NQ, S, SO, SO₂; wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, -Aryl oder -Aralkyl ist; und

(p) eine positive ganze Zahl ist; und

R₂ eine Abstandhaltereinheit (Spacer), ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

-CO-NH-(CH₂)_d-, -CO-NH-(CH₂-CH₂-O)_d-,



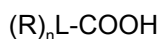
ist,

wobei (d) eine ganze Zahl zwischen 1 und einschließlich 18 ist

12. Polymer nach Anspruch 1, des Weiteren umfassend eine Abstandhaltereinheit, die nahe an (L) liegt.

13. Polymer nach Anspruch 1, wobei mindestens ein (R) des Weiteren eine funktionelle Gruppe umfasst, die mit Nukleophilen kovalent binden kann.

14. Verfahren zum Bilden eines biologisch aktiven Konjugats, umfassend das Inkontaktbringen eines biologisch aktiven Nukleophils, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Proteinen, Peptiden, Polypeptiden, Enzymen und chemotherapeutischen Molekülen, mit einem aktivierten verzweigten nicht-antigenen Polymer mit einer Struktur, dargestellt durch

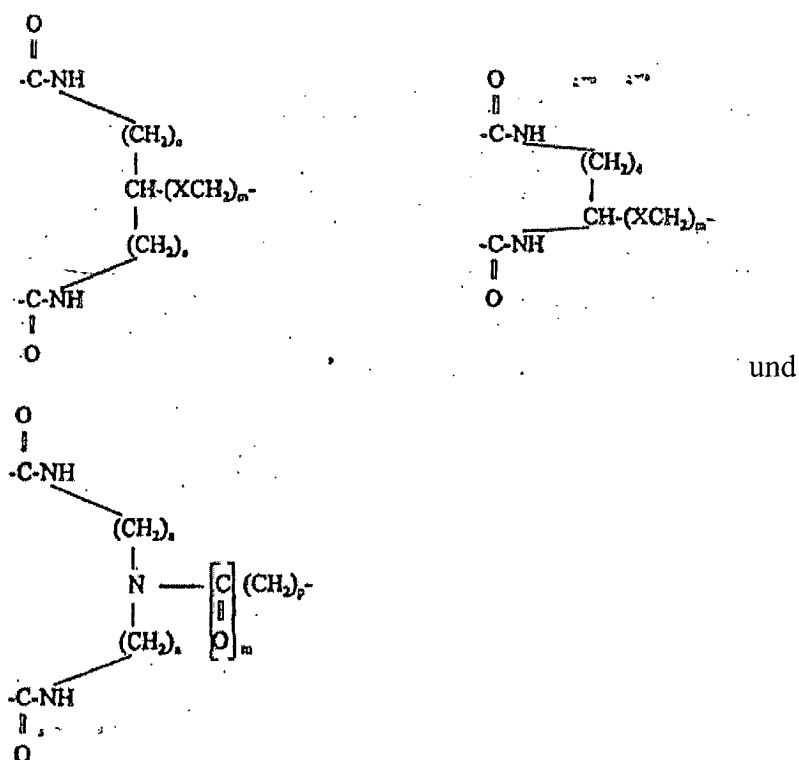


(Ia)

wobei (R) ein wasserlösliches, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer ist, das eine terminale C₁-C₄-Alkylgruppe enthält;

(n) = 2

(L) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

(m) 0 oder 1 ist;

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus O, NQ, S, SO, SO₂; wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, -Aryl oder -Aralkyl ist; und

(p) eine positive ganze Zahl ist.

