

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 022**

51 Int. Cl.:

C08G 69/10 (2006.01)

C07K 1/12 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2009 E 09805374 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2307448**

54 Título: **Preparación de polilisina y poliornitina de bajo peso molecular con alto rendimiento**

30 Prioridad:

07.08.2008 US 87031 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.06.2015

73 Titular/es:

**SIGMA-ALDRICH CO. LLC (100.0%)
3050 Spruce Street
St. Louis, MO 63103, US**

72 Inventor/es:

PONNUSAMY, ETTIGOUNDER

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 537 022 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

Preparación de polilisina y poliornitina de bajo peso molecular con alto rendimiento

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere en general a la preparación a gran escala (escala mayor de 1 kg) de polilisina o poliornitina de bajo peso molecular con alto rendimiento, mediante la preparación de un producto intermedio de polilisina o poliornitina que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 12.500 Daltons a aproximadamente 22.00 Daltons, y la hidrólisis para producir una polilisina o poliornitina que tiene un peso molecular medio ponderado de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons. En realizaciones preferidas, el procedimiento se usa para preparar polilisina. En algunas de estas realizaciones, el polímero es un homopolímero de poli-L-lisina.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La polilisina y poliornitina son conocidas y se están investigando como agentes de condensación de ADN para usar en terapia génica no vírica. Sin embargo, como se conoce en la bibliografía, la poli-L-lisina tiene efectos citotóxicos que disminuyen con la disminución del peso molecular. Por lo tanto, es deseable la preparación de una polilisina de bajo peso molecular.

[0003] La poli-L-lisina y otros poliaminoácidos se han preparado por una variedad de rutas. Comercialmente, la poli-L-lisina se ha preparado por reacción del N-carboxianhídrido de N^ε-carbobenciloxi(Cbz)-L-lisina con un iniciador de polimerización para producir poli-N^ε-Cbz-L-lisina. La poli-N^ε-Cbz-L-lisina se trata con ácido bromhídrico en ácido acético para separar el grupo Cbz y formar poli-L-lisina que tiene un peso molecular de aproximadamente 7.000 Daltons. El producto se puede dializar, liofilizar, y recuperar con un 11-30% de rendimiento. Este rendimiento del procedimiento actual es variable y es inaceptablemente bajo. Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos a gran escala con rendimientos más altos que tengan menor variabilidad para producir polilisina que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons.

[0004] Waley y col., (1953), *Journal of Biochemistry*, volumen 55, páginas 328 - 337, describen la acción de la tripsina en la polilisina.

[0005] El documento US 7317070 describe un procedimiento mejorado para preparar poliaminoácidos en general, y más específicamente poli(ácido glutámico) y poli(ácido aspártico). También se describe un procedimiento para la preparación a gran escala (es decir, > 1 kg) de poliaminoácidos, en particular poli(ácido glutámico) y poli(ácido aspártico).

[0006] Van Dijk-Wolthuis y col., (1997), *Macromol. Chem. Phys.*, volumen 198, páginas 3893-3906, describen la síntesis y caracterización de poli-L-lisina con peso molecular bajo controlado.

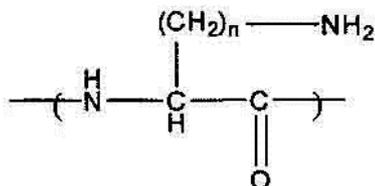
RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] Entre los diferentes aspectos de la invención hay un procedimiento para preparar una polilisina o poliornitina de peso molecular relativamente bajo a gran escala con alto rendimiento.

[0008] De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un polímero polilisina o poliornitina que comprende unidades que se repiten que corresponden a la fórmula 3 o una sal de la misma, y que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons y un índice de polidispersidad de 1,2-1,5, comprendiendo el procedimiento:

hidrolizar un producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida que comprende unidades que se repiten que corresponden a la fórmula 3 o una sal de la misma y que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 12.500 Daltons a aproximadamente 22.000 Daltons, en el que

[0009] la fórmula 3 tiene la estructura:



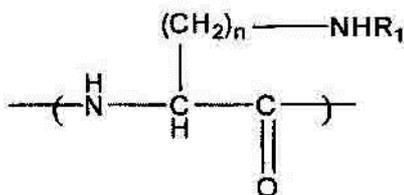
Fórmula 3

n es 3 o 4; y

5

la hidrólisis del producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida se lleva a cabo durante un tiempo de reacción calculado a partir del peso molecular medido mediante la viscosidad del producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida.

- 10 **[0010]** El procedimiento de la invención descrito antes puede comprender además eliminar el grupo protector de nitrógeno de un producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida que comprende unidades que se repiten de fórmula 2 o una sal del mismo, y que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 12.500 Daltons a aproximadamente 22.000 Daltons, en el que la fórmula 2 tiene la estructura

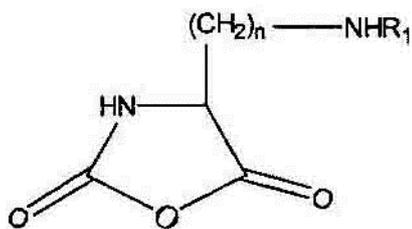


15

Fórmula 2

R₁ es un grupo protector de amino; y n es 3 o 4.

- 20 **[0011]** Los diferentes procedimientos descritos antes pueden comprender además la preparación del producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida, por polimerización de un compuesto N-carboxianhídrido de fórmula 1, en donde la fórmula 1 tiene la estructura



25

Fórmula 1

R₁ es un grupo protector de amino; y n es 3 o 4.

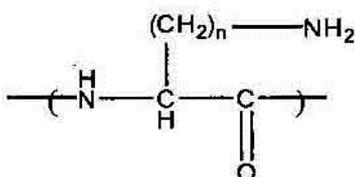
[0012] Otros objetos y características serán en parte evidentes y en parte se señalan en lo sucesivo.

30

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

- [0013]** Ventajosamente, la polilisina o poliornitina se pueden preparar de acuerdo con el procedimiento de la presente invención de una forma relativamente más eficaz y/o productiva. En general, el polímero polilisina o poliornitina comprende unidades que se repiten que corresponden a la fórmula 3, sal N^e o sales N^δ de la misma:

35



Fórmula 3

en donde n es 3 (es decir, poliornitina) o 4 (es decir, polilisina). El producto polímero polilisina o poliornitina 5 comprende una mezcla de moléculas que tienen unidades que se repiten de fórmula 3 para formar un polímero que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons.

10 **[0014]** En general, los homopolímeros de polilisina pueden estar compuestos de isómeros D, L o una mezcla racémica de las unidades de lisina que se repiten. En realizaciones preferidas, la polilisina comprende poli-L-lisina. Además, los homopolímeros de poliornitina pueden estar compuestos de isómeros D, L o una mezcla racémica de las unidades de ornitina que se repiten. En realizaciones preferidas, la poliornitina comprende poli-L-ornitina. La estereoquímica de la polilisina o poliornitina está determinada por la estereoquímica del monómero de partida. Las estructuras de fórmulas 1, 2 y 3 representan monómeros y polímeros que tienen una estereoquímica D, L o una 15 mezcla de D y L.

