



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 0721759-5 A2**



\* B R P I 0 7 2 1 7 5 9 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 19/07/2007  
(43) Data da Publicação: 11/02/2014  
(RPI 2249)

(51) Int.Cl.:  
A61K 31/74

**(54) Título:** " POLÍMEROS ANFIFÍLICOS DE AUTOMONTAGEM COMO AGENTES ANTICANCERÍGENOS"

**(57) Resumo:**

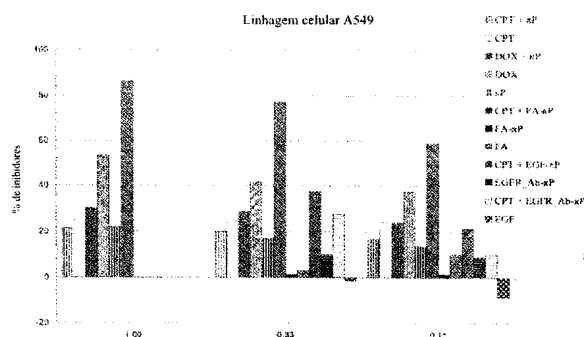
**(73) Titular(es):** Allexcel, Inc.

**(72) Inventor(es):** Anil R. Diwan, Ann Louise Onton, Jayant G. Tatake

**(74) Procurador(es):** NELLIE ANNE DAIEL-SHORES

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2007073880 de 19/07/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2009/011702 de 22/01/2009



## "POLÍMEROS ANFIFÍLICOS DE AUTOMONTAGEM COMO AGENTES ANTICANCERÍGENOS"

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos campos de polímeros anfifílicos, e especificamente a polímeros tipo colméia de formação micela biocompatível. A invenção também se refere aos campos de distribuição de droga direcionada e agentes anticancerígenos.

### FUNDAMENTOS

Os copolímeros de bloco anfifílicos compreendendo um bloco hidrofóbico e um bloco hidrofílico tem sido bastante estudado nos últimos anos, por causa de sua capacidade para automontagem em uma variedade de nanoestruturas enquanto o solvente circundante é variado. Veja Cameron et al., Can. J. Chem./Rev. Can. Chim. 77:1311-1326 (1999). Em soluções aquosas, o compartimento hidrofóbico de um polímero anfifílico tem uma tendência para automontar a fim de evitar contato com água e minimizar a energia interfacial livre do sistema. Ao mesmo tempo, os blocos hidrofílicos formam uma "corona" hidratada no ambiente aquoso, e assim os agregados mantêm uma estrutura termodinamicamente estável. O resultado é uma suspensão coloidal do tipo látex, estável de partículas agregadas de polímero tendo núcleos hidrofóbicos e coronas hidrofílicas.

Os copolímeros anfifílicos do tipo colméia diferem dos copolímeros de bloco no que diz respeito à espinha dorsal que é largamente hidrofóbica ou hidrofílica, com cadeias de polímero de polaridade oposta pendentes da espinha dorsal em vez de incorporadas na mesma. Os copolímeros do tipo colméia foram preparados com espinhas dorsais hidrofóbicas e ramificações hidrofílicas (Mayes et al., Patente U.S. Nº 6.399.700), e também com espinhas dorsais hidrofílicas e ramificações hidrofóbicas (Watterson et al., Patente U.S. Nº 6.521.736; Uchegbu et al., U.S. Application Publication No. 2006/0148982). Os anteriores foram usados para fornecer apresentação multivalente dos ligandos para os receptores de superfície de célula, enquanto os últimos foram usados para solubilizar drogas e entregá-las às células.

Os agregados de polímero anfifílicos são estudados como portadores para solubilização das drogas insolúveis, veículos de entrega direcionados à droga, e siRNA ou sistemas de entrega de gene. Eles possuem uma estrutura mais estável do que as micelas de peso molecular baixo convencional, devido ao emaranhamento de cadeia e/ou à cristalinidade da região hidrofóbica interior. A natureza polimérica do veículo torna os agregados relativamente imunes à desintegração que os lipossomas ordinários sofrem quando diluídas abaixo de sua concentração crítica de micela. A ausência de uma membrana de bicamada as permite mais prontamente fundir com membranas celulares e entregar sua carga diretamente à célula. A natureza anfifílica dos agregados também confere uma atividade similar ao detergente e os agregados direcionados adequadamente parecem ser capazes de se

fundir com e romper as proteínas de revestimento virais.

Devido à biocompatibilidade excelente de poli (etileno glicol) (PEG), e à habilidade aparente de partículas "escondidas" revestidas-PEG para iludir o sistema reticuloendotelial, micelas, lipossomas, e polímeros que incorporam PEG foram considerados extensivamente como materiais para sistemas de distribuição de droga. Há muitos relatórios do uso de PEG como o componente hidrofílico dos PEG-lipídios (formando lipossomas e micelas); veja, por exemplo, Krishnadas et al., *Pharm. Res.* 20:297 – 302 (2003). Os copolímeros de bloco anfílicos de automontagem, que automontam nas mais robustas "polimersomas", foram investigados igualmente como veículos para solubilização e distribuição de droga. Ver, por exemplo, Jones e Leroux, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48:101-111 (1999); Photos et al., *J. Controlled Release*, 90:323-334 (2003); Kataoka et al., *Adv. Drug Deliv. Ver.* 47:113-131 (2001); e Torchilin, *J. Controlled Rel.* 73:137-172 (2001).

Veja, também Gref et al., *Int. Symp. Controlled Release Mater.* 20:131 (1993); Kwon et al., *Langmuir*, 9:945 (1993); Kabanov et al., *J. Controlled Release*, 22:141 (1992); Allen et al., *J. Controlled Release*, 63:275 (2000); Inoue et al., *J. Controlled Release*, 51:221 (1998); Yu e Eisenberg, *Macromolecules*, 29:6359 (1996); Discher et al., *Science*, 284:113 (1999); Kim et al., Patente U.S. Nº 6.322.805; Seo et al., Patente U.S. Nº 6.616.941 e Seo et al., Patente Européia Nº EP 0583955. O uso de poli(etilenoimina) (PEI) nesta capacidade foi relatado, com um foco na distribuição dos oligonucleotídeos (Nam et al., Patente U.S. Nº 6.569.528; Wagner et al., publicação do pedido de Patente U.S. Nº 20040248842). Em uma tendência similar, Luo et al., em *Macromolecules* 35:3456 (2002), descreve dendrímeros de poliamidoamina conjugada-PEG ("PAMAM") apropriados para distribuição de polinucleotídeos.

Além da necessidade de solubilizar, distribuir, e entregar drogas, há uma necessidade para os sistemas de distribuição de droga direcionada que atingem especificamente um tipo de célula, tecido, tumor, ou órgão alvo. Isto é realizado geralmente pela anexação de anticorpos ou de outros ligandos com uma afinidade específica para paredes celulares no local alvo. Entretanto, grupos funcionais perdem PEG a não ser que nas extremidades das cadeias de polímero, e em um copolímero de bloco na maioria dos grupos terminais sejam ligados a outro componente do copolímero de bloco. Por este motivo, a anexação de porções alvo tais como anticorpos ou moléculas de adesão celular a copolímeros de bloco PEG é limitada geralmente ao bloco de não-PEG, que não é infelizmente a parte do copolímero que é para expor normalmente na corona do agregado automontado.

O fenômeno da separação de fase que resulta na automontagem de copolímeros de bloco em agregados do polímero é prontamente reversível, e tentativas foram feitas para aumentar a estabilidade dos agregados por meio da reticulação do núcleo hidrofóbico (veja Patente Européia Nº EP 0552802). A anexação covalente da droga ao componente hidrofó-

bico de um copolímero de bloco foi tentada (Park e Yoo, Patente U.S. Nº 6.623.729; Patente Européia Nº EP 0397307).

Os polímeros dendríticos são facilmente conjugados as porções alvo, e também têm potencial para atingir células específicas in vivo (Singh et al. (1994) Clin. Chem. 40:1845) e adesão de blocos dos patógenos virais e bacterianos aos substratos biológicos. Os polímeros ramificados em colméia e dendrienxertos conjugados ao ácido siálico múltiplo foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a hemaglutinação do vírus e bloquear a infecção das células de mamíferos in vitro (Reuter et al. (1999) Bioconjugate Chem. 10:271). Os inibidores de vírus mais eficazes foram as macromoléculas de dendrienxertos e ramificadas em colméia, que mostrou até 50.000 vezes o aumento da atividade contra estes vírus.

Recentemente, a empresa farmacêutica Starpharma anunciou o desenvolvimento bem sucedido de um biocida a base de dendrímero (VivaGel™) que previne a infecção pelo HIV através da ligação aos receptores na superfície do vírus (Halford (2005) Chem. & Eng. News 83(24):30). Chen et al. (2000) (Biomacromolecules. 1:473) relataram que os dendrímeros poli (propilenoimina) funcionalizados pelo amônio quaternário são biocidas muito potentes.

Destruir as células cancerosas sem danificar as células saudáveis quase idênticas de um paciente é um problema particularmente difícil. Mesmo com os agentes quimioterápicos que obtiveram êxito, a toxicidade seletiva com base no mecanismo para as células cancerosas foi apenas parcialmente atingido. Por esta razão, o tratamento do câncer é uma classe de agentes para os quais a entrega direcionada é especialmente desejável e grandes esforços estão sendo envidados com o objetivo de desenvolver ligandos para marcadores de superfície de células cancerígenas específicas. (Delgado e Francisco, Drug Targeting: Strategies, Principles and Applications, Humana Press, 2000).

Por exemplo, o receptor da superfície celular para o ácido fólico é frequentemente elevado no câncer de ovário, rim, pulmão, mama, cérebro e endométrio, e nas células mielóide de origem hematopoiética. Já que o receptor folato é geralmente críptico em células normais, mas é exibido na superfície das células cancerígenas, que freqüentemente são exploradas como um alvo para terapias contra o câncer direcionada aos receptores (Lu and Low, J Control Release. 91:17-29 (2003)). Os ácidos fólicos conjugados diretamente com drogas antineoplásicas, anticorpos (Patent U.S. No. 5.547.668), lipossomas (Liu e Lee, Drug Design Reviews Online, 2:547-552 (2005)) e as construções da entrega da droga de nanopartículas (Torchilin, Adv. Drug Delivery Rev. 58:1532-1555 (2006)) estão entre as aplicações relatadas. As micelas formadas a partir de copolímeros em bloco anfífilicos conjugados com folato foram mostradas para entregar seletivamente paclitaxel às células tumorais (Park et al. J. Controlled Release 109:158-168 (2005)).

Da mesma forma, o receptor do fator de crescimento epidérmico (ErbB1, EGFR) é

representado em diversos espectros de tumores humanos de origem epitelial, incluindo câncer de mama, cabeça e pescoço, estômago, colo-retal, esôfago, próstata, bexiga, rins, pâncreas e ovário, e câncer de pulmão de células não-pequenas. Estes resultados estabeleceram o EGFR como outro alvo importante para os sistemas de liberação mediada por receptor. O próprio EGF apresenta atividade mitogênica e angiogênica forte, o que o torna inadequado como porções alvo, mas uma variedade de ligandos não-agonistas para EGFR foram desenvolvidos para esta finalidade.

Os anticorpos direcionados contra os epítomos específicos de células ou de tumores são utilizadas com sucesso como terapias-alvo, seja isoladamente (para ativar o sistema complementar do paciente) ou para liberar radioisótopos ou toxinas. Por exemplo, tositumomab, um anticorpo murino IgG<sub>2a</sub> lambda monoclonal direcionado contra o antígeno CD20-B linfócitos pode ser radioiodinado e utilizado para liberação do iodo-131 seletivamente nas células do linfoma. Esta terapia foi realizada com sucesso na clínica como tratamento de linfoma não-Hodgkin, e tem sido comercializada para esta indicação sob o nome comercial Bexxar™. Da mesma forma, ibritumomab (Zevalin™), outro anticorpo anti-CD20 monoclonal, foi utilizado para liberar ítrio-90 para a imunoradioterapia de linfoma não-Hodgkin.

Outros anticorpos direcionados ao câncer testados clinicamente incluem alemtuzumab (anti-CD52, Campath™) para a leucemia linfocítica crônica; bevacizumab (anti-VEGF, Avastin™) para câncer de cólon e câncer de pulmão; cetuximab (anti-EGFR, Erbitux™) e panitumumab (anti-EGFR, Vectibix™) para câncer de cólon, de cabeça e pescoço; gentuzumab (anti-CD33, Mylotarg™) para a leucemia mielogênica aguda; rituximab (anti-CD20, Rituxan™) e epratuzumab (anti-CD22, Lymphocide™) para linfoma não-Hodgkin, e trastuzumab (anti-HER-2, Herceptin™) para câncer de mama. A imunotoxina Mylotarg™, na qual um anticorpo anti-CD33 conjugado com caliqueamicina, uma droga anti-tumoral citotóxica, é de grande relevância.

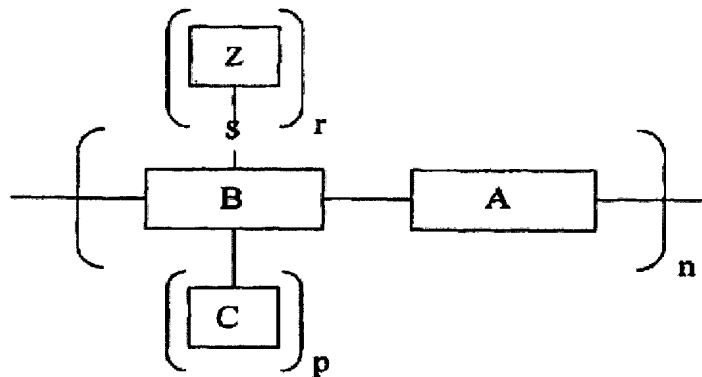
Ainda há uma necessidade de um sistema de distribuição de droga que seja estável, biocompatível, favorável à anexação de uma variedade de porções alvo e eficientes na entrega de carga substancial de drogas aos alvos de células tumorais desejados. Há ainda uma necessidade de agentes anticancerígenos direcionados que sejam igualmente estáveis, eficazes e biocompatíveis.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece moléculas de polímero tipo colméia biocompatíveis, compreendendo uma espinha dorsal hidrofílica tendo porções de ponto de ramificação, e ramificações hidrofóbicas unidas nestas porções de ponto de ramificação. As porções de ponto de ramificação fornecem ainda pontos de anexação, na forma de grupos funcionais reativos, aos quais as porções alvo específicas para células tumorais podem ser anexadas. A invenção fornece suspensões aquosas dos agregados de polímero formados por tais po-

límeros, e fornece métodos para solubilizar agentes antitumorais pelo encapsulamento de tais agentes nos núcleos hidrofóbicos dos agregados de polímeros. O método para encapsulamento de drogas compreende basicamente o contato de espécies de drogas com um polímero da invenção em um solvente aquoso ou aquoso misturado. A carga de droga resultante é mantida em um estado de solubilização dentro do núcleo hidrofóbico dos agregados do polímero macromolecular formado pelo polímero em colméia quando suspenso no meio aquoso. Em modalidades preferidas, o agregado de polímeros, com sua carga de drogas encapsuladas, é seletivamente distribuído nas células cancerígenas alvo pela porção alvo.

A invenção também fornece métodos para destruir ou inibir o crescimento ou a reprodução de células cancerígenas, ou para o tratamento do câncer em mamíferos, que compreende o contato de tal célula cancerígena ou a administração em tal mamífero de uma droga anticancerígena encapsulada dentro de um polímero do tipo colméia que consiste essencialmente da seguinte estrutura:



A estrutura compreende uma espinha dorsal formada pela alternância de porções de ponto de ramificação B e blocos de polímero solúvel em água e hidrofílicos. As cadeias laterais hidrofóbicas C e, opcionalmente, as porções alvo Z estão ligadas às porções de ponto de ramificação. Fica entendido que a cadeia polimérica possui grupos terminais, tipicamente um H ou um polímero em bloco A na porção terminal B e, normalmente, OH em blocos de polímero terminal A, mas a invenção abrange todas as terminações de cadeia convenientes. Preferencialmente, as cadeias laterais C são hidrocarbonetos lineares ou ramificados, opcionalmente substituídos por um ou mais substituintes hidrofílicos, ou hidrocarbonetos cíclicos ou policíclicos  $C_6-C_{30}$  ou opcionalmente substituídos por um ou mais substituintes hidrofílicos. As cadeias laterais C também podem ser aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos ou polímeros. Os substituintes hidrofílicos adequados para as cadeias laterais C são hidroxila, carboxila e grupos amina, bem como amida, sulfonamida, sulfóxido e sulfona. Os substituintes hidrofílicos preferidos são grupos apróticos polares, tais como amida terciária, sulfóxido e sulfona.