15. Polymerkonjugat, das durch Umsetzen des verzweigten, im Wesentlichen nicht-antigenen Polymers nach Anspruch 1 mit einem Nukleophil hergestellt wird.
16. Konjugat nach Anspruch 15, wobei mindestens ein (R) ein Poly(alkylenoxid) ist.
17. Konjugat nach Anspruch 16, wobei das Poly(alkylenoxid) ein Molekulargewicht zwischen etwa 200 und etwa 8.000 aufweist.
18. Konjugat nach Anspruch 15, wobei jedes (R) ein Poly(ethylenglycol) ist.
19. Konjugat nach Anspruch 15, wobei das Nukleophil ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Proteinen, Peptiden und Polypeptiden.
20. Konjugat nach Anspruch 15, wobei das Nukleophil ein Vertreter der Gruppe, bestehend aus antineoplastischen, antiinfektösen Mitteln, Mitteln gegen Angst, antigastrointestinalen Mitteln, Aktivierungsmitteln für das zentrale Nervensystem, Analgetika, Fruchtbarkeits-, Empfängnisverhütungsmitteln, kardiovaskulären Mitteln, gefäßverdünnenden Mitteln und Vasokonstriktionsmitteln.
21. Konjugat nach Anspruch 20, wobei das antineoplastische Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Taxil, Taxanen, taxoteren, taxoiden Molekülen, Camptothecin, Anthracyclinen und Methotrexaten.
22. Polymerkonjugat nach einem der Ansprüche 15–21 zur Verwendung als Medikament.
23. Verzweigtes, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer, umfassend die Formel

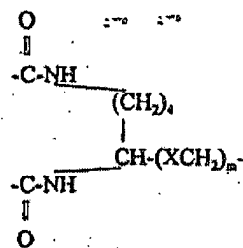
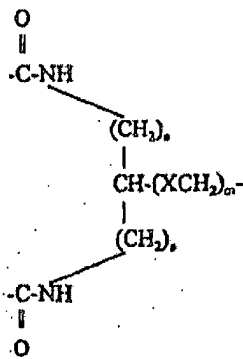
$(R)_nL-A$

wobei (R) ein wasserlösliches, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer ist, das eine terminale C_1-C_4 -Gruppe enthält;

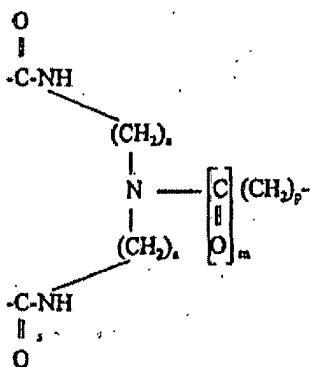
(n) = 2;

(A) eine funktionelle Gruppe, die mit einem biologisch aktiven Nukleophil, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Proteinen, Peptiden, Polypeptiden, Enzymen und chemotherapeutischen Molekülen, einer Einheit, die zum Reagieren mit dem Nukleophil funktionalisiert werden kann, ist; und

(L) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



und



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

(m) 0 oder 1 ist;

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus O, NQ, S, SO, SO₂; wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, -Aryl oder -Aralkyl ist; und

(p) eine positive ganze Zahl ist.

24. Polymer nach Anspruch 23, wobei mindestens ein (R) ein Poly(alkylenoxid) ist.

25. Polymer nach Anspruch 23, wobei das Poly(alkylenoxid) ein Molekulargewicht zwischen etwa 200 und etwa 8.000 aufweist.