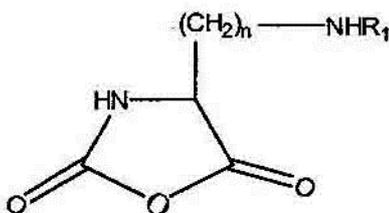
[0015] Independientemente de la composición de las unidades que se repiten, el procedimiento de la presente invención permite la preparación de polilisina que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons. Para algunas aplicaciones, se desea polilisina 20 que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina de aproximadamente 7.000 Daltons a aproximadamente 10.000 Daltons. El procedimiento también permite la preparación de poliornitina que tiene un peso molecular medio ponderado basado en ornitina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons

25 **[0016]** Para los propósitos de esta solicitud, el peso molecular medio ponderado se determina usando la cromatografía de permeabilidad en geles con técnica de dispersión de la luz láser de multiángulo (GPC MALLS) que proporciona un peso molecular medio ponderado absoluto y el índice de polidispersidad.

Polimerización

30 **[0017]** La polilisina o poliornitina de la presente invención se puede preparar por un procedimiento que empieza con la polimerización de un N-carboxianhídrido de una lisina N^ε-protegida o una ornitina N^δ-protegida, en un medio de polimerización que comprende un disolvente adecuado. La polimerización preferiblemente se lleva a cabo en presencia de un iniciador de polimerización contenido en el medio de reacción.

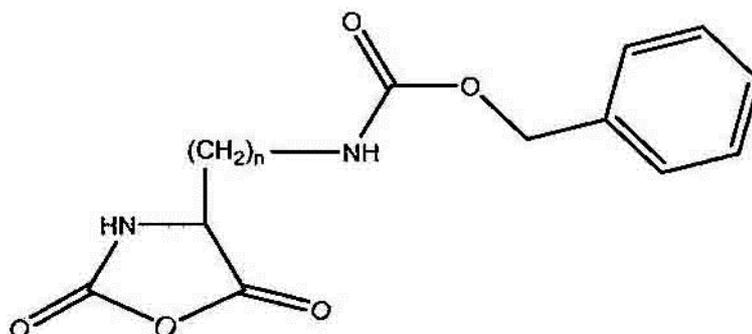
35 **[0018]** La preparación de N-carboxianhídridos de lisinas y ornitinas protegidas es conocida. En general la lisina u ornitina protegida se trata con fosgeno en un disolvente tipo éter (p. ej., tetrahidrofurano) para producir el correspondiente N-carboxianhídrido de lisina N^ε-protegida, o N-carboxianhídrido de ornitina N^δ-protegida. En algunas realizaciones, el N-carboxianhídrido de lisina N^ε-protegida, o N-carboxianhídrido de ornitina N^δ-protegida 40 corresponde a la fórmula 1



Fórmula 1

en la que R_1 es un grupo protector de amino; y n es 3 o 4. R_1 , por ejemplo, puede ser carbobenciloxi (Cbz), t-butiloxicarbonilo (t-Boc) o aliloxicarbonilo. Preferiblemente, R_1 es carbobenciloxi (Cbz). Por lo tanto, por ejemplo, en una realización, el N-carboxianhídrido es el N-carboxianhídrido de Cbz-lisina o Cbz-ornitina y corresponde a la fórmula 1A.

5



Fórmula 1A

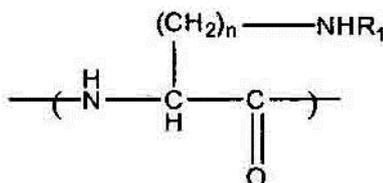
[0019] En general, el iniciador de polimerización es un nucleófilo. Además, el iniciador de polimerización
10 preferiblemente tiene propiedades físicas que permiten que el iniciador sea separado del polímero producto o eliminado de otra forma de la mezcla de reacción tras completarse la reacción de polimerización. Los iniciadores de polimerización de ejemplo incluyen alcóxidos de metal que tienen la fórmula MOR, en la que M es un metal y R es un grupo alquilo. Por ejemplo, el metal puede ser sodio o potasio. A modo de ejemplos adicionales, el resto alquilo puede ser un grupo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Los iniciadores de
15 polimerización actualmente preferidos incluyen metóxido sódico, etóxido sódico, propóxido sódico, metóxido potásico, etóxido potásico, propóxido potásico o combinaciones de los mismos. El metóxido sódico es actualmente preferido en particular.

[0020] La relación molar del N-carboxianhídrido ("NCA") al iniciador de polimerización usada para formar la mezcla
20 de reacción de polimerización puede variar a lo largo de un intervalo relativamente amplio. En general, se prefiere que la relación molar del NCA al iniciador esté en el intervalo de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, preferiblemente, de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 12:1, respectivamente.

[0021] El disolvente usado en la mezcla de reacción de polimerización en general puede ser cualquier disolvente
25 adecuado. Los disolventes de ejemplo incluyen dioxano, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el monómero N-carboxianhídrido inicial se mezcla con el disolvente para proporcionar una concentración de monómero entre aproximadamente 0,2 M y aproximadamente 1 M; preferiblemente de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,6 M; o entre aproximadamente 0,2% en peso a aproximadamente
30 0,13% en peso; preferiblemente entre 0,05% en peso a aproximadamente 0,1% en peso.

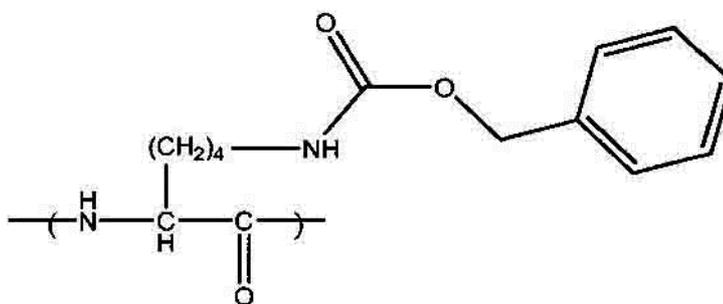
[0022] La temperatura de reacción de la polimerización del N-carboxianhídrido no es estrechamente crítica. La
reacción se puede llevar a cabo a lo largo de un intervalo de temperaturas y tiempos dependiendo del disolvente usado. Las condiciones de reacción (p. ej., disolvente, presión y temperatura) se seleccionan con el fin de proporcionar una velocidad de reacción que no sea demasiado lenta y minimizar la pérdida de disolvente debido a la
35 evaporación. Por ejemplo, la polimerización se puede llevar a cabo durante un periodo de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 horas, más típicamente de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 24 horas, a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C, más típicamente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, y preferiblemente a aproximadamente 25 °C.