As porções alvo Z opcionais são ligandos ou anticorpos com afinidade de ligação específica com a superfície de uma célula cancerígena. Em algumas modalidades da inven-

ção, duas ou mais porções diferentes Z estão presentes em uma determinada molécula de polímero ou ponto de ramificação, de modo que os antígenos e receptores de superfície das células múltiplas podem ser direcionados a fim de aumentar a especificidade. "Afinidade de ligação específica" significa que o ligando ou anticorpo é capaz de ligar a superfície da célula cancerígena in vivo na presença de diversas superfícies celulares e macromoléculas encontradas no corpo do mamífero a ser tratado. A afinidade pode ser específica somente para as células cancerígenas ou para o tipo de células que são cancerígenas no paciente. Por exemplo, em um linfoma de célula B, o ligando pode ser um anticorpo para o receptor CD-20 presente em todas as células B. O grau de especificidade não precisa ser extremamente alto, mas deve ser suficiente para tratar o câncer de forma mais eficaz do que a carga de drogas solubilizado sozinha. A porção representada por "s" é uma ligação ou uma porção espaçadora e, quando s é um espaçador, cada s pode transportar de 1-4 grupos Z. O valor de n varia de 1 a cerca de 100; o valor médio de p varia de 1 a 2 e em algumas modalidades, r pode ser zero. Nestas modalidades, onde r é diferente de zero, o valor médio de r varia de 1-4.

A porção de ponto de ramificação B é uma porção multivalente com ligações a dois blocos de polímero, ligações para 1-2 cadeias laterais C (em média), e, quando r é diferente de zero, uma ou mais ligações a espaçadores "s" e/ou ligandos Z. Em algumas modalidades, as ligações a B e s e/ou Z são estabelecidas por meio de uma pluralidade de grupos funcionais reativos, que são capazes de servir como pontos de anexação. Em modalidades preferidas específicas, as porções alvo são unidas covalentemente às porções de ponto de ramificação de polímeros da invenção e uma droga é incorporada ao núcleo de agregados, de modo a formar um complexo de drogas direcionado.

A invenção ainda fornece métodos para a preparação dos polímeros tipo colméia, agregados, e agregados de polímeros direcionados e complexos de drogas direcionados descritos aqui. Os polímeros da invenção de automontagem nos agregados de polímero que eficientemente solubilizam, distribuem, e entregam drogas in vivo, são não tóxicos, biocompatíveis e estáveis, e são capazes de carregar porções alvo de células múltiplas em suas superfícies exteriores.

### 30 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 mostra a atividade de composições ilustrativas da invenção em um ensaio de proliferação de célula em uma cultura de células tumorais A549.

A Fig. 2 mostra a atividade de composições ilustrativas da invenção em um ensaio de proliferação de célula em uma cultura de células tumorais H441.

35 A Fig. 3 mostra a atividade de composições ilustrativas da invenção em um ensaio de proliferação de célula em uma cultura de células tumorais Skbr3.

A Fig. 4 mostra a atividade de composições ilustrativas da invenção em um ensaio

de proliferação de célula em uma cultura de células tumorais MDA-MB-231.

A Fig. 5 mostra a atividade de composições ilustrativas da invenção em um ensaio de proliferação de célula em uma cultura de células tumorais BT474.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 Alguns exemplos de polímeros da invenção, referidos aqui como "π-polímeros", são descritos no pedido internacional no. PCT/US06/01820, depositado em 19 de janeiro de 2006, estando o seu relatório incorporado aqui para referência em sua integralidade. Eles possuem uma arquitetura tipo colméia, com uma espinha dorsal formada de porções B alternadas de ponto de ramificação e de blocos de polímeros A solúveis em água, hidrofílicos; 10 e tendo uma pluralidade de cadeias laterais C hidrofóbicas unidas a cada porção de ponto de ramificação, conforme mostra a figura 1. As cadeias laterais C são as porções relativamente curtas, hidrofóbicas, que podem ser moléculas, cadeias ou oligômeros alifáticos ou insaturados. O valor de p é idealmente um número inteiro, seja 2, 3, ou 4. Na prática, as cadeias laterais são mais freqüentemente introduzidas por meio de reações químicas com 15 eficiência menor do que perfeita, tendo por resultado um valor médio de p para a preparação de polímero como um conjunto que não é o número inteiro pretendido. Os valores médios de números não inteiros podem igualmente ser obtidos pelo desenho, como discutidos abaixo. Assim, o valor médio de p nos polímeros da invenção é maior que um e pode ser maior que quatro ( $1 < p < 4$ ). Nas modalidades preferidas, p varia de aproximadamente 2 a 4, e mais 20 preferivelmente  $1,5 < p < 2$ . Fica entendido que, quando um valor inteiro é inferior, o valor inteiro é idealizado e não se refere ao valor médio realmente encontrado nas amostras físicas dos polímeros que são discutidas.

O bloco de polímero A da espinha dorsal é selecionado a partir das cadeias de polímero solúveis em água e/ou hidrofílicas, incluindo, entre outros, poli(etileno glicol), poli(propileno glicol), poli(etileno imina), poli(álcool vinílico), poli(vinilpirrolidona), polissacarídeos, e semelhante. Preferivelmente, as unidades de polímero A são cadeias poli(etileno glicol) de fórmula  $-(CH_2CH_2O)_m-$  onde m está entre 1 e 10.000, preferivelmente entre 3 e 3.000. 25

Na fabricação de poli(etileno glicol) de várias classes, sabe-se que na indústria para 30 acoplar uma parte ligante divalente (por exemplo, éter de diglicidil de bisfenol A) a duas cadeias poli(etileno glicol), dobrando eficazmente o peso molecular do polímero ao reter uma faixa de peso molecular relativamente estreita. Moléculas de "poli(etileno glicol)" resultantes são interrompidas conseqüentemente no ponto médio da cadeia de polímero pela porção ligante não-glicol (veja, por exemplo, aduto poli(etileno glicol)-bisfenol A diglicidil éter, N° 35 registro CAS 37225-26-6). Oligômeros mais elevados, isto é, aqueles que têm três cadeias de PEG separadas por duas porções de éter de diglicidil de bisfenol A, igualmente são sabidos, ver, por exemplo, o pedido de patente internacional WO 00/24008. Como usado aqui,

conseqüentemente, os termos "poli(etileno glicol)" e "poli(propileno glicol)" abrangem cadeias de polímero poli(etileno glicol) e poli(propileno glicol) que incorporam unidades ligantes de não-glicol, incluindo mas não limitadas ao éter de diglicidil de bisfenol A, éter de diglicidil de bisfenol B, éter de diglicidil de bisfenol S, éter de diglicidil de hidroquinona, e semelhante.

5 Para finalidades desta especificação, qualquer de tais porções ligantes não são contadas como "unidades de monômero".

O bloco de polímero A tem mais preferivelmente um comprimento médio entre vinte e cinquenta unidades de monômero. As cadeias de polietileno glicol podem ser substituídas na extremidade com grupos funcionais apropriados para uso como ligantes a outras porções, incluindo, mas não limitados a amino, mercapto, acrilato, acrilamida, maleato, maleimida, e semelhante, em uma ou ambas as extremidades. O valor de  $n$  varia de 1 a 1000 e está preferivelmente entre 3 e 100. O peso molecular total de  $\pi$ -polímero pode variar de 1000 a 100.000 dáltons ou mais; está preferivelmente acima de 2.000 dáltons, e mais preferivelmente acima de 7.000 dáltons.

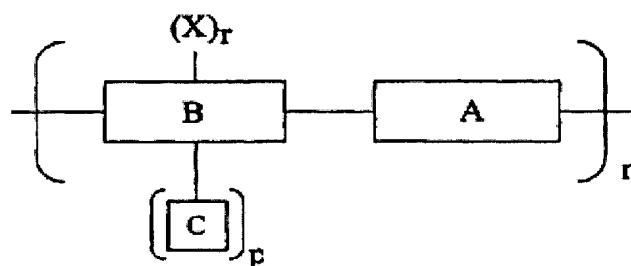
15 As porções hidrofóbicas C podem ser as mesmas ou diferentes, e podem variar de uma unidade de monômero para a próxima e pode ser, por exemplo, hidrocarbonetos lineares (substituídos opcionalmente por um ou mais substituintes hidrofílicos), hidrocarbonetos policíclicos (substituídos opcionalmente por um ou mais substituintes hidrofílicos), aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos e polímeros. Os substituintes hidrofílicos apropriados incluem, mas não são limitados a, grupos funcionais hidroxila, éter, ciano, e amida. São contemplados especificamente grupos  $C_8$  a  $C_{20}$  alquila portando substituintes  $\omega$ -hidróxi,  $\omega$ -ciano,  $\omega$ -amido, ou  $\omega$ -alcóxi. Neste contexto, o termo "substituinte" inclui a substituição de um heteroátomo, tal como O, N, ou S, para um átomo de carbono na cadeia hidrocarboneto ou sistema de anel da porção C. Assim, as ligações de éter e amida, e os anéis heterocíclicos podem ser incorporados na porção C.

25 As porções hidrofóbicas C são cadeias alifáticas ( $C_8$ - $C_{20}$ ) preferivelmente relativamente curtas, mas podem igualmente ser oligômeros curtos. Os oligômeros apropriados incluem ácidos hidróxi oligo tais como poli(ácido glicólico), poli(ácido DL-láctico), poli(ácido L-láctico), e copolímeros de ácidos hidróxi poli(ácido glicólico) e poli(ácido láctico) e, poli 30 (aminoácidos), poli(anidridos), poli(ortoésteres), e poli(fosfoésteres), polilactonas tais como poli(épsilon-caprolactona) poli(delta-valerolactona) poli(gama-butirolactona) e poli(beta-hidroxibutirato). As porções C podem igualmente ser selecionadas das moléculas hidrofóbicas, tais como o colesterol, ácido cólico, ácido deoxicólico, ácido litocólico e substâncias relacionadas; substâncias similares a prostaglandina; substâncias estereoidais (p. ex. de- xametasona); ácidos retinóicos, retinol, e substâncias relacionadas ao retinol; peptídeos hidrofóbicos e similares. O peso molecular de cada porção C é maior que 40, preferivelmente 35 entre 50 e 1.000, e mais preferencialmente entre 100 e 500. O valor logP (água octanol) da

molécula C-H é preferencialmente cerca de 1,4 e preferencialmente superior a 2,0 e mais preferencialmente superior a cerca de 2,5. Geralmente, qualquer porção C parece ser adequada para uso na presente invenção, se a molécula C-H for substancialmente solúvel em água. "Substancialmente insolúvel" significa que C-H líquido formará uma fase separada quando misturada com água.

É uma característica de distinção dos polímeros tipo colméia desta invenção que as cadeias laterais C não estão distribuídas regularmente e uniformemente ao longo da cadeia de polímero, mas ocorre um pouco nos conjuntos [C]<sub>p</sub>. Estes conjuntos são espaçados mais ou menos regularmente ao longo da cadeia de polímero, dependendo do grau de monodispersividade das unidades de polímero A. Assim, a distância entre as duas cadeias C unidas a uma porção de ramificação comum B é diferente da distância entre as duas cadeias laterais unidas às porções de ramificação diferentes, que são separadas pelo bloco de polímero A.

Em uma modalidade da invenção particularmente adequada para a entrega direcionada, as porções B do ponto de ramificação compreendem ainda um ou mais grupos funcionais reativos X, conforme mostrado na Fórmula 2, que são adequados para a anexação de porções alvo.



Na fórmula 2, os grupos reativos individuais X podem ser os mesmos ou podem ser diferentes um do outro, e podem opcionalmente ser obstruídos ou protegidos conforme possa ser necessário durante a montagem do polímero 2. O valor médio de r variará de 0 (nas modalidades com grupos X ou Z) a aproximadamente 8. Tipicamente, os grupos reativos serão selecionados a partir dos grupos funcionais conhecidos na técnica para ser úteis para formar ligações covalentes entre espécies moleculares. Em algumas modalidades, existe um único ponto de anexação X. Em outras modalidades, pode existir três ou quatro tipos diferentes de grupos reativos. Os grupos reativos apropriados X incluem, mas não são limitados a -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -CHO, -NHNH<sub>2</sub>, -COOH, -ONHNH<sub>2</sub>, haloacila, acetoacila, -CN, -OCN, -SCN, -NCO, -NCS, e semelhante; ligações duplas reativas tais como vinílicas, acrílicas, alílicas, maléicas, cinâmicas, e semelhante, e grupos com ligações triplas reativas tais como o acetilenocarbóxi e acetilenocarboxamido (apropriados para adições de Michael, reações de Diels-Alder e reações de adição de radical livre).

As porções de célula alvo exemplares incluem, mas não são limitadas, ligandos re-

ceptor-específicos, anticorpos, aptâmeros ou peptídeos que se ligam a um receptor de superfície de célula específico e outras porções alvo, tais como peptídeos que possuem uma seqüência de aminoácido ácido Arginina-Glicina-Aspártico (RGD) ou um motife de Tirosina-Isoleucina-Serina-Arginina-Glicina (YISRG); fatores de crescimento incluindo fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento de fibroblasto; ligandos de receptor celular tais como folato, metotrexato, ácido pteróico, estradiol, estratriol, testosterona, e outros hormônios; manose-6-fosfato, açúcares, vitaminas, triptofano, e semelhante. Os agonistas receptores e antagonistas receptores, sejam competitivos ou alostérico, podem ser empregados.

10 Os aptâmeros podem ser selecionados para ligação a um receptor através de métodos conhecidos na técnica. Os peptídeos capazes de se ligar a um receptor podem ser selecionados usando métodos padrão, como a triagem de microplacas de alta taxa de transferência, phage display, matrizes planas e pinos, e similares. Os anticorpos são anticorpos preferivelmente monoclonais direcionados a antígenos de superfície celular específica; as  
15 porções alvo apropriadas incluem não somente os anticorpos completos mas igualmente os fragmentos do anticorpo que contêm as seqüências de ligação de antígenos ativos, tais como fragmentos Fab' 2, fragmentos Fab', ou peptídeo de cadeia curta (ex. peptídeos de região determinante de complementaridade (CDR)) ou análogos da seqüência de ligação de antígeno ativo de tais anticorpos. Os anticorpos apropriados incluem, mas não estão limitados a, os anticorpos direcionados contra os antígenos tumorais, como NCA90, NCA95, CEA, CD15, CD20, CD22, CD33, CD52, VEGF e EGFR. Os anticorpos são de preferência monoclonais, e, opcionalmente, podem ser humanizados, quiméricos, ou plenamente humana, e podem ser PEGuilados ou de outra forma modificados. Os anticorpos policlonais podem, no entanto, ser empregados com vantagem em algumas circunstâncias, devido às suas  
20 capacidades de ligação com antígenos múltiplos.

Particularmente, os anticorpos apropriados incluem, entre outros, tositumomab, ibritumomab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, panitumumab, rituximab, epratuzumab, tositumomab e trastuzumab, e os fragmentos de anticorpos ou peptídeos compreendendo os seus domínios de ligação.

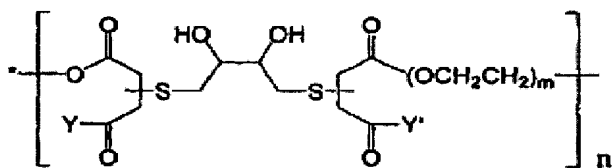
30 Em uma modalidade alternativa, a biotina pode ser unida ao  $\pi$ -polímero por meio de um grupo funcional X e ser usada como um meio de ligação não-covalente para as proteínas avidina e estreptavidina acoplada, peptídeos, anticorpos, hormônios de crescimento e outras porções alvo.

Em algumas modalidades da invenção, algumas frações de porções B de ponto de ramificação de ponto de ramificação são conectadas a outras porções de ponto de ramificação em outra parte da cadeia de polímero, de modo a formar uma estrutura hidrogel reticulada. Tal reticulação pode ser efetuada pela reação do polímero com as porções multifun-

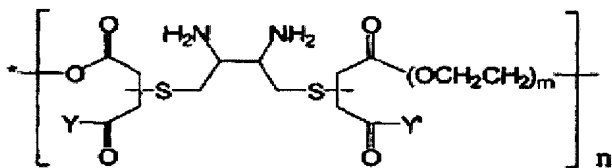
cionais que contêm grupos homofuncionais ou heterofuncionais, pelo menos um que reage com o X ou grupo reativo em C situado em uma primeira porção de ponto de ramificação, e pelo menos, um que reage com o X ou com um grupo funcional reativo presente em C em uma segunda porção de ponto de ramificação na mesma molécula de polímeros. A reticulação pode igualmente ser feita através de uma ligação aos grupos funcionais terminais da cadeia de polímero A. A partir dos polímeros do tipo colméia lineares, tais polímeros reticulados podem opcionalmente carregar as porções alvo.

