



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 959**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 31/07** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02792256 .6**  
86 Fecha de presentación : **30.10.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1453545**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **Conjugados poliméricos solubles en agua de ácido retinoico.**

30 Prioridad: **30.10.2001 US 335043 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **Nektar Therapeutics AI, Corporation**  
**490 Discovery Drive**  
**Huntsville, Alabama 35806-2902, US**

72 Inventor/es: **Bentley, Michael, David;**  
**Zhao, Xuan;**  
**Leach, Chester;**  
**Kuo, Mei-Chang y**  
**Charan, Chatan, K.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 284 959 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Conjugados poliméricos solubles en agua de ácido retinoico.

**5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere a productos conjugados poliméricos solubles en agua de retinoides biológicamente activos, y en particular, a composiciones de productos conjugados poliméricos de retinoides solubles en agua que son adecuados para la liberación en el pulmón mediante inhalación. También se proporcionan los métodos para preparar y administrar tales productos conjugados.

**Antecedentes de la invención**

Los retinoides, tales como el retinol, el ácido retinoico, y los ésteres retínicos, están considerados formas de vitamina A. Existen numerosos derivados de vitamina A tales como el beta-caroteno, el retinal, el retinol, el ácido todo trans-retinoico, el ácido 9-cis retinoico y el ácido 13-cis retinoico. La vitamina A se considera un micronutriente esencial, y una deficiencia de vitamina A puede tener efectos perjudiciales, tales como el endurecimiento (hiperqueratosis) de las membranas mucosas, especialmente las del sistema respiratorio. En los casos graves, una deficiencia de vitamina A puede conducir a susceptibilidad a infecciones bronquiales e incluso ceguera (McDowell, E.M., *et al.*, Cell Pathol., 45:197-219, 1984). Afortunadamente, en la mayoría de los casos, el consumo de vitamina A puede conducir a la reversión de estas condiciones inducidas por la deficiencia de vitamina A. Interesantemente, las enfermedades de las membranas mucosas del sistema respiratorio tales como la bronquitis aguda y crónica, el enfisema, e incluso ciertos tipos de cáncer, no inducidas por una deficiencia de vitamina A, también se han tratado o prevenido con éxito mediante la administración sistémica de vitamina A, normalmente a dosis elevadas. De hecho, los retinoides se han utilizado con éxito en el tratamiento de numerosas condiciones incluyendo los trastornos de la piel tales como el acné, y los cánceres tales como la leucemia promielocítica aguda, el cáncer de pulmón, el cáncer de próstata, y el cáncer de mama.

Desafortunadamente, debido a las elevadas dosis requeridas para un tratamiento eficaz, los retinoides tienen efectos secundarios tóxicos que pueden ser devastadores y potencialmente fatales. Estos efectos adversos incluyen hiperlipidemia, hipercalcemia, y toxicidad para la piel, el hígado, y el sistema nervioso central. Adicionalmente, la mayoría de las formas de vitamina A de origen natural, tales como los isómeros todo cis y todo trans del ácido retinoico, son lipófilos, lo que significa que son insolubles en agua. Su insolubilidad no solo contribuye a la necesidad de administrar elevadas dosis de retinoides para que sean eficaces, si no que también los fármacos insolubles en agua tales como estos son extremadamente difíciles de formular. Por otra parte, como resultado de su insolubilidad en agua, los fármacos tales como el ácido retinoico a menudo poseen biodisponibilidades extremadamente bajas.

De este modo, existe la necesidad de nuevas formas solubles y formulaciones de retinoides, preferiblemente formas solubles en agua de retinoides tales como ácido retinoico que pueden ser fácilmente formuladas en composiciones terapéuticas, y que (i) no están interferidas por los problemas que plagan las formas de origen natural de la vitamina A tales como la baja biodisponibilidad y la elevada toxicidad, (ii) no requieren la adición de alquilaminas o tensioactivos o detergentes para solubilizar el retinoide, y (iii) pueden, en ciertos casos, ser liberadas en el pulmón mediante inhalación, concretamente para el tratamiento localizado de enfermedades del tracto respiratorio.

**Compendio de la invención**

Generalmente, la presente invención proporciona nuevos derivados de ácido retinoico solubles en agua que, basándose en su solubilidad acuosa, son mucho más fáciles de formular, elaborar, y liberar que sus contrapartes retinoides no modificadas. Adicionalmente, los retinoides modificados de la invención son particularmente adecuados para la administración mediante inhalación. De hecho, los autores de la invención han descubierto que además de las ventajas anteriormente mencionadas asociadas con el incremento de la solubilidad en agua de los derivados retinoides proporcionados en la presente memoria, los compuestos de la invención, cuando son administrados en el pulmón, se pueden depositar en el tejido pulmonar, lo que significa que tales compuestos son particularmente ventajosos para la liberación localizada en el pulmón para el tratamiento de las enfermedades obstructivas crónicas tales como el enfisema. De este modo, la administración de tales compuestos directamente al pulmón, unida al aumento de la solubilidad en agua de los retinoides proporcionados aquí, puede permitir la administración de dosis más pequeñas de los derivados retinoides de la invención para lograr niveles terapéuticamente útiles, reduciendo de ese modo su toxicidad sistémica.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de producto conjugado retinoide polimérico adecuada para la administración pulmonar, donde la composición comprende un retinoide unido covalentemente a un polímero soluble en agua y no peptídico.

Los polímeros solubles en agua y no peptídicos para su uso en la formación de un producto conjugado de la invención son poli(alquilenglicoles), polioles polioxietilados, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxi alquilmetacrilamida), poli(metacrilato de hidroxialquilo), poli( $\alpha$ -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), y copolímeros, terpolímeros, y mezclas de los mismos. En una realización particularmente preferida de la invención, el polímero es un polietilenglicol (PEG). La porción polimérica del producto conjugado puede poseer cualquiera de las numerosas geometrías incluyendo estructuras lineales, ramificadas, en forma de tenedor o de pesa.

## ES 2 284 959 T3

En una realización de la invención, la composición inhalable comprende un producto conjugado preparado a partir de un retinoide lipófilo seleccionado del grupo que consiste en ácido 13-cis-retinoico, ácido todo trans-retinoico, ácido 9-cis-retinoico, ácido 11-cis-retinoico y retinol.

5 Las composiciones de la invención pueden ser líquidas o pueden ser formulaciones de polvo seco.

Asimismo está abarcado por la invención un aerosol de una composición de producto conjugado polimérico retinoide como se ha descrito antes.

10 En una realización de la invención, la composición de aerosol está contenida en un dispositivo inhalador.

En otra realización más, la composición de producto conjugado polimérico comprende adicionalmente un captador de radicales libres.

15 En una realización alternativa, se proporciona una composición de polvo seco de un producto conjugado polimérico retinoide.

Según otra realización más, el polímero soluble en agua y no peptídico está unido covalentemente al retinoide por medio de una conexión hidrolíticamente inestable. Las conexiones preferidas incluyen éster, tioléster (-C(O)-S) y amida.

En otra realización más, en la composición de producto conjugado polimérico retinoide está ausente un agente necesario para solubilizar el retinoide en un vehículo portador.

25 Se proporciona un método para administrar una forma soluble en agua de un retinoide a un sujeto mamífero que lo necesita. El método incluye las etapas de (i) proporcionar un producto conjugado polimérico retinoide como se describe en la presente memoria, (ii) introducir en un aerosol la composición de (i) para formar una composición en aerosol, y (iii) administrar al sujeto mediante inhalación la composición en aerosol para el depósito localizado en el pulmón del sujeto.

30 Según otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para proporcionar una composición de retinoide soluble en agua para la administración al pulmón de un sujeto que lo necesite. El método incluye las etapas de (i) unir covalentemente un retinoide con un polímero soluble en agua y no peptídico como se ha definido previamente para formar un producto conjugado polimérico retinoide soluble en agua, (ii) proporcionar una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el producto conjugado del apartado (i) y (iii) introducir en un aerosol la composición. En una realización preferida, el sujeto padece una enfermedad pulmonar obstructiva crónica tal como el enfisema.

En otra realización más, la invención proporciona productos conjugados polimérico retinoide concretos.

40 En una realización, la invención proporciona un producto conjugado polimérico retinoide que comprende un polímero soluble en agua y no peptídico unido covalentemente al carbono carbonílico del ácido retinoico para formar un enlace hidrolíticamente degradable.

Según una realización específica del producto conjugado polimérico retinoide *per se*, si el polímero es un polietilenglicol lineal y la conexión es una conexión éster, el peso molecular del polietilenglicol es de al menos 2.000 daltons. Según otra realización más del producto conjugado polimérico *per se*, si el polímero es un polietilenglicol lineal con protección terminal, el retinoide es el ATRA, y la conexión es una conexión amida, el polietilenglicol tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 5.000 daltons.

50 En otra realización más de la invención, se proporciona un producto conjugado polimérico retinoide que tiene la siguiente estructura:



donde

RA junto con el grupo carbonilo representa un radical ácido retinoico,

65 X es un heteroátomo; y

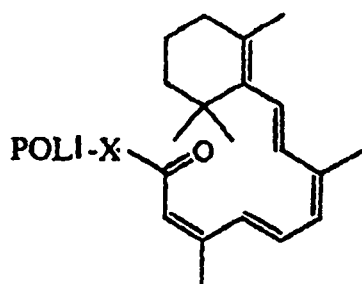
POLI es un polímero soluble en agua, no peptídico.

## ES 2 284 959 T3

En una realización específica de estructura (I), X es un heteroátomo seleccionado entre O, N-H, y S, donde (i) si POLI es un polietilenglicol lineal y X es O, el peso molecular de POLI es de al menos aproximadamente 2.000 daltons, y (ii) si POLI es un polietilenglicol lineal con protección terminal, y RA junto con el carbonilo adyacente representa un radical ATRA, y X es N-H, POLI tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 5.000 daltons.

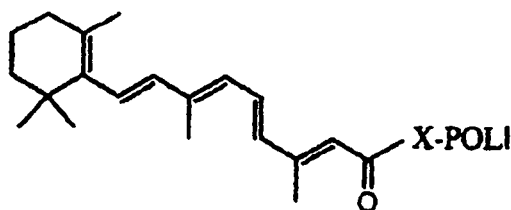
En una realización preferida, un producto conjugado de la invención contendrá una conexión hidrolíticamente degradable, tal como una conexión éster, entre el radical ácido retinoico y el polímero. De este modo, en semejante realización, se considera que el producto conjugado polimérico es un profármaco, lo que significa que la conexión hidrolizable se puede hidrolizar para liberar el retinoide de origen no modificado.

Los productos conjugados particularmente preferidos poseerán las siguientes estructuras generalizadas, donde X y POLI se definen como antes.



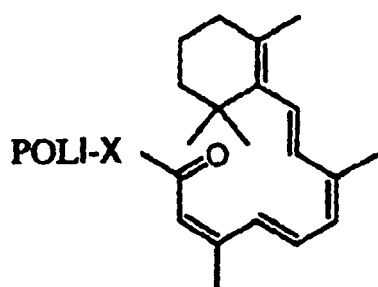
ácido 13-cis-retinoico

(II)



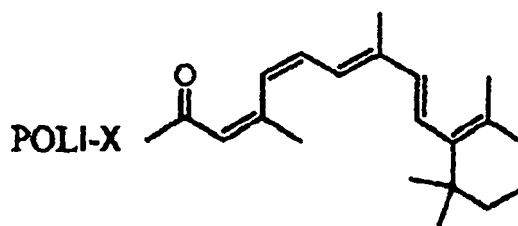
ácido todo-trans-retinoico

(III)



ácido 9-cis-retinoico

(IV)



ácido 11-cis-retinoico

(V)

La porción POLI de un producto conjugado de la invención puede ser lineal, tal como PEG metoxilado, ramificado (o con múltiples brazos), o en forma de tenedor. En las realizaciones concretas de la invención donde el polímero es lineal, el producto conjugado puede incorporar un polímero heterobifuncional u homobifuncional. Un producto conjugado de un polímero heterobifuncional es uno donde un extremo del polímero está anclado al retinoide y el otro extremo está funcionalizado con un radical diferente. Un producto conjugado de un polímero homobifuncional posee una estructura donde cada extremo del polímero lineal está unido covalentemente a un retinoide, típicamente mediante un enlace idéntico.

La invención también proporciona un método para formar un producto conjugado polimérico de ácido retinoico. El método incluye las etapas de proporcionar un polímero soluble en agua y no peptídico que tiene un extremo que es un grupo funcional que es reactivo con un ácido carboxílico o un grupo haluro de ácido, tal como hidroxilo, amino o tiol. Semejante polímero se hace reaccionar después con ácido retinoico o una forma activada de ácido retinoico tal como el correspondiente haluro de ácido para formar un producto conjugado polimérico retinoico que tiene, por ejemplo, una conexión éster o tioletéster o amida entre el esqueleto polimérico y el radical ácido retinoico.

Un producto conjugado de polímero-retinoide de la invención, cuando es introducido en un aerosol y administrado por medio de inhalación, es particularmente útil en el tratamiento del enfisema.

Estos y otros objetos y características de la invención se harán totalmente evidentes cuando se consideren a la vista de la siguiente descripción detallada.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 ilustra gráficamente la tasa de hidrólisis de un producto conjugado polimérico de ácido retinoico representativo en un tampón. El producto conjugado contiene una conexión éster que acopla el radical retinoide al polímero. El estudio de la hidrólisis se describe en el Ejemplo 9.

La Fig. 2 ilustra gráficamente la tasa de hidrólisis de un producto conjugado polimérico de ácido retinoico representativo en suero de rata. El producto conjugado contiene una conexión éster que acopla el retinoide al polímero; el estudio de la hidrólisis se describe en el Ejemplo 10.

La Fig. 3 demuestra las concentraciones de ATRA y producto conjugado y PEG-5kD-éster ATRA en pulmón de rata después de la administración intratraqueal como se describe en el Ejemplo 11.

### Descripción detallada de la invención

Desde un punto de vista, el diseño, la síntesis, la caracterización y la formulación de diversos productos conjugados de PEG-ácido retinoico representativos se han optimizado para la liberación pulmonar en el pulmón. Hasta ahora, la preparación y formulación de productos conjugados de PEG-ácido retinoico para la liberación en el pulmón no se había demostrado. Los productos conjugados de la invención ofrecen muchas ventajas, incluyendo muy notablemente la naturaleza soluble en agua de las composiciones y productos conjugados de la invención. De este modo, los productos conjugados poliméricos proporcionados en la presente memoria son mucho más fáciles de formular en composiciones terapéuticas administrables cuando se comparan con sus contrapartes retinoides de origen lipófilas no modificadas. Por ejemplo, las composiciones previas de retinoides para la terapia por inhalación han estado limitadas a composiciones inhaladoras de dosis medida que requieren la adición de una alquilamina a un disolvente clorofluorocarbonado con el fin de solubilizar el retinoide (véase por ejemplo, Tong, W., y Warrell, R., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.251.941). En contraste, los presentes productos conjugados de retinoides, en virtud de su solubilidad acuosa, pueden ser administrados utilizando cualquiera de los numerosos vehículos de liberación sin la necesidad de agentes solubilizantes o emulsionantes adicionales (p. ej., CREMAPHOR® o MOLECUSOL®), muchos de los cuales no son deseables para la administración al pulmón.

Por otra parte, al formar ciertas composiciones secadas por pulverización de los productos conjugados retinoides de la invención, los autores de la invención fueron capaces de superar las desventajas planteadas durante el secado por pulverización del ácido retinoico no modificado, esto es, la sublimación del compuesto de bajo punto de fusión en la secadora por pulverización. De este modo, el anclaje covalente de una cadena polimérica al ácido retinoico era suficiente para aumentar los puntos tanto de fusión como de ebullición del ácido retinoico para hacer de ese modo el secado por pulverización un procedimiento mucho más atractivo, en términos tanto de rendimiento como de eficacia.

Por último, los datos *in vivo* indican que los productos conjugados de retinoides de la invención proporcionan niveles sostenidos de ácido retinoico en los pulmones - es decir, los productos conjugados de ácido retinoico parecen depositarse en el pulmón al menos en un grado medible en vez de ser rápidamente absorbidos a través del tejido pulmonar a la circulación sistémica, lo que a su vez conduce a la reducción de la toxicidad sistémica cuando se compara con las inyecciones i.v. Por otra parte, los datos en plasma indican que los productos conjugados poliméricos de la invención son retenidos en el pulmón en un grado mucho mayor que el correspondiente retinoide no modificado o no conjugado con un polímero. Es decir, el retinoide no modificado se absorbe relativamente rápidamente a través del tejido pulmonar a la circulación, mientras el producto conjugado es retenido significativamente en el pulmón, demostrando adicionalmente las ventajas de un producto conjugado de polímero-retinoide cuando se compara con el de origen no modificado en el tratamiento localizado y en la prevención de las afecciones del tracto respiratorio tal como el enfisema.

#### I. Definiciones

Los siguientes términos utilizados en la presente memoria tienen los significados indicados.