[0023] El polímero resultante contiene unidades que se repiten de lisina u ornitina protegida. Por ejemplo, estas
40 unidades que se repiten en general pueden corresponder a la fórmula 2



Fórmula 2

en donde R₁ y n son como se han definido antes en relación con la fórmula 1. En diferentes realizaciones preferidas, cuando la unidad que se repite es una lisina protegida, el grupo protector amino es Cbz, la unidad que se repite de polilisina protegida en general corresponde a la fórmula 2A.



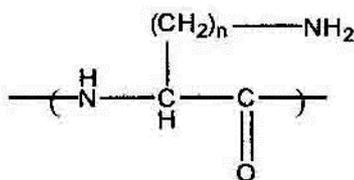
Fórmula 2A

10

[0024] Tras completarse la polimerización, el poliaminoácido se puede hacer precipitar en agua y filtrar, pero típicamente el polímero polimerizado protegido se diluye con disolvente a una concentración de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,5 M (o de aproximadamente 0,0064% en peso a aproximadamente 0,064% en peso) de producto intermedio de polilisina protegida (basado en la cantidad del material de partida NCA); preferiblemente de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,3 M. El producto de la polimerización es un producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida, preferiblemente un homopolímero de lisina protegida, que tiene típicamente un peso molecular medio ponderado basado en lisina entre aproximadamente 12.500 Daltons y aproximadamente 22.000 Daltons.

20 Eliminación del grupo protector de amino

[0025] El grupo protector de amino se puede eliminar por hidrogenación catalítica o tratamiento con un ácido fuerte. Estos ácidos fuertes pueden incluir ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, y similares. En diferentes realizaciones preferidas, el grupo protector de amino se elimina por tratamiento con ácido bromhídrico anhidro. Cuando se elimina el grupo protector de amino, la polilisina o poliornitina contiene unidades que se repiten de fórmula 3



Fórmula 3

30

en donde n es como se ha definido antes en relación con la fórmula 1. En general, el número de unidades que se repiten varía dependiendo de las condiciones específicas del procedimiento. En las condiciones que prevalecen en la reacción de desprotección, el número de unidades que se repiten proporciona un peso molecular medio ponderado basado en lisina o basado en ornitina de aproximadamente 12.500 Daltons a aproximadamente 22.000

Daltons.

[0026] En la eliminación del grupo protector de amino, el producto intermedio de polilisina N^ε-sustituida o poliornitina N^δ-sustituida preferiblemente se pone en contacto con un ácido fuerte. Cuando la reacción de polimerización se ha llevado a cabo en un medio disolvente, esta solución se puede diluir para proporcionar un medio de reacción para la etapa de desprotección. El producto de la reacción de polimerización preferiblemente se diluye con el mismo disolvente que se ha usado para la polimerización, para producir una solución que tiene una concentración de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,5 M; preferiblemente de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,3 M (o de aproximadamente 0,0064% en peso a aproximadamente 0,064% en peso) de producto intermedio de polilisina protegida (basado en la cantidad del material de partida NCA) para usar en la etapa de desprotección. Alternativamente, el producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida se puede haber hecho precipitar de la solución de la reacción de polimerización y volver a disolver en el disolvente deseado para producir una solución en el último intervalo de concentración, preparatoria para la etapa de desprotección.

[0027] Para llevar a cabo la reacción de desprotección, el ácido fuerte en un disolvente o solo, se puede introducir en el medio de reacción de desprotección. Preferiblemente, el ácido fuerte se introduce en el medio de reacción de desprotección en una relación en peso de polilisina N^ε-sustituida o poliornitina N^δ-sustituida (basado en el material de partida NCA) entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 4:1. En algunos casos, una solución de un ácido fuerte comprende entre aproximadamente 20% en peso y aproximadamente 40% en peso de ácido fuerte (p. ej. HBr) y entre aproximadamente 60% y aproximadamente 80% de disolvente (p. ej., ácido acético) y se introduce en el medio de polimerización. Preferiblemente, se usa una solución de ácido bromhídrico de 30 a 35% en peso en ácido acético como fuente de HBr; esta mezcla típicamente contiene entre 0,5 y 1,5% en peso de agua. Típicamente, el ácido fuerte preferiblemente se añade relativamente despacio, p. ej., a lo largo de un periodo de aproximadamente 45 a aproximadamente 90 minutos (esencialmente gota a gota en una escala de laboratorio), y la mezcla de reacción de polimerización se agita para asegurar la mezcla uniforme.

[0028] La temperatura de reacción de la etapa de desprotección no es estrechamente crítica. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C; más preferiblemente, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C; típicamente a aproximadamente 25 °C. Típicamente, la etapa de desprotección requiere aproximadamente de 15 a 20 horas, lo más típicamente 18 horas de reacción.

[0029] La etapa de desprotección produce el producto intermedio de polilisina o poliornitina en forma de una sal de ácido mineral N^ε o N^δ, que precipita en el medio de reacción de desprotección orgánico mezclado. Esta sal se separa del líquido sobrenadante, tal como por filtración, y los sólidos se lavan con un disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente polar tal como acetona, para separar el producto secundario principal de bromuro de bencilo. La sal del producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida o su base libre se puede entonces recoger en un medio acuoso e hidrolizar para dar el producto polímero polilisina o poliornitina. Cuando se usa un ácido fuerte para la hidrólisis, el producto polímero polilisina también se produce en la forma de su sal de ácido mineral N^ε o N^δ.

[0030] Incluso después del lavado con disolvente, el producto de reacción de desprotección típicamente permanece contaminado con oligómeros, sales de menor peso molecular y otros subproductos de bajo peso molecular. Antes de la reacción de hidrólisis, el producto de reacción de desprotección se puede purificar además recogiendo en un medio acuoso y sometiendo a diálisis o ultrafiltración. Una mezcla de alimentación de diálisis que comprende una solución acuosa del producto de reacción de desprotección, p. ej., en una concentración entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,5% en peso, se pone en contacto con una superficie de membrana de diálisis, o una membrana de ultrafiltración que tiene un líquido vehículo, p. ej., una corriente de agua desionizada que fluye, en contacto con su cara opuesta. Para la ultrafiltración, se puede establecer una presión diferencial de entre aproximadamente 138 kPa (20 psi) y aproximadamente 207 kPa (30 psi) a través de la membrana para promover el flujo de un permeado que comprende componentes de bajo peso molecular y disolvente, a través de la membrana a la solución vehículo. El transporte de oligómeros y contaminantes de bajo peso molecular al líquido vehículo deja un retenido que comprende producto intermedio de polilisina desprotegida de contenido reducido de oligómero.

[0031] El retenido se puede diluir con agua, preferiblemente desionizada, para proporcionar una solución que típicamente comprende de 0,03% en peso a 0,1% en peso de polilisina desprotegida que se puede usar como el material de alimentación para la etapa de hidrólisis. Alternativamente, el retenido se puede liofilizar para dar una polilisina desprotegida sólida seca, que después se puede volver a disolver en un medio acuoso para proporcionar de forma conveniente una solución de la concentración mencionada antes que se envía a la etapa de hidrólisis.