A porção B do ponto de ramificação é derivada tipicamente de uma molécula multifuncional que tem uma pluralidade de grupos reativos, dois dos quais são apropriados para a anexação à unidade A de polímero hidrofílico, e, pelo menos, dois dos quais são apropriados para a anexação das porções C hidrofóbicas. A porção B pode opcionalmente ter um ou mais grupos reativos adicionais X como descritos acima.

Particularmente, as porções de ponto de ramificação preferidas são conjugados de ditiotretitol (DTT), ditioeritritol (DTE), ou 2-3-diaminobutano-1-4-ditiol com duas moléculas de ácido maléico. A combinação desta porção de ponto de ramificação com polietileno glicol como a porção A gera a espinha dorsal de polímero das fórmulas 3 e 3a



3



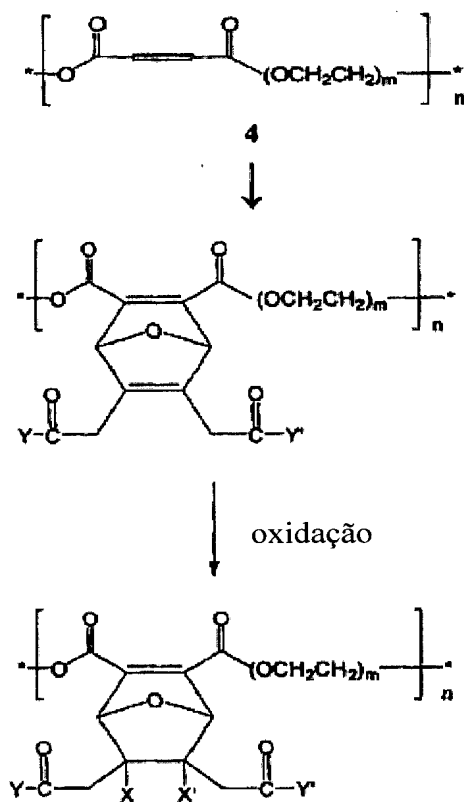
3a

onde Y e Y' podem ser os mesmos ou diferentes, e são selecionados preferivelmente de OH, NH<sub>2</sub>, ONH<sub>2</sub>, NHOH, e NHHN<sub>2</sub>. Em uma modalidade preferida, os grupos amino ou hidroxila do ditiol são os grupos reativos X, servindo como pontos de anexação para porções de droga ou alvo, enquanto os grupos funcionais Y e Y' servem como pontos de anexação para porções C. Alternativamente, os grupos Y e Y' podem servir como pontos de anexação para porções alvo, enquanto os grupos amina ou hidroxila são usados para unir as porções C.

As fórmulas 3 e 3a foram desenvolvidas para carregar a informação de que cada átomo do enxofre pode independentemente ser unido de alfa ou beta a um grupo carbonila

de éster de PEG. A invenção abrange composições de isômero únicas assim como misturas de regioisômeros em uma ou ambas ligações C-S. Além disso, devido aos quatro carbonos assimétricos na fórmula 1, a invenção abrange todos isômeros e misturas quirais, meso, e isômeros diastereoméricos e suas misturas.

5 O aduto Diels-Alder do ácido dicarboxílico acetileno e um furano podem igualmente servir como uma porção de ponto de ramificação apropriada. Por exemplo, o poliéster 4 derivou-se do PEG e o ácido dicarboxílico acetileno é conhecido por realizar as reações do Diels-Alder com furanos (M. Delerba et al., *Macromol. Rapid Commun.* 18 (8): 723-728 (1997)).

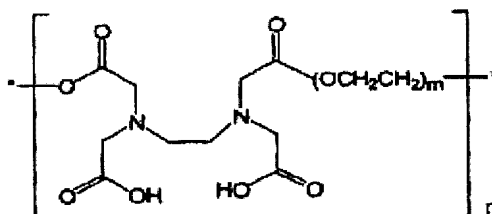


*Esquema 1*

5

10 Assim, o mesmo pode estar sujeito a uma reação de Diels-Alder com um furano 3,4-dissubstituído para gerar uma espécie tal como 5, e o polímero 5 pode ser modificado por hidroxilação ou epoxidação para fornecer grupos reativos (por exemplo, X e X' no esquema 1).

15 Da mesma forma, a reação de PEG com dianidrido de ácido etilenodiamina tetraacético fornecerá um poliéster de fórmula 6 mediante a condensação subsequente:

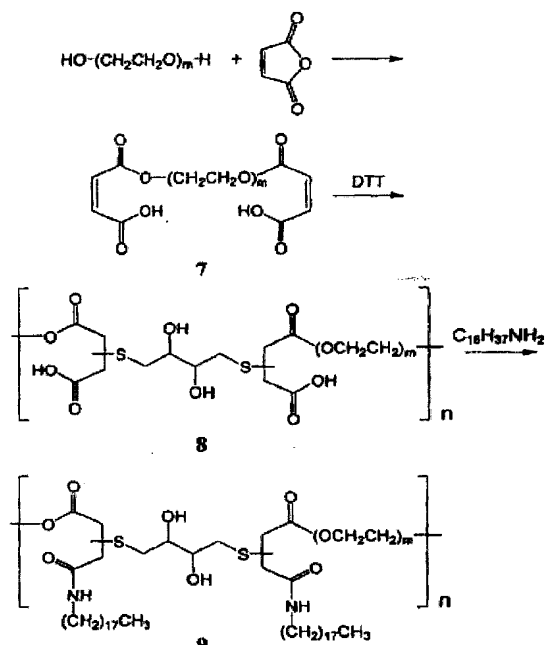


6

Outras porções de ponto de ramificação apropriadas podem ser derivadas de ácido tartárico, ácido acetileno-dicarboxílico, ácido nitrilotriacético, dianidrido de ácido 3-4-3'-4'-difênil sulfona tetracarboxílico, dianidrido de ácido 3-4-3'-4'-difênil éter tetracarboxílico, dianidrido piromelítico, alcanoditióis tais como 1-2-etanoditiol e 1-4-butanoditiol, bis(2-mercaptoetil)éter, 2-mercaptoetilsulfeto, dimercaptopropanol, dimercaptopurina, dimercapto-  
 5 tiadiazol, ácido dimercaptossuccínico, benzenodimetanotiol, benzenoditiol, benzenodimetanotiol dihalogenados, 4-4'-tiobisbenzenotiol dihalogenado e semelhante.

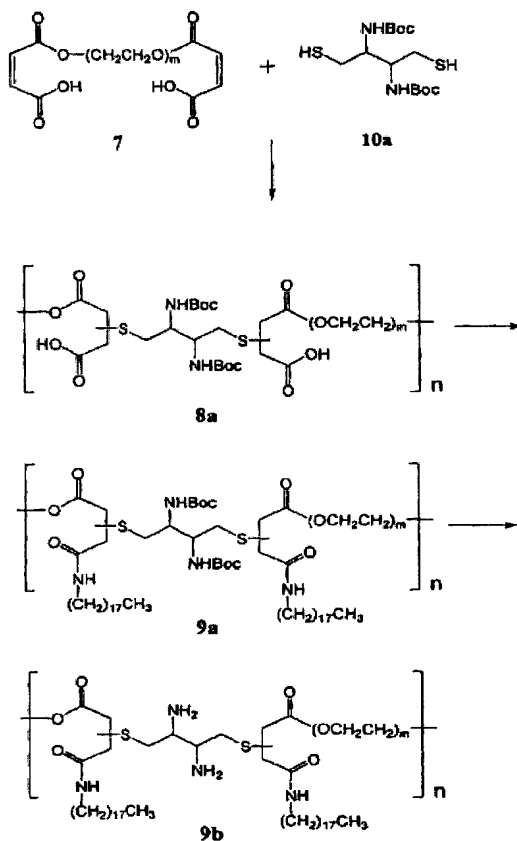
Onde Y e Y' são OH, grupos hidrofóbicos C podem ser ligados ao polímero pela amidação ou esterificação dos grupos de ácido carboxílico. Os grupos hidrofóbicos C são preferivelmente relativamente porções pequenas ( $C_8-C_{20}$ ) e predominante hidrocarboneto e podem ser lineares ou ramificados ou conter um ou mais anéis. Os exemplos incluem, mas não são limitados a, porções covalentemente unidas derivadas de moléculas C-H n-octanol, n-decanol, n-dodecilamina, n-pentadecilamina, colesterol, ácido deoxicólico, ácido cólico, retinol, vitamina A e diversos isômeros de ácido retinóico cis e trans, diversos tócoferóis e ácido aracdônico. Embora os polímeros da invenção sejam representados, para a conveniência, como tendo no máximo duas cadeias laterais hidrofóbicas diferentes, deve ser compreendido que as propriedades de solventes interiores dos agregados de polímeros podem ser alteradas ou ajustadas pelo uso de misturas de dois ou mais compostos hidrofóbicos de forma que sejam introduzidas uma variedade de cadeias laterais hidrofóbicas em um polímero particular. Além dos efeitos do solvente, decorrentes, por exemplo, da ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, as propriedades físico-químicas, tais como as fases de cristal líquido e as temperaturas de transição de fase podem ser modificadas. Esses efeitos são bem conhecidos, por exemplo, a partir de estudos de bicamadas da membrana.

Como um exemplo específico, um polímero de fórmula 2, onde  $X=OH$  e  $r = 2$ , foi preparado pela reação de um polietileno glicol com anidrido maléico para formar o poliéster 7, seguido pela reação com ditiotretitol para formar 8. O ácido 7 foi então amidado com n-octadecilamina para formar o polímero tipo colméia desejado 9 (esquema 2). Os polímeros tipo colméia DTT derivados de amida representados pela fórmula 9 são referidos no mesmo como "π-Polímero A"; o polímero específico 9 no esquema 2 seria designado "C<sub>18</sub>-π-Polímero A".



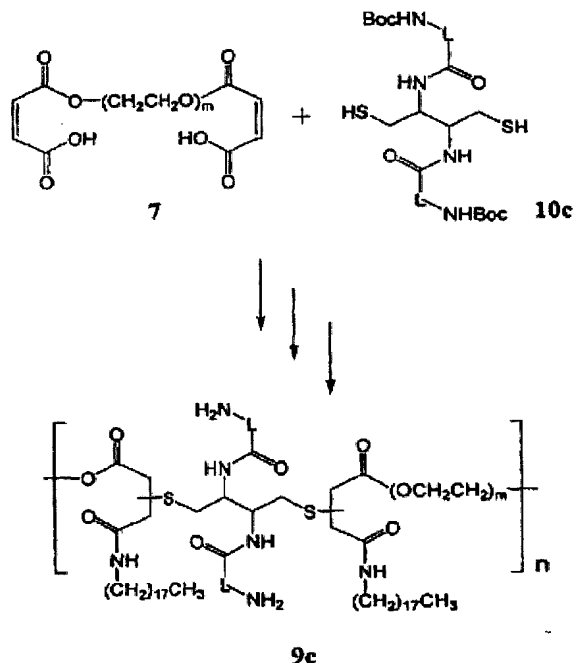
### Esquema 2

A substituição de 2-3-bis(t-butoxicarbonilamino)butano-1-4-ditiol (10a; DuPriest et al., Patente U.S. Nº 4.755.528) para ditiotretiol conduz, após a desproteção, o  $\pi$ -polímero funcionalizado pela amino correspondente 9b (Esquema 3).



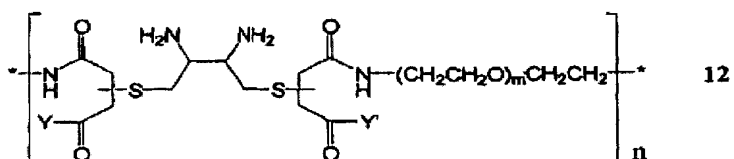
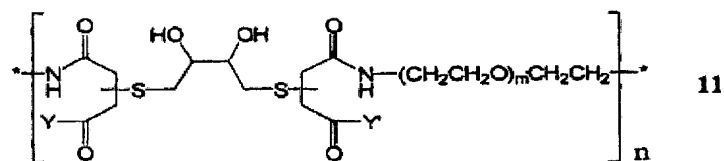
## Esquema 3

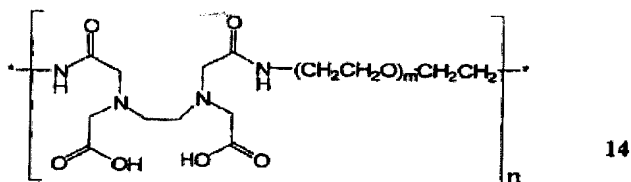
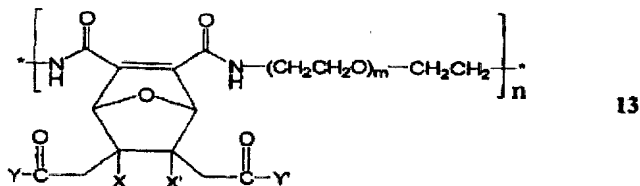
O uso de butanoditiol 10c conduz do mesmo modo os polímeros da estrutura geral 9c, com grupos espaçadores L no lugar para anexação subsequente de porções alvo (esquema 4). Os grupos espaçadores L podem ser qualquer dos grupos espaçadores conhecidos na técnica para uso na anexação de ligandos ou indicações para as moléculas de substrato, incluindo, mas não limitados a,  $C_2$  a  $C_{20}$  alquilenos e espaçadores oligo(etileno glicol) com uma a dez unidades  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ .



## Esquema 4

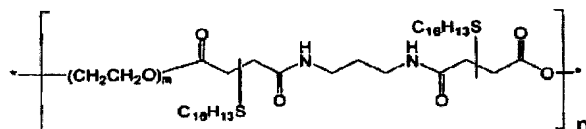
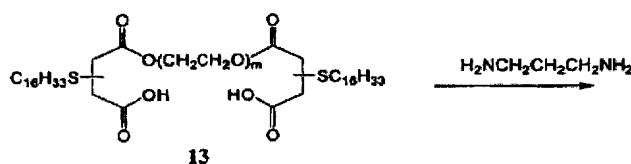
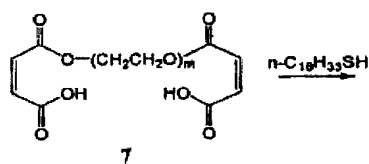
Em outras modalidades, um polímero PEG com grupos amino terminais podem ser usados para preparar os exemplos que têm ligações amida entre as unidades A e B, como mostrado nas estruturas 10-14 abaixo. Cada uma destas poliamidas pode ser derivada através da reação de diamina PEG  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$  com o anidrido cíclico apropriado:



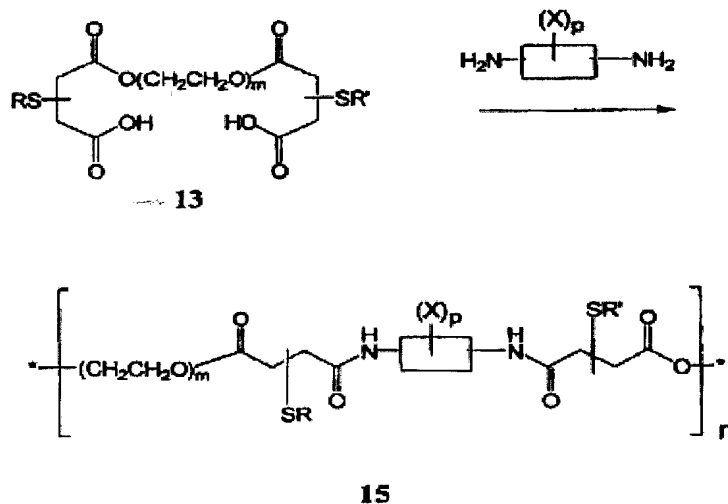


Sob circunstâncias suaves, os aminoácidos acima são os produtos previstos. Sob aquecimento, a formação de imida pode ser esperada, conduzindo os polímeros com poucos grupos reativos, mas ainda apropriados para anexação de porções C hidrofóbicas. Uma formação imida indesejável pode ser reduzida ou evitada pela realização de reações a temperaturas baixas e/ou sob condições aquosas. Alternativamente, as cadeias laterais C pendentes podem ser adicionadas às extremidades dos blocos de polímero A, e as porções de ponto de ramificação podem passar a existir no momento da polimerização (esquema 5).