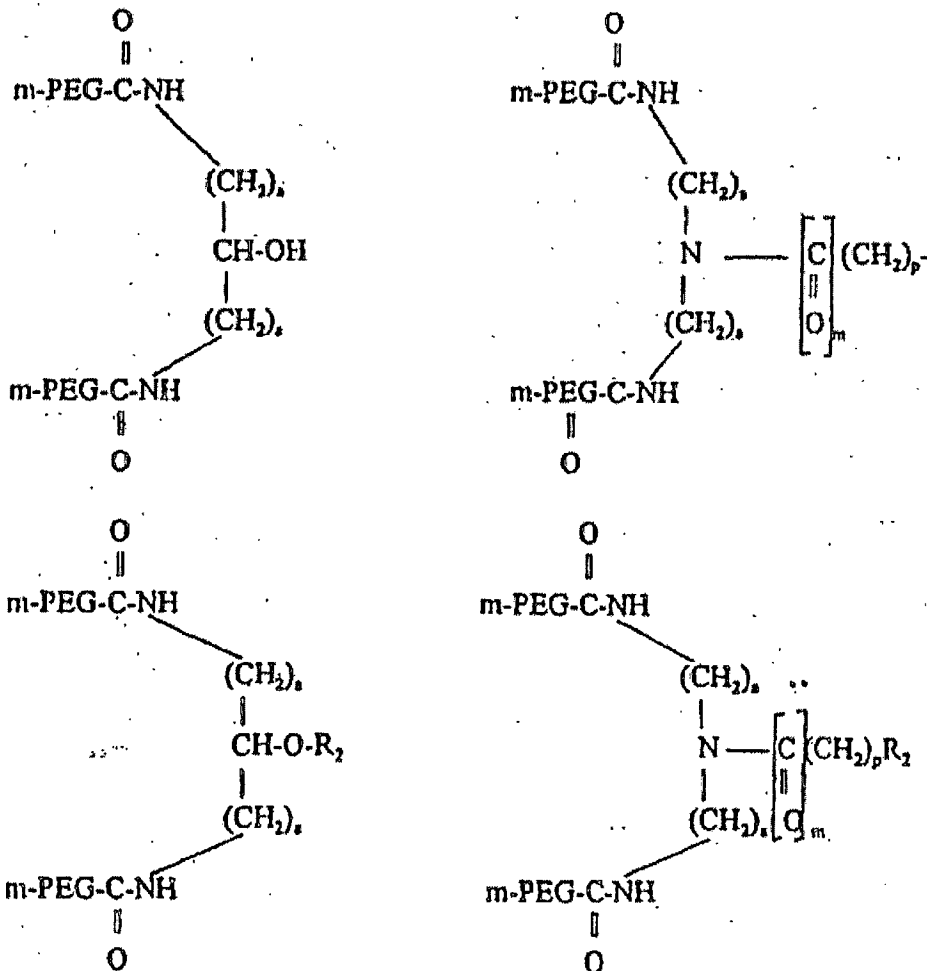
26. Polymer nach Anspruch 25, wobei das Poly(alkylenoxid) ein Molekulargewicht zwischen 2.000 und etwa 42.000 aufweist.

27. Polymer nach Anspruch 26, wobei das Poly(alkylenoxid) ein Molekulargewicht zwischen etwa 5.000 und etwa 20.000 aufweist.

28. Polymer nach Anspruch 23, wobei jedes (R) ein Poly(ethylenglycol) ist.

29. Polymer nach Anspruch 23, wobei die terminale C₁-C₄-Alkylgruppe Methoxy ist.

30. Polymer nach Anspruch 23, umfassend eine Struktur, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus



und

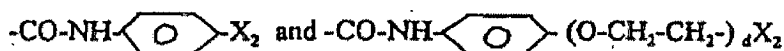
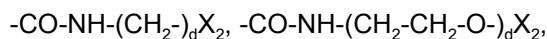
wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

(m) 0 oder 1 ist;

(p) eine positive ganze Zahl ist und

R₂ eine Abstandhaltereinheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Polymeren,



ist,

wobei (d) eine ganze Zahl zwischen 1 und einschließlich 8 ist und
(X₂) H, OH, NH₂ oder COOH ist.

31. Verfahren zum Bilden eines biologisch aktiven Konjugats, umfassend das Inkontaktbringen eines biologisch aktiven Nukleophils, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Proteinen, Peptiden, Polypeptiden, Enzymen und chemotherapeutischen Molekülen, mit einem aktivierten, verzweigten, nicht-antigenen Polymer mit einer Struktur, dargestellt durch