Según se utiliza en la memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el”, “la”, incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos “grupo funcional”, “radical activo”, “sitio reactivo”, “grupo químicamente reactivo”, y “radical químicamente reactivo” se utilizan comúnmente en la técnica y en la presente memoria para hacer referencia a porciones distintas, definibles o unidades de una molécula. Estos términos son sinónimos en las técnicas químicas y se utilizan en la presente memoria para indicar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas. Se pretende que el término “activo”, o “reactivo” cuando se utiliza junto con un grupo funcional, incluya aquellos grupos funcionales que reaccionan fácilmente con grupos electrofílicos o nucleofílicos de otras moléculas, en contraste con aquellos grupos que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción muy poco prácticas para reaccionar (esto es, grupos “no-activos” o “inertes”). Por ejemplo, como se entendería en la técnica, el término “éster activo” incluiría aquellos ésteres que reaccionan fácilmente con grupos nucleofílicos tales como las aminas. Los ésteres activos ejemplares incluyen los ésteres de N-hidroxisuccinimidilo o los ésteres de 1-benzotriazolilo. Típicamente, un éster activo reaccionará con una amina en un medio acuoso en cuestión de minutos, mientras ciertos ésteres, tales como ésteres metílicos o etílicos, requieren un catalizador fuerte para reaccionar con un grupo

nucleofílico. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término “grupo funcional” incluya las formas protegidas.

El término “grupo funcional protegido” o “grupo protector” o “grupo de protección” hace referencia a la presencia de un radical (esto es, el grupo protector) que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo concreto de una molécula en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo así como de las condiciones de reacción que se vayan a emplear y de la presencia de grupos reactivos adicionales o grupos protectores en la molécula, si los hubiera. Los grupos protectores conocidos en la técnica se pueden encontrar en Greene, T.W., *et al.*, *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*. 3ª ed., John Wiley & Sons, New York, NY (1999).

El término “conexión” o “conector” (L) se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a un átomo o una colección de átomos utilizados para conectar, preferiblemente por medio de uno o más enlaces covalentes, radicales de interconexión tales como dos segmentos poliméricos o un extremo de un polímero y un grupo funcional reactivo presente en un agente bioactivo, tal como el ácido retinoico. Un conector de la invención puede ser hidrolíticamente estable o puede incluir una conexión fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

Una unión “fisiológicamente hidrolizable” o “hidrolíticamente degradable” es un enlace débil que reacciona con agua (esto es, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no solamente del tipo de conexión general que conecta dos átomos centrales si no también de los sustituyentes anclados a estos átomos centrales. Las conexiones hidrolíticamente inestables o degradables incluyen pero no están limitadas a éster carboxilato, éster fosfato, tioléster, anhídridos, acetales, cetales, éter aciloxialquílico, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos. Las tasas de hidrólisis ilustrativas tanto en tampón como en suero para los productos conjugados representativos de la invención se proporcionan en los Ejemplos 9 y 10.

Una conexión o enlace “hidrolíticamente estable” hace referencia a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, no experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas, en ningún grado apreciable a lo largo de un período prolongado de tiempo. Los ejemplos de las conexiones hidrolíticamente estables incluyen pero no están limitadas a las siguientes: enlaces carbono-carbono (p. ej., en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos, y similares. Generalmente, una conexión hidrolíticamente estable es aquella que muestra una tasa de hidrólisis de menos de aproximadamente 1-2% por día en condiciones fisiológicas. Las tasas de hidrólisis de los enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de los libros de texto de química normalizados, o alternativamente, las tasas de hidrólisis de un compuesto dado se pueden medir utilizando mecanismos normalizados conocidos en la técnica.

Una conexión “enzimáticamente inestable” o “enzimáticamente degradable” es una conexión que puede ser degradada por una o más enzimas.

Se pretende que “PEG” o polietilenglicol, según se utiliza en la presente memoria, abarque cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Muy típicamente, los PEG para su uso en la presente invención contendrán la siguiente estructura,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , donde los grupos terminales o la arquitectura real del radical PEG completo puede variar. Un PEG comúnmente empleado es el PEG con protección terminal, en el que un extremo del PEG está protegido con un grupo relativamente inerte, típicamente un grupo alcoxi tal como metoxi ( $-\text{OCH}_3$ ), mientras el otro extremo es un grupo hidroxilo que puede ser sometido después a modificación química. El término “PEG” incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas lineal, ramificada o con múltiples brazos, incluyendo PEG alcoxilado, PEG bifuncional, PEG en forma de tenedor, PEG ramificado, PEG pendiente, o PEG con conexiones degradables en él. Las formas de PEG específicas para su uso en la preparación de productos conjugados con retinoides de la invención, tales como los PEG ramificados, lineales, PEG en forma de tenedor, y similares, se describirán con mayor detalle más abajo.

El “peso molecular promedio nominal” en el contexto del polímero no peptídico, hidrófilo de la invención tal como PEG, hace referencia al peso molecular promedio en masa del polímero, determinado típicamente mediante cromatografía de exclusión por tamaño, dispersión de luz o velocidad intrínseca en 1,2,4-triclorobenceno. Los polímeros de la invención son típicamente polidispersos, teniendo un valor de polidispersidad bajo de menos de aproximadamente 1.05.

El término “alquilo”, “alquenilo”, y “alquinilo” hacen referencia a cadenas hidrocarbonadas con una longitud que oscila típicamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 átomos de carbono, preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 átomos, e incluye cadenas lineales y ramificadas. A menos que se indique de otro modo, la realización preferida de cualquier alquilo referido en la presente memoria es alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  (p. ej., metilo o etilo).

“Cicloalquilo” hace referencia a una cadena hidrocarbonada cíclica saturada o insaturada, incluyendo compuestos cíclicos unidos por puentes, fusionados, o espiro, que comprenden preferiblemente de 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8.

El término “alquilo sustituido”, “alquenilo sustituido”, “alquinilo sustituido” o “cicloalquilo sustituido” hace referencia a un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o cicloalquilo sustituido con uno o más sustituyentes que no interfieren,

## ES 2 284 959 T3

tales como, pero no limitados a, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, p. ej., ciclopropilo, ciclobutilo, y similares; acetileno; ciano; alcoxi, p. ej., metoxi, etoxi, y similares; alcanoiloxi inferior, p. ej., acetoxi; hidroxilo; carboxilo; amino; alquil(inferior) amino, p. ej., metilamino; cetona; halo, p. ej., cloro o bromo; fenilo; fenilo sustituido, y similares.

5 “Alcoxi” hace referencia a un grupo -O-R, donde R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (p. ej., metoxi o etoxi).

10 “Ariilo” representa uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 o 6 átomos de carbono. Múltiples anillos de ariilo, pueden estar fusionados como en el naftilo o no fusionados, como en el bifenilo. Los anillos de ariilo también pueden estar fusionados o no fusionados con uno o más anillos hidrocarbonados, heteroarílicos, o heterocíclicos.

“Ariilo sustituido” es un ariilo que tiene uno o más grupos que no interfieren como sustituyentes. Para las sustituciones en el anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (esto es, orto, meta o para).

15 “Heteroarilo” es un grupo ariilo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, preferiblemente N, O, o S, o una combinación de los mismos, cuyo grupo heteroarilo está opcionalmente sustituido en el átomo o los átomos de carbono o nitrógeno con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -CF<sub>3</sub>, fenilo, bencilo, o tienilo, o un átomo de carbono en el grupo heteroarilo junto con un átomo de oxígeno forman un grupo carbonilo, o cuyo grupo heteroarilo está opcionalmente fusionado con un anillo de fenilo. Los anillos heteroarílicos también pueden estar fusionados con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, heterocíclicos, arílicos, o heteroarílicos. Heteroarilo incluye, pero no está limitado a, heteroarilos de 5 miembros que tienen un heteroátomo (p. ej., tiofenos, pirroles, furanos); heteroarilos de 5 miembros que tienen dos heteroátomos en las posiciones 1,2 o 1,3 (p. ej., oxazoles, pirazoles, imidazoles, tiazoles, purinas); heteroarilos de 5 miembros que tienen tres heteroátomos (p. ej., triazoles, tiadiazoles); heteroarilos de 5 miembros que tienen 3 heteroátomos; heteroarilos de 6 miembros con un heteroátomo (p. ej., piridina, quinolina, isoquinolina, fenantrina, 5,6-cicloheptenopiridina); heteroarilos de 6 miembros con dos heteroátomos (p. ej., piridazinas, cinolinas, ftalazinas, pirazinas, pirimidinas, quinazolininas); heteroarilos de 6-miembros con tres heteroátomos (p. ej., 1,3,5-triazina); y heteroarilos de 6 miembros con cuatro heteroátomos.

30 “Heteroarilo sustituido” es un heteroarilo que tiene uno o más grupos que no interfieren como sustituyentes.

“Heterociclo” o “heterocíclico” representa uno o más anillos de 5-12 átomos, preferiblemente 5-7 átomos, con o sin insaturación o carácter aromático y al menos un átomo del anillo no es de carbono. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno, y nitrógeno. Se pueden fusionar múltiples anillos, como en la quinolina o el benzofurano.

35 “Heterociclo sustituido” es un heterociclo que tiene una o más cadenas laterales formadas a partir de sustituyentes que no interfieren.

Los sustituyentes que “no interfieren” son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, son típicamente no reactivos con otros grupos funcionales contenidos en la molécula.

40 Los sustituyentes o radicales que no interfieren adecuados incluyen, pero no están limitados a, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, aralquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>, alcarilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, fenilo, fenilo sustituido, toluoilo, xilenilo, bifenilo, alcoxialquilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxiarilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>, ariloxialquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>, oxiarilo C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, alquilsulfino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilsulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) donde m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, -NO<sub>2</sub>, -CN, -NRC(O)-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -C(O)-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), tioalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, -C(O)O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -OH, -SO<sub>2</sub>, =S, -COOH, -NR, carbonilo, -C(O)-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-CF<sub>3</sub>, -C(O)-CF<sub>3</sub>, -C(O)NR<sub>2</sub>, -(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-S-(arilo C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>), -C(O)-(arilo C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) donde cada m es de 1 a 8, -C(O)NR, -C(S)NR, -SO<sub>2</sub>NR, -NRC(O)NR, -NRC(S)NR, las sales de los mismos, y similares. Cada R utilizado en la presente memoria es H, alquilo o alquilo sustituido, ariilo o ariilo sustituido, aralquilo, o alcarilo.

50 “Heteroátomo” representa cualquier átomo distinto de carbono en un compuesto hidrocarbonado análogo. Los ejemplos incluyen oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo, arsénico, silicio, selenio, telurio, estaño y boro.

55 Según se utiliza en la presente memoria, “no peptídico” hace referencia a un esqueleto polimérico libre de conexiones peptídicas. No obstante, el esqueleto polimérico puede incluir un número minoritario de conexiones peptídicas espaciadas a lo largo del esqueleto, tal como, por ejemplo, no más de aproximadamente 1 conexión peptídica por aproximadamente 50 unidades monoméricas.

60 “Polipéptido” hace referencia a cualquier molécula que comprende una serie de restos aminoácido, típicamente al menos aproximadamente 10-20 restos, conectados por medio de conexiones amida (también referidas como conexiones peptídicas) a lo largo del esqueleto carbonado alfa. Si bien en algunos casos los términos pueden ser utilizados como sinónimos en la presente memoria, un polipéptido es un péptido que tiene típicamente un peso molecular de hasta aproximadamente 10.000 Da, mientras los péptidos que tienen un peso molecular por encima de ese son referidos comúnmente como proteínas. Pueden estar presentes modificaciones de las cadenas laterales de los péptidos, junto con glicosilaciones, hidroxilaciones, y similares. Adicionalmente, se pueden anclar al polipéptido otras moléculas no peptídicas, incluyendo lípidos, y moléculas de fármaco pequeñas.

## ES 2 284 959 T3

5 “Aminoácido” hace referencia a cualquier compuesto que contiene tanto un grupo amino como un grupo ácido carboxílico. Aunque el grupo amino se presenta muy comúnmente en la posición adyacente a la función carboxi, el grupo amino puede estar situado en cualquier localización dentro de la molécula. El aminoácido también puede contener grupos funcionales adicionales, tales como amino, tio, carboxilo, carboxamida, imidazol, etc. Un aminoácido puede ser sintético o de origen natural, y se puede utilizar en sus formas racémica u opcionalmente activa (D-, o L-), incluyendo diversas proporciones de enantiómeros.

10 “Oligómero” hace referencia a cadenas monoméricas cortas que comprenden de 2 a aproximadamente 10 unidades monoméricas, preferiblemente de 2 a aproximadamente 5 unidades monoméricas.

Se pretende que el término “producto conjugado” haga referencia a la entidad formada como resultado del anclaje covalente de una molécula, p. ej., un retinoide, a una molécula polimérica reactiva, preferiblemente un poli(etilenglicol).

15 “Bifuncional” en el contexto de un polímero de la invención hace referencia a un polímero que posee dos grupos funcionales reactivos que pueden ser iguales o diferentes.

20 “Multifuncional” en el contexto de un polímero de la invención representa un polímero que tiene 3 o más grupos funcionales anclados, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes. Los polímeros multifuncionales de la invención comprenderán típicamente de aproximadamente 3 a 100 grupos funcionales, o de 3 a 50 grupos funcionales, o de 3 a 25 grupos funcionales, o de 3 a 15 grupos funcionales, o de 3 a 10 grupos funcionales, o contendrán 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grupos funcionales anclados al esqueleto polimérico.

25 “Polvo seco” hace referencia a una composición en polvo que contiene típicamente menos de aproximadamente un 10% de humedad.

30 Una composición que es “adecuada para la liberación pulmonar” hace referencia a una composición que es susceptible de ser introducida en un aerosol e inhalada por un sujeto de manera que una porción de las partículas introducidas en el aerosol alcancen los pulmones para permitir la penetración en el tracto respiratorio inferior y los alvéolos. Se considera que semejante composición es “respirable” o “inhalable”.

35 Las partículas “introducidas en un aerosol” son partículas líquidas o sólidas que están suspendidas en un gas, típicamente como resultado de la actuación (o el disparo) de un dispositivo de inhalación tal como un inhalador de polvo seco, un atomizador, un inhalador de dosis medidas, o un nebulizador.

40 La “dosis emitida” o “DE” proporciona una indicación de la liberación de una formulación de fármaco desde un dispositivo inhalador después del disparo o evento de dispersión. Más específicamente, para las formulaciones de polvo seco, la DE es una medida del porcentaje de polvo que se extrae de un envase de dosificación unitaria y que sale de la pieza bucal del dispositivo inhalador. La DE se define como la razón de la dosis liberada por un dispositivo inhalador con respecto a la dosis nominal (esto es, la masa de polvo por dosis unitaria situada en un dispositivo inhalador adecuado antes del disparo). La DE es un parámetro determinado experimentalmente, y se determina típicamente utilizando un ajuste del dispositivo *in vitro* que imita la dosificación del paciente. Para determinar el valor de DE, se coloca una dosis nominal de polvo seco, típicamente en una forma de dosificación unitaria, en un inhalador de polvo seco adecuado (tal como el que se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.785.049, cedida a Inhale Therapeutic Systems) que después se hace actuar, dispersando el polvo. La nube de aerosol resultante se extrae después por medio de vacío del dispositivo, donde es capturada sobre un filtro tarado anclado a la pieza bucal del dispositivo. La cantidad de polvo que alcanza el filtro constituye la dosis emitida. Por ejemplo, para una forma de dosificación que contiene 5 mg de polvo seco en un dispositivo de inhalación, si la dispersión del polvo da como resultado la recuperación de 4 mg de polvo en el filtro tarado descrito antes, la dosis emitida para la composición de polvo seco es:  $4 \text{ mg (dosis liberada)} / 5 \text{ mg (dosis nominal)} \times 100 = 80\%$ . Para los polvos no homogéneos, los valores de DE proporcionan una indicación de la liberación de fármaco desde el dispositivo inhalador después del disparo en lugar de polvo seco, y se basan en la cantidad de fármaco en lugar de en el peso de polvo total. De un modo similar para MDI y las formas de dosificación de nebulizadores, la DE corresponde al porcentaje de fármaco que se extrae de una forma de dosificación y que sale por la pieza bucal de un dispositivo inhalador.

55 La “dosis de partícula fina” o “FPD” se define como el porcentaje de masa de partículas de polvo que tiene un diámetro aerodinámico menor de  $3,3 \mu\text{m}$ , típicamente determinado mediante la medición en un aparato impactador en cascada de Andersen.

60 Un polvo “dispersable” o “dispersivo” es aquél que tiene una valor DE de al menos aproximadamente el 30%, más preferiblemente el 40-50%, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 50-60% o mayor.

65 “Diámetro medio de masa” o “MMD” es una medición del tamaño de partícula medio, puesto que los polvos de la invención son generalmente polidispersos (esto es, consisten en un intervalo de tamaños de partícula). Los valores MMD referidos en la presente memoria son determinados mediante sedimentación centrífuga, aunque se puede utilizar cualquier número de técnicas empleadas comúnmente para medir el tamaño medio de partícula (p. ej., microscopía electrónica, dispersión de luz, difracción con láser).

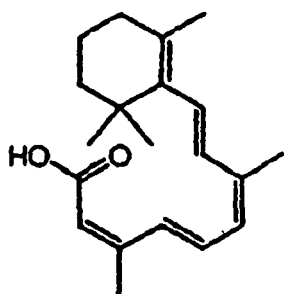
El “diámetro aerodinámico medio de masa” o “MMAD” es una medida del tamaño aerodinámico de una partícula dispersa. El diámetro aerodinámico se utiliza para describir un polvo introducido en un aerosol en términos de su comportamiento de asentamiento, y es el diámetro de una esfera de densidad unidad que tiene la misma velocidad de asentamiento, en el aire, que la partícula. El diámetro aerodinámico abarca la forma de la partícula, la densidad y el tamaño físico de una partícula. Según se utiliza en la presente memoria, el MMAD hace referencia al punto medio o mediana de la distribución del tamaño de partícula aerodinámico de un polvo introducido en un aerosol determinado mediante impacto en cascada, a menos que se indique de otro modo.