Em adição às diaminas simples tal como 1-3-diaminopropano, como mostrado no esquema 5, diaminas tendo (opcionalmente mascaradas) grupos funcionais reativos X podem ser empregadas, conduzindo os polímeros 15 apropriados para anexação de porções alvo (esquema 6). Nas fórmulas abaixo, p pode variar de 0-4, e cada X é independentemente o mesmo ou diferente de qualquer outro grupo X que pode estar presente. Um grupo reativo X não precisa ser pendente, mas pode, por exemplo, ser um grupo NH dentro da cadeia dos átomos que compõe a diamina, como no monômero  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ .



Esquema 5



Esquema 6

5 Alguns  $\pi$ -polímeros preparados como acima possuem grupos reativos X apropriados para derivatização adicional, para unir porções alvo ou para efetuar reticulação das cadeias de polímero através de agentes de reticulação bifuncionais ou multifuncionais. Em

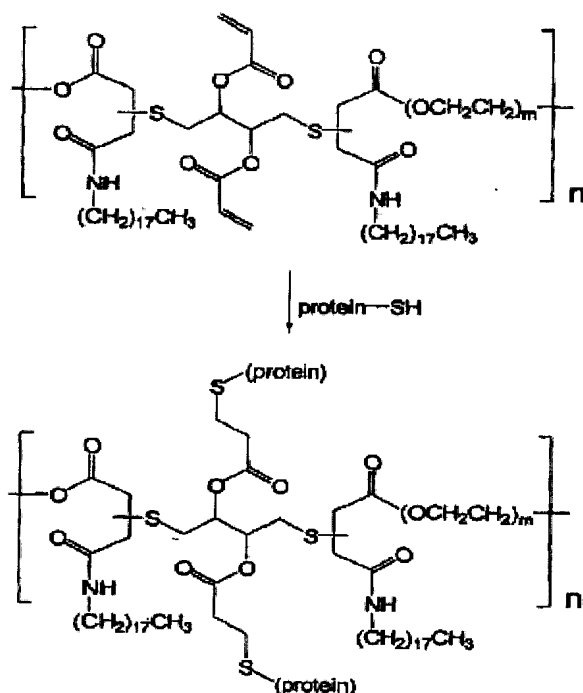
10 modalidades particulares, derivatização parcial dos grupos reativos na cadeia de polímero é realizada para gerar  $\pi$ -polímeros que têm uma variedade de grupos reativos diferentes, que permite a anexação de uma variedade de porções alvo a uma única cadeia de polímero. Assim, a adição de uma quantidade subestoiquiométrica de cloreto de acrilóila (ou anidrido maléico) ao  $\pi$ -polímero do exemplo 1 fornecerá um polímero com grupos acrilóila (ou maleí-

15 la) e hidroxila residuais. A adição subsequente de Michael de uma quantidade subestoiquiométrica de um ácido mercapto-carboxílico, por exemplo, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOH, forneceria um polímero com grupos hidroxila, acrilóila, e carboxila. A adição de cisteína introduz amino e grupos carboxila, além do que todos os grupos reativos residuais deixados atrás por quantidades subestoiquiométricas de reagentes.

Outra aproximação aos  $\pi$ -polímeros polifuncionais envolve a omissão deliberada de uma porção das cadeias hidrofóbicas C. O  $\pi$ -polímero do exemplo 1, por exemplo, pode ser preparado com grupos de ácido carboxílico não reativos por expediente simples de limitar a quantidade de alquilamina de formação pendente na etapa de amidação. Contudo, uma outra aproximação é amidação com uma mistura de aminas, uma porção de que contém um grupo reativo X. Também, sob circunstâncias apropriadas (anidrido maléico em excesso na etapa A e em excesso DTT na etapa B), uma preparação de polímero tendo uma população desejada de grupos tiol livres pode ser gerada.

25 O  $\pi$ -polímero do exemplo 1 contém, pelo desenho, os grupos hidroxila derivados da porção DTT na espinha dorsal, que servem como grupos reativos X. A esterificação destes grupos com cloreto de acrilóila ou cloreto de metacrilóila em meios aquosos na presença de

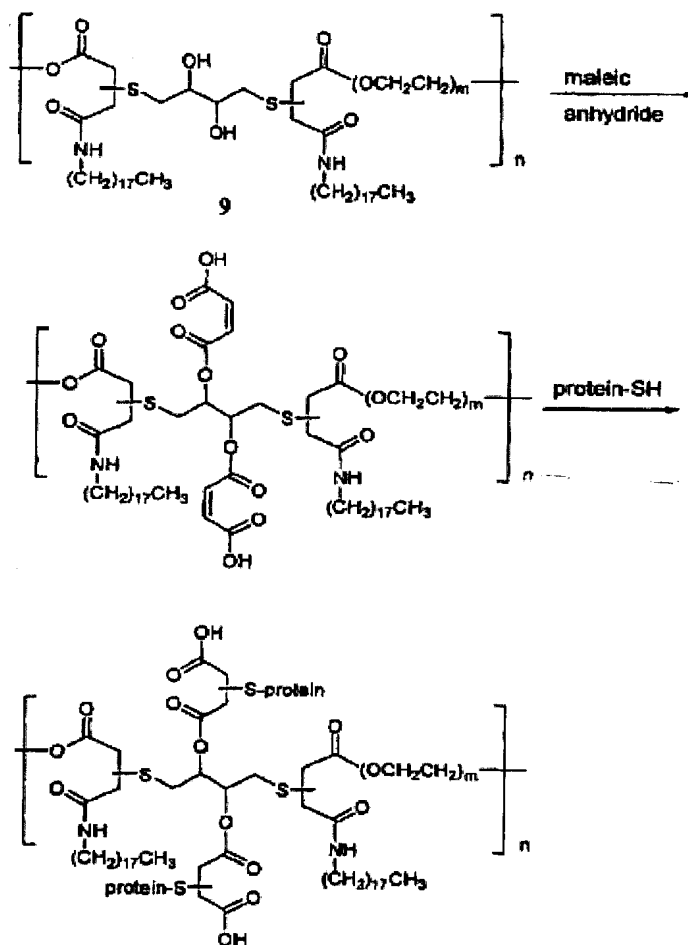
5 tampão de carbonato/bicarbonato resulta na substituição de acrilóila nos grupos -OH. O polímero acrilato pode prontamente estar sujeito à polimerização radical (com ou sem o monômero radical adicionado tal como um composto acrílico ou reticulador tal como um composto bisacrílico) para obter hidrogéis apropriados para a entrega controlada de droga (atuando como depósitos ou reservatórios de polímero) e para tratamentos tópicos (tais como remendos ou pomadas de pele). O grupo acrílico pode igualmente ser sujeito a uma adição de Michael, em particular, com um tiol, tal como aquele de um resíduo de cisteína em uma proteína, enzima, peptídeo, anticorpo, fragmento Fab' 2 ou fragmento Fab', ou outra porção alvo (esquema 7).



10 Esquema 7

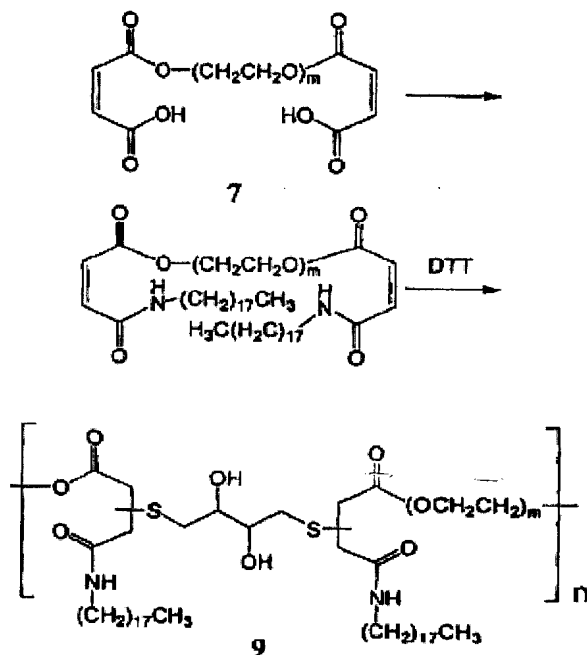
15 Um  $\pi$ -polímero que possui grupos hidroxila reativos, após secagem, pode igualmente ser esterificado com anidrido maléico para unir o grupo maleato, um acceptor Michael, gerando simultaneamente um grupo carboxílico livre. No polímero resultante, a ligação dupla maléica está disponível para uma adição de Michael, em particular, com um tiol, tal como aquela de um resíduo de cisteína em uma proteína, enzima, peptídeo, anticorpo, fragmento Fab' 2 ou fragmento Fab', ou outra porção alvo. (Esquema 8), e o grupo carboxila estão disponíveis para acoplar ao grupo amino em uma porção alvo, como os resíduos de lisina nas proteínas e nos peptídeos.

20 Uma porção diferente pode ser unida ainda (ou previamente disponível) ao grupo carboxílico recentemente introduzido através da amidação. Assim pelo menos duas porções alvo podem ser unidas mesmo sob a saturação de condições de reação (isto é, a porção a ser unida está presente no excesso estequiométrico).



Esquema 8

Uma preparação alternativa envolve a amidação de dimaleato PEG, seguido pela reação com um ditiol, como mostrado no Esquema 9. A amidação pode ser realizada através do uso de ésteres ativos ou a qualquer dos muitos processos conhecidos de ativação do ácido carboxílico, incluindo, mas não limitados aos métodos que empregam EDC, DIPC, DCC ou similares, com ou sem catalisadores, tais como: NHS, HOBT, DMAP, piridina ou TMED. O dimaleamido PEG reage então com DTT ou outro ditiol para afetar a adição similar ao Michael à dupla ligação, produzindo o polímero desejado. A vantagem deste processo é que se pode escolher entre uma seleção potencialmente muito vasta de dimaleamidos PEG pré-formados, os monômeros precisos (e suas relações) que se deseja incorporar no polímero.



Esquema 9

Os polímeros que carregam grupos carboxilato pendentes podem ser amidados com aminas sob condições típicas de acoplamento, e podem igualmente ser convertidos aos grupos isocianatos através do rearranjo de Curtius e então serem acoplados com aminas ou alcoóis para formar uréias e carbamatos, respectivamente. Tais reações podem ser usadas para introduzir os grupos hidrofóbicos C, ou para unir as porções alvo.

As aminas livres podem ser introduzidas no polímero pelo menos parcialmente reagindo com um dos grupos reativos com uma diamina. A diamina deve ser escolhida de modo que um dos grupos amina seja protegido ou não reativo sob as condições da reação. Os últimos podem freqüentemente ser realizados usando etilenodiamina em um pH de aproximadamente 7,5, desde o pKa' s dos dois grupos amino difere consideravelmente. Preferivelmente, esta amidação é realizada como uma etapa separada após a introdução dos grupos hidrofóbicos pendentes. Um peptídeo ou outra molécula tendo um grupo carboxílico pode então ser unida pela amidação nesta amina livre.

Assim, mesmo sob condições de saturação, tanto como três peptídeos diferentes ou outras porções alvo podem ser unidas ao  $\pi$ -polímero: um através de tiol, um através de amina ou hidroxila, e um através do grupo de ácido carboxílico. Além das porções alvo, os agentes de imagem também podem ser incorporados aos polímeros da invenção, permitindo a visualização da distribuição do polímero no corpo. Os agentes radioterapêuticos tais como  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{224}\text{Ac}$  e similares e citotoxinas tais como caliqueamicina, endotoxinas bacterianas, gelonina, abrina, ricina ou similares, também podem ser anexados aos polímeros.

Os grupos hidroxila e tiol podem igualmente ser convertidos em amins pelos métodos conhecidos (por exemplo, a reação Mitsunobu) ou modificados em amins primárias pela reação com aziridina ou uma haloalquil amina (tal como bromoetilamina ou cloroetilamina). A amidação com cisteamina introduzirá um dissulfeto, que possa reagir diretamente com a cisteína de um peptídeo ou anticorpo para unir o peptídeo ou anticorpo; ou pode primeiramente ser reduzido, por exemplo, com aminoetanotiol ou DTT, para uma reação adicional com um peptídeo ou anticorpo.

Ao executar as reações parciais, pode-se introduzir grupos funcionais reativos adicionais a um polímero da invenção, incluindo, entre outros, (1) grupos tiol reativos tais como derivados de ácido acrílico ou maléico, (2) grupos reativos de ácido carboxílico tais como amino ou hidroxila, (3) grupos amina reativos tais como carboxila, e (4) grupos dissulfeto reativos tais como mercapto. O número de tais grupos funcionais adicionados por molécula de polímero pode variar de  $1/r$  até diversos múltiplos de  $r$ , dependendo do reagente usado e da quantidade usada.

Alternativamente, duas ou mais porções alvos específicas podem ser unidas para melhorar a especificidade da ligação a uma superfície da célula cancerígena. Duas ou mais porções alvos específicas podem igualmente ser usadas para gerar uma interação entre alvos celulares diferentes, por exemplo, uma porção pode atingir o polímero à célula cancerígena e outra porção pode facilitar a ligação a fatores complementares e a ativação do caminho complementar.

A anexação de porções alvo às unidades de repetição dos polímeros da invenção resulta na exposição multivalente das porções na cadeia de polímero e nas superfícies de nanopartículas. A exposição multivalente conduz frequentemente a grandes aumentos na afinidade do alvo. Por exemplo, os anticorpos multivalentes podem ser mais eficazes na liberação de seus alvos do que os anticorpos divalentes normais. As proteínas de ligação carboidratos e carboidratos são conhecidas pela natureza multivalente e ineficazes se monovalentes. Similarmente, o peptídeo multivalente e as porções carboidrato alvo serão mais eficazes do que o monômero sozinho.

Um outro benefício da anexação das porções alvo às cadeias de polímeros da invenção é um aumento substancial no peso molecular, que resulta nas taxas de liberação renais reduzidas de peptídeos e outros ligandos. Além disso, a espinha dorsal PEG confere benefícios similares aquelas proteínas PEGilação, tais como evasão de vigilância imune.

Os polímeros em colméia da invenção são úteis para encapsulamento em sistemas solventes aquosos, solúveis em água e drogas anticancerígenas escassamente solúvel em água. O método de encapsulamento de uma substância em um solvente aquoso compreende o contato da droga com um polímero tipo colméia da invenção na presença de água, para dar forma a um complexo solúvel em água da substância e do polímero. Alternativamen-

te, o polímero e a substância a serem encapsulados podem ser combinados com uma emulsão aquosa-orgânica bifásica e o solvente orgânico pode ser removido por evaporação. Um processo ilustrativo está descrito na patente US 6.838.089, incorporada aqui para referência. Acredita-se que, na maioria dos casos, o polímero automonta em nanopartículas similares a micela que têm a droga dissolvida entre as cadeias C hidrofóbicas que coalescem no núcleo das partículas, enquanto os blocos A formam uma coroa hidrófila que abaixa suficientemente a energia livre interfacial para permitir que uma suspensão aquosa das partículas permaneça estável.

Em alguns casos, a substância escassamente solúvel pode não se dissolver inteiramente no núcleo, mas pode existir como uma nanopartícula sólida cercada por e suspensa nas cadeias C no núcleo das partículas. A prática da invenção não depende de qualquer grau particular de mistura das cadeias C com a substância escassamente solúvel. A droga pode em alguns casos se dissolver a nível molecular entre as cadeias C, mas em outros casos, ela pode exibir qualquer grau de separação de fase do ambiente de cadeia C. Em alguns casos, pode-se esperar que o sistema se mova de um estado para outro em função das condições externas, tais como pH, temperatura ou taxa de divisão. A taxa de divisão na corrente sanguínea, por exemplo, pode ser bastante elevada, embora seja geralmente baixa no sistema linfático. Tais mudanças no estado provocadas por fatores ambientais podem ser exploradas pelo controle da liberação da droga a partir do núcleo de partículas.

O poder de solvatação do núcleo hidrofóbico das partículas do polímero pode ser modificado pela alteração das porções C hidrofóbicas. As modificações apropriadas incluem, entre outros, introdução de um ou mais substituintes hidrofílicos, tais como hidroxila, éter, amida e grupos funcionais ciano, a fim de aumentar a polaridade e/ou a capacidade de polarização do núcleo hidrofóbico.

