

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 620**

(51) Int. Cl.:

C08G 65/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03709581 .7**

(86) Fecha de presentación : **12.03.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1496076**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

(54) Título: **Derivado de polímeros hidrofílicos con rama tipo Y y método de preparación de compuesto método que comprende el compuesto anterior.**

(30) Prioridad: **13.03.2002 WO PCT/CN02/00147**

(73) Titular/es: **Beijing Jiankai Technology Co., Ltd.**
Building C-4F, Shangdi Xinxilu nº 2
Pioneering Park, Haidian District
100085 Beijing, CN

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(72) Inventor/es: **Ji, Shishan y**
Zhu, Dequan

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(74) Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 291 620 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

Derivado de polímeros hidrofílicos con rama tipo Y y método de preparación de compuesto método que comprende el compuesto anterior.

5

Campos de la invención

La presente invención se refiere a derivados de polímeros hidrofílicos ramificados con forma de Y, sus métodos de preparación, y conjugados de los derivados y moléculas de fármaco, en especial proteínas y polipéptidos. Esta 10 invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados.

Antecedentes de la invención

Se han usado como medicinas proteínas y polipéptidos naturales y recombinantes. Los productos después de la 15 purificación y separación pueden utilizarse para tratar enfermedades específicas por vías parenterales. Cuando son administradas parenteralmente, no obstante, las proteínas pueden tener inmunogenicidad, o ser relativamente insolubles en agua, o tener vidas medias farmacológicas cortas. Cómo aumentar y mantener una concentración de suero muy efectiva *in vivo* es de gran importancia.

Además de proteínas, clínicamente hay necesidad de modificar otros constituyentes de medicina natural tales 20 como flavonoides, terpenoides, antraquinonas, esteroides y alcaloides para prolongar sus vidas medias fisiológicas, mejorar su estabilidad y la posibilidad de alcanzar el lugar objetivo, aumentar su solubilidad en agua, cambiar vías de administración y mejorar la biodisponibilidad.

Recientemente, se ha usado ampliamente PEG para conjugar proteínas, péptidos u otros agentes terapéuticos, para prolongar sus vidas medias fisiológicas y reducir su inmunogenicidad y toxicidad. Clínicamente, se han usado ampliamente PEG y sus derivados como portadores en la fabricación de preparaciones farmacéuticas de fármacos comerciales. Los métodos para conjugar PEG con moléculas de fármacos han progresado mucho en los últimos 10 25 años y habían sido aplicados a muchos fármacos aprobados oficialmente. Por ejemplo, PEG-intron®, un conjugado de PEG con un -interferón, muestra una vida media de circulación más larga y mejor efecto terapéutico. El conjugado de PEG con paclitaxel reduce la toxicidad y aumenta la bioactividad. El metabolismo del PEG es muy conocido, y el PEG es aceptado como modificador de fármacos seguro.

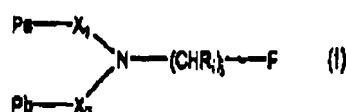
Un proceso llamado PEGilación es aplicado a menudo cuando se conjuga PEG con fármacos. A saber, uno o más 30 de los grupos terminales del PEG son activados para formar un grupo funcional adecuado, el cual es reactivo a al menos un grupo funcional de los fármacos, y puede formar un enlace estable con él.

Se ha informado sobre muchos derivados de PEG. Se ha informado sobre el ácido propiónico de PEG lineal, el 35 ácido butanoico y sus ésteres de NHS en la patente estadounidense nº 5672662. Recientemente, se ha informado sobre un PEG ramificado con forma de U en la patente estadounidense nº 5643575 En estos derivados de PEG, dos PEG lineales se enlazan a una molécula o estructura a través de dos grupos funcionales lineales, tales como dos grupos amino o dos grupos carboxilo. En un ejemplo de la patente, el PEG ramificado es derivado de PEG lineal y lisina, que 40 es una especie de aminoácido que tiene dos grupos amino.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un derivado de polímeros hidrofílicos ramificados con forma de Y nuevo, que está representado por la fórmula I:

50



55

donde

P_a y P_b son polímeros hidrofílicos, los cuales son el mismo o diferentes;

60

j es un número entero de 1 a 12;

R_i está seleccionado del grupo compuesto de H, un C_{1-12} alquilo no sustituido o sustituido, un arito sustituido, un aralquilo, y un heteroalquilo;

65

X_1 y X_2 independientemente son grupos de enlace, donde X_1 es $(\text{CH}_2)_n$, y X_2 es seleccionado del grupo compuesto por $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_n\text{OCO}$, $(\text{CH}_2)_n\text{NHCO}$ y $(\text{CH}_2)_n\text{CO}$, donde n es un número entero de 1-10; y

F es un grupo funcional seleccionado del grupo compuesto por un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo éster, cloruro de ácido carboxílico, hidracida, maleimida y disulfuro de piridina, siendo capaz de reaccionar con

ES 2 291 620 T3

un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo tiol de un agente terapéutico o un sustrato para formar un enlace covalente.

Según otro aspecto de la invención, se proporcionan derivados de poli(etilenglicol) ramificados con forma de Y representados por la fórmula II:

10



donde

15

P_a y P_b son polietilenglicoles, que son el mismo o diferentes;

n y j son independientemente un número entero de 1 a 12;

20

R_i está seleccionado del grupo compuesto por H, un C_{1-12} alquilo no sustituido o sustituido, un arilo sustituido, un aralquilo, y un heteroalquilo; y

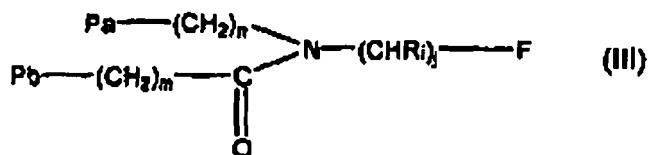
25

F es un grupo funcional seleccionado del grupo compuesto de un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo éster, cloruro de ácido carboxílico, hidracida, maleimida y disulfuro de piridina, siendo capaz de reaccionar con un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo tiol de un agente terapéutico o un sustrato para formar un enlace covalente.

30

Según además otro aspecto de la invención, se proporcionan derivados de poli(etilenglicol) ramificados con forma de Y representados por la fórmula III:

35



donde

40

P_a y P_b son polietilenglicoles, que son el mismo o diferentes;

n, m y j son independientemente un número entero de 1 a 12;

45

R_i está seleccionado del grupo compuesto por H, un C_{1-12} alquilo no sustituido o sustituido, un arilo sustituido, un aralquilo, y un heteroalquilo; y

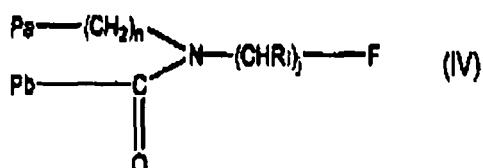
50

F es un grupo funcional seleccionado del grupo compuesto por un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo éster, cloruro de ácido carboxílico, hidracida, maleimida y disulfuro de piridina, siendo capaz de reaccionar con un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo tiol de un agente terapéutico o un sustrato para formar un enlace covalente.

55

Según además otro aspecto de la invención, se proporcionan derivados de poli(etilenglicol) ramificados con forma de Y representados por la fórmula IV:

60



donde

65

P_a y P_b son polietilenglicoles, que son el mismo o diferentes;

n y j son independientemente un número entero de 1 a 12;

70

R_i está seleccionado del grupo compuesto por H, un C_{1-12} alquilo no sustituido o sustituido, un arilo sustituido, un aralquilo, y un heteroalquilo; y

ES 2 291 620 T3

F es un grupo funcional seleccionado del grupo compuesto por un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo éster, cloruro de ácido carboxílico, hidracida, maleimida y disulfuro de piridina, siendo capaz de reaccionar con un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo tiol de un agente terapéutico o un sustrato para formar un enlace covalente.

5 Según además otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar el derivado de PEG de la fórmula II, que comprende:

10 a 0°C inicio de la polimerización de óxido de etileno con N, N-di-2-hidroxiletil-2-benzoxietil amina en la presencia de un catalizador;

alquilación de grupos hidroxilo terminales;

eliminación de grupos bencilo por hidrogenización catalítica; y

15 derivatización del grupo hidroxilo nuevo para incorporar el grupo terminal F.

Según además otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar los derivados de PEG de las fórmulas (III) y (IV), que comprende:

20 reacción de un mesilato de metoxipolietilenglicol con un aminoácido bajo condiciones básicas,

reacción del producto obtenido arriba con otro derivado de metoxipolietilenglicol, y posterior derivatización para incorporar un grupo F terminal.

25 Según además otro aspecto de la invención, se proporcionan conjugados de los derivados de polímeros de arriba y moléculas de fármacos a través del grupo funcional F.

Según además otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de arriba.

30 Descripción breve de los dibujos

Fig. 1 muestra la síntesis de derivados de polietilenglicol ramificados con forma de Y (1).

35 Fig. 2 muestra la síntesis de derivados de polietilenglicol ramificados con forma de Y (2) y (7).

Fig. 3 muestra la síntesis de derivados de polietilenglicol ramificados con forma de Y (5).

40 Fig. 4 muestra la síntesis de derivados de polietilenglicol ramificados con forma de Y (6).

Fig. 5 muestra la síntesis de conjugados de derivados de polietilenglicol ramificados con forma de Y (1) y fármacos (a través de enlaces de éster).