Hidrólisis para reducir el peso molecular

[0032] La hidrólisis se lleva a cabo poniendo en contacto el producto intermedio de polilisina desprotegida en un medio acuoso de reacción de hidrólisis con un ácido fuerte (p. ej., ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, y similares) que preferiblemente tiene una concentración entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 0,5 M en el medio acuoso. La relación del ácido fuerte al producto intermedio de polilisina desprotegida para la hidrólisis preferiblemente es entre aproximadamente 1:5 y aproximadamente 1:1. Para establecer la concentración de ácido fuerte deseada en el medio de reacción, se puede introducir de forma conveniente una fuente de ácido fuerte tal como HBr en el medio de reacción de hidrólisis en una solución fuente que tiene una concentración en el intervalo de 40% en peso a 68% en peso. La hidrólisis se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 30 °C y produce un polímero de polilisina o poliornitina que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons a partir de polilisina o poliornitina que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 12.500 Daltons a aproximadamente 22.000 Daltons. Puesto que la reacción de hidrólisis avanza progresivamente siempre que la polilisina o poliornitina permanezca en contacto con el ácido fuerte en las condiciones mencionadas antes, es necesario establecer el punto final de la reacción, de modo que el peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina del polímero polilisina o poliornitina esté dentro del intervalo objetivo, preferiblemente de 5.500 a 12.000 Daltons. De acuerdo con el procedimiento de la invención, el punto final de la reacción de hidrólisis se calcula basándose en la viscosidad de una solución de muestra de producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida dializada y liofilizada. Si toda la cantidad de producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida se ha purgado de oligómeros y contaminantes de bajo peso molecular por diálisis y después el retenido se ha liofilizado, se puede usar una muestra de este producto intermedio liofilizado para la proyección del punto final. Por otro lado, se puede recoger una muestra del producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida sin purificar y someter a diálisis y liofilización a una escala de laboratorio para proporcionar la muestra usada en la proyección del punto final.

[0033] Para calcular el tiempo de reacción de hidrólisis deseado, se prepara una solución de ensayo que consiste en una solución acuosa al 1% en peso basado en lisina u ornitina de la muestra dializada y liofilizada, o muestra del producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida dializada y liofilizada, y se determina la viscosidad de esta solución a 25°C. La viscosidad de la muestra se determina añadiendo 10 ml del disolvente a un viscosímetro de tamaño 50 Cannon-Fenske, poniendo el viscosímetro en un baño de agua a temperatura constante que tiene una temperatura de 25 ± 0,1 °C y alineando verticalmente el tubo capilar del viscosímetro con un hilo ponderado en el exterior del baño. Se deja que la temperatura del viscosímetro alcance el equilibrio a lo largo de 20 minutos, se introduce el disolvente en el tubo justo hasta la marca M (véase la figura 1). El tiempo en segundos para que el menisco pase de la marca M a la marca N es el tiempo de eflujo para el disolvente. Se hacen al menos cuatro lecturas sucesivas del tiempo de flujo hasta que la desviación promedio de la media es menor que ±0,1 segundos. El viscosímetro se limpia y se repite el procedimiento anterior usando la solución acuosa al 1% en peso del producto polímero para obtener el tiempo de eflujo, t , para la muestra. Se calculan las viscosidades relativas y específicas usando las siguientes ecuaciones.

$$\text{Viscosidad relativa } (\eta_r) = t/t_0$$

45

$$\text{Viscosidad específica } (\eta_{sp}) = \eta_r - 1$$

[0034] Para calcular el peso molecular mediante la viscosidad, se usa la siguiente ecuación (véase, A. Aaron y A. Berger, *Biochim. Biophys. Acta*, volumen 69, página 397 (1963)). Esta ecuación se desarrolló para la polilisina, pero la polilisina y la poliornitina son químicamente similares, teniendo la poliornitina un grupo metileno menos en su unidad de repetición, y se puede usar la misma ecuación.

50

$$\text{Grado de polimerización (GP)} = \log^{-1}[\log(\eta_{sp}/c) \times 0,79 + 2,46]$$

La variable, η_{sp} , es la viscosidad específica y c es la concentración de la solución de polímero. El peso molecular se calcula usando las siguientes ecuaciones.

55

$$\text{Peso molecular} = \text{GP} \times 209 \text{ (para la polilisina.HBr)}$$

$$\text{Peso molecular} = \text{GP} \times 195 \text{ (para la poliornitina.HBr)}$$

[0035] El tiempo necesario para hidrolizar el polímero al peso molecular medio ponderado deseado de 5.500 a 12.000 Daltons (medido por GPC MALLS) se puede entonces calcular usando la siguiente fórmula:

$$5 \quad \text{Tiempo requerido} = [(\text{Peso molecular mediante viscosidad del polímero no hidrolizado} - 21.000) \times 0,012] + 72 (\pm 10\%) \text{ horas.}$$

El 21.000 y 0,012 son factores que se han determinado de forma empírica. Se entenderá que la selección de 1% en peso como la concentración de la polilisina o poliornitina en la solución de ensayo es arbitraria y que cualquier concentración que de una viscosidad razonable frente al gradiente de peso molecular es aceptable. Sin embargo, las constantes en el algoritmo del tiempo de reacción expuestas antes solo se aplican en el caso de una solución al 1% en peso. Para cualquier otra concentración, será necesario determinar las constantes de la ecuación por correlación de datos empíricos.

15 **[0036]** Una vez que se ha determinado el tiempo de hidrólisis, el polímero no hidrolizado se disuelve en agua desionizada para formar una solución transparente, se mezcla durante 10 minutos, y se añade el ácido fuerte y se mezcla para el tiempo calculado. Típicamente, el tiempo de reacción para la reacción de hidrólisis es de aproximadamente 100 horas a aproximadamente 350 horas. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo en la medida necesaria para producir un polímero que tiene una unidad que se repite de fórmula 3 y un peso molecular medio ponderado de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons. El índice de polidispersidad (IPD) se calcula dividiendo el peso molecular medio ponderado entre el peso molecular medio numérico. El IPD indica la distribución de masas moleculares individuales en un lote de polímeros. El IPD para la polilisina hecha por el procedimiento descrito antes es de 1,2 a 1,5.