“Excipiente o portador farmacéuticamente aceptable” hace referencia a un excipiente que puede ser incluido opcionalmente en las composiciones de la invención. Para las composiciones para inhalación se prefieren excipientes que pueden ser llevados a los pulmones sin efectos toxicológicos adversos significativos para el sujeto, y concretamente para los pulmones del sujeto.

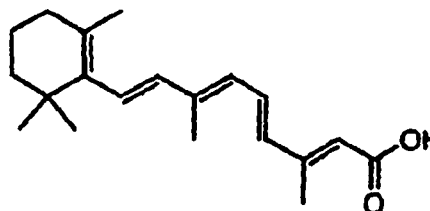
Una “cantidad farmacológicamente eficaz” o “cantidad fisiológicamente eficaz” es la cantidad de un producto conjugado de polímero-ácido retinoico presente en una composición terapéutica como se describe en la presente memoria que es necesaria para proporcionar un nivel eficaz de ácido retinoico para el tratamiento de una afección diana sensible al tratamiento con un retinoide. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, p. ej., el PEG-retinoide concreto, el dispositivo de liberación empleado, los componentes y las características físicas de la composición terapéutica, la población de pacientes pretendida, las consideraciones del paciente, y similares, y puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica, basándose en la información proporcionada en la presente memoria.

## II. Retinoides

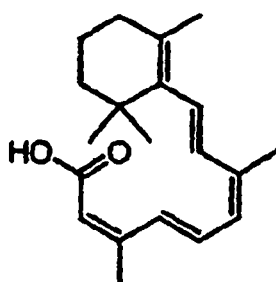
Los retinoides para su uso en la presente invención incluyen los retinoides naturales así como los análogos sintéticos y las sales y los ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los retinoides representativos para su uso en la preparación de un producto conjugado de polímero según la invención incluyen retinol, ácido todo-trans-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, ácido 9-cis-retinoico, ácido 11-cis-retinoico, y 14-hidroxi-retinoico. Se prefieren los compuestos de ácido retinoico lipófilos, el ácido todo-trans-retinoico (ATRA), el ácido 13-cis-retinoico, el ácido 9-cis-retinoico, el ácido 11-cis-retinoico. Para facilitar la referencia, las estructuras de los ácidos retinoicos cis y trans de origen se proporcionan más abajo:



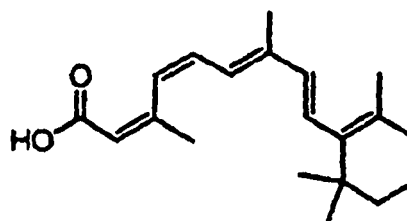
ácido 13-cis-retinoico



ácido todo-trans-retinoico



ácido 9-cis-retinoico



ácido 11-cis-retinoico

El anclaje covalente de la cadena polimérica se puede producir en cualquier posición del radical retinoide que sea adecuada para la modificación química, aunque muy preferiblemente el anclaje del polímero se producirá mediante reacción de un polímero adecuadamente activado con el carbono carbonílico del radical ácido carboxílico.

Los ácidos retinoicos particularmente preferidos son aquellos que se ha demostrado que son eficaces en el tratamiento de ciertos trastornos respiratorios tales como el enfisema, la bronquitis crónica, y el asma, p. ej., el ácido todo-trans-retinoico (Massaro G., Massaro, D., *Nature Medicine*, 3:675-677, 1997) y el ácido 13-cis-retinoico (Belloni, P., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.339.107).

## III. El Polímero

En general, la porción polimérica soluble en agua y no peptídica del producto conjugado es no tóxica y bio-compatibile, y se caracteriza típicamente por tener de 2 a aproximadamente 300 términos. Los ejemplos de tales polímeros incluyen, pero no están limitados a, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) (“PPG”), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poliol polioxiethylado, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmetacrilamida), poli(metacrilato de hidroxialquilo), poli( $\alpha$ -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acriolilmorfolina), y copolímeros, terpolímeros, y mezclas de los mismos.

Un polímero particularmente preferido es el polietilenglicol. El término PEG utilizado en la presente memoria incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de las numerosas geometrías o formas, incluyendo sus formas lineales (p. ej., alcoxi PEG o PEG bifuncional), formas ramificadas o con múltiples brazos (p. ej., PEG en forma de tenedor o PEG anclado a un núcleo de poliol), PEG pendiente, o PEG con enlaces biodegradables, que se van a describir más completamente más abajo.

Típicamente, el PEG es activado con un grupo activador adecuado apropiado para el acoplamiento a un sitio deseado en el retinoide tal como el carbono carbonílico. Un PEG activado poseerá un grupo reactivo en un término para la reacción con un retinoide. Se pretende que el término “conector” utilizado en la presente memoria abarque un grupo activador situado en un término de PEG para la reacción con un retinoide tal como ácido retinoico, y puede incluir adicionalmente más átomos (generalmente inertes) entre la porción PEG del polímero y el grupo activado en el término, para facilitar la preparación del PEG activado. Los conectores pueden contener cualquiera de los numerosos átomos, sin embargo, se prefieren los conectores que contienen metilenos intermedios entre el esqueleto de PEG y el grupo activador terminal. Los derivados de PEG representativos y los métodos para conjugar estos polímeros con un fármaco tal como un retinoide son conocidos en la técnica y son descritos adicionalmente por Zalipsky, S., *et al.*, “Use of Functionalized Poli(Ethylene Glycols) for Modification of Polipeptides” en *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris, Plenum Press, New York (1992), y en *Advanced Drug Reviews*, **16**:157-182 (1995).

Típicamente, el peso molecular promedio en número de la porción polimérica de un producto conjugado polimérico de la invención es de aproximadamente 100 dalton (Da) a aproximadamente 100.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 500 dalton a aproximadamente 100.000 dalton.

Más específicamente, un producto conjugado PEG-retinoide de la invención comprenderá típicamente una o más cadenas de PEG cada una con un peso molecular que oscila entre aproximadamente 200 y aproximadamente 40.000 dalton, y que oscila preferiblemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 20.000 dalton. Preferiblemente, un PEG para su uso en la invención poseerá un peso molecular medio que caiga en uno de los siguientes intervalos: de aproximadamente 200 a 10.000 dalton, de aproximadamente 200 a aproximadamente 7.500 dalton, de aproximadamente 200 a aproximadamente 6.000 dalton, de aproximadamente 200 a aproximadamente 5.000 dalton, de aproximadamente 200 a aproximadamente 3.000 dalton, de aproximadamente 200 a aproximadamente 2.000 dalton, y de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.000 dalton.

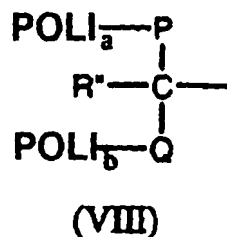
Los polímeros para el anclaje a un retinoide poseerán generalmente un peso molecular promedio en número seleccionado entre los siguientes: (i) aproximadamente 500 Da, o (ii) aproximadamente 750 Da, o (iii) aproximadamente 900 Da, o (iv) aproximadamente 1.000 Da, o (v) aproximadamente 2.000 Da, o (vi) aproximadamente 3.000 Da, o (vii) aproximadamente 4.000 Da, o (viii) aproximadamente 5.000 Da, o (ix) aproximadamente 10.000 Da, o (x) aproximadamente 15.000 Da, o (xi) aproximadamente 20.000, o (xii) aproximadamente 25.000 Da. En una realización concreta de la invención, se prefieren los polímeros que tienen un peso molecular de más de aproximadamente 2.000 dalton. Los productos conjugados de retinoides preparados con PEG que tienen pesos moleculares de 5.000 dalton, 20.00 dalton, 2.000 dalton, y 10.000 dalton (utilizando PEG tanto lineales como con múltiples brazos) se describen en los Ejemplos.

En términos del número de subunidades, los PEG para su uso en la invención comprenderán típicamente numerosas subunidades de (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) que caen dentro de uno o más de los intervalos siguientes: de 2 a aproximadamente 900 subunidades, de aproximadamente 4 a aproximadamente 450 subunidades, de aproximadamente 4 a aproximadamente 250 subunidades, de aproximadamente 4 a aproximadamente 170 subunidades, de aproximadamente 4 a aproximadamente 140 subunidades, de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 subunidades, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 subunidades, de aproximadamente 4 a aproximadamente 70 subunidades, de aproximadamente 4 a aproximadamente 45 subunidades, y de aproximadamente 4 a aproximadamente 25 subunidades.

Un polímero particularmente preferido para su uso en la invención es un polímero con protección terminal, lo que significa un polímero que tiene al menos un extremo protegido terminalmente con un grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> inferior. Una de tales formas de PEG particularmente preferidas es el metoxi-PEG (comúnmente referido como mPEG), una forma lineal de PEG donde un término del polímero es un grupo metoxi (-OMe), mientras el otro término es un grupo hidroxilo u otro grupo funcional que puede ser químicamente modificado.

Las moléculas de PEG con múltiples brazos o ramificadas, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.932.462, también pueden ser utilizadas para formar un producto conjugado de la invención. En térmi-

nos generales, un polímero de múltiples brazos o ramificado posee dos o más “brazos” de polímero que se extienden desde un punto de la rama central (p. ej., C en la estructura de más abajo) que están anclados covalentemente, ya sea directamente o indirectamente por medio de átomos conectores intermedios, a un radical activo, tal como un retinoide. Por ejemplo, un polímero PEG ramificado ejemplar puede tener la estructura:



donde:

POLI<sub>a</sub> y POLI<sub>b</sub> son polímeros con PEG, tal como metoxi-poli(etilenglicol);

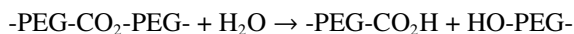
R<sup>•</sup> es un radical no reactivo, tal como H, metilo o PEG; y

P y Q son conexiones no reactivas. En una realización preferida, el polímero con PEG es lisina disustituida con metoxi-poli(etilenglicol) o un derivado de la misma. Dependiendo del radical activo del retinoide pretendido para el acoplamiento al polímero, la función éster reactiva de la lisina disustituida puede ser modificada adicionalmente para formar un grupo funcional adecuado para la reacción con el grupo diana del retinoide.

El polímero puede tener alternativamente estructura de tenedor. En términos generales, un polímero que tiene una estructura en forma de tenedor se caracteriza por tener una cadena polimérica anclada a dos o más agentes activos por medio de conexiones covalentes que se extienden desde un punto de una rama hidrolíticamente estable del polímero. Un ejemplo de un PEG en tenedor es representado por PEG-YCHZ<sub>2</sub>, donde Y es un grupo conector y Z es un grupo terminal activado para el anclaje covalente a un agente biológicamente activo, tal como un retinoide. El grupo Z está conectado a CH por una cadena de átomos de longitud definida. En la Solicitud Internacional Núm. PCT/US99/05333, se describen diversas estructuras de PEG en tenedor adecuadas para su uso en la presente invención. La cadena de átomos que conecta los grupos funcionales Z con el átomo de carbono de la ramificación sirve como grupo traba y pueden comprender, por ejemplo, una cadena alquílica, una conexión éter, una conexión éster, una conexión amida, o combinaciones de las mismas.

Un polímero de PEG también puede adoptar la forma de una molécula de PEG pendiente que tiene grupos reactivos, tales como hidroxilo, anclados covalentemente a lo largo del esqueleto de PEG en lugar de en los extremos de la cadena de PEG. Tales grupos reactivos pendientes pueden estar anclados al esqueleto de PEG directamente o a través de un radical de conexión, tal como un grupo alquilenilo.

Además de las formas de PEG descritas antes, el polímero también puede ser preparado con una o más conexiones débiles o degradables en el esqueleto del polímero, incluyendo cualquiera de los polímeros descritos antes. Es decir, además de la conexión que acopla el polímero al retinoide, el polímero puede contener enlaces hidrolizables adicionales dentro del polímero para proporcionar la degradación adicional del polímero, p. ej., tras el depósito del producto conjugado en el pulmón de un sujeto después de la administración por inhalación. Por ejemplo, se puede preparar un PEG con conexiones éster en el esqueleto del polímero que son sujeto de hidrólisis. Como se muestra más abajo, esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de peso molecular inferior:



Otras conexiones hidrolíticamente degradables que pueden estar contenidas en el esqueleto polimérico incluyen conexiones carbonato; las conexiones imina resultantes, por ejemplo, de la reacción de una amina y un aldehído (véase, p. ej., Ouchi *et al.*, Polymer Preprints, 38(1):582-3 (1997); conexiones éster fosfato formadas, por ejemplo, haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; conexiones hidrazona que se forman típicamente por reacción de una hidrazida y un aldehído; conexiones acetal que se forman típicamente por reacción entre un aldehído y un alcohol; conexiones éster en orto que se forman, por ejemplo, mediante reacción entre un formiato y un alcohol; conexiones peptídicas formadas por un grupo amino, p. ej., en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y conexiones oligonucleotídicas formadas, por ejemplo, por un grupo fosforamídita, p. ej., en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

Tales rasgos opcionales del producto conjugado polimérico, es decir, la introducción de una o más conexiones degradables en la cadena polimérica, pueden proporcionar un control adicional sobre las propiedades finales deseadas del producto conjugado tras la administración. Por ejemplo, se puede administrar un producto conjugado grande y relativamente inerte (es decir, que tiene una o más cadenas de PEG de elevado peso molecular mayor de aproximadamente 10.000, donde el producto conjugado no posee esencialmente bioactividad), que cuando está en el pulmón,

es hidrolizado para generar un producto conjugado bioactivo que posee una porción de la cadena de PEG original. De este modo, las propiedades del producto conjugado de PEG-retinoide pueden ser ajustadas algo más eficazmente para equilibrar la bioactividad del producto conjugado y el efecto de depósito (tiempo de residencia) del retinoide en el pulmón.

En resumen, cualquiera de una variedad de polímeros monofuncionales, bifuncionales o multifuncionales que sean solubles en agua y no peptídicos como se define en la Reivindicación 1 puede ser utilizado para formar un producto conjugado de retinoide según la presente invención. El polímero puede ser lineal, o puede estar en cualquiera de las formas descritas antes (p. ej., ramificada, en forma de tenedor, y similares).

#### IV. *Productos conjugados de Polímero y Retinoide*

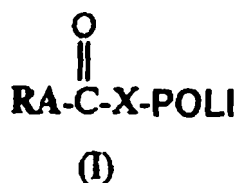
Como se ha descrito generalmente antes, un producto conjugado polimérico de la invención comprende un polímero soluble en agua y no peptídico anclado covalentemente a un compuesto retinoide, donde la porción de polímero del producto conjugado puede poseer cualquiera de las formas ejemplares descritas en la sección III anterior. En los casos en los que el retinoide es un ácido retinoico, los productos conjugados preferidos son aquellos en los que la conexión que conecta el ácido retinoico al polímero es un derivado del grupo ácido carboxílico de origen, tal como un éster, una amida o un éster de tiol. Los productos conjugados de polímero de la invención son útiles para el tratamiento de cualquier afección sensible a la terapia con retinoides y son particularmente beneficiosos para su uso en la quimioprevención, concretamente de los cánceres aerodigestivos, tales como el cáncer de pulmón así como los carcinomas y malignidades de la cabeza y el cuello. Por otra parte, la administración localizada de los productos conjugados de polímero de la invención por inhalación da como resultado una fracción superior de dosis que alcanza el sitio de acción deseado, esto es, las regiones alveolares, cuando se compara con la administración sistémica. De esta manera, los productos conjugados de polímero de la invención se capaces de minimizar los efectos secundarios adversos comunes de la terapia sistémica con retinoides causada por niveles tóxicos de retinoides en la circulación. Por otra parte, debido a la solubilidad en agua de los productos conjugados de la invención, los vehículos de liberación con una base acuosa y las condiciones de tratamiento acuoso durante los tratamientos tales como el secado por pulverización pueden ser empleados sin tener que recurrir a agentes solubilizantes o los riesgos del secado por pulverización con disolventes orgánicos.

Los productos conjugados de la invención son preferiblemente aunque no necesariamente profármacos, lo que significa que la conexión entre el polímero y el retinoide es hidrolíticamente degradable para permitir la liberación del retinoide de origen. Las conexiones degradables ejemplares incluyen éster carboxilato, éster fosfato, tioléster, anhídridos, acetales, cetales, éter aciloxialquílico, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos. Tales conexiones pueden ser fácilmente preparadas mediante modificación de cualquier radical retinoide (p. ej., el grupo carboxilo de un retinoide o un grupo hidroxilo de un retinol) y/o el polímero utilizando métodos de acoplamiento comúnmente empleados en la técnica. Sin embargo, son muy preferidas las conexiones hidrolizables que se forman fácilmente por reacción de un polímero adecuadamente activado con un grupo funcional no modificado contenido en la molécula de origen. Por ejemplo, es muy preferida para la modificación de un ácido retinoico una conexión éster o tioléster resultante del ataque sobre el carbono carbonílico del retinoide mediante un grupo hidroxilo o tiol del polímero.

Alternativamente, también se puede emplear una conexión hidrolíticamente estable, tal como una conexión amida, uretano (también conocido como carbamato), amina, tioéter (también conocido como sulfuro), o urea (también conocido como carbamida) para acoplar el retinoide al polímero. De nuevo, la conexión hidrolíticamente estable preferida es una amida, debido a la naturaleza sencilla de la química. Es decir, se puede preparar una amida fácilmente mediante reacción de un ácido retinoico (o un equivalente funcional del mismo) con un polímero terminado en amino. La conexión concreta y la química de la conexión empleada dependerá de la molécula de retinoide concreta, de los grupos funcionales del retinoide asequibles o bien para el anclaje a un polímero o bien para la conversión en un sitio de anclaje adecuado, la posible presencia de grupos funcionales adicionales dentro de la molécula de retinoide, y similares, y puede ser fácilmente determinada por un experto normal en la técnica basándose en la pauta presentada en la presente memoria.