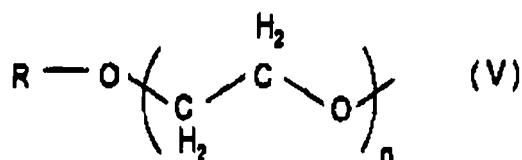
45 Fig. 6 muestra la síntesis de conjugados de derivados de polietilenglicol ramificados con forma de Y y fármacos (a través de otros enlaces).

Fig. 7 muestra la síntesis de conjugados de derivados de polietilenglicol ramificados con forma de Y y proteínas.

50 Descripción detallada de la invención

En la presente invención, el polímero hidrofílico es, por ejemplo, un polietilenglicol, un polipropilenglicol, un alcohol polivinílico, una poliacrilmorfolina o un copolímero de los mismos, especialmente preferidos son un polietilenglicol y copolímeros del mismo.

55 En los derivados de PEG de las fórmulas (II) a (IV) de la presente invención, P_a y P_b pueden ser el mismo o diferentes, y pueden ser el PEG representado por la siguiente fórmula (V):



65

ES 2 291 620 T3

donde:

R es H, un C₁₋₁₂ alquilo, cicloalquilo o aralquilo; y

5 n es un número entero, que representa el grado de polimerización, preferiblemente haciendo que el peso molecular de PEG sea 300 a 60.000.

En la fórmula (V), R es preferiblemente H, metilo, etilo, isopropilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo o bencilo.

10 Los derivados de polímeros hidrofílicos ramificados con forma de Y de la presente invención son preparados preferiblemente uniendo dos cadenas de PEG lineal a un grupo amino de una molécula pequeña.

El PEG se usa aquí como un ejemplo para ilustrar la preparación de derivados de polímeros hidrofílicos ramificados con forma de Y de la presente invención.

15 La estructura general del PEG es como la fórmula de abajo:



25

donde:

R es H, un C₁₋₁₂ alquilo, un cicloalquilo o un aralquilo, y

30 n es un número entero, que representa el grado de la polimerización.

Como un alquilo inferior, R puede ser cualquier grupo alquilo inferior que tenga 1-6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, n-pentilo, o n-hexilo. Como un cicloalquilo, R es preferiblemente un cicloalquilo que contiene 3-7 átomos de carbono, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, y ciclohexilo. Entre éstos, el ciclohexilo es más preferible. El compuesto típico es metoxipolietenglicol (mPEG). Otros análogos y derivados del polietenglicol, tales como los polipropilenglicoles, los alcoholes de polivinilo, y las poliacrilmorfolinas y similares, también pueden ser usados en la presente invención.

40 Con respecto a los PEG, éstos suelen ser medidos por peso molecular. Se prefiere que el peso molecular del PEG que forma los conjugados se encuentre en el intervalo de 300 a 60.000 daltones, lo que significa que n es aproximadamente 6 a 1.300. Es más preferido que n sea 28, 112 y 450, correspondiendo respectivamente al peso molecular de 1.325, 5.000 y 20.000. Debido a la no homogeneidad de los PEG iniciales que suelen ser definidos por sus pesos moleculares más que la unidad de autorrepetición n, los PEG suelen caracterizarse con un peso molecular de media de peso, más que sus unidades de autorrepetición representadas por n. Los compuestos de PEG iniciales con 45 diferentes pesos moleculares diferentes son sintetizados con facilidad usando métodos conocidos en la técnica o están disponibles comercialmente.

50 Los derivados de PEG con forma de Y de la presente invención pueden ser sintetizados y preparados mediante métodos generales en este campo. Los diferentes compuestos reivindicados en la invención son sintetizados y preparados mediante métodos conocidos, los cuales se pueden encontrar en las literaturas tecnológicas y patentes en este campo.

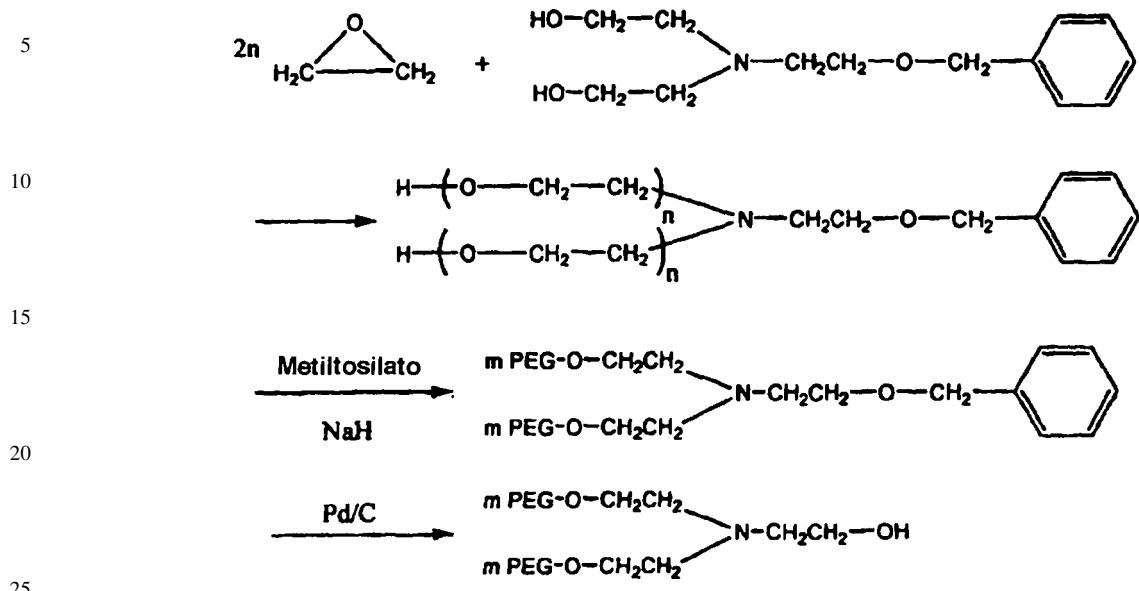
55 Para que P_a y P_b sean mPEG, X₁ y X₂ sean un alquilo ramificado simple, y F sea un grupo hidroxilo, la fórmula posible está más abajo:



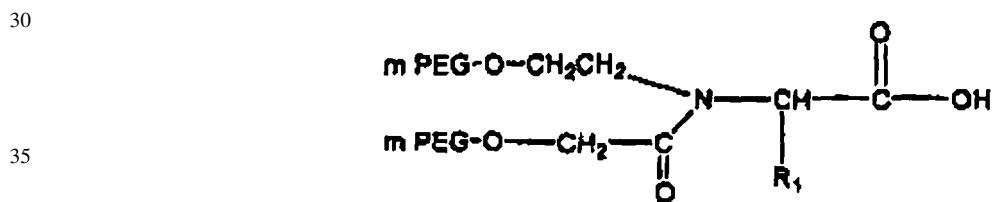
65

ES 2 291 620 T3

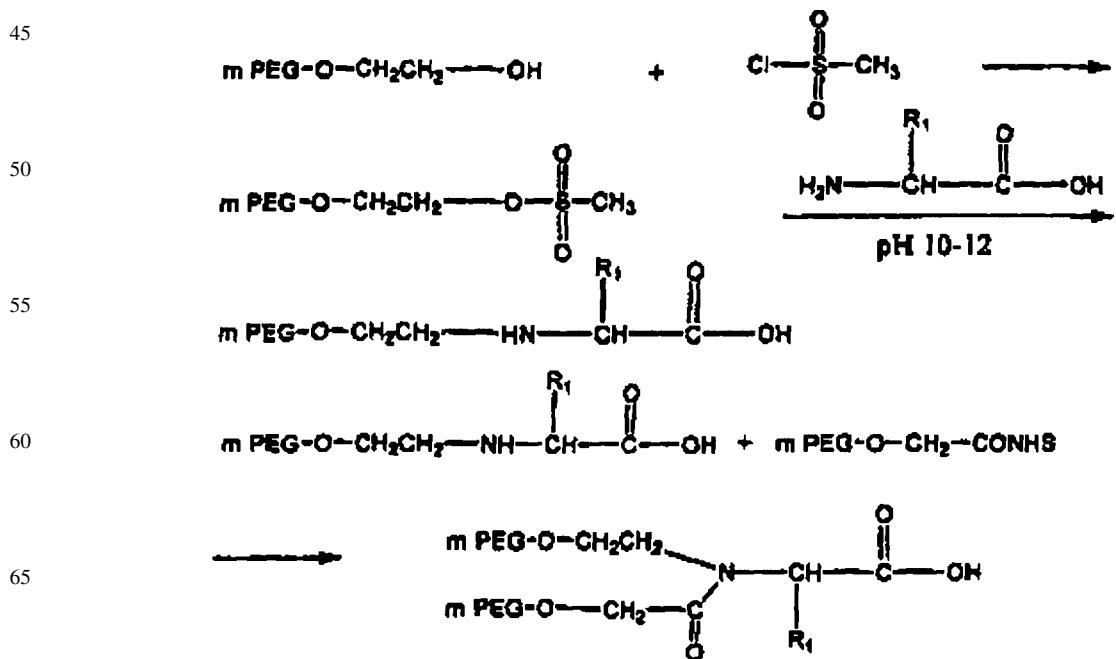
Este compuesto puede ser preparado usando un iniciador de polimerización estándar, para promover la polimerización de óxido de etileno o etilenglicol. Un método estándar de preparación se muestra más abajo:



Para que P. y Pb sean metoxipolietilenglicos (mPEG), siendo X_1 y X_2 diferentes, la fórmula posible está más abajo:



Este compuesto puede ser obtenido a partir de reacciones graduales de un PEG con un compuesto que contiene un grupo amino. El compuesto seleccionado que contiene un grupo amino puede ser un aminoácido, una aminoacetona u otra molécula con un grupo amino. La vía de preparación estándar está ilustrada más abajo. No obstante, hay otros métodos estándar útiles para preparar este derivado que son conocidos en este campo.