As drogas anticancerígenas podem ser encapsuladas e entregue por estes polímeros incluem, entre outros, doxorrubicina, camptotecina, docetaxel, paclitaxel, topotecan, irinotecan, imatinib, sunitinib, sorafenib, axitinib, pazopanib, etoposido, metotrexato, methopterin, diclorometotrexato, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurina, cladribina, estaurosporina, citarabina, melfalano, leurosina, actinomicina, daunorrubicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina D, mitomicina A, carninomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina, cisplatina, carboplatina, vimblastina, vincristina, vindesina, ácido retinóico, colquicina, dexametasona e tamoxifeno, e seus derivados e análogos dessas drogas, bem como agentes fotodinâmicos, ácidos nucléicos, análogos de ácidos nucléicos e complexos de ácido nucléico. Os análogos de ácido nucléico incluem espécies tais como tiofosfatos, fosforamidatos e ácidos nucléicos de peptídeos. Os complexos de ácido nucléico são complexos iônicos de ácidos oligonucléicos ou seus análogos com quantidades neutralizantes de taxas de espécies catiônicas e policatiônicas.

Como resultado da capacidade dos polímeros da invenção de encapsulamento de drogas anticancerígenas, a invenção atual igualmente fornece composições farmacêuticas, que compreendem um ou mais  $\pi$ -polímeros da invenção em combinação com uma quantidade terapêuticamente eficaz de um ou mais agentes farmacologicamente ativos e transportador farmacêuticamente aceitável ou excipiente. Os transportadores e excipientes apropriados incluem água e salina e aditivos sólidos tais como tampões, sais, açúcares, polissacarídeos, tais como celulose e seus derivados e diversos umectantes, glidantes, preservativos, agentes de ligação e dispersantes conhecidos na técnica. Os polímeros da invenção podem tornar eficaz o que seria de outra maneira, na técnica anterior, uma quantidade ineficaz de um agente farmacologicamente ativo. Para finalidades desta divulgação, conseqüentemente, uma "quantidade terapêuticamente eficaz" é a quantidade de agente que torna a composição total eficaz.

Todas as patentes, os pedidos de patente e as publicações mencionadas aqui são incorporadas para referência em sua totalidade.

## EXEMPLOS

### 1. Procedimentos gerais.

A invenção igualmente fornece processos para a preparação de polímeros em colméia da invenção. A síntese destes polímeros é realizada prontamente por uma pessoa versada na técnica em síntese orgânica, seguindo os procedimentos descritos abaixo. O material de partida chave é polietileno glicol, que é secado preferivelmente antes de usar. Isto é feito de forma conveniente ao agitar o PEG derretido sob o vácuo em uma temperatura elevada, até que as bolhas parem de se formar. Isto pode levar de 8 a 12 horas, dependendo da qualidade do PEG. Uma vez seco, o PEG pode ser armazenado sob argônio indefinidamente. As classes industriais e de pesquisa disponíveis no comércio de PEG podem ser empregadas para fazer os polímeros da invenção, por exemplo, o "PEG 1500" polidisperso do comércio que tem uma distribuição de peso molecular de 1430-1570. Tal material pode incorporar éter diglicidil de bisfenol A, que introduz grupos hidroxila secundários no centro da cadeia de PEG. A fim de assegurar que os polímeros da invenção tenham as propriedades mais reprodutíveis e consistentes, o PEG é preferivelmente livre de bisfenol A e de baixa capacidade de dispersão. Os polímeros de PEG que tem >95% monodispersos, tal como comercialmente disponíveis de Nektar Therapeutics (antigamente Shearwater Polymers), Huntsville, AL, e Polypure AS, Oslo, Noruega são mais preferidos. Um exemplo de um PEG particularmente preferido é "PEG-28" de Polypure, que é >95%  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{28}\text{H}$ , peso molecular 1252.

Todas as reações são realizadas sob uma atmosfera inerte tal como nitrogênio ou argônio, com agitação magnética ou preferivelmente mecânica.

Na etapa A, o PEG seco é derretido e é adicionado anidrido maléico (2 moles por

mole de PEG) com agitação. A quantidade de anidrido maléico deve coincidir com o número de grupos hidroxila terminais do PEG o mais próximo possível. Uma redução de anidrido maléico resultará em cadeias de polímero terminadas em hidroxila, ao passo que um excesso de anidrido maléico consumirá grupos tiol na etapa seguinte, conduzindo à terminação da cadeia prematura e grupos carboxila terminais. A temperatura de reação não é crítica, e o processo pode convenientemente ser realizado em temperaturas entre 45°C e 100°C. A temperatura preferida da reação está entre 65°C e 90°C. Se forem empregadas temperaturas elevadas, o anidrido maléico tende a sublimar e medidas devem ser tomadas para verificar se o anidrido maléico permanece em solução. Ao minimizar o espaço aéreo e submergir o vaso de reação em um banho de óleo são métodos eficazes.

Dependendo da temperatura selecionada, a reação pode ser concluída em 2 horas ou menos ou pode ser conduzida durante a noite. A reação pode ser monitorada por TLC em placas de sílica gel e continuada após o desaparecimento do anidrido maléico. O contraste visual, UV e mancha de iodo podem ser usados para examinar as placas TLC.

Na etapa B, o éster bis-maleato de PEG bruto produzido na etapa A é combinado com o ditioneitol (DTT) e N-N'-N'-N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) (com água adicionada, caso necessário para fluidez), e a mistura agitada a 70°C. A reação está completa dentro de 30 minutos, como indicado pelo aumento rápido na viscosidade. O peso molecular do produto será reduzido se mais ou menos do que a quantidade ótima de DTT for empregada. O peso molecular do produto pode igualmente ser reduzido, se desejado, substituindo TEMED por uma base de amina terciária menos eficaz tal como TEA.

Na etapa C, água suficiente é adicionada à mistura de reação para reduzir a viscosidade, e 0,1 mol de N-hidroxissuccinimida (NHS) e 1,05 mol de hexadecilamina por mol de grupos de ácido carboxílico no polímero são adicionados. (Esta quantidade de NHS parece minimizar de maneira ótima a extensão de reações laterais.) Um excesso de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1-4mol de EDC por mol de grupos de ácido carboxílico) é adicionado em porções com água adicional adicionada como necessário para manter a agitação. O pH da mistura de reação é mantido acima de 7, e preferivelmente entre 9 e 11, para aperfeiçoar a reatividade da alquilamina. Com dodecilamina, esta reação pode ser conduzida a aproximadamente 40 a 45°C, ao passo que com octadecilamina a temperatura é de cerca de 55°C a 57°C. A reação é seguida por TLC até que um nível constante de alquilamina restante seja observado, tipicamente após o funcionamento durante a noite.

A mistura de reação é acidificada a um pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,5 e agitada à temperatura ambiente por até aproximadamente 24 horas para destruir EDC não reagido, então, titulada a um pH de 7,0 usando 1N NaOH/ou TEMED. A mistura de reação final é centrifugada a aproximadamente 800 xg por 1 a 3 horas, para remover

contaminantes sólidos e subprodutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante pode ser cromatografado em uma coluna GPC (Toyopearl™, Sephadex™, Sephacryl™, Biogel™, etc.). Os polímeros  $\pi$  são materiais anfipáticos, no entanto, e exibem afinidade para a maioria de empacotamentos de coluna GPC, assim, complicam a remoção de contaminantes. Alternativamente, o polímero pode ser cromatografado em uma coluna de interação hidrofóbica de poros grandes (por exemplo, TOYOPEARL™ Phenyl 650C, Toshih Biosciences, Montgomeryville, PA, EUA), eluindo com um gradiente de metanol em água. Preferivelmente, a mistura de reação é dialisada para diversas mudanças de água acidificada e neutra para remover materiais de partida de baixo peso molecular e subprodutos de reação.

A mistura de reação pode igualmente ser extraída com butanona, isopropanol, butanol ou outros solventes orgânicos polares para remover impurezas orgânicas, mas quantidades substanciais de polímero anfifílico são perdidas para o solvente de extração. Preferencialmente, a mistura de reação é submetida a ultrafiltração usando membranas apropriadas para fracionar o produto em graus de peso molecular, tais como 5kDa a 10kDa; 10kDa a 30kDa, 30kDa a 50kDa, etc. dependendo da interrupção da membrana de filtração empregada. Uma solução aquosa do polímero pode ser submetida à filtração sem saída para produzir uma solução estéril ou isenta de vírus, dependendo da escolha da membrana ou do meio de filtração.

## 2. Síntese de $\pi$ polímeros

Exemplo 1: Polímero de peso molecular médio PEG-Di(alquilamidosuccinil)ditioéter (C16- $\pi$ -Polímero A)

O polietileno glicol (PEG-1500, Sigma Chemical Co.) foi seco a vácuo a 80°C até que as bolhas parem de se formar. (8-12 horas, dependendo da qualidade do PEG.) O PEG seco pode ser armazenado dessecado sob argônio indefinidamente.

O PEG seco foi derretido sob argônio em um banho de óleo e anidrido maléico (2 moles por mole de PEG, corrigido para purezas) foi adicionado gradualmente com agitação. A mistura foi agitada sob argônio a 90°C. Como o anidrido maléico tende a sublimar, o espaço aéreo foi minimizado e o vaso de reação inteiro foi mantido na temperatura de reação. Qualquer anidrido maléico condensado nas paredes do vaso foi raspado para dentro da mistura de reação. O progresso da reação foi monitorado por TLC em placas de sílica gel usando etanol e hexano como solventes separadamente, com visualização de UV e mancha de iodo. A reação permaneceu por uma hora após o desaparecimento do anidrido maléico.

O dimaleato de PEG bruto foi diluído com dois volumes de água. Uma solução de ditiotretitol (DTT, 1,01 equivalentes por equivalente de PEG) e N-N'-N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED, 1,02 equivalentes) em água (2 volumes de água por volume de TEMED) foi, então, adicionada à mistura de reação com agitação. A reação foi agi-

tada a 70°C sob argônio por 2,5 horas, deixada à temperatura ambiente durante a noite e, então, agitada novamente a 70°C por 2 horas. A reação foi monitorada por TLC e foi considerada completa mediante o completo desaparecimento do DTT.

Foi adicionado água à mistura de reação acima para reduzir a viscosidade, até que a mistura pudesse ser agitada (a cerca de 25% de sólidos), a mistura foi agitada a 65°C sob argônio e foi adicionada N-hidroxissuccinimida (0,1 mol por mol de grupos de ácido carboxílico no polímero PEG-dimaleato-DTT), seguido por hexadecilamina (1,05 mol por mol de grupos de ácido carboxílico no polímero) e por N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 0,56 mol por mol de grupos de ácido carboxílico no polímero). A mistura foi agitada sob argônio por 1 hora e uma segunda porção de EDC (0,56 mol por mol de grupos de ácido carboxílico no polímero) foi adicionada. Após outra hora, uma terceira parcela de EDC (0,28 mol por mol de grupos de ácido carboxílico no polímero, para um total de 1,4 mol de EDC por mol de ácido carboxílico) foi ainda adicionada para compensar a perda de EDC para hidrólise. Foi adicionada água, conforme necessário, para manter a fluidez, porque os sólidos adicionados fizeram a suspensão difícil de agitar, e o pH foi mantido entre 3,5 e 7,5 (preferencialmente, entre 4,5 e 6,5) pela adição de 1N NaOH ou 1N HCL como necessário. A mistura foi agitada a 65°C sob argônio durante a noite, monitorada por TLC (sílica gel, desenvolvimento com etanol) até a alquilamina parecer ter alcançado uma concentração constante e foi agitada, então, por mais 4h. A mistura de reação, então, foi acidificada com 1N HCl até um pH de aproximadamente 4,0-4,5, agitada por 24h para destruir EDC não reagido e ajustada para pH 7,0 por adição gota a gota de 1N NaOH .

A mistura foi transferida para garrafas de centrifuga e mexida em uma centrifuga de topo de bancada a aproximadamente 800xg por 2 horas para separar sólidos residuais. Após a centrifugação, a mistura de reação foi extraída com isopropanol para remover impurezas orgânicas. A ultrafiltração é preferida como uma alternativa à extração com isopropanol.

Através deste método, os seguintes compostos amina são conjugados ao polímero:

Exemplo 1a: undecilamina.

Exemplo 1b: octadecilamina.

Exemplo 1c: 4-nonilbenzilamina.

Exemplo 1d: 3-[(4-fenoxi)fenil]propilamina.

Exemplo 1e: PEG-Di(alquilamidossuccinil)ditioeter (C16- $\pi$ -Polímero A, via rota alternativa do Esquema 9)

PEG (1,5 kD, desgaseificado e seco, como descrito acima) reagiu com anidrido maleico em excesso (equivalente a mais de 2,2 mol de etileno por mole de PEG), em condições de fundição, como descrito por exemplo 1, e os produtos de reação dissolvidos em água e dialisados contra água usando uma membrana de corte de 1kD. O retentado foi evaporado até quase a secura para fornecer PEG dimaleato adequado para amidação.

O PEG dimaleato dissolvido em um volume mínimo de água (cerca de 1 parte de água por 2 partes PEG dimaleato) foi aquecido sob argônio a 70-80°C em um frasco de reação. O pH foi ajustado para 5,0-5,5 com TEMED. Para esta solução foi adicionado 2 hexadecilamina equivalentes por mole de unidades de repetição PEG Dimaleato a 70-80°C. Uma  
5 solução de N-hidroxisuccinimida (2 equivalentes por mole de PEG dimaleato) em um volume mínimo de água foi, então, acrescentado, seguido de uma solução aquosa de EDC-HCl (3 equivalentes por mole de PEG dimaleato) em um fluxo lento. A mistura foi agitada a 70-80°C até TLC (sílica gel, para o desenvolvimento EtOH) mostrou conclusão da reação (local da hexadecilamina imutáveis ou ausentes). A mistura de reação foi resfriada e a carbodiimida  
10 em excesso foi destruída por adição de ácido acético até pH mantido estável entre 2,5 e 3,0. O produto foi purificado por diálise, primeiro contra o etanol aquoso e em seguida contra a água, ou, alternativamente, por precipitação com isopropanol.

O PEG diamida assim formado foi dissolvido em água, o pH da mistura de reação foi ajustado para entre 6,5 e 9 com TEMED, e a temperatura elevada a 60 – 70°C. Uma so-  
15 lução de DTT (equivalente a 1,2 molar por mole de PEG diamida) foi adicionado, e a mistura de reação agitada durante a noite. O excesso de tiol foi resfriado bruscamente com um equivalente estequiométrico de cloroacetamida e TEMED, para fornecer um teste negativo de Ellman. O produto foi então purificado por diálise contra água, e o retentado foi concentrado por evaporação.

#### 20 2: Polímero de Peso Molecular Alto PEG-Di(alquilamidosuccinil)ditioéter

O procedimento esboçado no Exemplo 1 foi seguido, salvo que 0,55 mol de DTT e 0,55 mol de TEMED por mol de anidrido maléico foram usados. A agitação vigorosa foi necessária porque a viscosidade se acumulou rapidamente. Pareceu que a maioria da reação estava completa dentro de 5-10 minutos, seguido pela conclusão lenta durante as próximas  
25 4 horas à medida que a temperatura foi elevada de 55°C a 80°C.

#### Exemplo 3: Polímero PEG-Di(alquilamidosuccinil)ditioéter

O procedimento esboçado no Exemplo 1 foi seguido, exceto quando 1,5 moles de dodecilamina por mol de grupos de ácido carboxílico no polímero foram empregados. Foram adicionados N-hidroxisuccinimida (NHS, 1,0 mol por mol de grupos de ácido carboxílico) e  
30 1,1'-Carbonildiimidazola (CDI 3,0 moles por mol de grupos de ácido carboxílico) e a reação foi agitada a 80°C por 4 horas e trabalhada como acima.

Através deste método, os seguintes compostos amino são conjugados ao polímero:

Exemplo 3a: undecilamina.

Exemplo 3b: tetradecilamina.

35 Exemplo 3c: octadecilamina.

Exemplo 3d: dehidroabietilamina.

Exemplo 3e: colesterol 2-aminoetil éter.

Exemplo 3f: 10-fenoxidecilamina.

Exemplo 3g: hidrazida de ácido sebáico.

Exemplo 3h: hidrazida de ácido oléico.

Exemplo 3i: hidrazida de ácido dehidroabiético.

5 Exemplo 3j: hidrazida de ácido cólico.

Exemplo 3k: hidrazida de ácido palmítico.