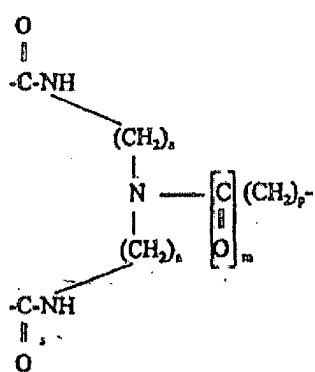
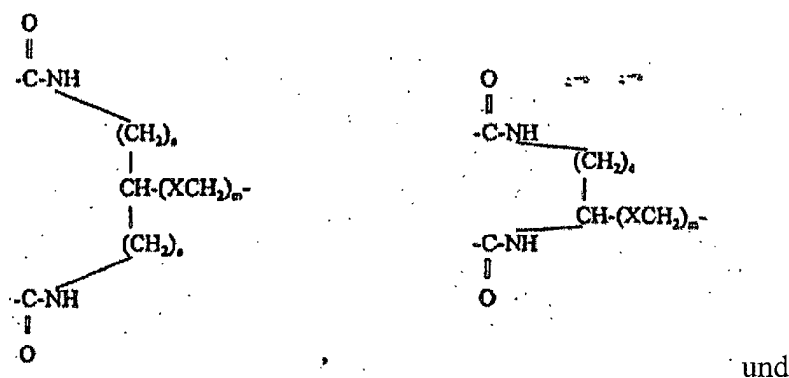


(I)

wobei (R) ein wasserlösliches, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer ist, das eine terminale C₁-C₄-Gruppe enthält;

(n) = 2

(L) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

(m) 0 oder 1 ist;

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus O, NQ, S, SO, SO₂; wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, -Aryl oder -Aralkyl ist;

(p) eine positive ganze Zahl ist; und

(A) eine funktionelle Gruppe ist, die mit dem biologisch aktiven Nukleophil kovalent binden kann.

32. Verfahren zur Herstellung eines verzweigten, nicht-antigenen Polymers, enthaltend eine reaktive Carbonsäuregruppe daran, umfassend

i) Inkontaktbringen eines verzweigten, nicht-antigenen Polymers mit der Struktur, dargestellt durch

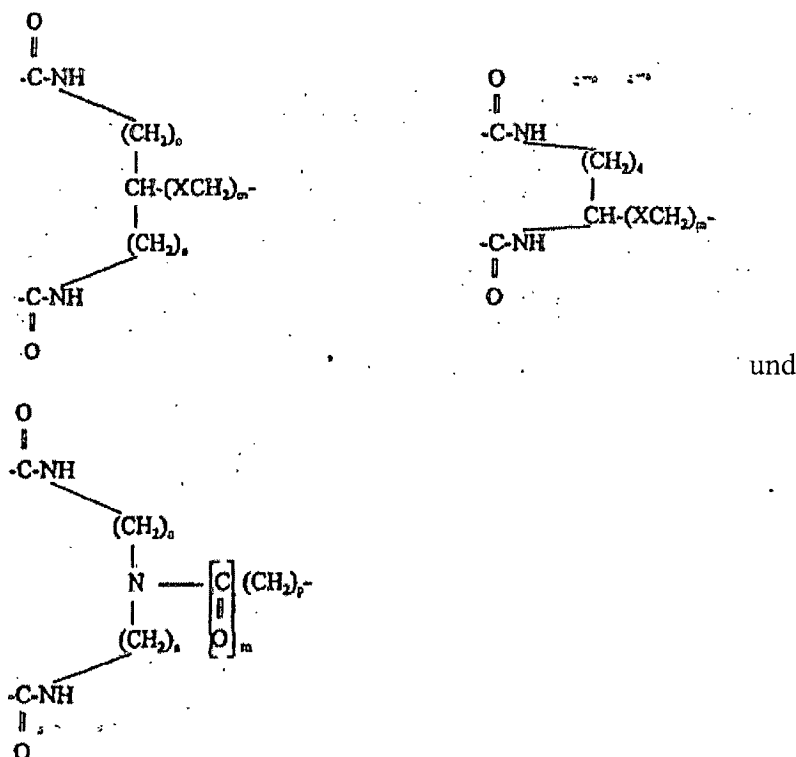


(I)