ES 2 291 620 T3

Cuando se usan los derivados de polímeros hidrofílicos de la presente invención, el grupo terminal F desempeña un papel clave. Derivados con grupos terminales diferentes tienen usos diferentes. La introducción de estos grupos funcionales determina los campos y estructuras aplicables de estos derivados. Respecto al uso deseado, los métodos siguientes pueden utilizarse para modificar el grupo funcional terminal:

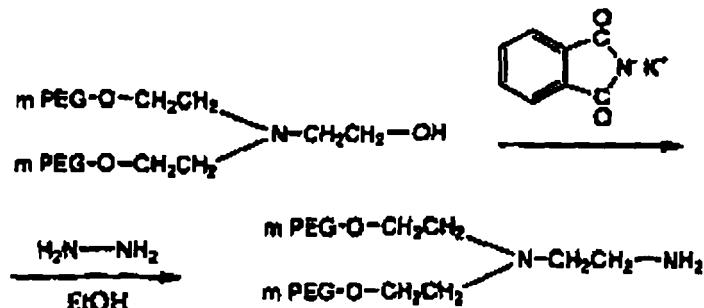
5

1. Aminación

Debido a la mayor reactividad de grupos amino sobre grupos hidroxilo, los derivados de PEG aminados son importantes en la reacción con una molécula que tenga un grupo de ácido carboxílico para dar como resultado un conjugado.

10

15



20

25

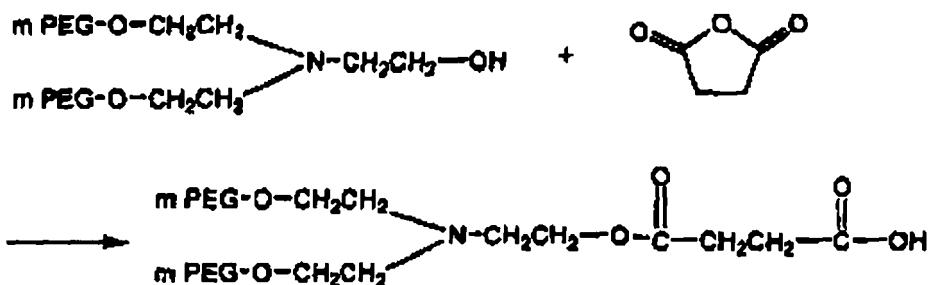
2. Carboxilación

La carboxilación ayuda a mejorar la reactividad de PEG y posibilita su conjugación con moléculas que tengan grupos amino o hidroxilo.

30

35

40



45

Si un aminoácido se usa como material inicial, el grupo terminal del PEG con forma de Y resultante tendrá un grupo carboxílico. Especialmente, si se usan aminoácidos o polímeros que contienen ácidos carboxílicos múltiples, los grupos terminales tendrán varios grupos de ácido carboxílico. Este tipo de estructura es útil para aumentar la carga de molécula de fármaco natural pequeña y alcanzar un efecto de liberación lento por degradación gradual.

3. Otros métodos de modificación

50

Otra modificación, por ejemplo, por cloruro de ácido, hidracina, maleimida, disulfuro de pirina y similares puede adoptarse de manera apropiada, así como obtenerse derivados correspondientes. Otros métodos de preparación en este campo serán evidentes para los expertos en esta técnica.

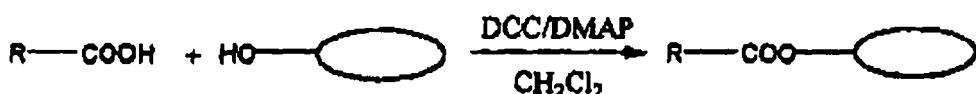
55

Muchos componentes de fármacos naturales tienen grupos funcionales activos tales como grupos amino, carboxilo e hidroxilo, los cuales enlazan con monosacáridos, polisacáridos, nucleósidos, polinucleósidos, fosforilo y similares *in vivo*, para formar estructuras farmacológicas activas.

60

De forma similar, los derivados de PEG con el grupo funcional terminal modificado puede conjugarse con las moléculas de fármaco de la misma manera para tomar el lugar de una molécula bioorgánica y superar los defectos de vidas medias fisiológicas cortas y el bajo efecto terapéutico. El modelo siguiente es una reacción de síntesis de éster general.

65



ES 2 291 620 T3

Un grupo éster puede ser eliminado por biodegradación *in vivo* para liberar el ingrediente activo. Un grupo amida es relativamente estable *in vivo*.

Los derivados de polímeros hidrofílicos con forma de Y de la presente invención pueden formar conjugados con moléculas de fármaco a través de grupos funcionales adecuados. Estos grupos funcionales pueden enlazar el grupo amino, hidroxilo o tiol libre de proteínas, polipéptidos y otros fármacos naturales con los derivados de polímeros. Para proteínas y péptidos con peso molecular alto, una molécula puede enlazarse con uno o más derivados de PEG para mejorar los efectos fisiológicos de las moléculas de fármacos *in vivo*. Para los componentes activos de un fármaco natural con peso molecular bajo, un derivado de PEG puede ser enlazado a una o más moléculas de fármaco a través de grupos funcionales apropiados para asegurar una concentración de fármaco apropiada y la función de liberación sostenida.

Las aplicaciones descritas arriba ofrecen algunos modelos de referencia posibles para aplicación médica de los derivados de PEG. La elección de derivados apropiados para aplicaciones reales puede ser confirmada usando farmacología animal, toxicología, estudio clínico y otros enfoques de este tipo.

Preferiblemente, las moléculas de fármaco incluidas en los conjugados de la presente invención son los ingredientes activos separados de plantas naturales, tales como el paclitaxel, la camptotecina, la cinobufagina, el ácido cítrirretinoico y la escopoletina. Preferiblemente, los fármacos son los ingredientes de medicinas naturales usados en el tratamiento de tumores, tales como el paclitaxel, la camptotecina, y derivados de los mismos. Los fármacos preferidos también incluyen interferones, tales como α - y β -interferón.

Los conjugados de la presente invención pueden ser administrados en la forma de compuestos puros o composiciones farmacéuticas adecuadas, por medio de cualesquiera vías aceptables o siendo incluidos en un reactivo para uso similar. Así, los conjugados pueden ser administrados por medio de vías orales, nasales, parenterales, tópicas, transdérmicas, rectales o de inyección en la forma de polvo sólido, semisólido, liofilizado o líquido, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas de gelatina blanda y dura, polvo, solución, suspensión y aerosoles. Preferiblemente, la forma de dosificación unitaria es conveniente para una dosificación precisa y fácil administración. La composición incluye portadores o excipientes farmacéuticos convencionales y el/los conjugado(s) de la presente invención como el/los ingrediente(s) activo(s). Además, también puede incluir otros agentes, portadores y excipientes.

En términos generales, dependiendo del método de administración, las composiciones aceptables farmacéuticamente incluirán aproximadamente el 1-99% en peso del conjugado de la presente invención, y el 99-1% en peso de excipiente farmacéutico adecuado. Preferiblemente, incluyen el 5-75% en peso del conjugado y el resto es cualquier excipiente farmacéutico adecuado.

El modo preferible de administración es la inyección con un esquema de dosificación general diario, que puede ser ajustado basado en la gravedad de la enfermedad que ha de ser tratada. Los conjugados de la presente invención o sus sales aceptables farmacéuticamente pueden ser formuladas en la dosificación para inyección, por ejemplo, disolviendo 0'5-50% de los componentes activos en un portador farmacéutico líquido, tal como agua, salina, glucosa acuosa, glicerol, etanol y similares para formar una solución de suspensión.

Las composiciones que pueden ser administradas como líquido tales como soluciones y suspensiones pueden ser preparadas disolviendo y dispersando el conjugado de la presente invención (aproximadamente 0'5-20%) y opcionalmente el excipiente farmacéutico en el portador. Ejemplo de portadores incluye agua, salina, glucosa acuosa, glicerol, etanol y similares.

Si se necesita, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además un adyuvante en una pequeña cantidad, tal como agente humectante, emulsionante, tampón pH, antioxidante y similares. Por ejemplo, se pueden añadir ácido cítrico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, hidroxitolueno butilado y similares.

Los métodos de preparación práctica de tales formas de dosificación son conocidos u obvios para los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase Pharmaceutical Sciences de Remington, 18^a edición, (Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1.990). En cualquier caso, según las técnicas de la presente invención, la composición aplicada incluirá una cantidad eficaz del conjugado de la presente invención para el tratamiento de la enfermedad correspondiente.