25 **[0037]** Después de haberse formado el producto de polilisina o poliornitina que tiene el peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina deseado, este producto se puede purificar además por diálisis o ultrafiltración. Para la preparación para la diálisis, la solución de la reacción de hidrólisis se puede diluir con agua en una relación volumétrica entre 30 partes de solución de la reacción de hidrólisis y 70 partes de agua a 70 partes de solución de la reacción de hidrólisis y 30 partes de agua. Preferiblemente, la relación es entre 40:60 y 60:40, convenientemente aproximadamente 50:50. La solución diluida después se pone en contacto con una superficie de una membrana de diálisis o ultrafiltración mientras que una solución acuosa vehículo se pone en contacto con la cara opuesta de la membrana. Para la ultrafiltración, se puede establecer una presión diferencial de entre aproximadamente 138 kPa (20 psi) y aproximadamente 207 kPa (30 psi) a través de la membrana para promover el flujo de un permeado que comprende componentes de bajo peso molecular y disolvente a través de la membrana a la solución vehículo. El producto dializado se recoge y preferiblemente se liofiliza para dar la polilisina o poliornitina que tiene unidades que se repiten de fórmula 3, en su forma comercialmente aceptable.

[0038] El rendimiento de la polilisina hidrolizada que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons, típicamente es mayor de aproximadamente 45% basado en la cantidad del material de partida NCA. En algunas realizaciones, el rendimiento de la polilisina hidrolizada se ha encontrado que está en el intervalo de aproximadamente 45% a aproximadamente 55% basado en la cantidad del material de partida NCA. Se ha observado que los experimentos para producir polilisina que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons en la etapa de polimerización, requerían más iniciador de polimerización y proporcionaban un rendimiento menor. Sin querer estar ligados por la teoría, se piensa que la mayor concentración del iniciador de polimerización iniciaba el crecimiento de más cadenas de polímero que con una concentración menor del iniciador de polimerización, y por consiguiente, debido a que el monómero de NCA se podía añadir a relativamente más cadenas en crecimiento, el producto polímero tenía muchas cadenas que eran de un peso molecular medio ponderado basado en lisina por debajo de los 5.500 Daltons deseados. La eliminación necesaria de estos, por diálisis o ultrafiltración, producía rendimientos bajos. En comparación, cuando se usa el procedimiento de la presente invención para preparar un polímero de mayor peso molecular que se hidroliza para proporcionar el peso molecular medio ponderado deseado, se usa una menor concentración del iniciador de polimerización en la polimerización del NCA y hay una menor cantidad de los productos polímeros de peso molecular bajo indeseables formados. Además, se ha observado que las cadenas de polímero más largas se hidrolizan primero y que el control del tiempo de reacción de hidrólisis puede controlar empíricamente el peso molecular medio ponderado del producto polímero hidrolizado.

[0039] En diferentes realizaciones, la eliminación del grupo protector del nitrógeno de un producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida que comprende unidades que se repiten de fórmula 2 y la hidrólisis del producto

intermedio de polilisina o poliornitina se llevan a cabo simultáneamente. Esto puede ser usando el mismo reactivo para eliminar el grupo protector del nitrógeno y para hidrolizar la polilisina o poliornitina.

Definiciones

5

[0040] Como se usa en el presente documento, los "grupos protectores de amino" descritos en el presente documento son restos que bloquean la reacción en el grupo amino protegido, mientras que son eliminados fácilmente en condiciones que son suficientemente suaves para no alterar otros sustituyentes de los diferentes compuestos. Por ejemplo, los grupos protectores de amino pueden ser carbobenciloxi (Cbz), t-butiloxicarbonilo (t-
10 Boc), aliloxicarbonilo y similares. Se puede encontrar una variedad de grupos protectores para el grupo amino y su síntesis en "Protective Groups in Organic Synthesis" de T.W. Greene y P.G.M. Wuts, John Wiley & Sons, 1999.

[0041] La expresión "peso molecular basado en lisina" se refiere al peso molecular del propio polímero polilisina, el producto intermedio de polilisina desprotegida o el producto intermedio de polilisina N^ε-protegida, expresado en
15 términos del peso equivalente de la base libre de polilisina no protegida. La expresión "peso molecular basado en ornitina" se refiere al peso molecular del propio polímero poliornitina, el producto intermedio de poliornitina desprotegida o el producto intermedio de poliornitina N^ε-protegida, expresado en términos del peso equivalente de la base libre de poliornitina no protegida. Se prefiere la expresión del peso molecular en esta base debido a las diferencias sustanciales en peso molecular entre las unidades que se repiten de fórmula 3 frente a la fórmula 2, así
20 como las diferencias entre la fórmula 3 como se representa y las sales de ácidos minerales de la misma.

[0042] Habiendo descrito la invención con detalle, será evidente que son posibles modificaciones y variaciones sin salirse del alcance de la invención definido en las reivindicaciones adjuntas.

25 EJEMPLOS

[0043] Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar mejor la presente invención.

[0044] Las técnicas usadas para la polimerización de los N-carboxianhídridos (NCA) en polímeros son conocidas
30 para los expertos en la materia, y se dan en detalle en el artículo revisado por M. Goodman y E. Peggion, *Pure and Applied Chemistry*, volumen 53, pág. 699, 1981, y el libro de H. R. Kricheldorf "Alpha amino acids-N-Carboxyanhydrides and Related Heterocycles", Springer Verlag (1987), y también las publicaciones recientes de Wendelmoed N. E. van Dijk-Wolthuis y col., *Macromol. Chem. Phys.* Volumen 198, pág. 3893 - 3906, 1997.

35 Ejemplo 1: Preparación de polímero de poli-L-lisina.HBr

[0045] *Polimerización.* Se disolvió NCA de N^ε-Cbz-L-lisina (35 g, 0,114 mol) en 0,228 litros de 1,4-dioxano para hacer una solución 0,5 M. La solución de NCA se transfirió a un matraz de fondo redondo, de tres bocas, de 1 litro
40 equipado con un mezclador mecánico y un baño de agua a una temperatura de 25 a 30 °C. Se puso metóxido sódico (0,0114 mol, 11,4 ml de solución 1 N) en 25 ml de 1,4-dioxano. La solución de metóxido sódico se añadió a la solución de NCA en una porción con mezclamiento enérgico. La solución de polimerización se mezcló durante 2 horas y se mantuvo de 25 a 30 °C durante 18 a 24 horas.

[0046] *Desprotección del grupo Cbz.* El polímero protegido, poli-Cbz-L-lisina se diluyó en solución de 1,4-dioxano
45 con 340 ml de 1,4-dioxano para hacer una solución que tenía una concentración 0,2 M basada en la cantidad del material de partida NCA. A esta solución se añadieron 70 ml de una solución de ácido bromhídrico (HBr) al 30% en ácido acético (material de partida NCA 2 ml/g). Esta solución se añadió gota a gota con mezclamiento enérgico en 20 minutos a una temperatura de 25 a 30 °C. El polímero empezó a precipitar después de haber añadido 40 ml de HBr en ácido acético. La mezcla resultante se mezcló de 25 a 30 °C durante 15 min para formar una suspensión
50 uniforme. Se añadieron otros 70 ml de HBr en ácido acético (NCA 2 ml/g) en un lote de 25 a 30 °C y se mezcló durante 18 horas. Se detuvo el mezclamiento y el precipitado se dejó sedimentar durante 15 min. Se decantó el líquido sobrenadante y se añadieron 350 ml de acetona al precipitado y se mezcló durante 5 min. Después se decantó el líquido sobrenadante. Esta etapa de lavado se repitió con 2 x 175 ml de acetona. Se añadió acetona (200 ml) y la mezcla se filtró en un embudo Buchner de 11 cm, se lavó con 2 x 100 ml de acetona y se secó en atmósfera
55 de nitrógeno durante 5 min. El polímero resultante se disolvió en 350 ml de agua desionizada y se burbujeó nitrógeno a través de la solución para separar las cantidades en trazas de bromuro de bencilo.