Los productos conjugados de polímero de la invención pueden poseer o no un grado medible de actividad retinoica. Es decir, un producto conjugado polimérico según la invención poseerá en cualquier parte de aproximadamente 0% a aproximadamente 100% o más de la bioactividad del compuesto retinoide de origen no modificado. Los compuestos que poseen poca o ninguna actividad retinoica contendrán típicamente una conexión hidrolizable que conecte el polímero al radical retinoide, de manera que con independencia de la carencia de bioactividad en el profármaco soluble en agua, la molécula de origen activa es liberada tras la escisión inducida por el medio acuoso de la conexión hidrolizable. Semejante actividad puede ser determinada utilizando un modelo *in-vivo* o *in-vitro* adecuado, dependiendo de la actividad conocida del compuesto de origen concreto empleado. Para los productos conjugados que poseen una conexión hidrolíticamente estable que acopla el retinoide al polímero, el producto conjugado poseerá típicamente un grado medible de actividad específica. Por ejemplo, semejantes productos conjugados poliméricos se caracterizan típicamente por tener una bioactividad de al menos aproximadamente 2%, 5%, 10%, 15%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90% o más en relación con la del retinoide de origen no modificado, cuando se mide en un modelo adecuado, tal como aquellos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, los compuestos que tienen una conexión hidrolíticamente estable (p. ej., una conexión amida) poseerán al menos aproximadamente un 40% de la bioactividad del retinoide de origen no modificado.

Los productos conjugados poliméricos ejemplares según la invención se describirán a continuación. Un producto conjugado polimérico representativo según la invención puede estar caracterizado generalmente por la siguiente estructura,

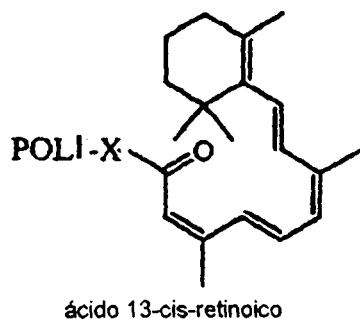


donde RA junto con el grupo carbonílico adyacente representa un radical retinoide, X es un conector, preferiblemente un heteroátomo seleccionado entre O, N-H, y S, y POLI es un polímero no peptídico, soluble en agua.

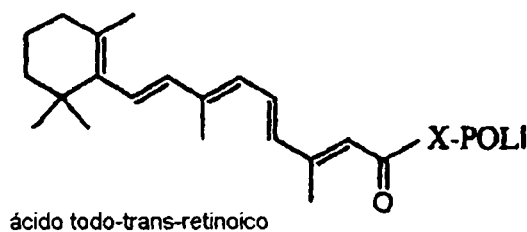
En un caso, por ejemplo, cuando el polímero es un polietilenglicol lineal y la conexión que conecta el retinoide al polímero es una conexión éster (p. ej., X es O), el peso molecular del polímero será preferiblemente de al menos aproximadamente 2.000 dalton. Alternativamente, en las ocasiones en las que el polímero es un polietilenglicol lineal con protección terminal, y la conexión es una conexión amida (p. ej., X es un N-H), el polímero tendrá preferiblemente un peso molecular de al menos aproximadamente 5.000 dalton.

La conexión C(O)-X resulta de la reacción de un grupo funcional en un extremo del polímero con una molécula de ácido retinoico. Como se ha mencionado antes, la conexión específica dependerá del tipo de grupo funcional utilizado. Si el polímero tiene funcionalidad terminal o está "activado" con un grupo hidroxilo, la conexión resultante será un éster de ácido carboxílico y X será O. Si el esqueleto del polímero está funcionalizado con un grupo tiol, la conexión resultante será un tioéster y X será S. Cuando se emplean ciertos polímeros de múltiples brazos, ramificados o en forma de tenedor, el radical C(O)X, y en particular el radical X, puede ser relativamente más complejo y puede incluir una estructura de conexión más larga. Por ejemplo, como se muestra más abajo en la realización de polímero "con forma de tenedor", la porción X del producto conjugado es un conector que corresponde a una conexión  $-X_1(W)_p-CH-Y_1-$  entre el polímero y el radical ácido retinoico.

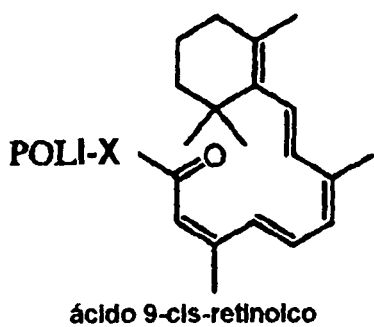
Los productos conjugados particularmente preferidos tendrán las estructuras generalizadas presentadas más abajo donde X y POLI se describen como antes.



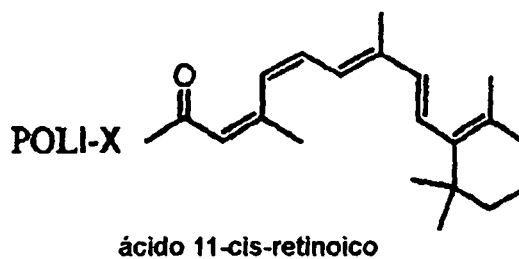
(II)



(III)

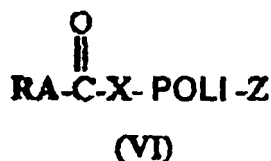


(IV)



(V)

Alternativamente, un producto conjugado de la invención puede poseer una estructura del siguiente tipo,




donde un extremo del polímero modificador está funcionalizado terminalmente con un grupo funcional, Z. El grupo funcional Z puede ser un grupo con protección terminal tal como alcoxi o benciloxi, o puede ser un grupo funcional reactivo tal como hidroxilo, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidrato de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, hidrazida, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxal, diona, mesilato, tosilato, tresilato, o equivalentes funcionales de los mismos.

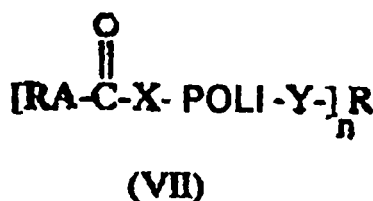
Los ejemplos específicos de los grupos funcionales terminales adecuados carbonato de succinimidilo (véanse p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.281.698, 5.468.478), amina (véase, p. ej., Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zaplisky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (véase, p. ej., Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, p. ej., Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pág. 170-181, Harris & Zaplisky Eds., ACS, Washington, DC, 1997; véase también la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.672.662), succinato de succinimidilo (véase, p. ej., Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) y Joppich et al. Macromol. Chem. 180:1381 (1979), éster de succinimidilo (véase, p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.650.234), éter de glicidilo (véase, p. ej., Pitha et al. Eur. J. Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (véase, p. ej., Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véase, p. ej., Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11:141 (1985); y Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehído (véase, p. ej., Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), Patente de los Estados Unidos Núm. 5.824.784, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.252.714), maleimida (véase, p. ej., Goodson et al. Bio/Technology 8:343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ortopiridil-disulfuro (véase, p. ej., Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314 (1993)), acrilol (véase, p. ej., Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.900.461).

En una realización, el producto conjugado caracterizado por tener la estructura generalizada (VI) anterior es uno en el que Z corresponde a



donde X' junto con el carbonilo es una conexión hidrolíticamente degradable y  representa el punto de anclaje al polímero. Tales productos conjugados son referidos en la presente memoria por tener una estructura de pesa donde un polímero central y típicamente lineal posee un retinoide anclado covalentemente a cada extremo. La realización concreta descrita inmediatamente antes se considera un producto conjugado polimérico homobifuncional cuando X y X' son idénticos, ya que ambos extremos del polímero están modificados para poseer funcionalidades que son iguales (de ahí el término "homo").

Asimismo se proporcionan en la presente memoria productos conjugados que tienen una estructura de múltiples brazos o ramificada tal como la siguiente:



La molécula del núcleo central está derivada de una molécula que tiene un número n de sitios funcionales capaces de anclarse a un número n de polímeros, POLI, por medio de una conexión, Y. Típicamente, tales productos

## ES 2 284 959 T3

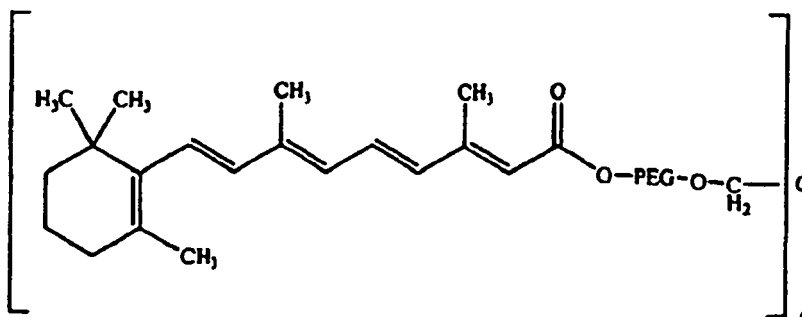
conjugados poseerán n valores que oscilan de aproximadamente 3 a 100, o más típicamente de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 o incluso de aproximadamente 3 a aproximadamente 10. R designa una molécula núcleo central que es preferiblemente no dendrítica tal como un poliol, una poliamina, o una molécula que tiene una combinación de grupos amino e hidroxilo. Los ejemplos de las moléculas núcleo específicas incluyen glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol, sorbitol, y lisina. RA, X y POLI se definen como antes (donde cada POLI se selecciona independientemente) e Y representa un conector. Preferiblemente, el peso molecular de R es menor de aproximadamente 2.000 Da.

Uno de tales productos conjugados particularmente preferidos posee la siguiente estructura:



donde PEG designa un polietilenglicol que tiene un PM de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 100.000 Da, o uno de los intervalos de peso molecular de PEG alternativos descritos antes.

En una realización de la invención donde el retinoide es ATRA, el producto conjugado poseerá la estructura mostrada más abajo.

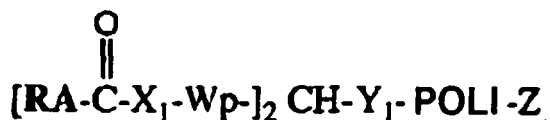


Un ejemplo específico de un producto conjugado polimérico en “forma de tenedor” ilustrativo de la invención se muestra más abajo:



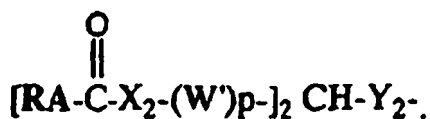
donde cada X<sub>1</sub> junto con el carbonilo forma una conexión hidrolíticamente degradable, p. ej., X<sub>1</sub> es un átomo o un grupo de átomos tales como O o S, Y<sub>1</sub> es un conector, tal como O, S o NH, cada p es independientemente 0 o 1, y cada W se selecciona independientemente del grupo formado por -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O<sub>2</sub>C-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, y -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, donde m y r son independientemente 1-10. Preferiblemente, cada p es 1 y cada W es -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, donde cada m es independientemente 1-10.

En una realización del producto conjugado polimérico en forma de tenedor anterior, Y<sub>1</sub> está unido a -POLI-Z, donde POLI es un polímero no peptídico, soluble en agua y Z es un grupo funcional tal como un grupo de protección terminal inerte como se ha descrito antes, p. ej.,



Alternativamente, Z puede ser un grupo funcional reactivo tal como hidroxilo, éster activo, carbonato activo, acetal, aldehído, hidrato de aldehído, alquenoilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, hidrazida, tiol, ácido carboxílico, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxal, diona, mesilato, tosilato, tresilato o equivalentes funcionales de los mismos.

Un producto conjugado polimérico en forma de tenedor homobifuncional ilustrativo es uno que tiene la estructura generalizada mostrada antes donde Z es



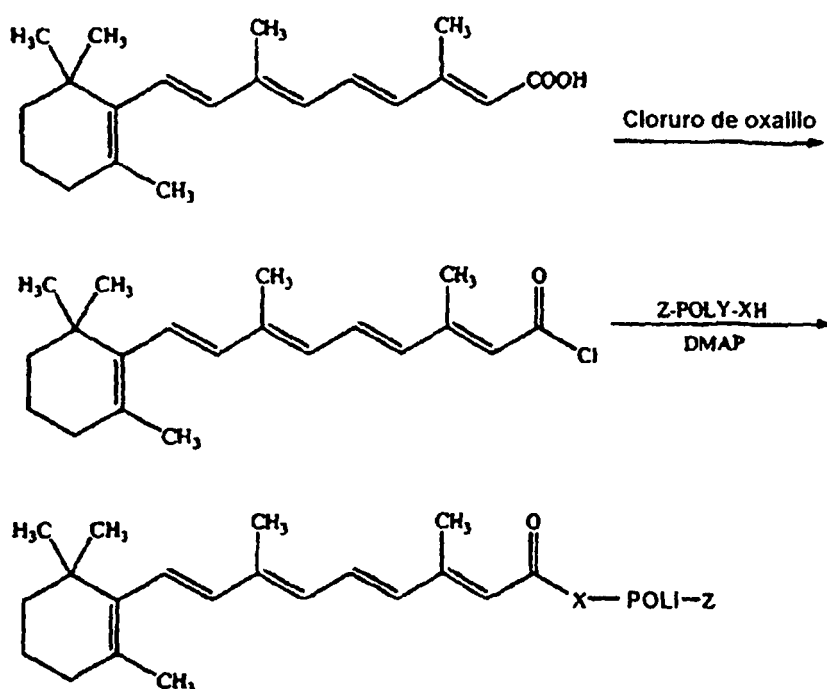
#### V. Métodos de Preparación

Un producto conjugado como se describe en la presente memoria se prepara utilizando los métodos de acoplamiento comúnmente empleados en la técnica. Un producto conjugado de polímero retinoide se puede formar, p. ej., haciendo reaccionar un polímero no peptídico y soluble en agua activado con un grupo funcional, p. ej., un hidroxilo o un tiol, que reacciona con un grupo ácido carboxílico o un ácido carboxílico activado tal como un haluro de ácido. En tales casos, el producto conjugado polimérico resultante es un profármaco de ácido retinoico que tiene, por ejemplo, una conexión éster o tioéster de ácido carboxílico entre el polímero y el radical ácido retinoico. Como se describe en los ejemplos adjuntos, para las reacciones de acoplamiento llevadas a cabo con ácido retinoico, la reacción se produce preferiblemente en presencia de una cantidad catalítica de reactivo de acoplamiento tal como N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-dimetilaminopiridina (DMAP). Las condiciones de reacción adecuadas para preparar un producto conjugado conectado con un éster mediante reacción de un polímero terminado en hidroxilo con el grupo carboxi del ácido retinoico puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica, p. ej., utilizando cualquiera de numerosas rutas tales como las descritas en "Comprehensive Organic Transformations", Larock R., VCH Publishers, 1989. Alternativamente, en las reacciones realizadas con una forma haluro de ácido de ácido retinoico, el haluro de ácido se puede formar haciendo reaccionar ácido retinoico con un haluro de oxalilo, tal como cloruro de oxalilo, que después se acopla al polímero como se ha descrito generalmente antes. La preparación de los productos conjugados conectados a amida o tioéster correspondientes también se puede realizar utilizando metodologías sintéticas convencionales.

El producto conjugado polimérico final producido es purificado generalmente y recogido mediante precipitación seguido de filtración y secado.

Un ejemplo de un esquema de reacción adecuado para preparar un producto conjugado de la invención se muestra más abajo, donde Z es un grupo protector terminal, POLI es un polímero no peptídico y soluble en agua, y X es O o S:

Esquema de Reacción I



## VI. Composiciones

Las composiciones de producto conjugado polímero-retinoide de la invención pueden ser administradas puras o en composiciones terapéuticas/farmacéuticas que contienen excipientes, disolventes, estabilizantes, etc., adicionales dependiendo del modo concreto de administración y de la forma de dosificación. Las rutas de administración específicas incluyen la oral, nasal, y pulmonar. Es muy preferida la ruta pulmonar, concretamente para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio, especialmente aquellas asociadas con el uso o la exposición al tabaco.

Las formulaciones farmacéuticas para la administración a mamíferos y preferiblemente a seres humanos comprenderá típicamente al menos un producto conjugado de PEG-retinoide de la invención junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, como se describirá con mayor detalle más abajo, concretamente para composiciones pulmonares. Las formulaciones de la presente invención son muy típicamente soluciones o suspensiones líquidas, mientras las formulaciones inhalables para la administración pulmonar son generalmente líquidas o en polvo, siendo generalmente preferidas las formulaciones en polvo. Las composiciones de retinoides modificados químicamente de la invención adicionales, aunque menos preferidas, incluyen jarabes, cremas, pomadas, comprimidos, y similares.

### A. Formulaciones Inhalables de Productos conjugados de Polímero Retinoide

Como se ha establecido antes, la ruta de administración para los productos conjugados de la invención es mediante inhalación en el pulmón. Los componentes de la formulación concreta, las características y los dispositivos de liberación se describirán ahora más completamente.