60

Ejemplos

Los derivados de polímeros y los conjugados de la presente invención y sus métodos de preparación se describirán adicionalmente mediante los ejemplos siguientes. Estos ejemplos no están destinados a limitar el ámbito de la invención de ninguna forma. El ámbito de la presente invención puede ser determinado por las reivindicaciones.

ES 2 291 620 T3

Ejemplo 1

Síntesis de derivados de polietilenglicol ramificados con forma de Y (1)

5 La síntesis se muestra en la figura 1. A 0°, se añadieron 10 ml. de óxido de etileno seco a un matraz de alto rendimiento, el cual incluía 200 mg. de N,N-dihidroxiletil-2-benziloxietil amina y 50 mg. de NaH seco. La mezcla de la reacción fue agitada con la temperatura siendo aumentada lentamente. Después de 28 horas, el líquido viscoso fue enfriado con agua y el polímero fue extraído con diclorometano. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro, y el disolvente fue extraído al vacío. Rendimiento: 8'2 g (81%), Pf: 56-58°C.

10 Se disolvieron 5 g. de (PEG)₂-N-CH₂CH₂O-Bz (el peso molecular es 10.000, obtenido del paso de arriba) en 50 ml. de tolueno. Se añadieron 0'1 g. de hidruro sódico y 0'5 g. de éster metílico de ácido sulfónico de benceno a la solución. La mezcla de la reacción fue calentada a 80°C durante 24 horas. Entonces, la solución fue enfriada con 2 ml. de alcohol isopropílico. El disolvente fue extraído al vacío y el residuo fue añadido a 200 ml. de alcohol isopropílico.

15 El precipitado fue recogido por filtración y secado en vacío. Rendimiento: 4'6 g (92%), Pf: 57-59°C.

20 Se disolvieron 3 g. de (MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂O-Bz (el peso molecular es 10.000, obtenido del paso de arriba) en 30 ml. de 1,4-dioxano anhidro. Entonces, se añadieron 0'1 g. de Pd/C a la mezcla de la solución como catalizador y se introdujo gas H₂ (40 psi) en el reactor. La solución fue agitada enérgicamente a temperatura ambiente durante la noche. El catalizador fue extraído por filtración y fue lavado con diclorometano fresco. El disolvente fue eliminado por evaporación giratoria y el residuo fue añadido en éter etílico. El precipitado fue recogido por filtración y secado en vacío. Rendimiento: 2'4 g (80%). NMR(DMSO): 3'5 (br m, H en PEG); 3'24 (s; 6H); 2'63 (t; 6H).

Ejemplo 2

Síntesis de succinimidil carbonato de polietilenglicol ramificado con forma de Y (2)

25 La síntesis se muestra en la figura 2. Se disolvieron 1 g. de derivado de PEG ramificado con forma de Y de PM 10.000 ((MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂OH, del ejemplo 1) y 0'1 g. de disuccinimidil carbonato en 20 ml. de acetonitrilo. 30 Se añadieron 0'1 ml. de piridina a la solución. La mezcla de la reacción fue agitada bajo la protección de nitrógeno durante la noche. El disolvente fue eliminado por evaporación giratoria y el residuo fue secado al vacío. El residuo sólido fue añadido a 10 ml. de diclorometano seco. El sólido no disuelto fue filtrado. La fase orgánica fue lavada con tampón de acetato sódico (0'1 M, pH 5.5), secada con sulfato de sodio anhidro, concentrada por evaporación giratoria, y precipitada en éter etílico. El producto fue secado en vacío. Rendimiento: 0'9 g (90%). NMR (DMSO): 3'5 (br m, H en PEG); 3'24 (s; 6H), 4'45 (t, 2H), 2'82 (s, 4H).

Ejemplo 3

Síntesis de mPEG-glicina (3)

40 Se disolvieron 5 g. de mPEG de peso molecular 5.000 en 50 ml. de tolueno, destilado azeotrópicamente durante 2 horas bajo la protección de nitrógeno, con 10 ml. de solución siendo extraída por destilación, y después se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadieron a la reacción 3 ml. de diclorometano seco y 0'08 ml. de trietilamina seca. La mezcla se enfrió en un baño de agua helada y se añadieron gota a gota 0'12 ml. de cloruro de metanosulfonilo seco. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente bajo la protección de nitrógeno durante la noche. La reacción fue enfriada añadiendo 2 ml. de etanol absoluto. Se eliminó parte del disolvente por evaporación giratoria, se recogió el precipitado por filtración, y entonces se añadieron 150 ml. de éter etílico. El precipitado fue recogido por filtración y secado en vacío. Rendimiento: 4'8 g (96%). NMR(DMSO): 3'5 (br m, H en PEG), 3'24 (s; 3 H; 4'32 (t; 2H).

50 Se disolvieron 2 g. de hidrocloruro de glicina en 20 ml. de agua desionizada. Se añadió 1 g. de NaOH a la solución de glicina para ajustar el pH en 10.5. Luego, se añadieron a la solución 2 g. de éster de mesilato de mPEG de peso molecular 5.000 (obtenido del paso de arriba). La solución fue incubada a 37°C durante 72 horas, y luego neutralizada por solución de hidrocloruro a pH aproximadamente 7. El polímero fue extraído con diclorometano. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro y el disolvente fue extraído al vacío. Rendimiento: 1'7 g (85%), Pf: 55-57°C.

55 NMR (DMSO): 3'5 (br m, H en PEG), 3'24 (s, 3H), 2'95 (t; 2H), 3'11 (s, 2H).

Ejemplo 4

Síntesis de mPEG-alanina (4)

60 Se disolvieron 5 g. de mPEG de peso molecular 5.000 en 50 ml. de tolueno, destilado azeotrópicamente durante 2 horas bajo la protección de nitrógeno con 10 ml. de disolvente siendo extraído por destilación, y entonces se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadieron a la reacción 3 ml. de diclorometano seco y 0'08 de trietilamina seca. La mezcla fue enfriada en un baño de agua helada y se añadieron gota a gota 0'12 ml de cloruro de metanosulfonilo seco. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente bajo la protección de nitrógeno durante la noche. La reacción fue enfriada añadiendo 2 ml. de etanol absoluto. El disolvente fue extraído por evaporación giratoria, el precipitado fue recogido por filtración, y luego fueron añadidos 150 ml. de éter etílico. El precipitado fue recogido por filtración y secado en vacío. Rendimiento: 4'5 g (90%). NMR (DMSO): 3'5 (br m, H en PEG); 3'24 (s, 3H), 4'32 (t, 2H).

ES 2 291 620 T3

Se disolvieron 2 g. de hidrocloruro de alanina en 20 ml. de agua desionizada. Se añadió 1 g. de NaOH a la solución de alanina para ajustar el pH en 10.5. Luego, se añadieron a la solución 2 g. de mesilato de mPEG de peso molecular 5.000. La solución fue incubada a 37°C durante 72 horas, y luego neutralizada con solución de hidrocloruro a pH aproximadamente 7. El polímero fue extraído con diclorometano. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro, y el disolvente fue extraído al vacío. Rendimiento: 1'9 g (94%), Pf: 55-57°C. NMR (DMSO): 3'5 (br m, H en PEG), 3'24 (s, 3H), 2'94 (m, 1H), 1'24 (d, 3H).

Ejemplo 5

10 Síntesis de derivados de PEG ramificados con forma de Y (5) reactivos a un grupo amino

La síntesis se muestra en la figura 3. Se disolvió 1 g. de mPEG-glicina (3) o mPEG-alanina (4) de peso molecular 5.000 (del ejemplo 3 ó 4) en 20 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 1 g. de éster de carboxietil NHS de mPEG (mPEG-O-CH₂-CO-NHS, peso molecular 5.000) y 0'1 ml. de trietilamina. La solución fue agitada durante la noche. El disolvente fue extraído al vacío y el residuo fue añadido a éter etílico. El precipitado fue recogido por filtración y secado al vacío. El producto (ácido de PEG ramificado con forma de Y) fue más purificado por cromatografía de intercambio fónico. Rendimiento: 0'98 g (50%).

20 Se disolvieron 0'5 g. de ácido de mPEG ramificado con forma de Y en 10 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 7 mg. de N-hidroxilsuccinimida (NHS) y 13 mg. de dicitohexilcarbodiimida (DCC). La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente fue extraído al vacío. El residuo fue añadido a 20 ml. de alcohol isopropílico (AIP). El producto fue recogido por filtración y secado al vacío. Rendimiento: 0'48 g (96%), NMR (DMSO): 3'5 (br m, H en PEG), 3'24, (s, 6H), 2'81 (s, 4H), 4'15 (s, 2H), 4'07 (t, 2H), 4'48 (t, 2H).

25 Ejemplo 6

Síntesis de derivados de PEG ramificados con forma de Y (6) reactivos hacia el grupo amino

La síntesis se muestra en la figura 4. Se disolvió 1 g. de mPEG-glicina (3) o mPEG-alanina (4) de peso molecular 5.000 (del ejemplo 3 ó 4) en 20 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 1 g. de carbonato de NHS de mPEG (mPEGO-CO-NHS) de PM 5.000 daltones y 0'1 ml. de trietilamina. La solución fue agitada durante la noche. El disolvente fue extraído al vacío y el residuo fue añadido a éter etílico. El precipitado fue recogido por filtración y secado al vacío. El producto (ácido de PEG ramificado con forma de Y) fue más purificado por cromatografía de intercambio de iones. Rendimiento: 0'98 g (50%).

35 Se disolvieron 0'5 g. de ácido de mPEG ramificado con forma de Y en 10 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 7 mg. de N-hidroxilsuccinimida (NHS) y 13 mg. de dicitohexilcarbodiimida. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente fue extraído al vacío. El residuo fue añadido a 20 ml. de alcohol isopropílico. El precipitado fue recogido por filtración y secado al vacío. Rendimiento 0'48 g (96%). NMR (DMSO): 3'5 (br m, H en PEG), 3'24 (s, 6H), 2'81 (s, 4H), 4'15 (s, 2H), 4'07 (t, 2H).

Ejemplo 7

45 Síntesis de derivados de PEG ramificados con forma de Y (7) reactivos hacia el grupo tiol

La síntesis se muestra en la figura 2. Se disolvió en tolueno 1 g. de PEG ramificado con forma de Y ((MeO-PEG)₂-NCH₂CH₂OH) de peso molecular 10.000 (obtenido en el ejemplo 2), se destiló azeotrópicamente durante 2 horas bajo protección de nitrógeno, y luego se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron a la solución 3 ml. de diclorometano seco y 0'08 ml. de trietilamina seca. La mezcla fue enfriada en un baño de agua helada y cloruro de metanosulfonilo seco fue añadido gota a gota. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente bajo nitrógeno seco durante la noche. La reacción fue enfriada añadiendo 3 ml. de etanol absoluto. El disolvente fue extraído por evaporación giratoria, el precipitado fue eliminado por filtración, y luego se añadieron 150 ml. de éter etílico. El precipitado fue recogido por filtración y secado en vacío. Rendimiento: 0'8 g (80%).

55 Se disolvió 1 g. de mesilato de PEG ramificado con forma de Y ((MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂OMs) de peso molecular 10.000 en 30 ml. de solución de amonio acuosa con el 5% de cloruro de amonio. La solución fue agitada durante 72 horas a temperatura ambiente. La solución fue extraída con diclorometano tres veces. La fase orgánica combinada fue secada con sulfato de sodio anhidro. El disolvente fue extraído al vacío. El residuo fue añadido a 50 ml. de alcohol isopropílico. El precipitado fue recogido y secado al vacío. Rendimiento: 0'7 g (70%).

60 Se disolvieron en acetonitrilo 0'5 g. de PEG amina ramificado con forma de Y ((MeO-PEG)₂-N-CH₂CH₂NH₂). Se añadieron a la solución 20 mg. de NHS-3-maleimidopropionato. La solución fue agitada durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente fue extraído al vacío. El residuo fue añadido a 30 ml. de alcohol isopropílico. El precipitado fue recogido y secado al vacío. Rendimiento: 0'42 g (84%). NMR (DMSO): 3'5 (br m, H en PEG), 3'24 (s, 6H), 3'05 (t, 2H), 2'56 (t, 2H), 6'71 (s, 2H en maleimida).

ES 2 291 620 T3

Ejemplo 8

Conjugado de derivados de PEG-NHS ramificados con forma de Y con α-interferón (8)

- 5 La síntesis se muestra en la figura 7. Se disolvieron 75 mg. de succinimidil éster de polietenglicol ramificado con forma de Y (del ejemplo 2, 5 ó 6) en 5 ml. de solución tamponada de α -interferón con concentración de interferón de 5 mg/ml (pH 7.4). En la solución de la reacción, el PEG y el α -interferón estaban en una relación de 3:1. La solución fue agitada suavemente durante 1 hora a 4°C y luego 5 horas a temperatura ambiente. La solución fue diluida a una concentración de interferón final de 0'5 mg/ml y purificada por HPLC con columna de gel. Se recogió el conjugado de
10 PEG ramificado con forma de Y monosustituido de α -interferón. La SDS-PAGE mostró que el producto no contenía α -interferón libre.

Análisis por SDS-PAGE: Mezcla de la reacción y el PEG-IFN purificado fue sometido a electrofóresis de gel de dodecil (lauril) sulfato/poliacrilamida de sodio (8-16%) y coloreado para la proteína usando tinte azul de Coomassie.
15 Fracciones de PEG en los conjugados de PEG2-IFN fueron coloreadas específicamente usando solución de yodo Titrisol (EM Science, Gibbstown, Nueva Jersey). El gel de SDS-PAGE fue enjuagado con agua destilada y colocado en 5% solución de cloruro de bario. Después de 10 minutos, el gel de arriba fue lavado con agua destilada y colocado en solución de 0'1 N de yodo Titrisol durante otros 10 minutos. El Titrisol fue enjuagado con agua destilada. El PEG coloreado (bandas marrón anaranjado) por el gel de SDS-PAGE que contenía muestras de Y-PEG-IFN fue almacenado
20 en agua destilada en una bolsa Kapak/Scotchpak sellada al calor.

Ejemplo 9

Conjugado de derivados de PEG-NHS ramificados con forma de Y con β-interferón

- 25 Se disolvió succinimidil éster de polietenglicol ramificado con forma de Y (ejemplo 5 ó 6) en 5 ml. de solución tamponada de β -interferón con concentración de interferón de 1 mg/ml (pH 7.4). En la solución de la reacción, el PEG y el β -interferón estaban en una relación de 3:1. La solución fue agitada suavemente durante 7 horas. La solución fue purificada por HPLC con columna de gel. Se recogió el conjugado de PEG ramificado con forma de Y monosustituido de β -interferón. La SDS-PAGE y la CE mostraron que el producto no contiene β -interferón libre.

Ejemplo 10

Conjugado de derivados de PEG ramificados con forma de Y con paclitaxel (10)

- 35 La síntesis se muestra en la figura 5. Se disolvió 1 g. de ácido carboxílico de PEG ramificado con forma de Y (del ejemplo 5 ó 6) en 10 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 90 mg. de paclitaxel, 8 mg. de dimetilaminopiridina y 25 mg. de diciclohexilcarbodiimida. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente fue extraído al vacío. El residuo fue añadido a 20 ml. de alcohol isopropílico. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con éter y secado al vacío. Rendimiento: 0'8 g (80%), Pf: 55-57°C.

Ejemplo 11

Conjugado de derivados de PEG ramificados con forma de Y con camptotecina (11)

- 45 La síntesis se muestra en la figura 6. Se disolvió 1 g. de ácido carboxílico de PEG ramificado con forma de Y (ejemplo 5 ó 6) en 10 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 120 mg. de glicina-camtotecina, 50 mg. de dimetilaminopiridina y 95 mg. de diciclohexilcarbodiimida. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente fue extraído al vacío. El residuo fue disuelto en 20 ml. de 1,4-dioxano. El precipitado fue eliminado por filtración. La solución fue concentrada, y el residuo fue añadido a 20 ml. de éter etílico. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con éter etílico y secado al vacío. Rendimiento: 0'8 g (80%), Pf: 56-58°C.

55

Ejemplo 12

Conjugado de derivados de PEG ramificados con forma de Y con cinobufagina (12)

60

- La síntesis se muestra en la figura 5. Se disolvió 1 g. de ácido carboxílico de PEG ramificado con forma de Y (ejemplo 5 ó 6) en 10 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 60 mg. de cinobufagina, 12 mg. de 1-hidroxibenzotriazola, 16 mg. de dimetilaminopiridina y 40 mg. de diciclohexilcarbodiimida. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente fue extraído al vacío. El residuo fue añadido a 20 ml. de alcohol isopropílico. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con éter y secado al vacío. Rendimiento: 0'75 g. (75%), Pf: 57-59°C.

ES 2 291 620 T3

Ejemplo 13

Conjugado de derivados de PEG ramificados con forma de Y con escopoletina (13)

5 La síntesis se muestra en la figura 5. Se disolvió 1 g. de ácido carboxílico de PEG ramificado con forma de Y (ejemplo 5 ó 6) en 20 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 30 mg. de cinobufagina, 20 mg. de 1-hidroxibenzotriazola, 20 mg. de dimetilaminopiridina y 38 mg. de diciclohexilcarbodiimida. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 12 horas bajo protección de nitrógeno. El disolvente fue concentrado al vacío. El residuo fue añadido a 20 ml. de 1,4-dioxano. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con éter y secado por salida de aire. 10 El disolvente fue extraído al vacío. El residuo remanente fue añadido a 100 ml. de alcohol isopropílico. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con éter y secado por salida de aire. Los precipitados fueron combinados y secados al vacío. Rendimiento: 0'92 g (92%), Pf: 56-58°C.

Ejemplo 14

Conjugado de derivados de PEG ramificados con forma de Y con ácido clicirretínico (14)

15 La síntesis se muestra en la figura 6. Se disolvió 1 g. de ácido carboxílico de PEG ramificado con forma de Y (ejemplo 5 ó 6) en 10 ml. de diclorometano. Se añadieron a la solución 0'2 ml. de cloruro de tionilo. La solución fue 20 agitada durante 2 horas. El disolvente e impurezas con punto de ebullición bajo fueron extraídos al vacío. Se añadieron 10 ml. de solución de diclorometano con 70 mg. de ácido clicirretínico, y se disolvieron mezclando. Entonces, se añadieron 60 mg. de 4-dimetilaminopiridina. La mezcla de la reacción fue agitada durante 12 horas a temperatura ambiente bajo la protección de gas de nitrógeno. El disolvente fue concentrado al vacío. El residuo fue añadido en 20 ml. de alcohol isopropílico. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con éter etílico, secado por salida de aire, 25 y más secado al vacío. Rendimiento: 0'6 g (60%). Pf: 58~60°C.

Ejemplo 15

Este ejemplo es para ilustrar el proceso de preparación de una composición farmacéutica típica administrada parenteralmente. La composición comprende el conjugado de la presente invención.

Componente

Conjugado preparado en el ejemplo 8	2 g
0'9% de salina	100 ml

El conjugado preparado en el ejemplo 8 fue disuelto en salina al 0'9% para obtener 100 ml. de solución para inyección intravenosa, la cual fue filtrada a través de membrana de 0'2 pm y envasada asepticamente. El polvo para inyección se obtuvo por liofilización.

Referencias citadas en la descripción

45 La lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. Ésta no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que las referencias se han reunido muy cuidadosamente, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP renuncia a toda responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 50
- US 5672662 A [0006]
 - US 5643575 A [0006]

55

60

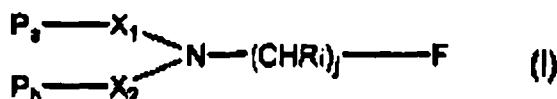
65

REIVINDICACIONES

1. Derivado de polímeros hidrofílicos ramificado con forma de Y representado por la fórmula I

5

10



donde

j es un número entero de 1 a 12;

15 R_i está seleccionado del grupo compuesto por H, un alquilo no sustituido o sustituido C₁₋₁₂, un arilo sustituido, un aralquilo, y un heteroalquilo;

20 F es un grupo funcional seleccionado del grupo compuesto por un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo éster, cloruro de ácido carboxílico, hidracida, maleimida y disulfuro de piridina, siendo capaz de reaccionar con un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo tiol de un agente terapéutico o un sustrato para formar un enlace covalente

y donde:

25 P_a y P_b son polímeros hidrofílicos, los cuales son el mismo o diferentes;

30 o X₁ y X₂ independientemente son grupos de enlace, donde X₁ es (CH₂)_n, y X₂ está seleccionado del grupo compuesto por (CH₂)_n, (CH₂)_nOCO, (CH₂)_nNHCO y (CH₂)_nCO, donde n es un número entero de 1-10;

P_a y P_b, son glicoles de polietileno, los cuales son el mismo o diferentes:

35 X₁ y X₂ independientemente son grupos de enlace, donde X₁ es (CH₂)_n, y X₂ está seleccionado del grupo compuesto por (CH₂)_n, CO y (CH₂)_mCO, donde n y m son independientemente un número entero de 1-12.

40 2. Derivado de polímeros hidrofílicos de la reivindicación 1, donde el polímero hidrofílico está seleccionado del grupo compuesto por el polietilenglicol, el polipropilenglicol, el alcohol polivinílico, la poliacrilmorfolina y copolímeros de los mismos.

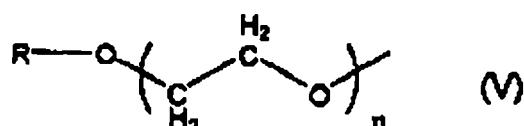
45 3. Derivado de polímeros hidrofílicos de la reivindicación 2, donde el polímero hidrofílico es polietilenglicol.

4. Derivado de polietilenglicol ramificado con forma de Y representado según la reivindicación 1, donde P_a y P_b son polietilenglicoles, los cuales son el mismo o diferentes y X₂ es (CH₂)_n.

50 5. Derivado de polietilenglicol ramificado con forma de Y según la reivindicación 1, donde P_a y P_b son polietilenglicoles, los cuales son el mismo o diferentes y X₂ es (CH₂)_nCO.

6. Derivado de polietilenglicol ramificado con forma de Y según la reivindicación 1, donde P_a y P_b son polietilenglicoles, los cuales son el mismo o diferentes y X₂ es CO.

55 7. Derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde P_a y P_b son el mismo o diferentes PEG de la fórmula (V):



60

donde

R es H, un C₁₋₁₂ alquilo, un cicloalquilo o un aralquilo; y

65 n es un número entero, que representa el grado de polymerización.

8. Derivado de la reivindicación 7, donde R está seleccionado del grupo compuesto por H, metilo, etilo, isopropilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo y bencilo.

ES 2 291 620 T3

9. Derivado de la reivindicación 7, donde el peso molecular de PEG es desde aproximadamente 300 a 60.000.

10. Método para preparar el derivado de PEG de la reivindicación 4, que comprende:

5 a 0°C inicio de la polimerización de óxido de etileno con N,N-di-2-hidroxiletil-2-benziloxietil amina en la presencia de un catalizador;

alquilación de grupos hidroxilos terminales;

10 eliminación de grupos bencilos por hidrogenización catalítica; y

derivatización del nuevo grupo hidroxilo para incorporar el grupo terminal F.

11. Método para preparar el derivado de PEG de la reivindicación 5 ó 6, que comprende:

15 reacción de un mesilato de metoxilpolietilenglicol con un aminoácido bajo condiciones básicas para producir un producto reactivo; y

20 reacción del producto reactivo obtenido arriba con otro derivado de metoxilpolietilenglicol, y derivatización adicional para incorporar un grupo terminal F.

12. Método de la reivindicación 11, donde el otro derivado de metoxilpolietilenglicol es éster de carboxietil NHS de mPEG.

25 13. Conjugado formado por la reacción del derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5 y 6 con moléculas de fármaco a través del grupo terminal F, preferiblemente una molécula de fármaco seleccionada del grupo compuesto por aminoácidos, proteínas, enzimas, nucleósidos, sacáridos, ácidos orgánicos, glucósidos, flavonoides, antraquinonas, terpenoides, fenoles fenilpropanoides, esteroides, glucósido de los esteroides y alcaloides.

30 14. Copolímero de los derivados de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5 y 6 y otros polímeros enlazados a través del grupo terminal F.

15. Conjugado de la reivindicación 13, donde el fármaco es un componente activo de una medicina natural, preferiblemente cinobufagina, ácido clicirretínico o escopoletina.

35 16. Conjugado de la reivindicación 13, donde el fármaco es un agente antitumoral, preferiblemente seleccionado del grupo compuesto de paclitaxel, camptotecina, interferón y derivados de los mismos.

17. Conjugado de la reivindicación 16, donde el interferón es α -, β - o γ - interferón.

40 18. Composición farmacéutica que comprende el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 y opcionalmente un portador y excipiente aceptables farmacéuticamente.

45

50

55

60

65

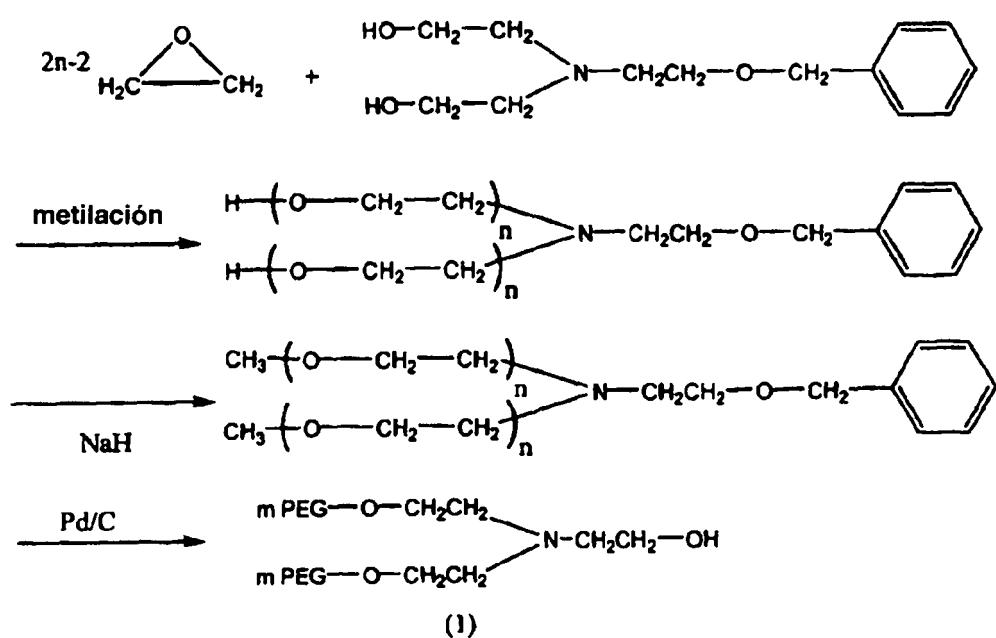


Fig. 1

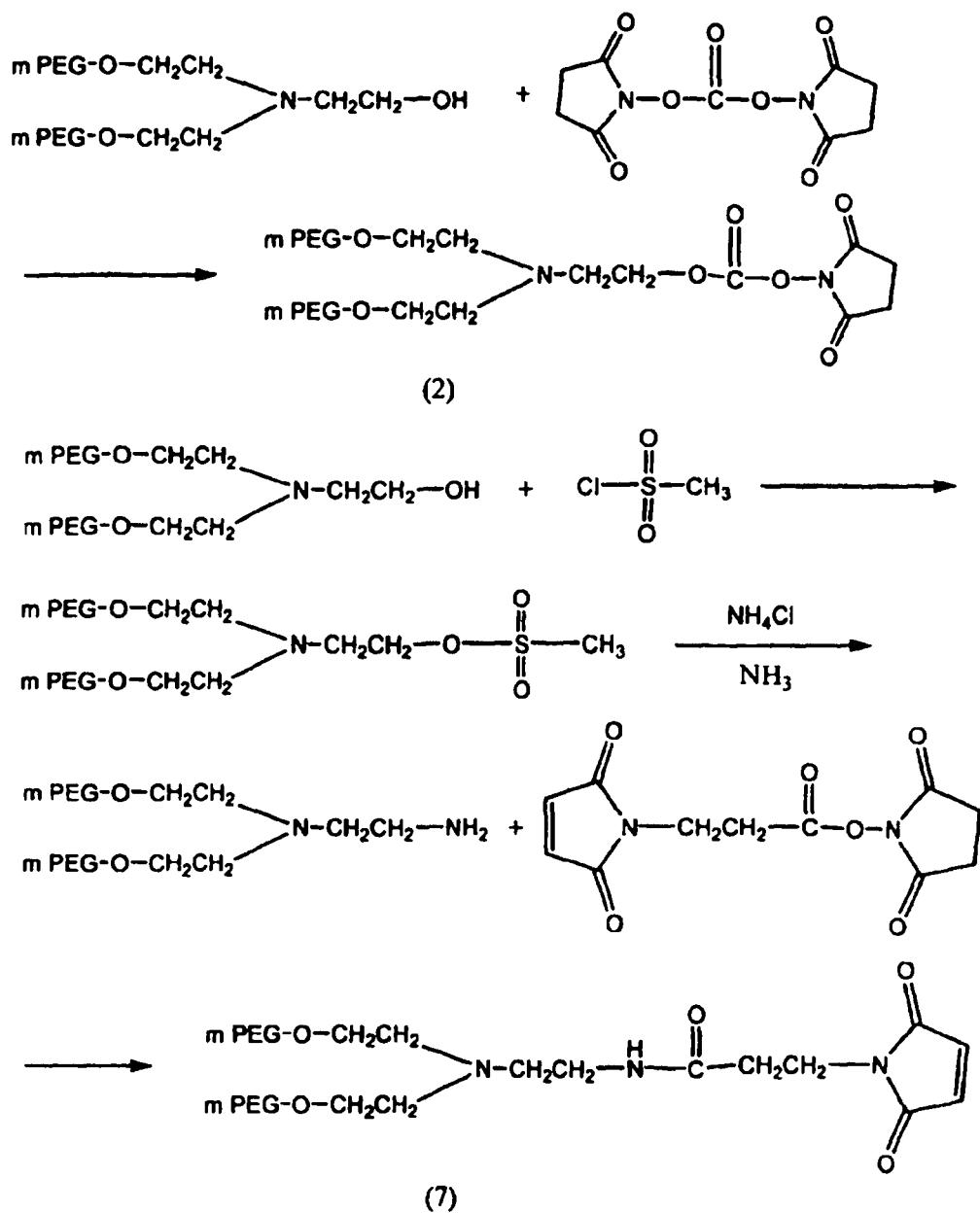


Fig. 2

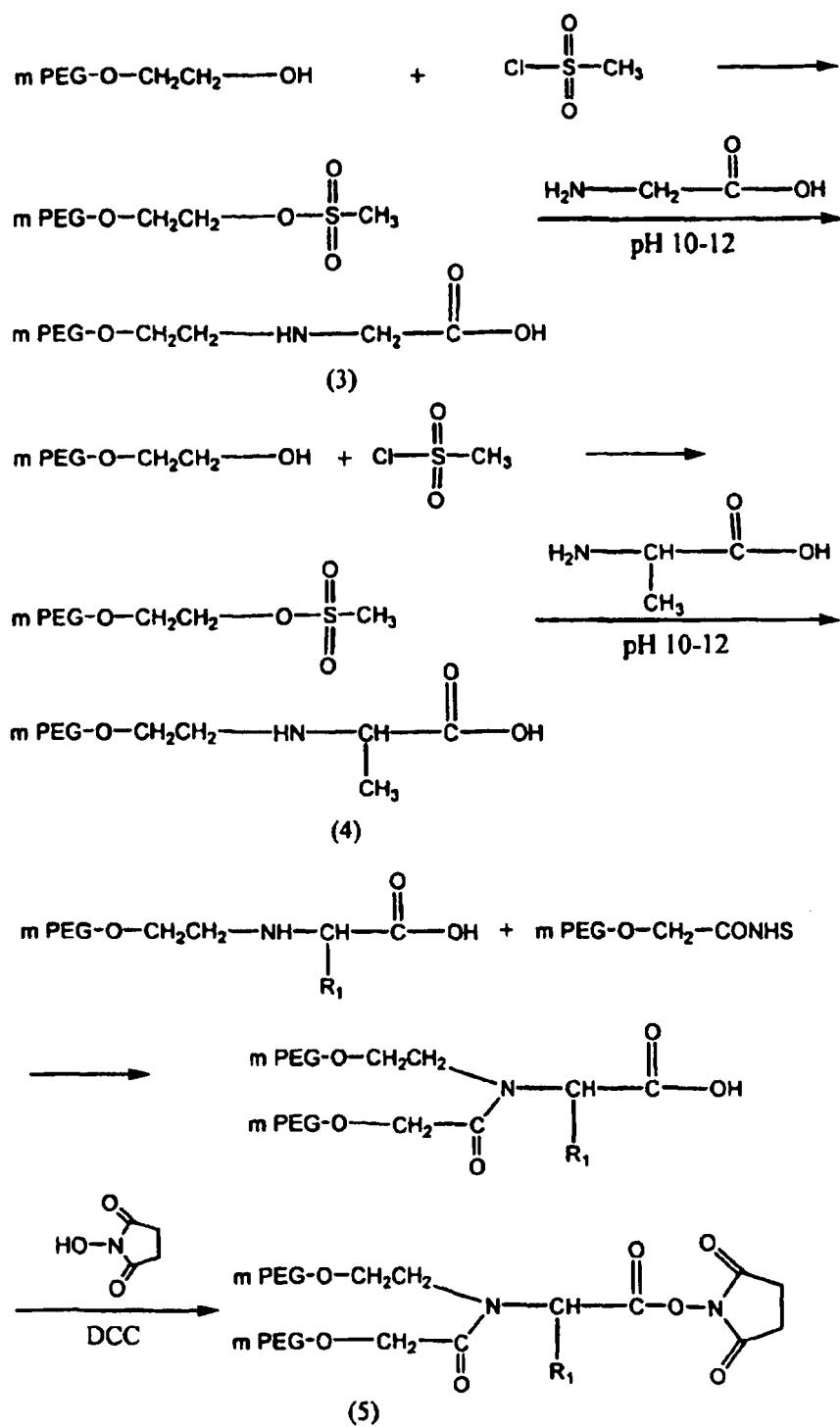


Fig. 3