Exemplo 4: Polímero PEG-co-(alquilamidossuccinato)

Uma solução de PEG (6,66 mmoles) e trietilamina (2,32 ml, 16,65 mmoles) em éter dietil seco (10 ml) é esfriada até 0 °C sob argônio e tratada gota a gota com cloreto de metanosulfonil (1,03 ml, 13,32 mmoles). A agitação permaneceu por 1 h a 0°C e, então, a temperatura ambiente por 2 h. O éter é evaporado e a acetona seca (15 ml) é adicionada ao resíduo a fim de precipitar o cloridrato de trietilamina, que é filtrado a partir da solução. O filtrado é tratado com brometo de lítio (2,31 g, 26,64 mmoles) e aquecido até o refluxo por 20 h. Então, a mistura é diluída com hexano e filtrada através de uma coluna curta de sílica (3 cm) coberta com Celite™ (0,5 cm) e eluída com hexano. O filtrado é seco, filtrado e evaporado para deixar um óleo  $\alpha,\omega$ -dibromo-PEG.

O  $\alpha,\omega$ -dibromo-PEG reagiu com o um equivalente de 2-2-dibutil-4-5-bis(metoxicarbonil)-1-3-2-dioxastanolano pelo método de Godjoian et al., Tetrahedron Letters, 37:433-6 (1996). O poliéter dimetiltartrato-PEG resultante é saponificado com KOH em metanol e, então, aminado com dodecilamina ou hexadecilamina como nos exemplos 1 e 3 acima, ou com as aminas nos exemplos 3a-3k.

Exemplo 5: Copolimerização de PEG com dianidrido de EDTA

PEG seco reagiu com dianidrido de ácido etilenodiaminatetracético pelo método descrito no Exemplo 1 e é, então, aminado com dodecilamina como no Exemplo 1 ou no hexadecilamina como no exemplo 3, ou com as aminas nos exemplos 3a-3k.

Da mesma maneira, os seguintes dianidridos são co-polimerizados com PEG e subsequentemente aminados:

Exemplo 5a: Naftalenotetracarboxílicodianidrido.

Exemplo 5b: Perilenotetracarboxílicodianidrido.

30 Exemplo 5c: Benzofenonatetracarboxílicodianidrido.

Exemplo 5d: 4-4'-(Hexafluoroisopropilideno)diftálico anidrido.

Exemplo 5e: Butano ácido tetracarboxílico dianidrido.

Exemplo 5f: Biciclo(2-2-2)oct-7-eno-2-3-5-6-tetracarboxílico dianidrido.

Exemplo 5g: Dietilenotetramina ácido pentacético dianidrido.

35 Exemplo 5h: 3-4-3'-4'-difenilsulfona ácido tetracarboxílico dianidrido.

Exemplo 5i: 3-4-3'-4'-difenil éter ácido tetracarboxílico dianidrido.

Exemplo 5j: Dianidrido piromelítico.

Exemplo 6A: Copolímero PEG-diamina com tioéteres pendentos.

Dimaleato de PEG, preparado como no Exemplo 1, reagiu com dodecanotiol (dois equivalentes por equivalente de dimaleato de PEG) usando o mesmo procedimento que o usado para DTT no Exemplo 1. Nenhuma diluição é necessária, porque nenhuma polimerização ocorre, e a reação é conduzida em PEG-dimaleato derretido. O catalisador TEMED é adicionado e o tiol é adicionado, então. A reação é seguida pelo desaparecimento de materiais de partida, usando TLC. As temperaturas até o ponto onde a perda de alquiltiol por vaporização se torna significativa podem ser empregadas (até cerca de 100°C). Um excesso ligeiro de alquiltiol pode ser empregado para saturar inteiramente os grupos maléicos. O alquiltiol em excesso é expelido no fim da reação por aspersão com nitrogênio ou argônio e/ou aquecimento sob vácuo, até que nenhum seja detectado pelo odor ou por TLC.

Por este método, os seguintes tióis podem ser conjugados a PEG dimaleato :

Exemplo 6Aa: mercaptosuccínico ácido di-t-butil éster.

Exemplo 6Ab: tetradecanotiol.

15 Exemplo 6Ac: hexadecanotiol.

Exemplo 6Ad: 2-mercaptoetanosulfônico ácido.

Exemplo 6Ae: 3-mercaptopropanosulfônico ácido.

Exemplo 6Af: 6-mercaptohexanóico ácido t-butil éster.

Exemplo 6Ag: 4-mercaptobenzóico ácido t-butil éster.

20 Exemplo 6Ah: mercaptoacético ácido t-butil éster.

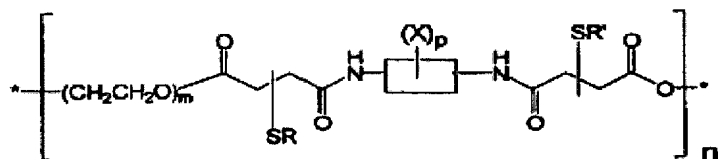
Exemplo 6Ai: 4-(t-butoxicarbonilamino)butanotiol.

Exemplo 6Aj: 3-(t-butoxicarbonilamino)benzil mercaptano.

Exemplo 6Ak: 4-decilbenzil mercaptano.

25 Os tióis que têm grupos funcionais reativos são apropriados para anexação a cadeias C e/ou os grupos funcionais reativos podem servir como pontos de anexação (X) para porções alvo.

Exemplo 6B: Copolímero PEG-diamina com tioéteres pendentos.



30 O aduto de tiol obtido no Exemplo 6A é aminado com 1-4-diaminobutano (um equivalente de diamina por dois grupos COOH), usando o mesmo procedimento usado para dodecilamina no Exemplo 1, com diluição com água como necessário para manter a fluidez da mistura de reação. As alíquotas adicionais de EDC são adicionadas, conforme necessário, para assegurar a polimerização completa. Por este método, os adutos de tiol dos Exemplos 6A e 6Aa até 6Ak são convertidos em uma poliamida PEG-diaminobutano.

Por este método, as seguintes diaminas podem ser convertidas para uma poliamida de PEG (BOC = t-butoxicarbonil):

Exemplo 6Ba: 2 (O-BOC)-1-3-diamino-2-propanol.

Exemplo 6Bb: N'-N''-di(BOC)hexaetileno tetramina.

5 Exemplo 6Bc: N'-N''-di(BOC)spermina.

Exemplo 6Bd: N'-BOC spermidina.

Exemplo 6Be: N'-N''-N'''-tri(BOC)pentaetileno hexamina.

Exemplo 6Bf: agmatina.

Exemplo 6Bg: lisina t-butil éster.

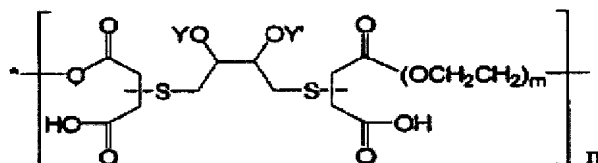
10 Exemplo 6Bh: 1-6-diaminohexano.

Exemplo 6Bi: 1-4-fenilenodiamina.

Exemplo 6Bj: 1-3-fenilenodiamina.

Exemplo 6Bk: 1-4-diaminobutano-2-3-diol acetonida.

Exemplo 7: PEG-Di(alquilsuccinato)ditióéter



15 O éter 2-3-bis-O-hexadecil de DTT (meso-2-3-bis (hexadeciloxi)butano-1-4-ditiol) é preparado por uma modificação do procedimento de S. Sasaki et al., Chem.Pharm.Bull. 33 (10): 4247-4266 (1985). Este é adicionado ao PEG dimaleato pelo método do Exemplo 1.

Por este método, os seguintes ditióis de éter são acoplados ao polímero de PEG:

Exemplo 7a: meso-2-3-bis(n-butoxi)butano-1-4-ditiol.

20 Exemplo 7b: meso-2-3-bis(4-nonilfenilmetoxi)butano-1-4-ditiol.

Exemplo 7c: meso-2-3-bis(fenil-4-metoxi)butano-1-4-ditiol.

Exemplo 7d: 4-6-bis(deciloxi)benzeno-1-3-dimetanotiol.

Exemplo 7e: 4-5-bis(deciloxi)benzeno-1-2-dimetanotiol.

Exemplo 7f: 3-4-bis(deciloxi)tiofeno-2-5-dimetanotiol.

25 Exemplo 8A: Succinatos de PEG substituídos

O método do Exemplo 1 é seguido, salvo que o 2-dodeceno-1-il succínico anidrido é usado no lugar do anidrido maléico. O substituinte dodecenil fornece as cadeias C penderentes C no polímero final.

30 Por este método os seguintes anidridos succínicos substituídos são esterificados com PEG:

Exemplo 8Aa: anidrido isobutenilsuccínico.

Exemplo 8Ab: anidrido 2-octeno-1-il.

Exemplo 8Ac: anidrido octadecenil succínico.

Exemplo 8Ad: 3-oxabicyclo-hexano-2,4-diona.

Exemplo 8Ae: anidrido ciclohexanodicarboxílico.

Exemplo 8Af: anidrido ftálico.

Exemplo 8Ag: anidrido 4-decil ftálico.

5 Exemplo 8Ah: anidrido hexahidrometilftálico.

Exemplo 8Ai: anidrido tetrahidroftálico.

Exemplo 8Aj: anidrido norbornenodicarboxílico.

Exemplo 8Ak: cantaridina.

Exemplo 8A1: anidrido biciclooctenodicarboxílico.

10 Exemplo 8Am: anidrido exo-3,6-epóxi-1,2,3,6-tetrahidroftálico.

Exemplo 8An: anidrido S-acetil mercaptosuccínico.

Exemplo 8B: PEG-Di(alquilamidossuccinil)ditióéter com grupos alquila pendentes.

Pelo método do Exemplo 1, os succinatos de PEG substituídos obtidos como descrito nos Exemplos 8A e 8Aa até 8An são reagidos com o DTT.

15 Por este método, os seguintes ditióis são reagidos com qualquer um dos succinatos de PEG substituídos obtidos como descrito nos Exemplos 8A e 8Aa até 8An:

Exemplo 8Ba: etano-1-2-ditiol.

Exemplo 8Bb: propano-1-3-ditiol.

Exemplo 8Bc: butano-1-4-ditiol.

20 Exemplo 8Bd: pentano-1-5-ditiol.

Exemplo 8Be: hexano-1-6-ditiol.

Exemplo 8Bf: 1-4-benzenoditiol.

Exemplo 8Bg: 1-3-benzenoditiol.

Exemplo 8Bh: 1-4-benzenodimetanotiol.

25 Exemplo 8Bi: 1-3-benzenodimetanotiol.

Exemplo 8Bj: 1-2-benzenodimetanotiol.

Exemplo 8C: Copolímero PEG-diamina com grupos alquila pendentes

Pelo método do exemplo 6B, o succinato de PEG substituído obtido como descrito no Exemplo 8A é copolimerizado com 1-4-diaminobutano.

30 Por este método, as seguintes diaminas são copolimerizadas com qualquer um dos succinatos de PEG substituídos dos Exemplos 8A e 8Aa até 8An:

Exemplo 8Ca: 2O-BOC 1-3-diamino-2-propanol.

Exemplo 8Cb: N'-N''-di(BOC)hexaetileno tetramina.

Exemplo 8Cc: N'-N''-di(BOC) espermina.

35 Exemplo 8Cd: N'-BOC espermidina.

Exemplo 8Ce: N'-N''-N'''-tri(BOC)pentaetileno hexamina.

Exemplo 8Cf: agmatina.

Exemplo 8Cg: lisina t-butil éster.

Exemplo 8Ch: 1-6-diaminohexano.

Exemplo 8Ci: 1-4-fenilenodiamina.

Exemplo 8Cj: 1-3-fenilenodiamina.

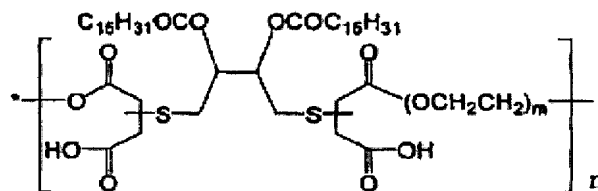
5 Exemplo 8Ck: 1-4-diaminobutano-2-3-diol acetona.

Exemplo 9: Transesterificação de PEG usando ácidos substituídos

Ditosilato de PEG: A 1 mol de PEG (dissolvido em DMF ou derretido como ele é) foram adicionados 2,1 moles de cloreto de tosila (excesso molar de 5%) em agitação sob argônio. A esta mistura de reação foram adicionados 2,2 moles de tetrametil etileno diamina (TEMED). A reação foi incubada, então, a 45°C por 2h. Os produtos foram dissolvidos usando TLC em etilacetato, tolueno ou etanol como solventes TLC. O ditosilato de PEG pode ser extraído da mistura de reação com tolueno. Em vez do cloreto de toluenosulfonil, outros agentes de sulfonação tais como cloreto de mesila (veja o exemplo 4), anidrido triflico ou cloreto de tresila podem igualmente ser usados (veja o pedido de patente 10/397332 dos E.U., publicação 20040006051).

Poliesterificação de ditosilato de PEG: A 1 mol de ditosilato de PEG derretido, com agitação sob o argônio, é adicionado 1 mol de S-S'-didecil-meso-2-3-dimercaptosuccinico ácido e 2 moles de TEMED. DMF é adicionado como necessário para manter a fluidez. A mistura de reação é aquecida a 80°C e agitada por 24 h ou até o término por TLC.

20 Exemplo 10: Polímero de Peso Molecular Médio PEG-Di(succinil)-di-(O-Acilado)tioéter (C16- $\pi$ Polímero B).



O dimaleato de PEG (10,24 g, 6,1 mmoles) preparado como no Exemplo 1 foi colocado em um frasco seco de 125 ml e aquecido a 70°C sob argônio para derreter o PEG dimaleato. A este material derretido, com agitação, foram adicionadas água (10 mL) e uma solução de DTT (0,961 g, 6,168 mmoles) e TEMED (0,723 g, 6,166 mmoles) em água (3 mL). A solução foi agitada a 70°C por aproximadamente 4 horas. A remoção de água in vácuo deu o polímero sólido em cerca de 90% de rendimento.

O polímero seco (5 g, 2,7 mmoles) foi aquecido a 70-90°C sob argônio para derretê-lo e TEMED (0,635 g, 5,5 mmoles) foi adicionado. Cloreto de palmitoil (1,689 g, 5,5 mmoles) foi adicionado com agitação e a mistura foi agitada sob argônio durante a noite. (A relação de polímero para cloreto de acila pode ser variada para obter graus de substituição de 0-100% de estequiometria.) Água foi adicionada à mistura de reação para isolar o "C16- $\pi$ -Polímero B".

Por este método os seguintes ácidos são esterificados com os grupos hidroxila do copolímero di(succinil)PEG-DTT:

Exemplo 10a: Ácido Oléico.

Exemplo 10b: Colesteril succinato.

5 Exemplo 10c: Ácido bifeníl-4-carboxílico.

Exemplo 10d: Ácido 4-Octilfenilacético.

Exemplo 10e: Ácido Hexadec-6-inoico.

10 Como uma alternativa ao uso de haletos ácidos, os grupos hidroxila derivados de DTT de  $\pi$ -polímeros podem igualmente ser ativados com 1-3-bis(2-2-dimetil-1-3-dioxolan-4-ilmetil) carbodiimida (BDDC) e acoplados diretamente com ácidos carboxílicos; veja Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Reagents for Glycoside, Nucleotide, and Peptide synthesis, Ed. David Crich, Wiley, 2005 p 107-108 e referências nos mesmos).

Exemplo 11: Ésteres substituídos por carboxila de C16- $\pi$ -polímero A

15 Os polímeros substituídos por ácido carboxílico são utilizados para ligar ligandos com grupos reativos de aminoácidos, utilizando metodologias de formação de ligação de peptídeo padrão (por exemplo, através de reagentes carbodiimida) para ligar os grupos amino à funcionalidade de ácido carboxílico do polímero. Estes materiais são facilmente obtidos por esterificação de  $\pi$ - polímero de grupos hidroxila com anidridos cíclicos. Por exemplo, C16- $\pi$ -polímero A dimaleato foi preparado pela reação de anidrido maléico com grupos hidroxila C16- $\pi$ -polímero A como se segue:

20 C16- $\pi$ -Polímero A (2g) e anidrido maléico (0,85 g) foram moídos em um pilão seco e transferidos a um frasco de fundo redondo de 50 mL. O frasco foi aquecido a 90°C, sob argônio, por 2-3 horas com agitação. A mistura de reação sólida foi, então, transferida com ajuda de água a um saco de diálise (interrupção a 3,5 kDa) e dialisada contra água para remover o ácido maleico em excesso e subprodutos de baixo peso molecular. O retentado então foi removido do saco de diálise e seco a 60°C ao peso constante para fornecer dimaleato de C16- $\pi$ -Polímero A (1,79g). A razão do Polímero A ao anidrido maleico pode variar para obter as substituições que variam de 0-100% da esterificação estequiométrica total.