[0047] *Diálisis/ultrafiltración y liofilización.* La solución de poli-L-lisina.HBr se dializó o ultrafiltró frente a agua desionizada corriente usando tubos de diálisis que tienen un corte de exclusión de peso molecular de

aproximadamente 12K o una membrana 5K para ultrafiltración (UF) para separar oligómeros y sales. La solución dializada o UF se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se liofilizó para obtener el polímero de poli-L-lisina.HBr sólido. El rendimiento era 73%. La RMN de ¹H mostró la eliminación completa del grupo Cbz (ausencia de pico aromático). La viscosidad se midió en una solución acuosa al 1% en peso a 25 °C y se calculó un peso molecular mediante la viscosidad de 26.750 Daltons.

[0048] Hidrólisis. El tiempo necesario para hidrolizar el polímero usando HBr acuoso al 48%, al peso molecular deseado (5.500-12.000 por GPC MALLS) se calculó usando la fórmula:

$$\begin{aligned}
 10 \text{ Tiempo requerido} &= [(Peso \text{ molecular mediante viscosidad} - 21.000) \times 0,012] + 72 (\pm 10\%) \text{ horas} \\
 \text{Número de horas} &= [(Peso \text{ molecular mediante viscosidad del polímero} - 21.000) \times 0,012] + 72 \text{ horas} \\
 &= (26.750 - 21.000) \times 0,012 + 72 \text{ horas} \\
 &= 141 \text{ horas} \\
 &= 5,875 \text{ días}
 \end{aligned}$$

15

[0049] El polímero (16 g) se disolvió en 253 ml de agua desionizada para formar una solución transparente, la solución se mezcló durante 10 min y se añadieron 130 ml de HBr (acuoso) al 48% y se mezcló durante 141 horas.

[0050] La solución de poli-L-lisina.HBr hidrolizada se dializó o UF frente a agua desionizada corriente usando un tubo de diálisis que tenía un corte de exclusión de peso molecular de aproximadamente 12K o una membrana 1K para UF para separar oligómeros y sales. La solución dializada o UF se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se liofilizó para obtener el polímero de poli-L-lisina.HBr sólido. El rendimiento era 45,2%. El peso molecular medido por GPC MALLS era 7.500 y la viscosidad se midió en solución acuosa al 1% en peso a 25 °C para calcular un peso molecular mediante la viscosidad de 14.400 Daltons.

25

Ejemplo 2: Preparación del polímero poli-L-lisina.HBr

[0051] Polimerización. Se disolvió NCA de N^c-Cbz-L-lisina (350 g, 1,144 mol) en 2,29 litros de 1,4-dioxano para hacer una solución 0,5 M. La solución de NCA se transfirió a un matraz de fondo redondo, de tres bocas, de 12 litros equipado con un mezclador mecánico y un baño de agua a una temperatura de 25 a 30 °C. Se puso metóxido sódico (114,4 ml de una solución 1 N, 0,1144 mol) en 100 ml de 1,4-dioxano. La solución de metóxido sódico se añadió a la solución de NCA en una porción con mezclamiento enérgico. La solución de polimerización se mezcló durante 2 horas y se mantuvo de 25 a 30 °C durante 18 a 24 horas.

[0052] Desprotección del grupo Cbz. El polímero protegido, poli-Cbz-L-lisina se diluyó en solución de 1,4-dioxano con 3.430 ml de 1,4-dioxano para hacer una solución que tenía una concentración 0,2 M basada en la cantidad del material de partida NCA. Se añadió una solución de HBr al 30% en ácido acético (700 ml, material de partida NCA 2 ml/g) gota a gota a la mezcla con mezclamiento enérgico a lo largo de 30 minutos de 25 a 30 °C. El polímero empezó a precipitar después de haber añadido aproximadamente 350 ml de la solución de HBr en ácido acético. La mezcla resultante se mezcló de 25 a 30 °C durante 15 min para formar una suspensión uniforme. Se añadieron otros 700 ml de HBr al 30% en ácido acético (material de partida NCA 2 ml/g) en un lote a 25-30 °C y se mezcló durante 18 horas. Se detuvo el mezclamiento y el precipitado se dejó sedimentar durante 15 min. Se decantó el líquido sobrenadante y se añadieron 3.500 ml de acetona a los sólidos y se mezcló durante 5 min, seguido de decantación del líquido sobrenadante. Esta etapa de adición de acetona, mezclamiento y decantación se repitió dos veces con 2 x 1.750 ml de acetona. Se añadió acetona (2.000 ml) y el polímero se filtró en un embudo Buchner de 18,5 cm, se lavó con 2 x 1.000 ml de acetona y se dejó secar en atmósfera de nitrógeno durante 5 min. El polímero se disolvió en 3.500 ml de agua desionizada y se burbujeó nitrógeno a través de la solución para separar las cantidades en trazas de bromuro de bencilo.

[0053] Diálisis/ultrafiltración y liofilización. La solución de poli-L-lisina.HBr se dializó o UF frente a agua desionizada corriente usando tubos de diálisis que tenían un corte de exclusión de peso molecular de aproximadamente 12K o una membrana 5K para UF para separar oligómeros y sales. La solución dializada o UF se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se liofilizó para obtener el polímero de poli-L-lisina.HBr sólido. El rendimiento era 75,5%. La RMN de ¹H mostró la eliminación completa del grupo Cbz (ausencia de pico aromático). La viscosidad se midió en una solución acuosa al 1% en peso a 25 °C y se calculó un peso molecular mediante la viscosidad de 27.700 Daltons.

[0054] Hidrólisis. El tiempo necesario para hidrolizar el polímero usando HBr acuoso al 48%, al peso molecular deseado (5.500-12.000 por GPC MALLS) se calculó que era 152,4 horas (6,35 días) usando la fórmula descrita en el

ejemplo 1. El polímero (179,0 g) se disolvió en 2.828 ml de agua desionizada para formar una solución transparente, la solución se mezcló durante 15 min y se añadieron 1.454 ml de HBr acuoso al 48% y se mezcló durante 152,4 horas.