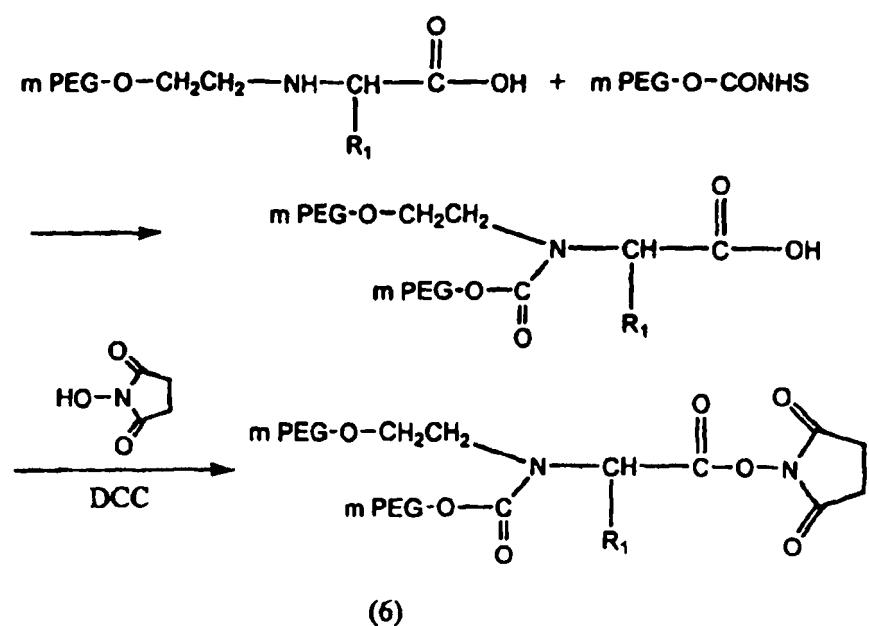


Fig. 4

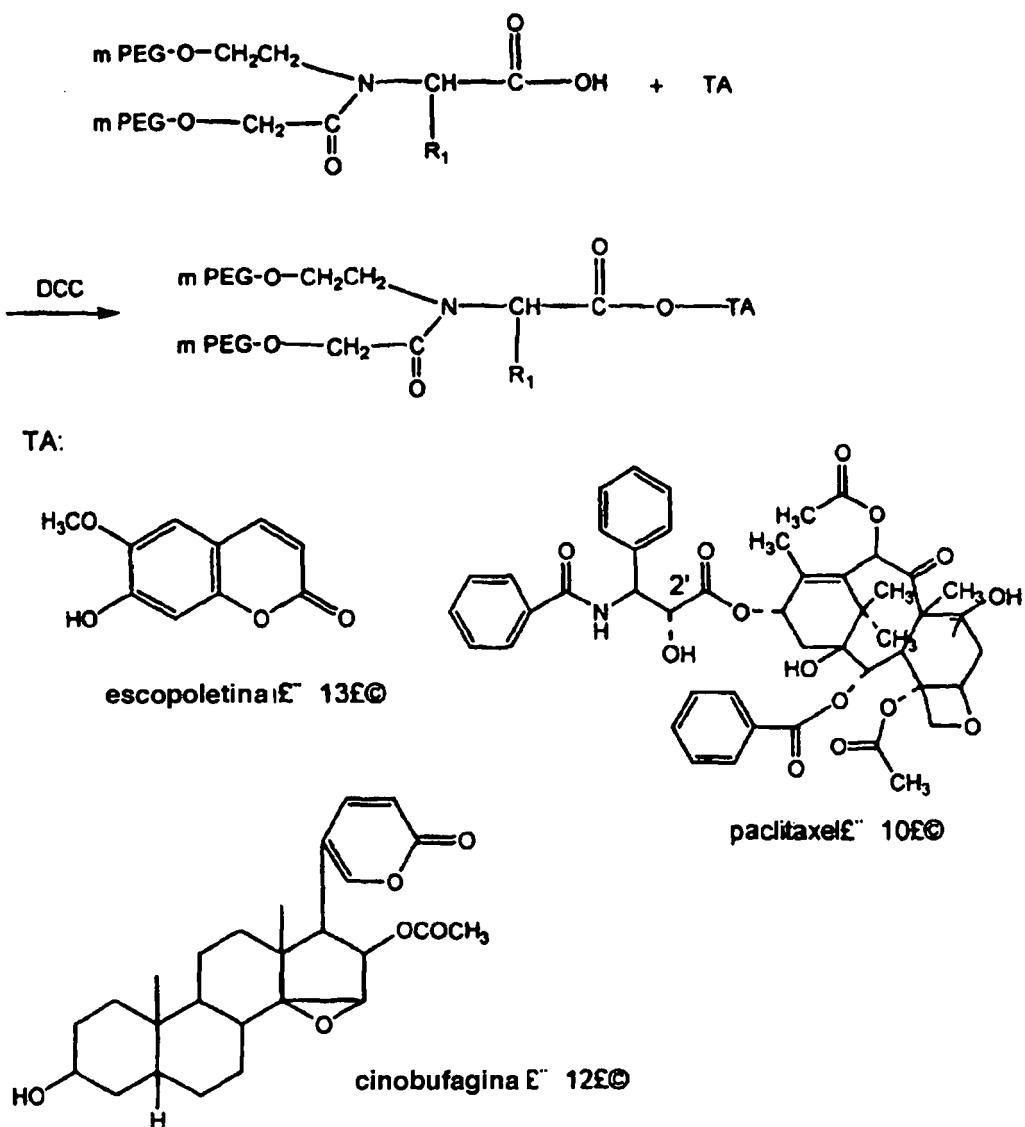


Fig. 5

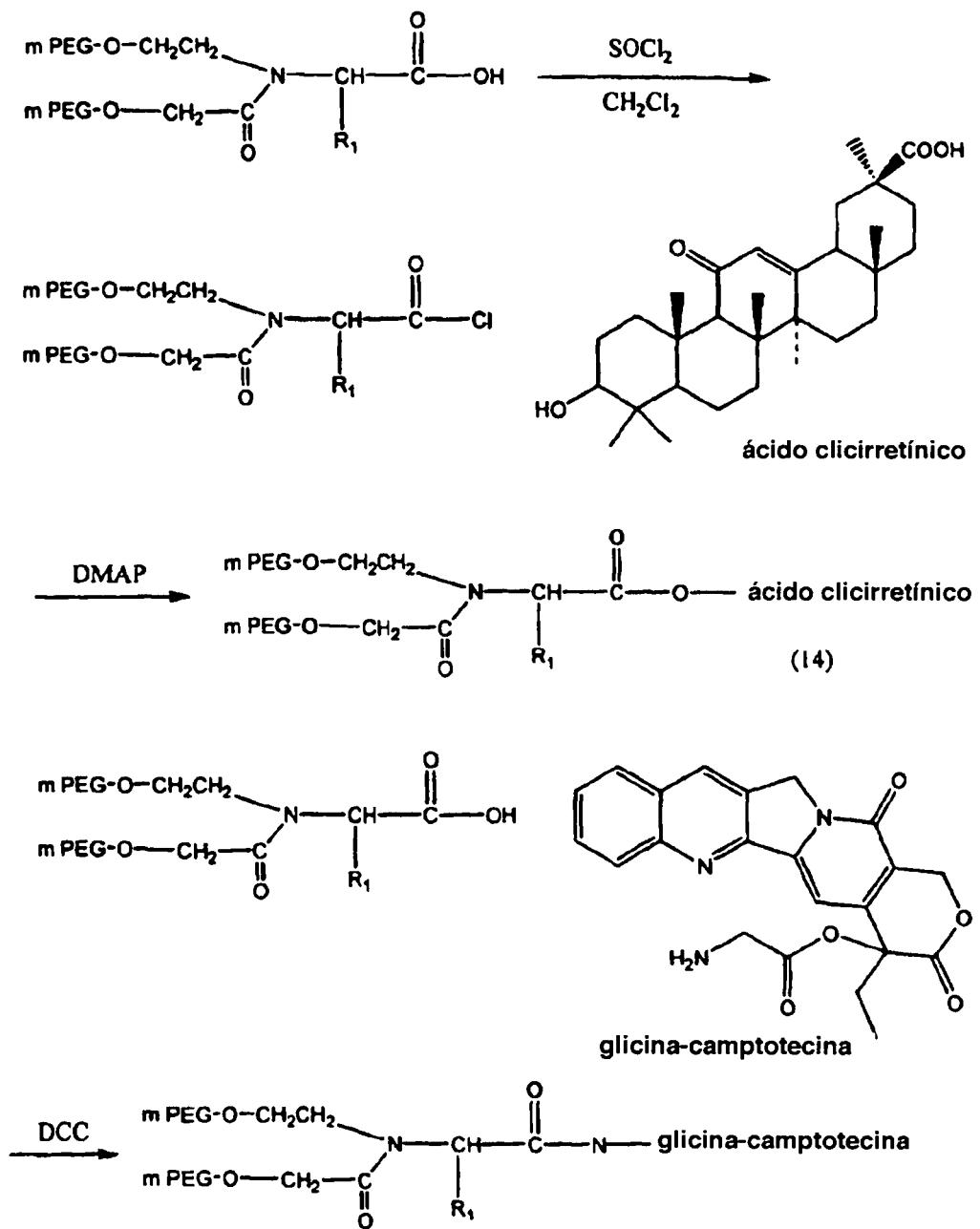


Fig. 6

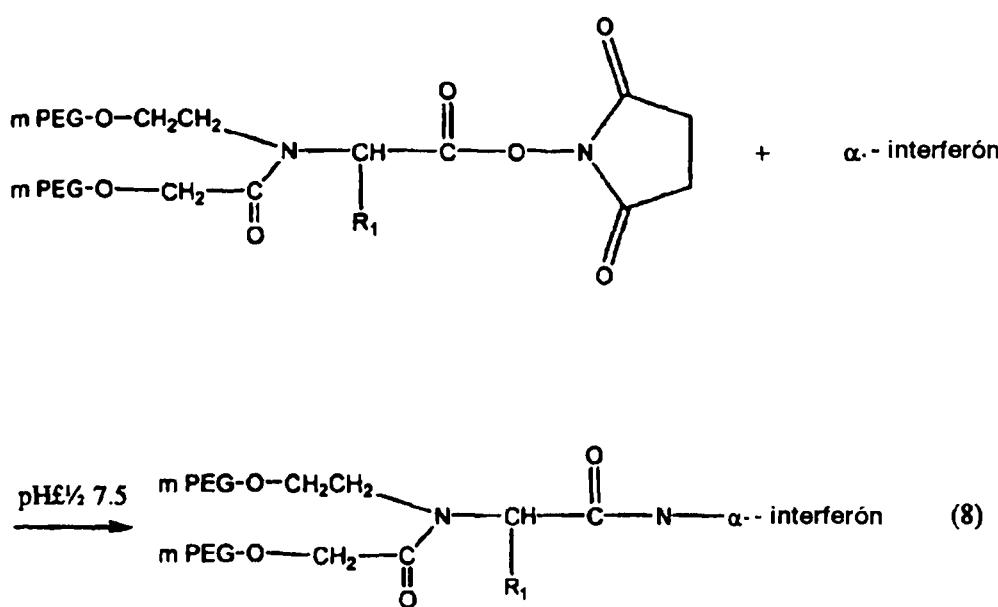


Figura 7