Exemplo 11a: Diglicolato C16- $\pi$  Polímero A

30 C16- $\pi$ -Polymer A (2 g) e anidrido diglicólico (1,0 g) reagiram ao método do Exemplo 11 acima, para fornecer C16- $\pi$ -Polymer diglicolato A. Tal como acontece com anidrido maleico, a proporção de um polímero de anidrido pode variar para obter substituições que variam de 0-100% de esterificação estequiométrica completa.

Exemplo 11b: C16- $\pi$  Polímero A bis(aconitato)

35 C16- $\pi$ -Polymer A (2 g) e anidrido aconítico (1,35 g) reagiram ao método do Exemplo 11 acima, para dar C16- $\pi$ -polímero A bis(aconitato).

De maneira similar, os seguintes anidridos são acoplados ao C16- $\pi$ -Polymer A. Ao

usar anidridos de baixa solubilidade, o pH pode ser ajustado para entre 4,5 e 6,5 antes da diálise como um auxílio para purificação. A diálise segundo contra 0,1 N HCl fornece a forma ácida do polímero, se desejado.

Exemplo 11c: Anidrido succínico

5 Exemplo 11d: Anidrido glutárico

Exemplo 11e: anidrido ftálico

A ligação dupla introduzida através de esterificação com maleico ou anidrido cis-acotínico também pode ser usado para adicionar tiol contendo ligandos ao polímero, conforme descrito no Exemplo 12 abaixo.

10 Exemplo 12: Aduto de Cisteína de Dimaleato de C16- $\pi$  Polímero A:

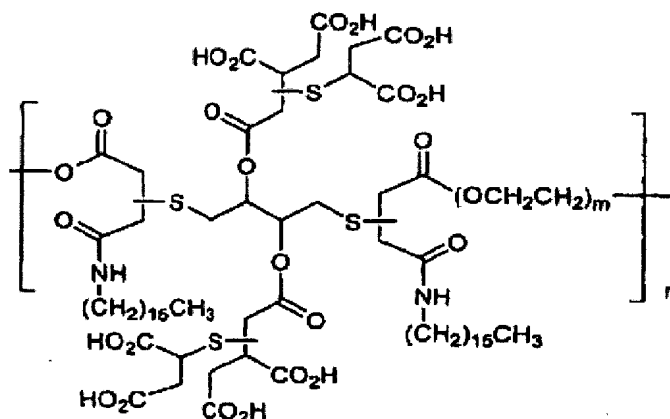
O Dimaleato de C16- $\pi$ -Polímero A em pó (Exemplo 11) (253mg) foi adicionado a água (5 mL) e a mistura foi agitada vigorosamente. A cisteína (24mg) e TEMED (30,5 $\mu$ l) foram adicionados à mistura de reação, e a mistura foi agitada a temperatura ambiente sob uma atmosfera de argônio. O progresso da reação foi monitorado por TLC (placas de sílica gel, n-butanol-ácido acético-água, 3:1:1) com detecção com ninidrina. A mistura de reação  
15 mostrou uma mancha positiva de ninidrina co-migrando com o polímero. A cisteína também forneceu uma mancha positiva de ninidrina, ao passo que o polímero de partida não forneceu nenhuma cor com ninidrina.

O método descrito acima foi utilizado para introduzir grupos carboxila adicionais para uso como pontos de anexação, ao passo que os tióis que tem diversos substituintes carboxílicos. Por exemplo, foi adicionado ácido mercaptosuccínico aos seguintes diésteres C-16- $\pi$  Polímero A:

Exemplo 12a: C16- $\pi$  Polímero A dimaleato

Exemplo 12b: C16- $\pi$  Polímero A diacrilato

25 Exemplo 12c: C16- $\pi$  Polímero A (bis)aconitato



Exemplo 12c

De forma semelhante, foi adicionado ácido 3-mercaptoglutarico aos seguintes diés-

teres C16- $\pi$  Polímero A:

Exemplo 12d: C16- $\pi$  Polímero A dimaleato

Exemplo 12e: C16- $\pi$  Polímero A diacrilato

Exemplo 12f: C16- $\pi$  Polímero A (bis)aconitato

### 5 3. Anexação de Porções alvo a Polímeros $\pi$

Exemplo 1: Anexação de ácido fólico a C-16- $\pi$ -Polímero A.

O ácido fólico (2 mmol) foi dissolvido em DMSO anidro e reagiu com carbodiimida dicitclohexil (DCC), à temperatura ambiente para formar o anidrido interno. Para esta mistura de reação foi então adicionada quantidade equimolar de cisteamina HCl e TEMED5 e da  
10 mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas sob argônio, com monitorização da reação por TLC. Após a reação ser concluída, a mistura da reação foi filtrada a vácuo para remover a reação em subprodutos. O filtrado foi diluído com metanol para precipitar um produto amarelo-alaranjado. O precipitado foi impregnado com metanol e filtrado para remover a uréia dicitclohexiluréia residual e DMSO. O conjugado de cisteamina-folato  
15 (S. Atkinson, J. Biol. Chem., 276 (30): 27930-27935) forneceu um teste positivo para outros grupos sulfidril com o reagente de Ellman e o TLC não mostrou a presença de cisteamina.

O conjugado de folato-cisteamina reagiu, então, sob argônio com o éster dimaleato de C16- $\pi$ -polímero A (exemplo 11 preparado a partir de PEG com um peso molecular de cerca de 1500). A fim de manter a hidrofiliidade dos agregados do polímero, uma quantidade de de folato cisteamina conjugado suficiente para consumir apenas 50% dos grupos de maleato disponível foi adicionado ao polímero. O pH da mistura de reação foi ajustado para 6,5-  
20 7,5 com TEMED e a mistura foi agitada durante a noite sob uma atmosfera de argônio. A mistura de reação foi então dialisada contra água com uma membrana de corte 3,5 kD para remover quaisquer subprodutos de baixo peso molecular e impurezas. O retentado foi removido e utilizado para o encapsulamento da droga e os ensaios de cultura celular descritos  
25 abaixo.

Exemplo 2: Anexação de Fator de Crescimento Epidérmico a C16- $\pi$ -Polímero A

O Fator de Crescimento Epidérmico (Sigma) foi tiolado com 2 equivalentes de 2-  
30 iminotiolano (Sigma) em PBS-EDTA pH 7,4, e o EGF tiolado foi anexado ao éster dimaleato de C16- $\pi$ -polímero pelo método descrito no Exemplo 1. O polímero conjugado a EGF foi purificada por ultrafiltração e lavado com PBS5 e o retentado foi usado para preparar o polímero alvo encapsulado.

Exemplo 3: Anexação de anticorpo monoclonal anti-EGFR ao C16- $\pi$ -Polímero B

O anticorpo monoclonal murino anti-EGFR (Sigma) como um líquido de ascite foi  
35 purificado por cromatografia sobre a coluna de Proteína A Imobilizada AffinityPak™ (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. O anticorpo purificado foi tiolado e conjugado ao éster dimaleato de C16- $\pi$ -polímero pelo método descrito no exemplo 1, em tampão PBS

no pH 7,4 e purificado por ultrafiltração.

#### 4: Encapsulamento de compostos anticancerígenos

Exemplo 1: Encapsulamento de camptotecina em C16- $\pi$ -Polímero A:

5 A camptotecina (10 mg, Sigma) foi dissolvida em DMSO e misturada com uma solução de C16- $\pi$ -polímero (100 mg, derivados de PEG 1,5 kD) em DMSO. A mistura similar ao gel foi sonicada por cerca de 10-30 minutos, diluído com água e centrifugado para remover quaisquer sólidos. O sobrenadante claro testado positivo pelo TLC para a presença de camptotecina encapsulada.

10 Exemplo 2: Encapsulamento de doxorrubicina em C16- $\pi$ -Polímero A: doxorrubicina HCl (5 mg, Sigma) foi dissolvido em água e tratada com um equivalente de TEMED para converter a forma de cloridrato de amina livre. Foi adicionada a forma de amina livre resultante, uma solução de C16- $\pi$ -polímero A (100 mg, derivado de PEG 1,5 kD) em DMSO, e a mistura processada e testada conforme descrito no Exemplo 1 acima.

15 Exemplo 3: Encapsulamento de camptotecina em C16- $\pi$ -polímero A conjugado com folato: Para o conjugado de ácido fólico com  $\pi$ -polímero A sintetizado acima, dissolvido em DMSO, foi adicionada uma solução de camptotecina em DMSO. Uma proporção de 1:10 pelo peso de camptotecina ao polímero foi utilizado nesta preparação. A mistura resultante foi processada como no exemplo 1 acima e forneceu um ensaio positivo para encapsulamento da camptotecina.

20 Exemplo 4: Encapsulamento de camptotecina em C16- $\pi$ -polímero A conjugado a EGF: O C16- $\pi$ -polímero A conjugado a EGF foi usado para encapsular a camptotecina, da mesma forma como descrito nos exemplos 1 e 3 acima.

25 Exemplo 4: Encapsulamento de camptotecina em C16- $\pi$ -polímero A conjugado a EGF: O C16- $\pi$ -polímero A conjugado a EGF para anticorpo anti-EGFR murino foi usado para encapsular a camptotecina, da mesma forma como descrito nos exemplos 1 e 3 acima.

#### 5. Ensaio de Proliferação de Células

Antes de serem avaliados em ensaios de proliferação de células tumorais, os exemplos acima preparados foram diluídos em concentrações iniciais com as composições a seguir:

30 CPT +  $\pi$ P

Composição: Camptotecina complexada com  $\pi$ -polímero

Unidade de repetição em mW: 2278

Ligando: -----

Ligando em mw: -----

35 Droga encapsulada: camptotecina

Droga em mw: 348

Concentração de polímero: .035 mg/ml

- 15,4  $\mu\text{M}$  em unidades de repetição  
 Concentração de ligando: -----  
 Concentração de droga: 3,48 mg/ml  
 10,0  $\mu\text{M}$
- 5 CPT  
 Composição: Camptotecina (controle)  
 Unidade de repetição em mW: ----  
 Ligando: -----  
 Ligando em mw: -----
- 10 Droga encapsulada: camptotecina  
 Droga em mw: 348  
 Concentração de polímero: -----  
 -----  
 Concentração de ligando: -----
- 15 -----  
 Concentração de droga: 3,48 mg/ml  
 10,0  $\mu\text{M}$   
 DOX +  $\pi\text{P}$   
 Composição: Doxorubicina complexada com  $\pi$ -polímero
- 20 Unidade de repetição em mW: 2278  
 Ligando: -----  
 Ligando em mw: -----  
 Droga encapsulada: doxorubicina  
 Droga em mw: 544
- 25 Concentração de polímero: .054 mg/ml  
 23,7  $\mu\text{M}$  em unidades de repetição  
 Concentração de ligando: -----  
 -----
- 30 Concentração de droga: 5,44 mg/ml  
 10,0  $\mu\text{M}$   
 DOX  
 Composição: Doxorubicina (controle)  
 Unidade de repetição em mW: -----  
 Ligando: -----
- 35 Ligando em mw: -----  
 Droga encapsulada: doxorubicina  
 Droga em mw: 544

- Concentração de polímero: -----  
-----
- Concentração de ligando: -----  
-----
- 5 Concentração de droga: 5,44 mg/ml  
10,0  $\mu$ M  
 $\pi$ P  
Composição:  $\pi$ -polímero (controle)  
Unidade de repetição mW: 2278
- 10 Ligando: -----  
Ligando em mw: -----  
Droga encapsulada: -----  
Droga em mw: -----  
Concentração de polímero: .035 mg/ml  
15 15,4  $\mu$ m em unidades de repetição  
Concentração de ligando: -----  
-----  
Concentração de droga: -----  
-----
- 20 CPT+FA- $\pi$ P  
Composição: camptotecina complexada com  $\pi$ - polímero conjugado com ácido fóli-  
co
- Unidade de repetição mW: 5338  
Ligando: ácido fólico
- 25 Ligando em mw: 441  
Droga encapsulada: camptotecina  
Droga em mw: 348  
Concentração de polímero: .031 mg/ml  
5,81  $\mu$ M em unidades de repetição
- 30 Concentração de ligando: 2,56  $\mu$ g/ml  
5,81  $\mu$ M  
Concentração de droga: 3,48  $\mu$ g/ml  
10,0  $\mu$ M  
FA- $\pi$ P
- 35 Composição:  $\pi$ - polímero conjugado com ácido fólico (controle)  
Unidade de repetição mW: 5338  
Ligando: ácido fólico

- Ligando em mw: 441  
Droga encapsulada: -----  
Droga em mw: -----  
Concentração de polímero: .031 mg/ml  
5        5,81  $\mu$ M em unidades de repetição  
Concentração de ligando: 2,56  $\mu$ g/ml  
      5,81  $\mu$ M  
Concentração de droga: -----  
FA
- 10        Composição: ácido fólico (controle)  
Unidade de repetição mW: -----  
Ligando: ácido fólico  
Ligando em mw: 441  
Droga encapsulada: -----
- 15        Droga em mw: -----  
Concentração de polímero: -----  
      -----  
Concentração de ligando: 4,41  $\mu$ g/ml  
      10,0  $\mu$ M
- 20        Concentração de droga: -----  
CPT + EGF- $\pi$ P  
Composição: camptotecina complexada com  $\pi$ - polímero conjugado com EGF  
Unidade de repetição mW: 5338  
Ligando: EGF
- 25        Ligando em mw: 6052  
Droga encapsulada: camptotecina  
Droga em mw: 348  
Concentração de polímero: .0868 mg/ml  
      16,3  $\mu$ M em unidades de repetição
- 30        Concentração de ligando: 910  $\mu$ g/ml  
      150  $\mu$ M  
Concentração de droga: 9,05  $\mu$ g/ml  
      26,0  $\mu$ M  
EGFR\_Ab- $\pi$ P
- 35        Composição:  $\pi$ - polímero conjugado com anticorpo anti-EGFR (controle)  
Unidade de repetição mW: 5338  
Ligando: anticorpo anti-EGFR

- Ligando em mw: 150.000  
 Droga encapsulada: -----  
 Droga em mw: -----  
 Concentração de polímero: .106 mg/ml  
 5        19,9  $\mu$ M em unidades de repetição  
 Concentração de ligando: 3000  $\mu$ g/ml  
           20,0  $\mu$ M  
 Concentração de droga: -----  
           -----
- 10        CPT + EGFR\_Ab- $\pi$ P  
 Composição: camptotecina complexada com  $\pi$ - polímero conjugado com anticorpo anti-EGFR
- Unidade de repetição mW: 5338  
 Ligando: anticorpo anti-EGFR  
 15        Ligando em mw: 150.000  
 Droga encapsulada: camptotecina  
 Droga em mw: 348  
 Concentração de polímero: .106 mg/ml  
           19,9  $\mu$ M em unidades de repetição  
 20        Concentração de ligando: 3000  $\mu$ g/ml  
           20,0  $\mu$ M  
 Concentração de droga: 11,0  $\mu$ g/ml  
           31,6  $\mu$ M
- EGF  
 25        Composição: peptídeo EGF (controle)  
 Unidade de repetição mW: -----  
 Ligando: EGF  
 Ligando em mw: 6052  
 Droga encapsulada: -----  
 30        Droga em mw: -----  
 Concentração de polímero: -----  
           -----
- Concentração de ligando: 200  $\mu$ g/ml  
           33,0  $\mu$ M  
 35        Concentração de droga: -----

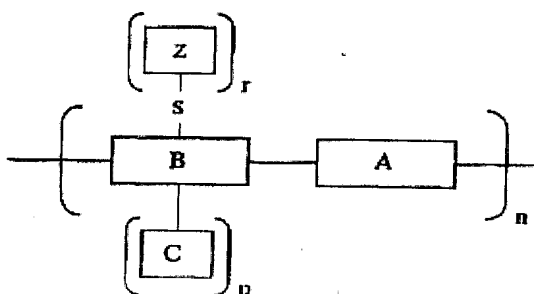
As seguintes linhagens celulares foram empregados com meios de crescimento especificado: A549 (meio F12), MDAMB231 (meio Lebovitz), H441, BT474 e SKBR3 (meio

RPMI). As células tumorais foram colocadas em placas de 96 poços em 3000 células /poço em meio completo, com 10% de soro fetal bovino e incubadas por 24 horas a 37°C. Após vinte e quatro horas de plaqueamento, os compostos do ensaio foram adicionados a diluições em série de 3 vezes, começando com 10 diluições das soluções estocadas acima descritas. As diluições testadas das soluções estocadas foram, portanto, 10:1, 30:1 e 90: 1, e as concentrações relativas foram 1,00, 0,33 e 0,11, respectivamente. Os seis materiais de teste estavam em armazenamento curto; estes foram diluídos diretamente em 30:1 e não testados em 10:1. As células foram incubadas por 72 horas a 37°C em meio de crescimento completo após a adição do composto de ensaio. No 4º dia, usando um kit de ensaio Promega Cell Titer Glo Luminescent®, as células foram lisadas e 100 microlitros de substrato/mistura tampão foram adicionados a cada poço, misturadas e incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram lidas em um luminômetro para medir a quantidade de ATP presente na célula lisada de cada poço, o que corresponde ao número de células viáveis em tal poço.