La cantidad de producto conjugado de retinoide en la formulación será aquella cantidad necesaria para liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de retinoide por dosis unitaria para lograr un efecto terapéutico deseado. En la práctica, ésta variará ampliamente dependiendo del retinoide concreto, de la porción de polímero del producto conjugado, de su actividad, de la afección que se vaya a tratar, etc. La composición contendrá generalmente en cualquier parte de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 99% en peso del producto conjugado polimérico, típicamente de aproximadamente 2% a aproximadamente 95% en peso de producto conjugado, y más típicamente de aproximadamente 5% a 85% en peso de producto conjugado, y también dependerá de las cantidades relativas de excipientes/aditivos contenidas en la composición: Más específicamente, la composición contendrá típicamente al menos aproximadamente uno de los siguientes porcentajes de producto conjugado: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en peso. Preferiblemente, las composiciones en polvo contendrán al menos aproximadamente 40%, p. ej., de aproximadamente 40-100% en peso de producto conjugado de polímero retinoide. Se entiende que se puede incorporar más de un retinoide a las formulaciones descritas en la presente memoria.

Las composiciones de la invención incluirán, en la mayoría de los casos, uno o más excipientes. Para las composiciones en polvo seco, se prefieren excipientes que tienen un punto de fusión elevado o aquellos que tienen una temperatura de transición vítrea elevada, p. ej., por encima de aproximadamente 35°C, preferiblemente por encima de aproximadamente 40°C, más preferiblemente por encima de 45°C, y muy preferiblemente de aproximadamente 55°C.

Son comúnmente empleados excipientes carbohidratados, ya sean solos o combinados con otros excipientes o aditivos. Los carbohidratos representativos para su uso en las composiciones e la invención incluyen azúcares, azúcares transformados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados, y polímeros de azúcares. Se prefieren los azúcares no reductores, azúcares que pueden formar una fase parcial o sustancialmente amorfa o vítrea cuando se combinan con un producto conjugado retinoide, y azúcares que poseen Tg relativamente elevadas (p. ej., Tg mayores de 40°C, preferiblemente mayores de 50°C, más preferiblemente mayores de 70°C, y muy preferiblemente que tienen Tg de 80°C y superiores).

Los excipientes adicionales incluyen aminoácidos, péptidos y concretamente oligómeros que comprenden 2-9 aminoácidos, y más preferiblemente 2-5 meros, y polipéptidos, todos los cuales pueden ser especies homo o hetero. Un aminoácido particularmente preferido es la leucina.

También es útil como excipiente un di- o tri-péptido que contiene dos o más restos leucilo, como se describe en la solicitud de patente Inhale Therapeutic System's International PCT/US00/09785. Uno de tales excipientes es la trileucina. Las formulaciones inhalables que contienen trileucina se describen en el Ejemplo 14.

Los poliaminoácidos, y en particular, aquellos que comprenden cualquiera de los aminoácidos descritos en la presente memoria, también son adecuados para su uso como excipiente. Se prefieren los poliaminoácidos tales como poli-lisina, poli-ácido glutámico, y poli(lys, ala).

Los excipientes y aditivos adicionales incluyen pero no están limitados a proteínas, polímeros no biológicos, y polímeros biológicos, que pueden estar presentes solos o combinados. Los excipientes adecuados son aquellos proporcionados en Inhale Therapeutic Systems' International Publication Núms. WO 96/32096 y 98/16205. Las composiciones también pueden incluir un tampón o un agente para el ajuste del pH.

Adicionalmente, una composición según la invención contendrá preferiblemente un captador de radicales libres tal como hidroxitolueno butilado (BHT), ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina A). Durante los experimentos realizados en apoyo de la presente invención, se descubrió que ciertas composiciones de PEG-retinoide,

p. ej., productos conjugados de PEG ATRA tales como PEG-5K-éster-ATRA, eran más propensos a la degradación (esto es, eran menos estables) que las composiciones del retinoide de origen no modificado, presumiblemente debido a la presencia de una pequeña cantidad de radicales libres en las composiciones de PEG-ATRA. La incorporación de un captador de radicales libres a la composición era eficaz para reducir sustancialmente o eliminar eficazmente la degradación inducida por radicales libres del producto conjugado.

Ventajosamente, las formulaciones de los productos conjugados de retinoides de la invención no requieren la incorporación de agentes solubilizantes o emulsionantes, debido a la naturaleza soluble en agua de los productos conjugados.

El uso de ciertas fosfatidilcolinas di-sustituídas para producir microestructuras perforadas (esto es, microesferas porosas, huecas) se describe con mayor detalle más abajo y se describe en el Ejemplo 15. Otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos adecuados para su uso en las composiciones según la invención se enumeran en “*Remington: The Science & Practice of Pharmacy*”, 19ª ed., Williams & Williams, (1995), y en “*Physician’s Desk Reference*”, 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998).

Generalmente, las composiciones farmacéuticas de la invención contendrán de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso de excipiente, preferiblemente de aproximadamente 5%-98% en peso de excipiente, más preferiblemente de aproximadamente 15-95% en peso de excipiente. Incluso más preferiblemente, la composición contendrá de aproximadamente 0-50% en peso de excipiente, más preferiblemente de 0-40% en peso de excipiente. En general, se desea una concentración de retinoide relativamente elevada (por ciento en peso) en la composición farmacéutica final. Típicamente, la cantidad óptima de excipiente/aditivo se determina experimentalmente, esto es, preparando composiciones que contienen cantidades variables de excipientes (que oscilan entre bajas y altas), examinando la estabilidad química y física del PEG-retinoide, la actividad del producto conjugado, su absorción desde el pulmón a la circulación, junto con las propiedades del aerosol de la composición, y explorando después el intervalo al cual se logra el funcionamiento óptimo del aerosol a la vez que se equilibran los otros factores mostrados antes.

#### B. Preparación de Polvos Secos

Las formulaciones de polvo seco de la invención que comprenden un producto conjugado de PEG-retinoide pueden ser preparadas mediante cualquiera de las numerosas técnicas de secado, y preferiblemente mediante secado por pulverización. El secado por pulverización de las formulaciones se lleva a cabo, por ejemplo, como se describe generalmente en “*Spray Drying Handbook*”, 5ª ed., K. Masters, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1991), y en las Publicaciones de Patente Internacionales Núms. WO 97/41833 (1997) y WO 96/32149 (1996) de Platz, R., *et al.*

Desde el punto de vista de la elaboración, las composiciones de producto conjugado de la invención se prefieren sobre otras composiciones de sus contrapartes de retinoide no modificadas por numerosas razones. Primero, debido a su insolubilidad en agua, los retinoides no modificados serían secados por pulverización o bien en forma de una suspensión o bien en un disolvente orgánico tal como etanol. El secado por pulverización en un disolvente orgánico puede no ser deseable debido a la generación de grandes volúmenes de vapores de desecho orgánicos inflamables y al potencial de explosión. Por otra parte, como se puede observar en el Ejemplo 13, utilizando parámetros de tratamiento convencionales, el secado por pulverización de un sólido de bajo punto de fusión tal como ATRA da como resultado la sublimación del compuesto a lo largo de todo el aparato de secado por pulverización, y la generación de un polvo que no fluye libremente. Estos problemas pueden ser evitados cuando se seca por pulverización un producto conjugado de retinoides de la invención, puesto que se pueden emplear soluciones de alimentación acuosas. Por otra parte, dependiendo de la elección del polímero, la porción de polímero del producto conjugado no solamente es eficaz para conferir solubilidad en agua al compuesto resultante, si no que también es eficaz al elevar el punto de fusión del producto conjugado, haciendo posible realizar el secado por pulverización utilizando parámetros de tratamiento convencionales. En segundo lugar, debido a su baja solubilidad en agua, no se pueden emplear formulaciones con una base acuosa para formular un retinoide no modificado. Esto es particularmente problemático para las formulaciones inhalables, puesto que los agentes requeridos para solubilizar un retinoide producen típicamente composiciones que no son adecuadas para la formación de aerosoles. Este problema se evita de un modo similar mediante el uso de un producto conjugado de la invención.

Una solución o suspensión de un producto conjugado de polímero retinoide puede ser secada por pulverización en una secadora por pulverización convencional, tal como las asequibles de proveedores comerciales tales como Niro A/S (Dinamarca), Buchi (Suiza) y similares, dando como resultado un polvo seco, dispersable como se demuestra en los Ejemplos. Las condiciones óptimas para el secado por pulverización de las soluciones de PEG-retinoide variarán dependiendo de los componentes de la formulación, y se determinan generalmente experimentalmente. El gas utilizado para secar por pulverización el material es típicamente aire, aunque también son adecuados gases inertes tales como nitrógeno o argón. Por otra parte, la temperatura tanto de entrada como de salida del gas utilizado no ocasiona la degradación o fusión del PEG-retinoide durante el procedimiento de secado por pulverización. Dependiendo del punto de fusión del producto conjugado, se selecciona una temperatura de entrada que produzca una temperatura de salida que sea al menos aproximadamente 10 grados o preferiblemente 15 grados más baja o más que la temperatura de fusión del producto conjugado. Preferiblemente, la temperatura de fusión del producto conjugado se determina primero para ayudar a una selección apropiada de la temperatura de salida y otros parámetros de tratamiento relevantes.

Las composiciones de polímero retinoide respirables que tienen las características descritas en la presente memoria pueden ser producidas también secando ciertos componentes de formulación lo que da como resultado la formación de un polvo de microestructura perforada como se describe en WO 99/16419. Los polvos de microestructura perforada comprenden típicamente microesferas huecas, secadas por pulverización que tienen una pared porosa relativamente fina que define un gran vacío interno. Los polvos de microestructura perforada pueden ser dispersados en un medio de suspensión seleccionado (tal como un agente de expansión no acuoso y/o fluorado) para proporcionar dispersiones estabilizadas antes del secado. El uso de microestructuras o productos microparticulados perforados (o porosos) con una densidad relativamente baja reduce significativamente las fuerzas de atracción entre las partículas, disminuyendo de ese modo las fuerzas de cizalla, incrementando la fluidez y la dispersabilidad de los polvos resultantes, y reduciendo la degradación por floculación, sedimentación o flotación de las dispersiones estabilizadas de las mismas.

Alternativamente, una composición de PEG-retinoide para la liberación pulmonar puede comprender partículas ligeras aerodinámicamente como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.136.295.

Una formulación en polvo de la invención también puede ser preparada mediante liofilización, secado a vacío, liofilización por pulverización, tratamiento de fluidos supercríticos (p. ej., como describen Hanna, *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 6.063.138), secado al aire, u otras formas de secado evaporativo.

Los polvos secos también pueden ser preparados combinando, triturando, tamizando o moliendo a chorro los componentes de la formulación en forma de polvo seco.

Una vez formada, una composición de polvo seco es mantenida preferiblemente en condiciones secas (esto es, humedad relativamente baja) con una exposición mínima al calor excesivo o luz durante la fabricación, el tratamiento, y el almacenamiento.

#### C. Rasgos de una Formulación de Polvo Seco Inhalable

Los polvos de la invención se caracterizan adicionalmente por varios rasgos, muy notablemente, uno o más de los siguientes: (i) dispersabilidades consistentemente elevadas, que se mantienen, incluso tras el almacenamiento, (ii) tamaños aerodinámicos de partícula pequeños (MMAD), (iii) valores mejorados de dosis de partícula fina, esto es, polvos que tienen un porcentaje superior de partículas de un tamaño menor de 3,3 micras MMAD, todo lo cual contribuye a la mejora de la capacidad del polvo para penetrar en los tejidos del tracto respiratorio inferior (esto es, los alvéolos) para la liberación localizada en el pulmón, o alternativamente, cuando se utiliza en el tratamiento de afecciones no respiratorias, absorción a la circulación sistémica. Estas características típicas de los polvos inhalables de la invención, que se van a describir más completamente más abajo, son importantes al maximizar la eficacia de la liberación en aerosol de tales polvos en el pulmón y el pulmón profundo.

Los polvos secos de la invención están compuestos por partículas susceptibles de constituir aerosoles eficaces para penetrar en los pulmones. Las partículas de la invención tienen un diámetro mediano de masa (MMD) de menos de aproximadamente 20-30  $\mu\text{m}$ , o menos de 20  $\mu\text{m}$ , o menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente menos de aproximadamente 7,5  $\mu\text{m}$ , y más preferiblemente menos de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ , e incluso menos de aproximadamente 3,5  $\mu\text{m}$ , y normalmente en el intervalo de 0,1  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los polvos preferidos están compuestos por partículas que tienen un MMD de aproximadamente 0,2 a 4,0  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, el polvo también contendrá partículas portadoras no respirables tales como lactosa, donde las partículas no respirables son típicamente mayores de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  (micras) de tamaño.

Los polvos de la invención se caracterizan adicionalmente por una distribución del tamaño de partícula en el aerosol de menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD), preferiblemente que tiene un MMAD menos de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente menos de 4,0  $\mu\text{m}$ , incluso más preferiblemente menos de 3,5  $\mu\text{m}$ , y muy preferiblemente menos de 3  $\mu\text{m}$ . Los diámetros aerodinámicos medianos de masa de los polvos oscilarán característicamente entre aproximadamente 0,1-10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre aproximadamente 0,2 - 5,0  $\mu\text{m}$  MMAD, more preferiblemente entre aproximadamente 1,0 - 4,0  $\mu\text{m}$  MMAD, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$ . Los diámetros aerodinámicos pequeños pueden lograrse generalmente mediante la combinación de condiciones de secado por pulverización optimizadas y la elección y la concentración de los excipientes.

Los polvos tendrán generalmente un contenido de humedad por debajo de aproximadamente 20% en peso, normalmente por debajo de aproximadamente 10% en peso, y preferiblemente por debajo de aproximadamente 5% en peso. Los polvos preferidos según la invención tienen un contenido en humedad que está por debajo de aproximadamente uno o más de los siguientes porcentajes en peso: 15%, 10%, 7%, 5%, o 3%. Semejantes sólidos que contienen poca humedad tienden a mostrar una mayor estabilidad tras el envasado y el almacenamiento.

Adicionalmente, los métodos de secado por pulverización y los estabilizantes y excipientes descritos en la presente memoria son eficaces para proporcionar formulaciones de producto conjugado polimérico altamente dispersables. Para las formulaciones en polvo, la dosis emitida (DE) de estos polvos es típicamente mayor del 30%, y normalmente mayor del 40%. Más preferiblemente, la DE de los polvos de la invención es mayor del 50%, y es a menudo mayor del 60%.

## D. Administración de la composición de Producto

## Conjugado

5 Las formulaciones de polímero-retinoide descritas en la presente memoria pueden ser liberadas directamente al pulmón utilizando cualquiera de los numerosos dispositivos de liberación. Por ejemplo, se puede emplear un inhalador de polvo seco (DPI), esto es, un dispositivo inhalador que utiliza el aliento inhalado del paciente como vehículo para transportar el fármaco en polvo seco a los pulmones. Se prefieren los dispositivos de inhalación de polvo seco de Inhale Therapeutic Systems' como los descritos por Patton, J.S., *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.458.135, 17 Oct. 1995; Smith, A. E., *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.740.794, 21 Abr. 1998; y Smith, A. E., *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.785.049, 28 Julio 1998. Cuando se administra utilizando un dispositivo de este tipo, el medicamento en polvo está contenido en un receptáculo que tiene una tapa perforable u otra superficie de acceso, preferiblemente un envase de burbuja o cartucho, donde el receptáculo puede contener una única unidad de dosificación o múltiples unidades de dosificación. Los métodos convenientes para llenar un gran número de cavidades (esto es, envases de dosis unitaria) con dosis medidas de medicamento en polvo seco son descritos p. ej., por Parks, D. J., *et al.*, Publicación de Patente Internacional WO 97/41031, 6 Nov. 1997, incorporada en la presente memoria como referencia. De este modo, en otro aspecto, la invención abarca una forma de dosificación unitaria de un producto conjugado de polímero-retinoide de la invención para su uso en un dispositivo inhalador.

20 Otros dispositivos de dispersión de polvo seco para la administración pulmonar de polvos secos incluyen aquellos descritos, por ejemplo por Newell, R. E., *et al.*, Patente Europea Núm. EP 129985, 7 Sept. 1988; Hodson, P. D., *et al.*, Patente Europea Núm. EP472598, 3 Julio 1996; Coccozza, S., *et al.*, Patente Europea Núm. EP 467172, 6 Abril 1994, y Lloyd, L.J. *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.522.385, 4 Junio 1996, incorporada en la presente memoria como referencia. También son adecuados para la liberación de polvos secos de PEG-retinoide los dispositivos de inhalación tales como Astra-Draco "TURBUHALER". Este tipo de dispositivo es descrito con detalle por Virtanen, R., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.668.218, 26 Mayo 1987; Wetterlin, K., *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.667.668, 26 Mayo 1987; y Wetterlin, K., *et al.* Patente de los Estados Unidos Núm. 4.805.811, 21 Feb. 1989. Otros dispositivos adecuados incluyen inhaladores de polvo tales como Rotahaler® (Glaxo), Discus® (Glaxo), Spiros® Inhaler (Dura Pharmaceuticals), y Spinhaler® (Fisons). También es útil el sistema DPI de múltiples dosis (MDDPI) que permite la liberación de más de una dosis terapéutica. Tales dispositivos son asequibles de AstraZeneca, GlaxoWellcome, y SkyePharma. También son adecuados los dispositivos que emplean el uso de un pistón para proporcionar aire para cualquier medicamento en polvo en suspensión, elevando el medicamento desde un tamiz portador haciendo pasar aire a través del tamiz, o mezclando aire con medicamento en polvo en una cámara de mezcla con la posterior introducción del polvo en el paciente a través de las piezas bucales del dispositivo, tal como describen Mulhauser, P., *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.388.572, 30 Sept. 1997.

Una composición de PEG-retinoide inhalable también puede ser liberada utilizando un inhalador de dosis medida presurizado, (MDI), p. ej., el inhalador de dosis medida de Ventolin®, que contiene una solución o suspensión de fármaco en un propelente líquido farmacéuticamente inerte, p. ej., un clorofluorocarbono o un fluorocarbono, como describen Laube, *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.320.094, 14 Junio 1994, y Rubsamen, R.M., *et al.* Patente de los Estados Unidos Núm. 5.672.581 (1994). Los dispositivos MDI son asequibles de proveedores tales como 3M Corporation, Aventis, Schering Plough y Vectura.

45 Alternativamente, los PEG-retinoides descritos en la presente memoria pueden ser disueltos o suspendidos en un disolvente, p. ej., agua o solución salina, y administrados mediante nebulización. Los nebulizadores para la liberación de una solución introducida en un aerosol incluyen AERx® (Aradigm), Ultravent® (Mallinkrodt), Pari LC Plus® o Pari LC Star® (Pari GmbH, Germany), DeVilbiss Pulmo-Aide, y Acorn II® (Marquest Medical Products).

Otro tipo de dispositivo que puede ser utilizado para liberar un producto conjugado de la invención en el pulmón es un dispositivo de pulverización líquida suministrado, p. ej., por Aradigm Corporation.

Alternativamente, se puede utilizar un dispositivo para aerosol electrohidrodinámico (EHD) para liberar un producto conjugado de retinoides en el pulmón.

55 Como se ha descrito previamente, los productos conjugados de polímero-retinoide descritos en la presente memoria también pueden ser administrados parenteralmente mediante inyección intravenosa, o menos preferiblemente mediante inyección intramuscular o subcutánea. Los componentes precisos de tales formulaciones pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica. Los tipos de formulación adecuada para la administración parenteral incluyen soluciones listas para la inyección, polvos secos para combinarlos con un disolvente antes de su uso, suspensiones listas para la inyección, composiciones insolubles secas para combinarlas con un vehículo antes de su uso, emulsiones y productos concentrados líquidos para su dilución antes de la administración. Por ejemplo, una solución inyectable de una composición de PEG-retinoide de la invención puede incluir la composición disuelta en un vehículo acuoso tal como cloruro de sodio acuoso, solución de Ringer, una solución de inyección de dextrosa, solución de Ringer con lactato añadido y similares, y puede incluir uno o más excipientes o aditivos farmacéuticamente aceptables como se ha descrito antes.

## VII. Utilidad

El producto conjugado polimérico de la invención puede ser utilizado para tratar cualquier afección sensible al ácido retinoico en mamíferos, incluyendo seres humanos. Las afecciones sensibles a la terapia con retinoides y que pueden ser tratadas o aliviadas mediante la administración de un producto conjugado según la invención incluyen afecciones de la piel tales como acné, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, bronquitis crónica, asma, enfisema, y cánceres aerodigestivos tales como los de cabeza y cuello. Una afección preferida para el tratamiento es el enfisema, concretamente mediante administración pulmonar de una formulación inhalable de un producto conjugado polimérico de la invención.

Los enfoques de la administración pulmonar pueden proporcionar la liberación localizada directa de un retinoide tal como ATRA en el tejido diana. Por otra parte, se ha demostrado que los productos conjugados de la invención, cuando son liberados en el pulmón, permanecen a concentraciones medibles durante un período prolongado en el tejido pulmonar en lugar de ser rápidamente adsorbidos a la circulación, demostrando adicionalmente la utilidad de este enfoque.

Generalmente, un método para el tratamiento o la profilaxis comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto conjugado polimérico de ácido retinoico como se ha descrito antes. La cantidad de la dosificación terapéuticamente eficaz de cualquier producto conjugado específico variará algo entre producto conjugado y producto conjugado, entre paciente y paciente, y dependerá de factores tales como la afección y el tamaño del paciente, la capacidad de carga del producto conjugado polimérico, y la ruta de liberación. Las dosificaciones de los paciente habituales de los cis- retinoides cuando se administran oralmente o mediante inyección oscilan entre aproximadamente 0,1 microgramos y aproximadamente 10 miligramos, preferiblemente entre aproximadamente 1,0 microgramos y aproximadamente 1,0 miligramos, y más preferiblemente entre aproximadamente 100 microgramos y aproximadamente 300 microgramos. La administración de un producto conjugado de cis-retinoide en el pulmón puede reducir la dosis requerida entre aproximadamente 2 veces y aproximadamente 100 veces; de este modo los intervalos de dosificación apropiados para los productos conjugados de la invención pueden ser calculados de acuerdo con esto; basándose en la dosis de retinoide en lugar de la dosis total del producto conjugado liberado.

Los siguientes ejemplos ilustran, pero en modo alguno se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

**Ejemplos***Materiales y Métodos*

El ácido retinoico se obtuvo de Aldrich (St. Louis, MO).

Todos los reactivos de PEG referidos en los ejemplos adjuntos son asequibles de Shearwater Corporation of Huntsville, AL.

Todos los datos de RMNH<sup>1</sup> fueron generados por medio de un espectrómetro de RMN a 300 o 400 MHz fabricado por Bruker.

*Mediciones del tamaño de partícula (Horiba):* Los diámetros medios de partícula (MMD) de los polvos fueron medidos utilizando un analizador del tamaño de partículas Horiba CAPA-700 (Horiba Instruments Inc., Irvine, CA). Las mediciones se basaron en la sedimentación centrífuga de las partículas dispersas en el medio de suspensión. El diámetro medio, que se basa en el diámetro de partícula de Stokes, fue calculado utilizando la densidad de la partícula y la densidad y viscosidad del medio de suspensión.

La densidad del polvo se ajustó a 1,5 g/cm<sup>3</sup> para todos los polvos. (Este valor nominal se utilizó para todos los polvos analizados y está dentro del intervalo que es típico para los polvos secados por pulverización). Las mediciones del tamaño de partícula se llevaron a cabo con aproximadamente 5 - 10 mg de polvo suspendido en 5 ml de Sedisperse A-11 (Micromeritics, Norcross, GA) y se dispersaron mediante sonicación durante 10 minutos. El intervalo sobre el cual que acumulaban los datos del tamaño de partícula se ajustó de 0,4 a 10,0  $\mu$ m.

*Mediciones del Tamaño de Partícula Aerodinámico*

*Impactador de Cascada de Andersen:* Se utilizó un impactador de cascada Andersen (un aparato de tipo tamiz con una serie de fases que capturan partículas sobre placas mediante impactación inercial según su tamaño) para determinar el MMD y la distribución del tamaño de partícula de formulaciones en polvo introducidas en aerosoles en una corriente de aire. Las placas fueron pesadas antes y después del ensayo y la masa de polvo depositada sobre la placa de cada fase fue determinada. A menos que se indique de otro modo, se acometieron estudios utilizando un impactador en cascada de Andersen tradicional que tenía ocho fases (de la parte superior a la inferior fases 0 a 7) con tamaños de corte que oscilaban entre 9,0 y 0,4  $\mu$ m, y una fase de filtro final que atrapa las partículas < 0,4  $\mu$ m cuando se hace funcionar a una velocidad de flujo de 28,3 L/min. El ajuste de ensayo del dispositivo era similar al ensayo DE, excepto que se unían el impactador en cascada y un cuello USP (United States Pharmacopia) (USP 23, capítulo <601>) a la pieza bucal del dispositivo en lugar de un filtro. Se llevaron a cabo típicamente múltiples dispersiones para cada impacto en cascada realizado para lograr datos gravimétricamente exactos.

## ES 2 284 959 T3

Los siguientes ejemplos demuestran la preparación de productos conjugados poliméricos de los retinoides ejemplares, ácido cis y trans-retinoico. Los productos conjugados se prepararon utilizando PEG de diversas geometrías y pesos moleculares. Se prepararon productos conjugados ejemplares que tenían geometrías lineales, en forma de tenedor o ramificadas con pesos moleculares de PEG totales que oscilaban entre 2kD y 20 kD. Los productos conjugados representativos fueron sintetizados para que contuvieran una conexión éster que acoplara los brazos del polímero al radical retinoide. Los datos de la hidrólisis que demostraban el rasgo de la conexión hidrolíticamente degradable de los productos conjugados tanto en tampón como en suero se proporcionan en los Ejemplos 9 y 10.

### Ejemplo 1

#### *Preparación de Producto Conjugado de mPEG (5 kDa) éster de ATRA*

La síntesis de un producto conjugado de PEG-ácido retinoico ejemplar utilizando un PEG lineal que tenía un peso molecular de 5 kD se describe más abajo.

En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 400 mg de ATRA (1,33 mmoles, Aldrich) en 60 ml de benceno anhidro. A esta solución se añadieron 3 ml de cloruro de oxalilo en cloruro de metileno (2 M). La solución se agitó durante dos horas en argón en ausencia de luz. El disolvente se separó después mediante evaporación rotatoria y el residuo se secó adicionalmente a vacío. Al residuo seco se añadieron 3,2 gramos de metoxi-PEG seco (5 kDa) en 60 ml de benceno anhidro seguido de 200 mg de dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se separó por filtración, el producto filtrado se evaporó a vacío y el jarabe residual se añadió a 80 ml de éter etílico. El producto precipitado resultante se recogió mediante filtración, se lavó con éter, y se secó a vacío. El producto se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa sobre una columna C4 (Delta-Pak 15Um 100 A, 25x100 mm) eluida con un gradiente de agua/acetonitrilo. RMN  $H^1$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (t,  $PEGOCH_2CH_2OCO-ATRA$ ), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace) 1,01 (s,  $2CH_3$ ), 1,68 (s,  $CH_3$ ), 1,99 (s,  $CH_3$ ), 2,30 (s,  $CH_3$ ).

### Ejemplo 2

#### *Preparación de Producto Conjugado de mPEG (20 kDa) Ester de ATRA*

Más abajo se describe la síntesis de un producto conjugado ejemplar utilizando un PEG lineal que tenía un peso molecular de 20 kD.

En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 300 mg de ATRA (1 mmol, Aldrich) en 20 ml de benceno anhidro. A esta solución se añadieron 2,2 ml de cloruro de oxalilo en cloruro de metileno (2 M). La solución se agitó durante dos horas en ausencia de luz. El disolvente se separó después mediante evaporación rotatoria y el residuo se secó adicionalmente a vacío. Al residuo seco se añadieron 10 gramos de mPEG seco de 20 kDa en 120 ml de una mezcla de cloruro de metileno anhidro y benceno (1/1) seguido de 150 ml de dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se separó por filtración, el producto filtrado se evaporó a vacío, y el jarabe residual se añadió a 300 ml de éter etílico. El producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con éter, y se secó a vacío. El producto se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa sobre una columna C4 (Delta-Pak 15Um 100 A, 25x100 mm) eluida con un gradiente de agua/acetonitrilo. RMN  $H^1$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (t,  $PEGOCH_2CH_2OCO-ATRA$ ), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace) 1,01 (s,  $2CH_3$ ), 1,68 (s,  $CH_3$ ), 1,99 (s,  $CH_3$ ), 2,30 (s,  $CH_3$ ).

### Ejemplo 3

#### *Preparación de Producto Conjugado de mPEG (2 kDa) Ester de ATRA*

Más abajo se describe la síntesis de un producto conjugado ejemplar utilizando un PEG lineal que tiene un peso molecular de 2 kD.

En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 200 mg de ATRA (0,66 mmoles, Aldrich) en 20 ml de benceno anhidro. A esta solución se añadieron 1,5 ml de cloruro de oxalilo en cloruro de metileno (2 M). La solución se agitó durante dos horas en argón en ausencia de luz. El disolvente se separó después mediante evaporación rotatoria y el residuo se secó adicionalmente a vacío. Al residuo seco se añadieron 0,64 g de mPEG seco (monometil éter de PEG, metoxi-PEG-OH) de 2kDa en 20 ml de benceno anhidro seguido de 120 mg de dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se separó por filtración, el producto filtrado se evaporó a vacío, y el jarabe residual se añadió a 60 ml de éter etílico. El producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con éter, y se secó a vacío. RMN  $H^1$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (t,  $PEGOCH_2CH_2OCO-ATRA$ ), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace) 1,01 (s,  $2CH_3$ ), 1,68 (s,  $CH_3$ ), 1,99 (s,  $CH_3$ ), 2,30 (s,  $CH_3$ ).

## ES 2 284 959 T3

### Ejemplo 4

#### *Preparación de Producto Conjugado de PEG (20kDa) di-Ester de ATRA*

5 ATRA-C(O)-O-PEG 20 kD-O-(O)C-ATRA

Más abajo se describe la síntesis de un producto conjugado ejemplar utilizando un reaccionante de PEG lineal homobifuncional (diol de PEG) que tiene un peso molecular de 20 kD. El producto conjugado resultante se caracteriza por tener estructura de pesa.

10

En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 300 mg de ATRA (1 mmol, Aldrich) en 20 ml de benceno anhidro. A esta solución se añadieron 2,2 ml de cloruro de oxalilo en cloruro de metileno (2 M). La solución se agitó durante dos horas en argón en ausencia de luz. El disolvente se separó después mediante evaporación rotatoria y es residuo se secó adicionalmente a vacío. Al residuo seco se añadieron 5 g de diol de PEG, 20 kDa, en 20 ml de benceno anhidro seguido de 150 mg de dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se separó mediante filtración, el producto filtrado se evaporó a vacío, y el jarabe residual se añadió a 120 ml de éter etílico. El producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con éter, y se secó a vacío. RMN H<sup>1</sup> (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (t, PEGOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO-ATRA), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace) 1,01 (s, 2CH<sub>3</sub>), 1,68 (s, CH<sub>3</sub>), 1,99 (s, CH<sub>3</sub>), 2,30 (s, CH<sub>3</sub>).

20

### Ejemplo 5

#### *Preparación de Producto Conjugado de PEG de 4 brazos de 20 kDa Ester de ATRA*

25 C-[CH<sub>2</sub>O-PEG-O(O)C-ATRA]<sub>4</sub>

Más abajo se proporciona la síntesis de un producto conjugado de múltiples brazos o ramificado caracterizado por cuatro brazos de PEG que tienen un peso molecular de aproximadamente 5 kD y que se extienden desde un núcleo de pentaeritritol central. De este modo, la estructura completa del producto conjugado se caracteriza por un núcleo central a partir del cual se extienden cuatro brazos de PEG cada uno con un ácido retinoico acoplado al extremo mediante un enlace éster, y que tiene un peso molecular total de aproximadamente 20 kD.

30

En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 200 mg de ATRA (0,66 mmoles, Aldrich) en 20 ml de benceno anhidro. A esta solución se añadieron 2,2 ml de cloruro de oxalilo en cloruro de metileno (2 M). La solución se agitó durante dos horas en argón en ausencia de luz. Después se separó el disolvente mediante evaporación rotatoria y el residuo se secó adicionalmente a vacío. Al residuo seco se añadieron 1,6 g de PEG de 4 brazos seco de 20 kDa, C-[CH<sub>2</sub>O-PEG-OH]<sub>4</sub> (Shearwater Corporation, Catalogue 2001, Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications, página 5) en 20 ml de benceno anhidro y después 120 mg de dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se separó mediante filtración, el producto filtrado se evaporó a vacío, y el jarabe residual se añadió a 60 ml de éter etílico. El producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con éter, y se secó a vacío. RMN H<sup>1</sup> (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (t, PEGOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO-ATRA), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace) 1,01 (s, 2CH<sub>3</sub>), 1,68 (s, CH<sub>3</sub>), 1,99 (s, CH<sub>3</sub>), 2,30 (s, CH<sub>3</sub>).

40

### Ejemplo 6

45

#### *Preparación de Producto Conjugado de Benciloxi-PEG de 5 kDa Ester de ATRA*

Más abajo se describe la síntesis de un producto conjugado ejemplar utilizando un PEG lineal que tiene un peso molecular de 5 kD y protegido terminalmente con un grupo benciloxi.

50

En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 50 mg de ATRA (0,166 mmoles, Aldrich), 0,7 g de benciloxi-PEG-OH de 5 kDa, 40 mg de DCC, 30 mg de HOBt y 10 mg de DMAP en 10 ml de cloruro de metileno anhidro. La solución se agitó durante la noche a la temperatura ambiente en argón en ausencia de luz. El disolvente se separó después mediante evaporación rotatoria y el residuo se disolvió parcialmente en 10 ml de 1,4-dioxano. La materia insoluble se separó por filtración y el disolvente se separó parcialmente a vacío. El jarabe resultante se añadió a 60 ml de éter etílico. El producto precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con éter, y se secó a vacío. RMN H<sup>1</sup> (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (t, PEGOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO-ATRA), 4,48 (s, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-), 7,32 (m, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace) 1,01 (s, 2CH<sub>3</sub>), 1,68 (s, CH<sub>3</sub>), 1,99 (s, CH<sub>3</sub>), 2,30 (s, CH<sub>3</sub>).

55

### Ejemplo 7

#### *Preparación de Producto Conjugado de PEG de 4 brazos de 10 kDa Ester de ATRA*

65 C-[CH<sub>2</sub>O-PEG-O(O)C-ATRA]<sub>4</sub>

Más abajo se describe la síntesis de un producto conjugado de múltiples brazos o ramificado ejemplar caracterizado por cuatro brazos de PEG cada uno con un peso molecular aproximado de aproximadamente 2,5 kD y que se extiende desde un núcleo de pentaeritritol central. La estructura total del producto conjugado se caracteriza por un núcleo central

## ES 2 284 959 T3

a partir del cual se extienden cuatro brazos de PEG cada uno con un ácido retinoico acoplado al extremo mediante una conexión éster, y con un peso molecular total de aproximadamente 10 kD.

5 En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 200 mg de ATRA (0,66 mmoles, Aldrich) en 20 ml de benceno anhidro. A esta solución se añadieron 100  $\mu$ l de cloruro de oxalilo. La solución se agitó durante dos horas en argón en ausencia de luz. El disolvente se separó por evaporación rotatoria y el residuo se secó adicionalmente a vacío. Al residuo seco se añadió 1 g de PEG de 4 brazos de 10 kDa seco, C-[CH<sub>2</sub>O-PEG-OH]<sub>4</sub> en 20 ml de benceno y 100 mg de dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se separó por filtración, el disolvente se separó a vacío, y el jarabe se añadió a 60 ml de éter etílico. El producto precipitado se recogió mediante filtración, se lavó con éter, y se secó a vacío. RMN H<sup>1</sup> (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (t, PEGOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO-ATRA), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace), 1,01 (s, 2CH<sub>3</sub>), 1,68 (s, CH<sub>3</sub>), 1,99 (s, CH<sub>3</sub>), 2,30 (s, CH<sub>3</sub>).

### Ejemplo 8

15 *Preparación de Producto Conjugado de PEG en forma de Tenedor de 5kDa-Ester de ATRA*



25 En este ejemplo, se describe la síntesis de un producto conjugado polimérico en forma de tenedor que tiene una cadena de PEG central a partir de la cual se extienden dos radicales de ATRA que se extienden desde un punto de la rama hidrolíticamente estable del polímero o conector polimérico (esto es, el grupo CH). El ATRA está acoplado a la estructura de polímero en forma de tenedor por medio de conexiones éster hidrolizables.

30 En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 300 mg de ácido retinoico todo trans (1 mmol, Aldrich) en 20 ml de benceno anhidro. A la solución resultante se añadieron 2,2 ml de cloruro de oxalilo en cloruro de metileno (2 M) a 0°C. La solución se agitó durante dos horas en argón en ausencia de luz. El disolvente se separó después por evaporación rotatoria y el residuo se secó adicionalmente a vacío. Al residuo seco se añadieron 1,5 g de 2-mPEGiloxi-1,3-propanodiol (5 kDa) seco en 20 ml de benceno anhidro seguido de 150 mg de dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se separó por filtración, el producto filtrado se evaporó a vacío, y el jarabe residual se añadió a 120 ml de éter etílico. El producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con éter en exceso, y se secó a vacío. RMN H<sup>1</sup> (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (dx, MeO-PEGOCH(CH<sub>2</sub>OCO-ATRA)<sub>2</sub>), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace) 1,01 (s, 2CH<sub>3</sub>), 1,68 (s, CH<sub>3</sub>), 1,99 (s, CH<sub>3</sub>), 2,30 (s, CH<sub>3</sub>).

### Ejemplo 9

*Tasa de Hidrólisis del Producto Conjugado de Ester de mPEG de 5 kDa Ester de ATRA en Tampón*

45 Se determinó la tasa de hidrólisis en tampón de un producto conjugado de PEG-ATRA ejemplar según la invención a dos temperaturas diferentes, la temperatura ambiente y la temperatura corporal.

50 Se disolvió MPEG de 5 kDa ATRA (véase el Ejemplo 1) en tampón fosfato (0,1M, pH 7,0) a una concentración de 0,5% en peso a temperaturas de 23°C y 37°C. A intervalos cronometrados, se separaron alícuotas para su análisis mediante HPLC en fase reversa analítica. Se obtuvieron las vidas medias de hidrólisis utilizando cinéticas de pseudo-primer orden. Como se muestra en la Fig. 1, la vida media (t<sub>1/2</sub>) de la hidrólisis a 23°C era de aproximadamente 3.500 horas, mientras la vida media a 37°C era de aproximadamente 877 horas. Estos resultados demuestran la naturaleza hidrolizable de estos productos conjugados acoplados a éster concretos para liberar el compuesto retinoide de origen. De este modo, estos productos conjugados se pueden caracterizar como formas profármaco solubles en agua de retinoides.

### Ejemplo 10

60 *Estudio de Hidrólisis de Producto Conjugado de mPEG de 5 kDa-éster de ATRA en suero de rata*

65 Para complementar los datos del tampón del Ejemplo 9 anterior, se determinó la tasa de hidrólisis del mismo producto conjugado de PEG-ATRA ejemplar anterior a 37°C para proporcionar una estimación de la velocidad de hidrólisis en condiciones que representaran más íntimamente aquellas encontradas por tales productos conjugados en el organismo.

Se disolvió mPEG de 5kDa-ATRA (80 mg) (véase el Ejemplo 1) en 5 ml de suero de rata y la solución resultante se incubó a 37°C. A intervalos cronometrados, se retiraron 0,7 ml de la mezcla ATRA/suero y se extrajeron dos veces

## ES 2 284 959 T3

con 2 ml de diclorometano. El extracto de diclorometano se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, y se evaporó a vacío. Se añadió agua al residuo seco y la mezcla resultante se filtró. El producto filtrado se analizó en cuanto a PEG ATRA y PEG mediante HPLC en fase reversa (Betasil C18, 100x2,). Como se muestra en la Fig. 2, la vida media (t<sub>1/2</sub>) de la hidrólisis era de aproximadamente 2,5 horas.

5

De nuevo, estos resultados apoyan adicionalmente la naturaleza hidrolizable de los productos conjugados de éster según la invención, y que con el transcurso del tiempo permite la administración pulmonar de tales productos conjugados. Tales productos conjugados se hidrolizarán probablemente a lo largo de un período prolongado de horas cuando estén presentes en el pulmón para liberar el retinoide de origen. Tales perfiles son particularmente atractivos para la terapia por inhalación por medio del tratamiento localizado de enfermedades del tracto respiratorio.

10

### Ejemplo 11

*Recuperación de ATRA y Producto Conjugado de mPEG (5 kD) Ester de ATRA en Plasma y Tejido Pulmonar Después de la Instilación Traqueal en Ratas Macho*

15

El siguiente estudio en ratas se realizó para determinar las concentraciones en plasma y tejido pulmonar de ácido todo-trans-retinoico no PEGilado (ATRA de control) versus un ácido todo-trans-retinoico PEGilado, Producto Conjugado de mPEG de (5kD) Ester de ATRA, tras la instilación intratraqueal en ratas macho.

20

*Animales:* Hilltop Lab Animals Inc (P.O. Box 183, Scottdale, PA 15683) suministró ratas Sprague Dawley previamente canuladas (catéter en la vena yugular [JVC]) (350-375 gramos). El sistema de ensayo incluía 2 ratas macho seleccionadas al azar para cada uno de los 6 grupos de ensayo.

25

*Muestras de ATRA y PEG-ATRA:* Se suministró Acido Todo Trans-retinoico PEGilado en forma de polvo que contenía 50% en peso de ATRA (Artículo de Control). El polvo se almacenó a -20°C y se protegió de la luz. Se proporcionó producto conjugado de metoxi PEG (5kD) éster de ATRA (Artículo de Ensayo) en forma de polvo que contenía el 5% en peso de ATRA que se almacenó a -20°C y se protegió de la luz.

30

*Soluciones de Partida:* Las soluciones de partida para la dosificación se prepararon como sigue.

Solución de Partida de ATRA/Control (2,0 mg/ml de Partida): Se añadieron 3,0 mL de PBS a 6,0 mg del polvo de ATRA. Esta solución se dosificó en forma de una suspensión a las ratas después de la sonicación y el vórtice.

35

Producto conjugado de metoxi PEG (5kD) éster de ATRA (20,0 mg/mL Partida): Se añadieron 3,0 mL de PBS a 60,0 mg del polvo de producto conjugado de metoxi PEG (5kD) éster de ATRA.

40

*Instilación Intratraqueal:* La administración de los artículos de control y de ensayo se logró mediante instilación intratraqueal con iluminación amarilla. Las ratas fueron anestesiadas ligeramente utilizando isoflurane el 3,0-5,0% inhalado mezclado con oxígeno en una cámara de anestesia de plexiglas. La dosis se administró insertando una aguja de gavage equipada con una jeringa de 1 mL en la boca de la rata debajo de la tráquea hasta justo encima de la carina. La dosis se administró en los pulmones utilizando este método, y después la aguja de gavage se separó. El animal se colocó de nuevo en su jaula y se dejó que se recuperara de la anestesia por sí solo tras el procedimiento de dosificación.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

## ES 2 284 959 T3

Las ratas recibieron las siguientes dosis:

Núm. de Grupo	Artículo de Control/Ensayo	Número de Animales/Género	Tiempo de Sacrificio (min)	Dosis Diaria Total de Acido todo-trans-retinoico ( $\mu\text{g}/\text{animal}$ )
1	Acido Todo-Trans-Retinoico	2M	5	300
2	Acido Todo-Trans-Retinoico	2M	60	300
3	Acido Todo-Trans-Retinoico	2M	120	300
4	PEG 5K Acido Todo-Trans-Retinoico	2M	5	300
5	PEG 5K Acido Todo-Trans-Retinoico	2M	60	300
6	PEG 5K Acido Todo-Trans-Retinoico	2M	120	300

Se administraron a las ratas 354  $\mu\text{g}$  IT (1,2  $\mu\text{moles}$ ) de RA o 300  $\mu\text{g}$  (1  $\mu\text{mol}$ ) de ATRA equivalente de mPEGSK-ATRA.

*Recogida de Sangre:* Se recogieron muestras de sangre de aproximadamente 3,0 ml antes de la dosis del catéter de la vena yugular en tubos de plasma heparinizado. En el momento de sacrificio designado para cada animal se indujo un plano quirúrgico de anestesia utilizando isoflurane al 3,0-5,0% inhalado mezclado con oxígeno. Una vez que se hubo alcanzado la anestesia de plano quirúrgico, se recogió sangre terminal. Las muestras de plasma fueron protegidas de la luz solar y la luz blanca y se almacenaron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Recogida de Pulmón:* Su realizó una punción del diafragma después de la recogida de sangre terminal. La tráquea de la rata se expuso y las costillas se separaron permitiendo el acceso a los pulmones. El corazón y los pulmones se separaron en bloque. Una vez que los pulmones fueron extirpados el corazón y cualquier tejido conectivo restante se separaron. Los pulmones se protegieron de la luz solar y de la luz blanca, se envolvieron en papel de aluminio y se congelaron instantáneamente utilizando nitrógeno líquido, y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se extrajeron ATRA y PEG-ATRA del pulmón de rata completo pesando primero y transfiriendo el pulmón de rata a un vial de color ámbar y cortando el pulmón en pequeños trozos. Después se añadió agua de calidad HPLC al tenido de pulmón cortado, la muestra se colocó en un baño de hielo, y después del tejido se homogeneizó y se sometió a sonicación. La muestra resultante se transfirió a un tubo de centrifuga al cual se añadió etanol, y la muestra se sometió a vórtice durante aproximadamente un minuto, seguido de centrifugación durante 30 minutos a 14.000 RPM a  $2-8^{\circ}\text{C}$ . La muestra se analizó después mediante HPLC.

*Análisis de la Muestra:* Las muestras de plasma y tejido de pulmón se analizaron en cuanto a las concentraciones de ácido todo trans-retinoico mediante picogramas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para

## ES 2 284 959 T3

el tejido de pulmón y mediante una técnica de cromatografía de líquidos en tándem con espectrofotometría de masas (LC-MS-MS) para las muestras de plasma. El análisis de HPLC se realizó utilizando un aparato Waters 2690 HPLC y una columna Vydac C18 4,6 x 250 mm.

5 Se prepararon soluciones normalizadas de diversas concentraciones conocidas de PEG-ATRA disuelto en agua y ATRA disuelto en etanol y se utilizaron para formar muestras de matriz de pulmón de preparaciones de pulmón de rata homogeneizadas como se ha descrito antes. Para preparar las muestras de matriz de pulmón para el análisis, se añadieron a las muestras homogeneizadas de pulmón de rata completo volúmenes conocidos de las soluciones patrón anteriores. Las muestras fueron analizadas para proporcionar una indicación del contenido de retinoide en tejido de pulmón en diversos momentos después de la administración IT tanto de ATRA como de PEG-ATRA.

15 Los resultados (resumidos gráficamente en la Fig. 3) indicaban que se lograban localmente niveles sostenidos y razonablemente altos de ATRA correspondientes de PEG ATRA en el tejido de pulmón después de la liberación en el pulmón, y que los niveles sistémicos elevados de retinoides se minimizaban. Más específicamente, los datos de la HPLC sugieren que PEG-ATRA es retenido en el pulmón en más de un 70% de la dosis durante al menos 2 horas después de la administración. El ATRA (no PEGilado) también se mantenía en el pulmón (Fig. 3), pero en un grado menor que su contraparte pegilada.

20 El análisis del plasma de rata transcurrido un tiempo de una hora mostraba que la concentración de ácido retinoico en plasma (ATRA) era de aproximadamente 145 ng/ml para la formulación de ATRA no PEGilado mientras la concentración de ácido retinoico en plasma era de aproximadamente 65 ng/ml para la formulación de ATRA PEGilado. Estos resultados junto con las concentraciones en tejido de pulmón mostrados en la Fig. 3 indican que los retinoides modificados con polímero tales como ATRA PEGilado son retenidas en el pulmón a lo largo de un período de tiempo más prolongado y a concentraciones significativamente superiores que sus contrapartes no modificadas con polímero.

25 Ejemplo 12

*Preparación de Producto Conjugado de mPEG (5 kDa) de Acido 13-cis-Retinoico (13-cis-RA) por medio de una Conexión Ester*

30 En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 156 mg de ácido 13-cis-retinoico (1,33 mmoles, Aldrich) en 25 ml de benceno anhidro. A esta solución se añadieron 1,9 ml de cloruro de oxalilo en cloruro de metileno (2 M). La solución se agitó durante dos horas en argón en ausencia de luz. El disolvente se separó después mediante evaporación rotatoria a 40°C y el residuo se secó adicionalmente a vacío. Al residuo seco se añadieron 2 gramos de metoxi-PEH-OH seco (5 kDa) en 25 ml de benceno anhidro seguido de 125 mg de dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se agitó a la temperatura ambiente durante la noche. El producto precipitado se separó por filtración, el producto filtrado se evaporó a vacío y el jarabe residual se añadió a 50 ml de éter etílico. El producto precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con éter, y se secó a vacío. Rendimiento: 1,99 g. RMN  $H^1$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,5 (m ancho, PEG), 4,15 (t, PEGOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO-13-cis-RA), 5,8-7,1 (M, H en doble enlace), 1,02 (s, 2CH<sub>3</sub>), 1,69 (s, CH<sub>3</sub>), 1,99 (s, CH<sub>3</sub>).

Ejemplo 13

*Secado por Pulverización de ATRA*

45 El siguiente experimento se realizó para explorar los rasgos de una formulación de ácido retinoico secada por pulverización.

50 Se disolvió ácido todo-trans-retinoico (2,997 g) en 255 mL de etanol para formar una suspensión de color amarillo fina (no todo el ATRA disuelto) que después se secó por pulverización utilizando una secadora por pulverización Bucci que funcionaba a una temperatura de entrada de 98°C y una temperatura de salida de 71°C utilizando nitrógeno como gas de alimentación. El polvo secado por pulverización se recuperó con un rendimiento de aproximadamente el 65%. Sin embargo, una cantidad significativa del ácido retinoico brillantemente coloreado se acumulaba en todo el aparato de secado por pulverización durante el secado por pulverización de la solución introducida, presumiblemente debido a la sublimación del compuesto durante el procedimiento de secado por pulverización.

60 Las bajas temperaturas de fusión y sublimación de los retinoides, y en particular de ATRA, hacen algo problemático el secado por pulverización del compuesto no modificado cuando se utilizan condiciones de secado por pulverización convencionales.

Ejemplo 14

*Polvo de PEG-Acido Retinoico Secado por pulverización Adecuado para la Inhalación*

65 Se formuló un producto conjugado de PEG-retinoide ilustrativo, producto conjugado de mPEG (5kD) éster de ATRA, en forma de un polvo seco para inhalación. Para ciertas formulaciones en polvo seco, se utilizó trileucina como excipiente ejemplar para intensificar las propiedades de aerosol y la estabilidad.

## ES 2 284 959 T3

La formulación de polvo seco inhalable se preparó como sigue: se disolvieron 100 mg de producto conjugado de mPEG-éster de ATRA purificado y 400 mg de trileucina (Bachem California Inc, USA Torrance, CA) en 200 mL de agua de calidad HPLC. La solución resultante contenía un 80% de porcentaje de peso sólido de trileucina, un 20% de porcentaje de peso sólido de mPEG5K-ATRA con una concentración de sólidos total del 0,25%.

Después la solución se secó por pulverización utilizando un secador por pulverización Buchi 190 a una velocidad de alimentación de aproximadamente 3 a 5 mL/min, a una temperatura de entrada de 69°C, una temperatura de salida del 40°C, y un vacío de -100 mbar. Debido a la baja temperatura de fusión del producto conjugado de PEG-ATRA, se empleó una temperatura de salida inusualmente baja.

El rendimiento del secado por pulverización era del 29%, y el polvo secado por pulverización tenía un color amarillo y fluía libremente. Las micrografías de barrido de electrones (SEM) de las partículas mostraban una morfología arrugada de las partículas de un tamaño de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ . El punto de fusión del polvo, medido mediante calorimetría de barrido diferencial, era de 200°C. El punto de fusión del producto conjugado de mPEG5K-éster de ATRA está entorno a 53°C.

Se determinaron los datos de aerosol para el polvo.

<b>DE</b>	<b>74%</b>
<b>MMAD</b>	<b>3,1 <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>FPM &lt; 5,0 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>54%</b>
<b>FPM &lt; 3,3 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>39%</b>

(FPM representa la masa de partícula fina que es el peso de polvo seco (o gotitas líquidas dependiendo de la formulación) más pequeñas que el tamaño definido, p. ej., 3,3 micras).

Se preparó de un modo similar una formulación se cada por pulverización compuesta por un 20% en peso de trileucina y un 80% de producto conjugado de mPEG5K-éster de ATRA. El polvo secado por pulverización tenía las siguientes propiedades: DE 27%, MMAD 7,0  $\mu\text{m}$ , FPM < 3,3  $\mu\text{m}$  3%. El punto de fusión del polvo, medido mediante calorimetría de barrido diferencial, era de alrededor de 53°C.

### Ejemplo 15

#### *Polvo de PEG-Acido Retinoico Secado por Pulverización Adecuado para la Inhalación*

Se formuló un producto conjugado de PEG-retinoide ilustrativo, producto conjugado de mPEG (5kD) éster de ATRA, de una manera alternativa en forma de un polvo seco para inhalación.

Se preparó una formulación de PEG-ATRA compuesta por 60% PEG-RA/37% DSPC/3%  $\text{CaCl}_2$  como sigue. Se añadieron 183 mg de DSPC y 17 mg de cloruro de calcio a 22,9 g de agua DI caliente (>70°C). Se dispersaron DSPC y  $\text{CaCl}_2$  en agua DI caliente utilizando un homogeneizador que funcionaba a 10.000 rpm durante 5 minutos. Después se añadieron 10,9 g de PFOB (bromuro de perfluorooctilo) a la mezcla y la mezcla se mezcló adicionalmente a una velocidad de mezclado de 12.000 rpm durante 5 minutos. La emulsión se elaboró adicionalmente a través de un homogeneizador a 1.265,4  $\text{kg}/\text{cm}^2$  durante varios pases adicionales. Se añadieron 300 mg de mPEG5K-ATRA (Ejemplo 1) a la emulsión. La emulsión se secó por pulverización utilizando el secador por pulverización Buchi B-191 a una velocidad de alimentación de 2,0 mL/min, una temperatura de entrada de 85°C, una temperatura de salida de 66°C, y un vacío de -29 mbares.

El rendimiento del secado por pulverización fue del 17%. La composición de polvo secada por pulverización tenía un color amarillo y fluía libremente. Las micrografías de barrido electrónico SEM revelaban partículas que eran algo esféricas y visiblemente menos porosas de lo esperado.

## ES 2 284 959 T3

Se generaron los datos del aerosol para el polvo resultante.

5

<b>Impactador DE</b>	<b>63%,</b>
<b>MMAD</b>	<b>3,5 <math>\mu\text{m}</math>,</b>
<b>FPM &lt; 5,0 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>86%</b>
<b>FPM &lt; 3,3 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>44%</b>

10

15

Ambos ejemplos anteriores, Ejemplos 15 y 16, demuestran la preparación de formulaciones en polvo seco de retinoides PEGilados que tienen propiedades de aerosol (p. ej., dispersabilidades y diámetros aerodinámicos) que las hacen particularmente adecuadas o ventajosas para la liberación pulmonar en el pulmón.

20

Muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención vendrán a la mente de un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención que tiene la ventaja de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos adjuntos. Por lo tanto, se debe entender que la invención no está limitada a las realizaciones específicas descritas. Aunque en la presente memoria se utilizan términos específicos, éstos se utilizan en un sentido solamente genérico y no con fines limitantes.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de producto conjugado de polímero-retinoide, adecuada para la administración pulmonar, comprendiendo dicha composición un retinoide unido covalentemente a un polímero soluble en agua y no peptídico seleccionado del grupo que consiste en poli(alquilenglicol), poliol polioxietilado, poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquil-metacrilamida), poli(metacrilato de hidroxialquilo), poli( $\alpha$ -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), y copolímeros, terpolímeros, y mezclas de los mismos.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, donde dicho polímero es polietilenglicol.
3. La composición de la reivindicación 1, donde dicho retinoide se selecciona del grupo que consiste en ácido 13-cis-retinoico, ácido todo-trans-retinoico, ácido 9-cis-retinoico, ácido 11-cis-retinoico, y retinol.
- 15 4. La composición de la reivindicación 3, donde dicho retinoide es ácido todo-trans-retinoico.
5. La composición de retinoide de la reivindicación 3, donde dicho retinoide es ácido cis-retinoico.
- 20 6. La composición de la reivindicación 1, donde dicho producto conjugado de polímero-retinoide es soluble en agua.
7. La composición de la reivindicación 1 en forma líquida o seca.
- 25 8. Un aerosol que comprende la composición de la reivindicación 1.
9. La composición de la reivindicación 1 en un dispositivo inhalador.
10. La composición de la reivindicación 1, que cuando es introducida en un aerosol, se **caracteriza** por un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de menos de 10  $\mu\text{m}$  (micras).
- 30 11. La composición de la reivindicación 1, que cuando es introducida en un aerosol, se **caracteriza** por un MMAD de menos de 5  $\mu\text{m}$  (micras).
- 35 12. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un captador de radicales libres.
- 40 14. La composición de la reivindicación 7, donde dicha composición es un polvo seco.
15. La composición de la reivindicación 14, **caracterizada** por una dosis emitida de al menos el 30%.
16. Una composición secada por pulverización de la reivindicación 1.
- 45 17. Una forma de dosificación unitaria que comprende la composición de la reivindicación 1 para su uso en un dispositivo inhalador.
18. La composición de la reivindicación 1, donde dicho polímero soluble en agua y no peptídico está unido covalentemente al retinoide por medio de una conexión hidrolíticamente inestable.
- 50 19. La composición de la reivindicación 18, donde dicha conexión hidrolíticamente inestable se selecciona del grupo que consiste en éster, tiolester (-C(O)-S) y amida.
20. La composición de la reivindicación 1, donde dicho polímero soluble en agua y no peptídico está unido covalentemente al retinoide por medio de una conexión hidrolíticamente estable.
- 55 21. La composición de la reivindicación 1, donde dicho polímero soluble en agua y no peptídico tiene un peso molecular medio de 500 dalton a 100.000 dalton.
- 60 22. La composición de la reivindicación 21, donde dicho polímero soluble en agua y no peptídico tiene un peso molecular medio de 750 dalton a 40.000 dalton.
23. La composición de la reivindicación 2, donde dicho polietilenglicol está protegido terminalmente.
- 65 24. La composición de la reivindicación 2, donde dicho polietilenglicol está protegido terminalmente con un grupo alcoxi.

## ES 2 284 959 T3

25. La composición de la reivindicación 2, donde dicho polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol lineal, polietilenglicol ramificado, polietilenglicol en forma de tenedor y polietilenglicol en forma de pesa.

5 26. La composición de la reivindicación 1 ausente un agente necesario para solubilizar dicho retinoide en un vehículo portador.

10 27. Una composición de producto conjugado de polímero retinoide de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26 para su uso como medicamento para la administración pulmonar a un sujeto humano.

28. La composición de la reivindicación 27, para el tratamiento de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas.

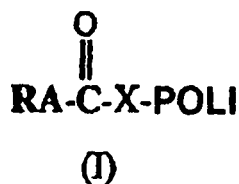
15 29. El uso de una composición de producto conjugado de polímero-retinoide de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, donde dicho medicamento se va a administrar mediante inhalación.

20 30. El producto conjugado de polímero-retinoide de la reivindicación 18, donde dicho polímero está anclado covalentemente, por medio de una conexión hidrolíticamente degradable, al carbono carbonílico del ácido retinoico, y adicionalmente donde (i) si el polímero es un polietilenglicol lineal y la conexión es una conexión éster, el peso molecular del polietilenglicol es de al menos 2.000 dalton, y (ii) si el polímero es un polietilenglicol lineal protegido terminalmente y la conexión es una conexión amida, el polietilenglicol tiene un peso molecular de al menos 5.000 dalton.

25 31. El producto conjugado de polímero retinoico de la reivindicación 30 donde dicha conexión hidrolíticamente degradable se selecciona del grupo que consiste en éster carboxilato, amida, y tiolester.

32. El producto conjugado de polímero retinoide de la reivindicación 30, donde el producto conjugado de polímero-retinoide comprende la estructura:

30



35

donde

40

RA junto con el grupo carbonilo representa un radical ácido retinoico,

X es un heteroátomo seleccionado entre O, N-H, y S, y

45

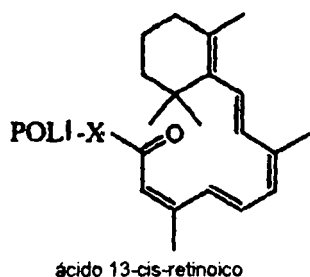
POLI es el polímero soluble en agua, no peptídico,

donde (i) si el POLI es un polietilenglicol lineal y X es O, el peso molecular del POLI es de al menos 2.000 daltons, y (ii) si el POLI es un polietilenglicol lineal con protección terminal y X es N, el POLI tiene un peso molecular de al menos 5.000 dalton.

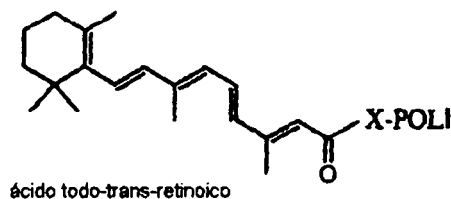
50

33. El producto conjugado de polímero retinoide de la reivindicación 32 seleccionado del grupo que consiste en:

55



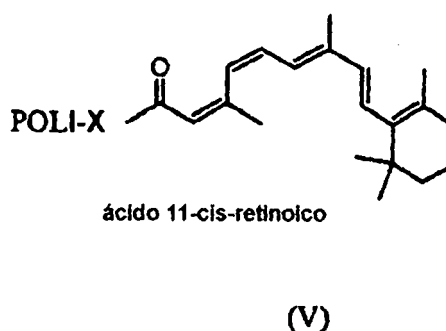
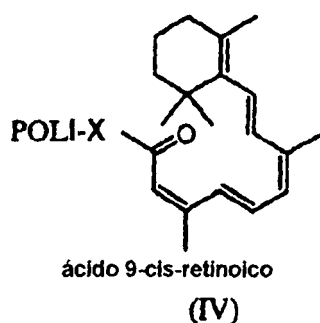
60



65

(II)

(III)



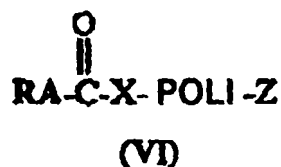
15 34. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 33, donde el POLI es un poli(etilenglicol).

35. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 33, donde X es O o S.

20 36. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 33, donde el POLI tiene de 2 a 300 términos.

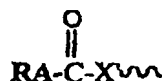
37. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 33, donde dicho POLI está protegido terminalmente.

25 38. El producto conjugado de polímero retinoide de la reivindicación 37, que tiene la siguiente estructura:



donde Z es un grupo funcional.

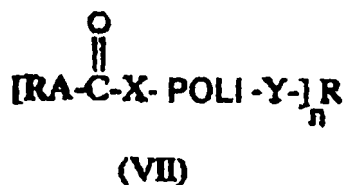
35 39. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 38, donde Z tiene la estructura



donde X' junto con el carbonilo es una conexión hidrolíticamente degradable y w representa el punto de anclaje al POLI.

45 40. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 38, donde el POLI es poli(etilenglicol) y Z es metoxi.

50 41. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 33 que tiene la estructura:



donde:

60 n es un número entero de 3 a 100;

R es una molécula núcleo central;

65 X junto con el grupo carbonilo adyacente es una conexión hidrolíticamente degradable;

Y es una conexión; y

## ES 2 284 959 T3

cada POLI es un polímero soluble en agua y no peptídico seleccionado independientemente como se define en la reivindicación 1.

42. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 41, donde n oscila de 3 a 20.

43. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 41, donde Y es O, S o NH.

44. El producto conjugado de polímero retinoide de la Reivindicación 41, donde R es un resto de una molécula núcleo central seleccionada del grupo que consiste en glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol, sorbitol, y lisina.

45. El producto conjugado de polímero retinoide de la reivindicación 32, donde POLI es un polietilenglicol seleccionado del grupo que consiste en PEG lineal, ramificado, en forma de tenedor, o en forma de pesa.

46. Un método para preparar una formulación de retinoide adecuada para la administración pulmonar, comprendiendo dicho método las etapas de:

unir covalentemente un retinoide a un polímero soluble el agua como se ha citado en la Reivindicación 1 para formar un producto conjugado de polímero retinoide soluble en agua,

preparar una composición farmacéutica que comprende dicho producto conjugado, donde dicha composición es adecuada para la administración pulmonar, e

introducir en un aerosol dicha composición.

47. El método de la reivindicación 46, donde dicha etapa de preparación comprende combinar dicho producto conjugado con uno o más excipientes.

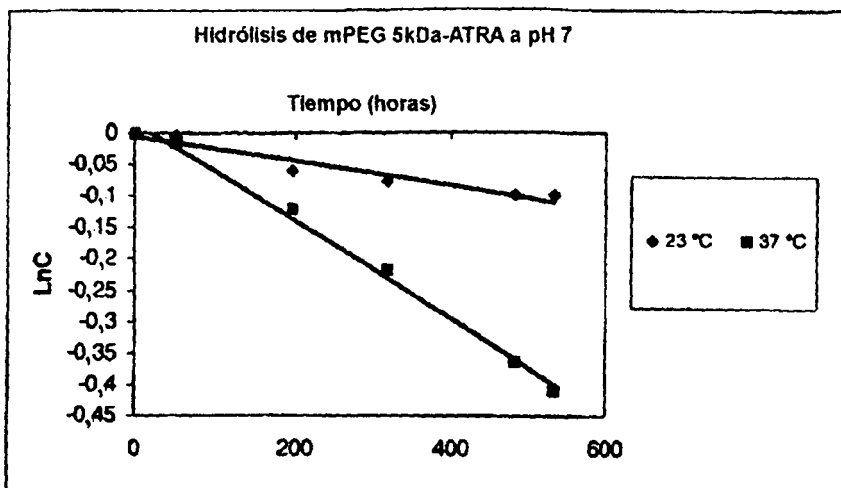


FIG. 1

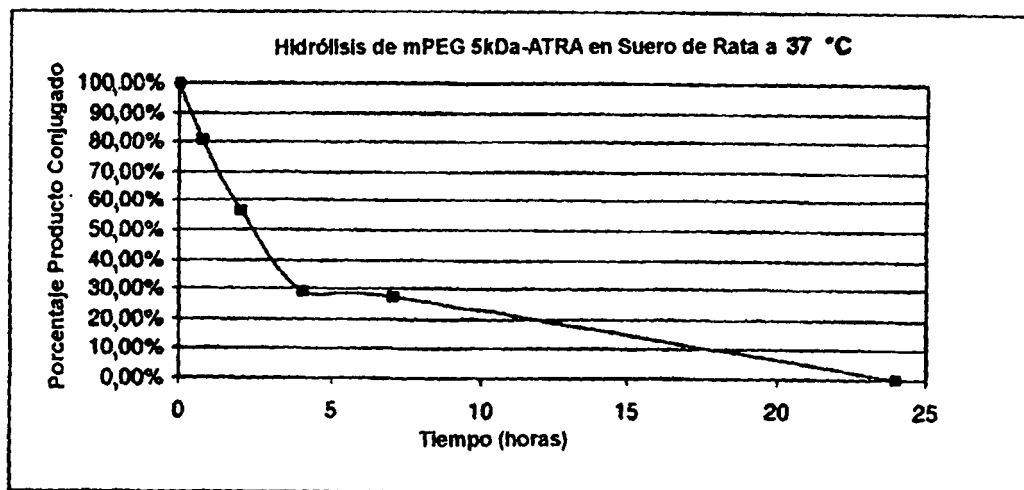
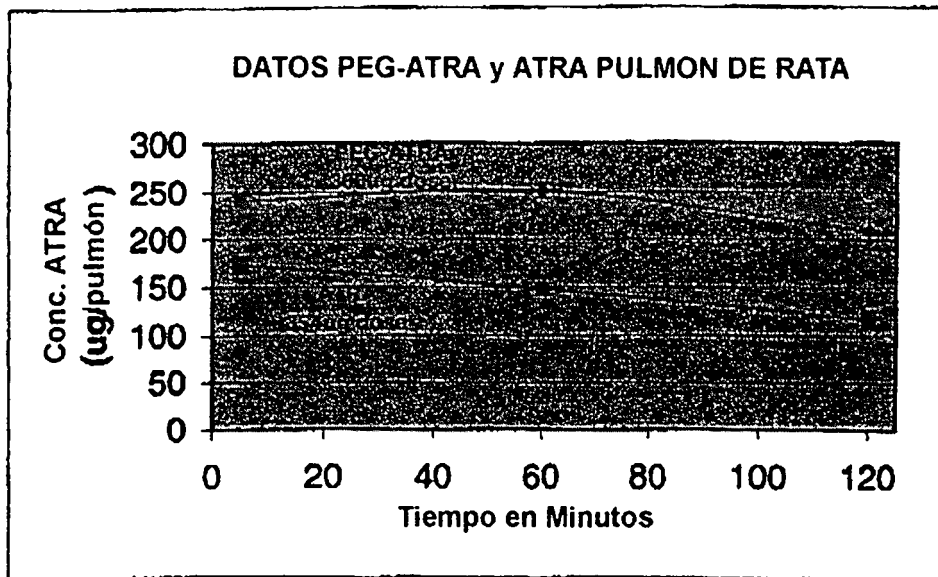


FIG. 2



**FIG. 3**