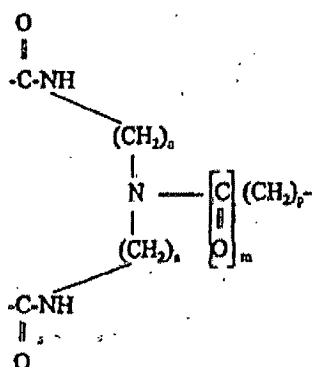
wobei (R) ein wasserlösliches, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer ist, das eine terminale C₁-C₄-Alkylgruppe enthält;

(n) = 2

(L) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



und



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

(m) 0 oder 1 ist;

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus O, NQ, S, SO, SO₂; wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, -Aryl oder -Aralkyl ist; und

(p) eine positive ganze Zahl ist; und

(A) eine funktionelle Gruppe ist, die mit einem Nukleophil kovalent binden kann;

mit einem Alkylhalogenacetat in Gegenwart einer Base unter Bildung eines Alkylesters eines verzweigten, nicht-antigenen Polymers; und

ii) Umsetzen des Alkylesters mit einer Säure unter Bildung des verzweigten, nicht-antigenen Polymers, enthaltend eine reaktive Carbonsäure daran, umfassend die Formel

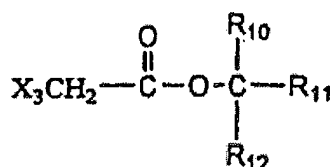
(R)_nL-COOH

(la)

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei das Alkylhalogenacetat ein tertiäres Alkylhalogenacetat ist.

34. Verfahren nach Anspruch 32, wobei das nicht-antigene Polymer Polyethylenglycol ist.

35. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das tertiäre Alkylhalogenacetat die Formel



umfasst, wobei

 X_3 Chlor, Brom oder Iod ist; und R_{10-12} unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus C₁₋₈-Alkylen, substituierten C₁₋₈-Alkylen oder verzweigten C₁₋₈-Alkylen und -Arylen.

36. Verfahren nach Anspruch 35, wobei das tertiäre Alkylhalogenacetat ein tertiäres Butylhalogenacetat ist.

37. Verfahren zur Herstellung eines aktiven Carbonats eines verzweigten nicht-antigenen Polymers, umfassend die Schritte

i) Inkontaktbringen eines verzweigten nicht-antigenen Polymers mit der Struktur, dargestellt durch

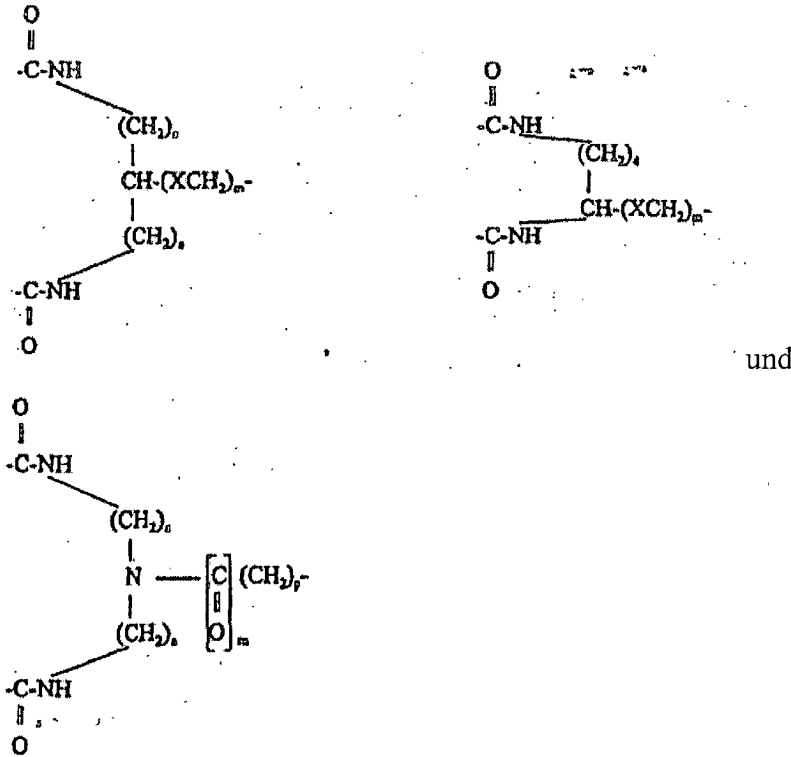


(I)

wobei (R) ein wasserlösliches, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer ist, das eine terminale C_1-C_4 -Gruppe enthält;