Os resultados para cada linhagem celular estão presentes nas figuras 1-5. Uma relativa concentração de 1,00 representa uma diluição de 10 vezes das soluções estocadas aqui descritas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender uma droga anticancerígena encapsulada dentro de um polímero do tipo colméia consistindo essencialmente na seguinte estrutura:



5 compreendendo uma espinha dorsal formada de porções B alternadas de ponto de ramificação e blocos de polímero A solúveis em água, hidrofílicos; e tendo cadeias C laterais hidrofóbicas e porções alvo Z anexadas às porções de ponto de ramificação, onde:

10 cada cadeia C lateral hidrofóbica é independentemente selecionada do grupo consistindo em hidrocarbonetos lineares ou ramificados C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos, hidrocarbonetos policíclicos ou cíclicos C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos; e aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos e polímeros;

15 cada porção alvo Z é independentemente um ligando tendo afinidade de ligação específica para a superfície das ditas células cancerígenas;

s é uma ligação ou uma porção espaçadora;  
o valor de n varia de 3 a aproximadamente 100;  
o valor médio de p varia de mais de um a quatro; e  
o valor médio de r varia de 1 a 8.

20 2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que n varia de 2 a cerca de 100.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção alvo é selecionada a partir do grupo consistindo em ligandos específicos de receptores, anticorpos, fragmentos de anticorpos e fatores de crescimento.

25 4. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma porção alvo é selecionada a partir do grupo que consiste de ligandos específicos de receptores, anticorpos, fragmentos de anticorpos e fatores de crescimento.

30 5. Composição, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tal ligante é selecionado a partir do grupo que consiste em fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de fibroblastos, ácido fólico, metotrexato, ácido pteróico, estradiol, estratriol, testosterona, manose-6-fosfato, e

fragmentos de anticorpo e anticorpos dirigidos contra NCA90, NCA95, CEA, CD15, CD20, CD22, CD33, CD52, VEGF ou EGFR.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 4, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que tal ligante é selecionado a partir do grupo que consiste em fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de fibroblastos, ácido fólico, metotrexato, ácido pteróico, estradiol, estratriol, testosterona, manose-6-fosfato, e fragmentos de anticorpo e anticorpos dirigidos contra NCA90, NCA95, CEA, CD15, CD20, CD22, CD33, CD52, VEGF ou EGFR.

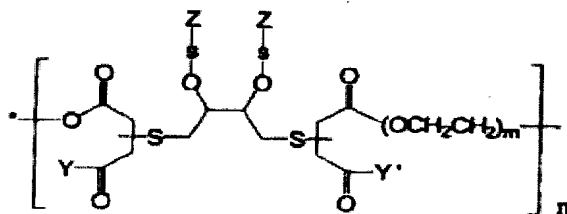
7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a droga é selecionada a partir do grupo que consiste em camptotecina, docetaxel, paclitaxel, topotecan, irinotecan, imatinib, sunitinib, sorafenib, axitinib, pazopanib, etoposida, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracila, 6-mercaptapurina, estaurosporina, citarabina, melfalano, leurosina, actinomicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina D, mitomicina A, carninomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina, cisplatina, carboplatina, vinblastina, vincristina, vindesina, ácido retinóico e tamoxifen.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a droga é selecionada a partir do grupo que consiste em doxorrubicina, camptotecina, docetaxel, paclitaxel, topotecan, irinotecan, imatinib, sunitinib, sorafenib, axitinib, pazopanib, etoposida, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluoruracil, 6-mercaptapurina, estaurosporina, citarabina, melfalano, leurosina, actinomicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina D, mitomicina A, carninomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina, cisplatina, carboplatina, vinblastina, vincristina, vindesina, ácido retinóico e tamoxifen.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o bloco de polímero A é selecionado a partir do grupo que consiste de poli (etileno glicol), poli(propileno glicol) e seus copolímeros.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 9, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o bloco de polímero A tem um comprimento médio dentre 4 e 700 unidades de monômeros.

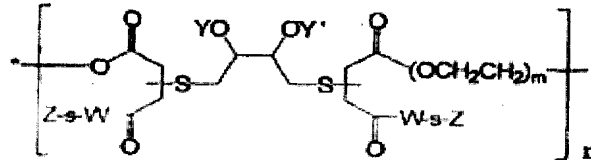
11. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o polímero tem a estrutura



onde  $m$  é 4-700, e  $Y$  e  $Y'$  são selecionados independentemente do grupo que consiste em  $R$ ,  $OR$ ,  $COOR$ ,  $SR$ ,  $NHR$ ,  $NRR'$ ,  $ONHR$ ,  $NHOR$ ,  $NRNH_2$ ,  $NHNHR$ ,  $NRNHR'$  e

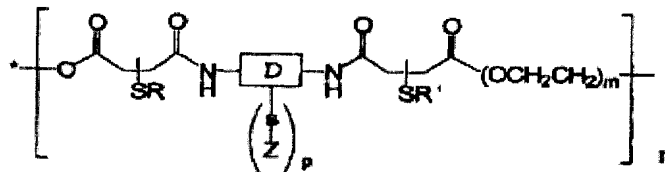
NHNRR', onde R e R' são selecionados independentemente do grupo que consiste nos hidrocarbonetos lineares ou ramificados C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos, hidrocarbonetos policíclicos ou cíclicos C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos; e aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos e polímeros.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polímero tem a estrutura

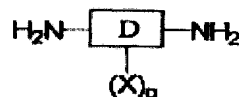


onde m é 4-700, W é O ou NH, e Y e Y' são selecionados independentemente do grupo que consiste em R, COR, COOR, CONHR, CONRR', CONHOR, CONRNH<sub>2</sub>, CONHNHR, CONRNHR', e CONHNRR', onde R e R' são selecionados independentemente do grupo que consiste nos hidrocarbonetos lineares ou ramificados C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos, hidrocarbonetos policíclicos ou cíclicos C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos; e aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos e polímeros.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polímero tem a estrutura

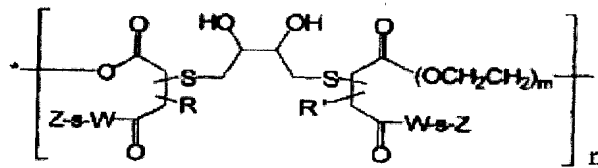


onde a porção D é derivada de uma diamina tendo a estrutura geral



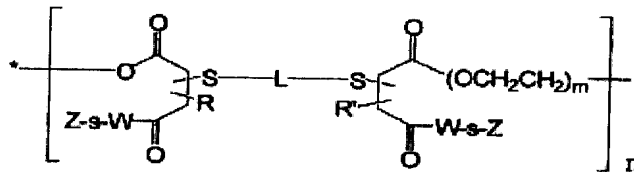
onde cada X é independentemente um grupo funcional reativo, p é 0-4, e m é 4-700; e onde R e R' são selecionados independentemente do grupo que consiste nos hidrocarbonetos lineares ou ramificados C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos, hidrocarbonetos policíclicos ou cíclicos C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos; e aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos e polímeros.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polímero tem a estrutura



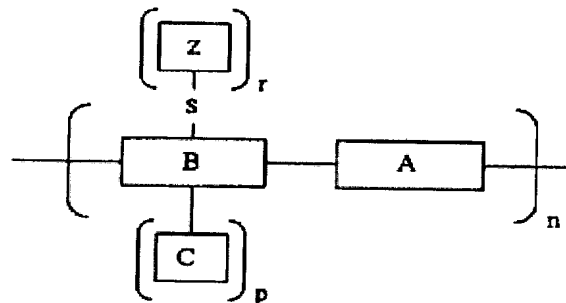
onde  $m$  é 4-700,  $W$  é O ou NH, e  $R$  e  $R'$  são selecionados independentemente do grupo que consiste nos hidrocarbonetos lineares ou ramificados  $C_6-C_{30}$  substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos, hidrocarbonetos policíclicos ou cíclicos  $C_6-C_{30}$  substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos; e aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos e polímeros.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polímero tem a estrutura



onde  $m$  é 4-700,  $L$  é fenileno, alquileno  $C_2-C_6$ , ou benzenodimetileno,  $W$  é O ou NH, e  $R$  e  $R'$  são selecionados independentemente do grupo que consiste nos hidrocarbonetos lineares ou ramificados  $C_6-C_{30}$  substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos, hidrocarbonetos policíclicos ou cíclicos  $C_6-C_{30}$  substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos; e aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos e polímeros.

16. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender um ou mais transportadores ou excipientes farmacologicamente aceitável e uma droga anticancerígena encapsulada em um polímero tipo colméia, tal polímero tipo colméia consiste essencialmente na seguinte estrutura:

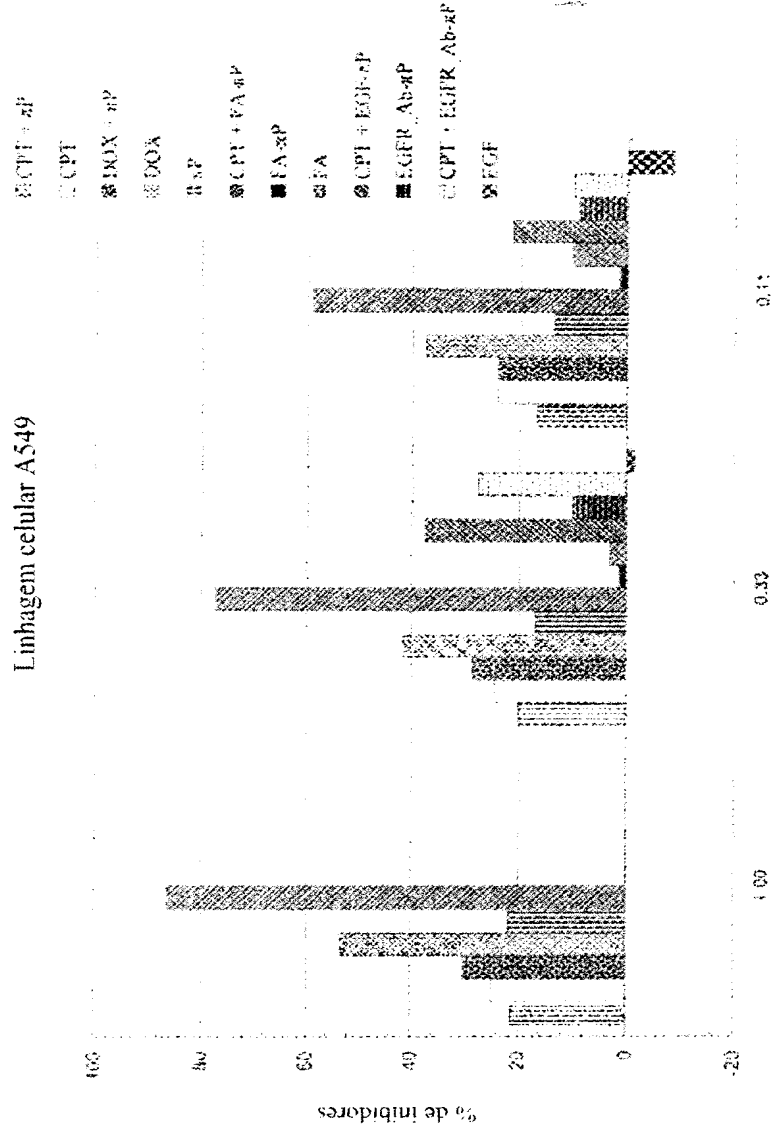


compreendendo uma espinha dorsal formada de porções B alternadas de ponto de ramificação e blocos de polímero A solúveis em água, hidrofílicos; e tendo cadeias C laterais hidrofóbicas e porções alvo Z anexadas às porções de ponto de ramificação, onde:

cada cadeia C lateral hidrofóbica é independentemente selecionada do grupo con-

sistindo em hidrocarbonetos lineares ou ramificados  $C_6-C_{30}$  substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos, hidrocarbonetos policíclicos ou cíclicos  $C_6-C_{30}$  substituídos opcionalmente com um ou mais substituintes hidrofílicos; e aminoácidos hidrofóbicos, peptídeos e polímeros;

- 5            cada porção alvo Z é independentemente um ligando tendo afinidade de ligação específica para a superfície das ditas células cancerígenas;
- s é uma ligação ou uma porção espaçadora;
- o valor de n varia de 1 a aproximadamente 100;
- o valor médio de p varia de mais de um a quatro; e
- 10            o valor médio de r varia de 0 a 8.



Concentrações Relativas

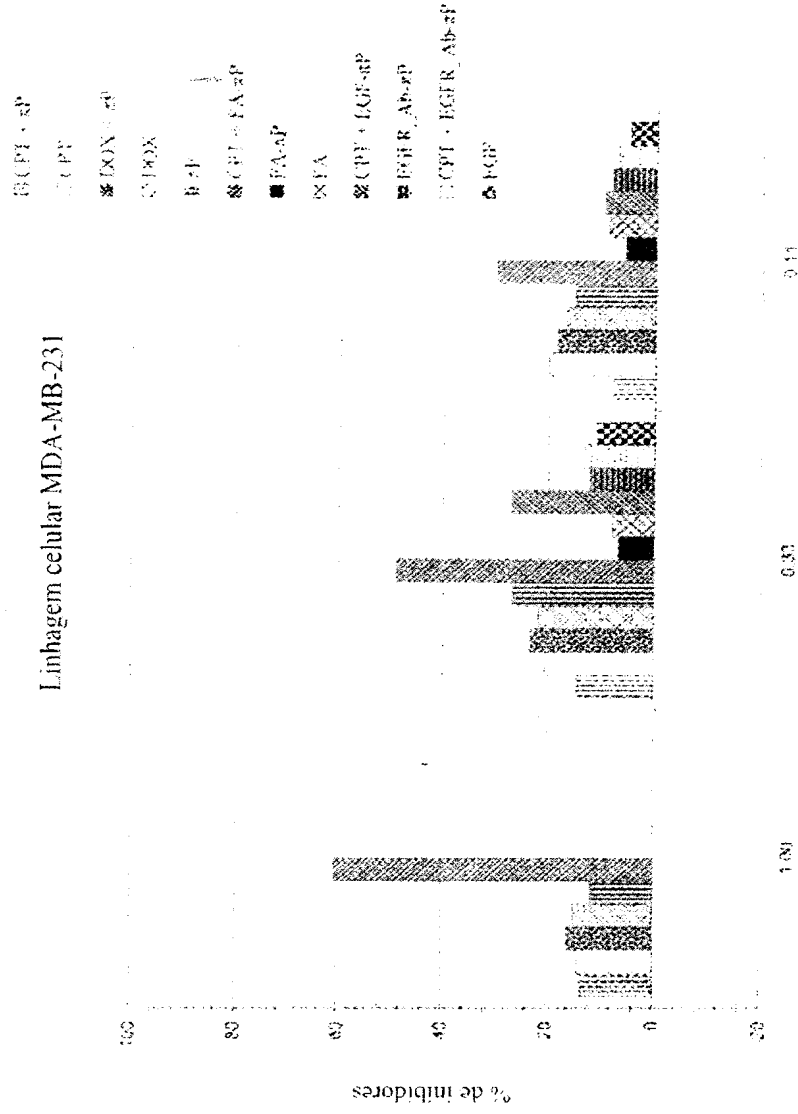
FIGURA 1



Concentrações Relativas

FIGURA 2





Concentrações Relativas

FIGURA 4



## RESUMO

### “POLÍMEROS ANFIFÍLICOS DE AUTOMONTAGEM COMO AGENTES ANTICANCERÍGENOS”

5 A invenção apresenta copolímeros biocompatíveis anfifílicos que possuem uma espinha dorsal hidrofílica e grupos hidrofóbicos pendentos. Os polímeros formam agregados moleculares de nanoescala em meios aquosos, que possuem interiores hidrofóbicos dentro, no qual as drogas anticancerígenas podem ser solubilizadas. Os polímeros apresentam opcionalmente anticorpos anexados, ligandos de receptores e outras porções alvo que mediam a aderência dos agregados que transporta drogas às células cancerígenas alvo.