- 5 **[0055]** La solución de poli-L-lisina.HBr hidrolizada se dializó o UF frente a agua desionizada corriente usando tubos de diálisis que tenían un corte de exclusión de peso molecular de aproximadamente 12K o una membrana 1K para UF para separar oligómeros y sales. La solución dializada o UF se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se liofilizó para obtener el polímero de poli-L-lisina.HBr sólido. El rendimiento era 53%. El peso molecular medido por GPC MALLS era 7.600 Daltons y la viscosidad se midió en una solución acuosa al 1% en peso a 25 °C para calcular un peso molecular mediante la viscosidad de 14.200 Daltons

Ejemplo 3: Preparación del polímero poli-L-lisina.HBr

15 **[0056]** *Polimerización.* Se transfirió NCA de N^ε-Cbz-L-lisina (7.500 g, 24,51 mol) a un reactor de 378,54 litros (100 galones) con una camisa de enfriamiento/calefacción y se disolvió en 49 litros de 1,4-dioxano para hacer una solución aproximadamente 0,5 M a una temperatura de 25 a 30 °C. Se preparó una solución de 2.451 ml de metóxido sódico 1 N (2,451 mol) en metanol y se añadió a la solución de NCA en una porción con mezclamiento enérgico. La solución de polimerización se mezcló durante 2 horas y se mantuvo de 25 a 30 °C durante 18 a 24 horas.

20 **[0057]** *Desprotección del grupo Cbz.* El polímero protegido, poli-Cbz-L-lisina se diluyó en solución de 1,4-dioxano se diluyó con 73,5 litros de 1,4-dioxano para hacer una solución que tenía una concentración 0,2 M basada en la cantidad del material de partida NCA. Se añadió una solución de HBr al 30% en ácido acético (15.000 ml, material de partida NCA 2 ml/g) lentamente a la solución de polímero con mezclamiento enérgico a lo largo de 60 minutos a una temperatura de 25 a 30 °C. El polímero empezó a precipitar después de haber añadido aproximadamente 7.500 ml de solución de HBr en ácido acético. La mezcla resultante se mezcló a una temperatura de 25 a 30 °C durante 45 min para formar una suspensión uniforme. Se añadió otra porción de HBr en ácido acético (15.000 ml, NCA 2 ml/g) en un lote a una temperatura de 25 a 30 °C y se mezcló durante 18 horas. Se detuvo el mezclamiento y el precipitado se dejó sedimentar durante 30 min. Se decantó el líquido sobrenadante y se añadieron 75 litros de acetona a los sólidos y se mezclaron durante 10 min, seguido de decantación del líquido sobrenadante. Esta etapa se repitió dos veces con 2 x 37,5 litros de acetona. Se añadió acetona (40 litros) y el polímero se filtró en filtro vitrificado. El polímero se lavó con 2 x 20 litros de acetona y se secó en atmósfera de nitrógeno durante 15 min. El polímero se disolvió en 75 litros de agua desionizada y se burbujeó nitrógeno a través de la solución para separar las cantidades en trazas de bromuro de bencilo.

35 **[0058]** *Diálisis/ultrafiltración y liofilización.* La solución de poli-L-lisina.HBr se dializó o UF frente a agua desionizada corriente usando tubos de diálisis que tenían un corte de exclusión de peso molecular de aproximadamente 12K o una membrana 5K para UF para separar oligómeros y sales. La solución dializada o UF se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se liofilizó para obtener el polímero de poli-L-lisina.HBr sólido. El rendimiento era 68,3%. La RMN de ¹H mostró la eliminación completa del grupo Cbz (ausencia de pico aromático). La viscosidad se midió en una solución acuosa al 1% en peso a 25 °C y se calculó un peso molecular mediante la viscosidad de 41.200.

45 **[0059]** *Hidrólisis.* El tiempo necesario para hidrolizar el polímero usando HBr acuoso al 48%, al peso molecular deseado (5.500-12.000 por GPC MALLS) se calculó que era 13,1 días (314,4 horas) usando la fórmula descrita en el ejemplo 1. El polímero (3.500 g) se disolvió en 55,3 litros de agua desionizada para formar una solución transparente, y se mezcló durante 30 min. Se añadió una solución acuosa de HBr al 48% (28,4 litros) y se mezcló durante 314 horas.

50 **[0060]** La solución de poli-L-lisina.HBr hidrolizada se dializó o UF frente a agua desionizada corriente usando tubos de diálisis que tenían un corte de exclusión de peso molecular de aproximadamente 12K o una membrana 1K para UF para separar oligómeros y sales. La solución dializada o UF se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se liofilizó para obtener el polímero de poli-L-lisina.HBr sólido. El rendimiento era 50,2%. El peso molecular medido por GPC MALLS era 9.300 Daltons y la viscosidad se midió en una solución acuosa al 1% en peso a 25 °C y se calculó un peso molecular mediante la viscosidad de 17.300 Daltons.

Ejemplo 4: Preparación del polímero poli-L-lisina.HBr

[0061] *Polimerización.* Se transfirió NCA de N^ε-Cbz-L-lisina (25.490 g, 83,3 mol) a un reactor de 757,08 litros (200

galones) con una camisa de enfriamiento/calefacción para mantener la temperatura de 25 a 30°C y se disolvió en 155 litros de 1,4-dioxano para hacer una solución que tenía una concentración de NCA de aproximadamente 0,5 M. Se preparó una solución combinando 8.277 ml de metóxido sódico 1 N (8,277 mol) con metanol y esta solución se añadió a la solución de NCA en una porción con mezclamiento enérgico. La solución de polimerización se mezcló durante 2 horas y la temperatura se mantuvo de 25 a 30 °C durante 18 a 24 horas.

5
10
15
20
[0062] *Desprotección del grupo Cbz.* El polímero protegido, poli-Cbz-L-lisina en una solución de 1,4-dioxano se diluyó con 204 litros de 1,4-dioxano para hacer una solución que tenía una concentración de aproximadamente 0,2 M basada en la cantidad del material de partida NCA. Se añadió una solución de HBr al 30% en ácido acético (50,4 litros, material de partida NCA 2 ml/g) lentamente a la solución de polímero con mezclamiento enérgico en 60 minutos a una temperatura de 25 a 30 °C. El polímero empezó a precipitar después de haber añadido aproximadamente 25 litros de solución de HBr en ácido acético. La mezcla resultante se mezcló a una temperatura de 25 a 30 °C durante 30 min para formar una suspensión uniforme. Se añadió una solución de HBr en ácido acético (50,4 litros, material de partida NCA 2 ml/g) en un lote a una temperatura de 25 a 30 °C y se mezcló durante 18 horas. Se detuvo el mezclamiento y el precipitado se dejó sedimentar durante 30 min. Se añadió acetona enfriada con hielo (383 litros) a los sólidos, se mezclaron durante aproximadamente 30 minutos y se filtraron por un filtro vitrificado. Los sólidos se lavaron con 3 x 172 litros de acetona y se dejaron secar en atmósfera de nitrógeno durante 15 min. El polímero se disolvió en aproximadamente 235 litros de agua desionizada y se burbujeó nitrógeno a través de la solución para separar las cantidades en trazas de bromuro de bencilo.

25
30
[0063] *Diálisis/ultrafiltración y liofilización.* La solución de poli-L-lisina.HBr se dializó o UF frente a agua desionizada corriente usando tubos de diálisis que tenían un corte de exclusión de peso molecular de aproximadamente 12K o una membrana 5K para UF para separar oligómeros y sales. La solución dializada o UF se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se liofilizaron 150 ml (debido al volumen muy grande de solución para liofilizar) para obtener el peso de sólido para el polímero de poli-L-lisina.HBr sólido. El peso total de sólidos se calculó basándose en el volumen total calculado. El rendimiento se calculó que era aproximadamente 55%. La RMN de ¹H mostró la eliminación completa del grupo Cbz (ausencia de pico aromático). La viscosidad del polímero en una solución acuosa al 1% en peso se midió a 25 °C y se calculó un peso molecular mediante la viscosidad de 32.360 Daltons.

35
[0064] *Hidrólisis.* El tiempo necesario para hidrolizar el polímero usando HBr acuoso al 48%, al peso molecular deseado (5.500-12.000 por GPC MALLS) se calculó que era 208,3 horas (9,17 días) usando la fórmula descrita en el ejemplo 1. Se añadió HBr acuoso al 48% a la solución de polímero en una cantidad para producir una concentración de HBr 0,3 M. Esta solución se mezcló durante 220 horas.

40
[0065] La solución de poli-L-lisina.HBr hidrolizada se dializó o UF frente a agua desionizada corriente usando un tubo de diálisis que tenía un corte de exclusión de peso molecular de aproximadamente 12K o una membrana 1K para UF para separar oligómeros y sales. La solución dializada o UF se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y se liofilizó para obtener el polímero de poli-L-lisina.HBr sólido. El rendimiento era 52%. El peso molecular medido por GPC MALLS era 8.100 Daltons y la viscosidad se midió en una solución acuosa al 1% en peso a 25 °C y se calculó un peso molecular mediante la viscosidad de 14.800 Daltons.

45
[0066] Cuando se introducen elementos de la presente invención o la o las realizaciones preferidas de la misma, los artículos “un”, “una”, “el”, “la” y “dicho/a” se pretende que indiquen que hay uno o más de los elementos. Los términos “comprende”, “incluye” y “tiene” se pretende que sean inclusivos y significa que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos listados.

50
[0067] En vista de lo anterior, se verá que se consiguen los varios objetos de la invención y otros resultados ventajosos.

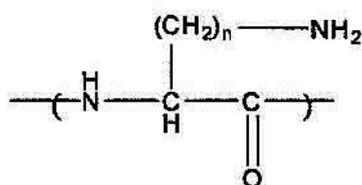
[0068] Puesto que se pueden hacer diferentes cambios en los procedimientos anteriores sin salirse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior se interprete como ilustrativa y no en un sentido limitante.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un polímero polilisina o poliornitina que comprende unidades que se repiten que corresponden a la fórmula 3 o una sal de la misma, y que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 5.500 Daltons a aproximadamente 12.000 Daltons y un índice de polidispersidad de 1,2-1,5, comprendiendo el procedimiento:

hidrolizar un producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida que comprende unidades que se repiten que corresponden a la fórmula 3 o una sal de la misma y que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 12.500 Daltons a aproximadamente 22.000 Daltons, en el que

la fórmula 3 tiene la estructura:



15

Fórmula 3

n es 3 o 4; y

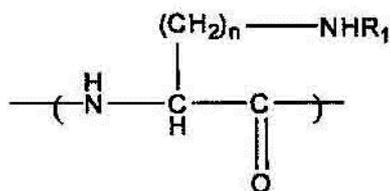
la hidrólisis del producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida se lleva a cabo durante un tiempo de reacción calculado a partir del peso molecular medido mediante la viscosidad del producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la preparación de dicho producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida comprende

25

eliminar el grupo protector de nitrógeno de un producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida que comprende unidades que se repiten de fórmula 2 o una sal de la misma, y que tiene un peso molecular medio ponderado basado en lisina u ornitina de aproximadamente 12.500 Daltons a aproximadamente 22.000 Daltons, en el que

30 la fórmula 2 tiene la estructura



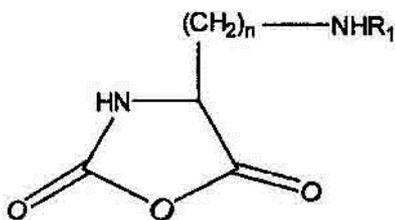
Fórmula 2

R₁ es un grupo protector de amino; y

35 n es 3 o 4.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que la preparación del producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida comprende la polimerización de un compuesto N-carboxianhídrido de fórmula 1, en el que la fórmula 1 tiene la estructura

40



Fórmula 1

4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que la hidrólisis del producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida y la eliminación del grupo protector del nitrógeno del producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida se llevan a cabo simultáneamente.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el grupo protector de amino es carbenciloxi, t-butoxicarbonilo o aliloxicarbonilo.
- 10 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la polimerización se lleva a cabo en presencia de un iniciador.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la polimerización se lleva a cabo en un medio disolvente orgánico, y la eliminación del grupo protector del nitrógeno del producto intermedio de polilisina o poliornitina protegida comprende introducir una combinación de un ácido mineral y un ácido orgánico en dicho medio disolvente orgánico, formando así un precipitado que comprende unidades que se repiten que consisten en la sal N^e o N^δ de las unidades que se repiten de fórmula 3 y dicho ácido mineral.
- 15 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, que comprende eliminar oligómeros y otros componentes de bajo peso molecular de una solución que comprende el producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida antes de hidrólisis de dicho producto intermedio desprotegido.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida y oligómeros asociados y/u otros componentes de bajo peso molecular se recogen en un medio acuoso, y el medio acuoso que contiene el polímero intermedio desprotegido y oligómeros y/u otros componentes de bajo peso molecular se pone en contacto con una superficie de una membrana de diálisis que tiene un medio acuoso en la superficie opuesta de la misma en el que los oligómeros y otros componentes de bajo peso molecular son recibidos en la diálisis, produciendo así un retenido que comprende producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida de contenido reducido de oligómero.
- 20 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el retenido se liofiliza para dar un producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida sólido.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde el producto intermedio de polilisina o poliornitina desprotegida sólido se recoge en una solución acuosa en la que se pone en contacto con un ácido mineral para la hidrólisis.
- 30 12. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la polimerización del compuesto N-carboxianhídrido se lleva a cabo en un medio de reacción de polimerización que comprende un disolvente no polar.
13. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el rendimiento de polímero de polilisina o poliornitina es mayor que aproximadamente 45% basado en la cantidad de compuesto N-carboxianhídrido.
- 45 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el polímero de polilisina es poli-L-lisina, poli-D-lisina, o una mezcla racémica de los mismos, o el polímero de poliornitina es poli-L-ornitina, poli-D-ornitina, o una mezcla racémica de los mismos.