(n) = 2

(L) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

(m) 0 oder 1 ist;

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus O, NQ, S, SO, SO₂; wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, -Aryl oder -Aralkyl ist; und

(p) eine positive ganze Zahl ist; und

(A) eine funktionelle Gruppe ist, die mit einem Nukleophil kovalent binden kann; mit p-Nitrophenylchlorformiat; und

ii) Umsetzen des aktiven p-Nitrophenylcarbonatesters von Schritt i) mit N-Hydroxysuccinimid.

38. Verfahren zur Herstellung eines aktiven Succinimidylcarbonatesters eines verzweigten nicht-antigenen Polymers, umfassend

Inkontaktbringen eines verzweigten nicht-antigenen Polymers mit der Struktur, dargestellt durch

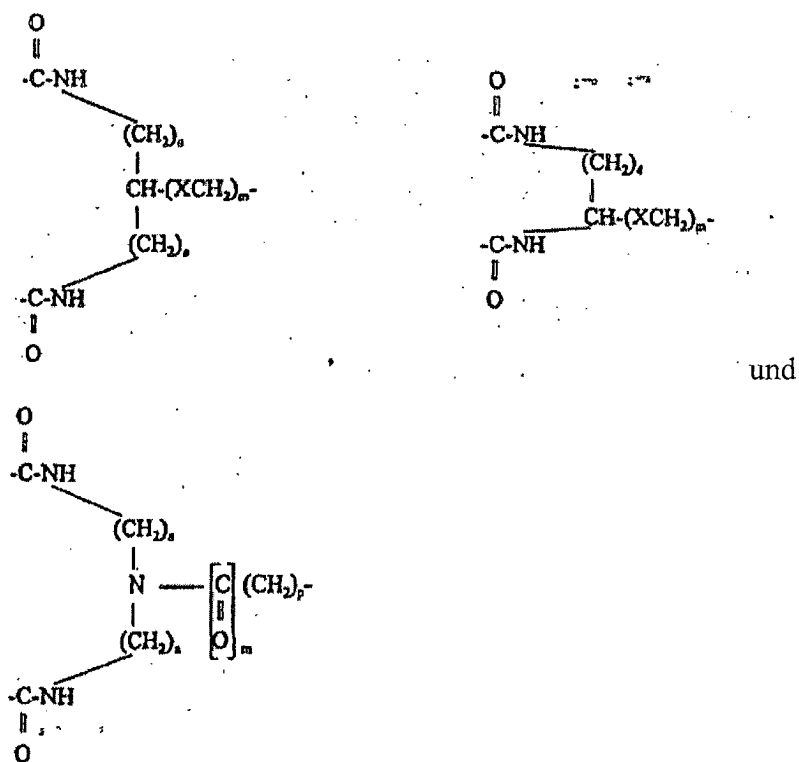


(I)

wobei (R) ein wasserlösliches, im Wesentlichen nicht-antigenes Polymer ist, das eine terminale C_1-C_4 -Alkylgruppe enthält;

(n) = 2

(L) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



wobei

(a) eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist;

(m) 0 oder 1 ist;

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus O, NQ, S, SO, SO₂; wobei Q H, C₁₋₈-Alkyl, verzweigtes C₁₋₈-Alkyl, substituiertes C₁₋₈-Alkyl, Aryl oder Aralkyl ist; und

(p) eine positive ganze Zahl ist; und

(A) eine funktionelle Gruppe ist, die mit einem Nukleophil kovalent binden kann;
mit N-Hydroxysuccinimid und einem Kondensationsmittel.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen