

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 417 324**

(51) Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 47/40** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2003 E 10184884 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2277551**

---

(54) Título: **Polímeros a base de ciclodextrina para el suministro de los agentes terapéuticos enlazados covalentemente a ellos**

(30) Prioridad:

**06.09.2002 US 408855 P  
31.10.2002 US 422830 P  
04.03.2003 US 451998 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.08.2013**

(73) Titular/es:

**CERULEAN PHARMA INC. (100.0%)  
840 Memorial Drive  
Cambridge, MA 02139, US**

(72) Inventor/es:

**CHENG, JIANJUN;  
DAVIS, MARK, E. y  
KHIN, KAY T.**

(74) Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 417 324 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**

Polímeros a base de ciclodextrina para el suministro de los agentes terapéuticos enlazados covalentemente a ellos.

**Antecedentes de la Invención**

El suministro de fármacos de algunos agentes terapéuticos de moléculas pequeñas, tales como camptotecina, ha sido problemático debido a sus pobres perfiles farmacológicos. Estos agentes terapéuticos tienen frecuentemente una baja solubilidad acuosa, sus formas bioactivas existen en equilibrio con una forma inactiva o las altas concentraciones sistémicas de los agentes conducen a efectos colaterales, tóxicos. Algunos planteamientos para evitar el problema de su suministro han sido conjugar el agente directamente a un polímero soluble en agua, tal como metacrilato de hidroxipropilo (HPMA), polietenglicol y ácido poli-L-glutámico. En algunos casos, estos conjugados han sido exitosos en la solubilización o estabilización de la forma bioactiva del agente terapéutico o en obtener una formulación de liberación sostenida que evite las complicaciones asociadas con las altas concentraciones sistémicas del agente.

Otro planteamiento para el problema del suministro de fármacos ha sido formar complejos de inclusión de hospedante/invitado entre el agente terapéutico y ciclodextrinas o derivados de las mismas. Las ciclodextrinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y sus formas oxidadas tienen propiedades físico-químicas, únicas, tales como buena solubilidad en agua, baja toxicidad y baja respuesta inmune. A la fecha, la mayoría de los estudios para el suministro de fármacos con ciclodextrinas se han enfocado en su capacidad para formar complejos supra-moleculares, en donde las ciclodextrinas forman los complejos de inclusión de hospedante/invitado con moléculas terapéuticas y, de esta manera, alteran las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de estas moléculas invitadas.

La patente norteamericana No. 5,276,088 describe un método para sintetizar polímeros que contienen ciclodextrina ya sea al hacer reaccionar alcohol polivinílico o celulosa o derivados de los mismos con derivados de ciclodextrina o mediante la copolimerización de un derivado de ciclodextrina con acetato de vinilo o metacrilato de metilo.

La patente norteamericana No. 5,855,900 describe un polímero que contiene ciclodextrina, biodegradable. La patente describe un montaje polimérico, biodegradable, estructurado de manera supra-molecular que comprende una pluralidad de  $\alpha$ ,  $\beta$ , y-ciclodextrinas modificadas por fármacos y una cadena polimérica, lineal que se enrosca a través de la cavidad estructural de las ciclodextrinas.

El documento WO 00/01734 describe copolímeros de ciclodextrina lineales que se pueden usar como un vehículo de suministro para agentes terapéuticos.

El documento WO 99/67296 describe polímeros para suministrar óxido nítrico *in vivo*.

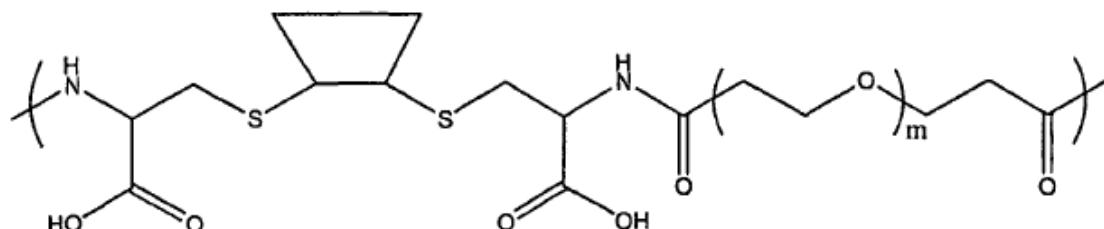
Yano et al (Journal of Controlled Release, 2002, Vol. 79, páginas 103-112), Yano et al (Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, Vol. 90, No 12, páginas 2103-2112), Hristova-Kazmierski et al (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1993, Vol. 3, NO. 5, páginas 831-834) y Tanaka et al (The Journal of Antibiotics, 1994, Vol. 47, No. 9, páginas 1025-1029) describen conjugados que comprenden un resto de ciclodextrina unido covalentemente a un agente terapéutico.

Kang et al (European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002, Vo. 15, páginas 163-170) discute la influencia de la formación de complejos de la ciclodextrina en la solubilidad, estabilidad y citotoxicidad de camptotecina.

Existe una necesidad actual por nuevos planteamientos para el suministro de agentes terapéuticos, pequeños que tienen pobres perfiles farmacológicos, tales como camptotecina, paclitaxel, doxorubicina y ciclosporina A.

**Sumario de la Invención**

Según la presente invención, se proporciona un proceso para producir un polímero que contiene ciclodextrina lineal, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un polímero formado por la unidad repetitiva de fórmula B:

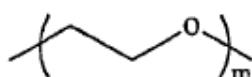


(B)

donde

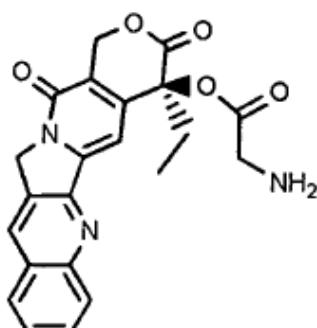


representa un resto de ciclodextrina; y



- 5    representa un polietilenglicol;

con un compuesto de fórmula C:



(C)

donde el polímero formado por la unidad repetitiva de fórmula B y el compuesto de fórmula C se hacen reaccionar en presencia de 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

- 10   La presente invención también proporciona un polímero que contiene ciclodextrina lineal que se puede obtener mediante dicho proceso.

La presente invención también proporciona una preparación farmacéutica que comprende dicho polímero que contiene ciclodextrina lineal o un éster, sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéutico. También se proporcionan los compuestos intermedios útiles en la síntesis de dicho polímero que contiene ciclodextrina lineal.

Más generalmente, la presente descripción se refiere a composiciones novedosas de conjugados poliméricos, definidos como materiales poliméricos acoplados covalentemente a agentes terapéuticos/bioactivos, como portadores para el suministro de agentes terapéuticos. En un caso, la presente descripción proporciona conjugados poliméricos, biocompatibles, solubles en agua que comprenden un polímero biocompatible, soluble en agua que está unido covalentemente a las porciones bioactivas a través de uniones que son escindidas bajo condiciones biológicas para liberar las porciones bioactivas. En ciertos tales casos, el polímero comprende porciones cíclicas que alternan con las porciones conectoras que acoplan las estructuras cíclicas, por ejemplo, en polímeros lineales o ramificados, preferiblemente polímeros lineales. El polímero puede ser un polication, polianión o un polímero no iónico. El agente bioactivo, el cual puede ser un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un adyuvante, forma preferiblemente al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o incluso 35% en peso del conjugado. En ciertos casos, la velocidad de liberación del fármaco es dependiente principalmente de la velocidad de la hidrólisis. En otras ciertas modalidades, la velocidad de liberación del fármaco es dependiente principalmente de la escisión enzimática.

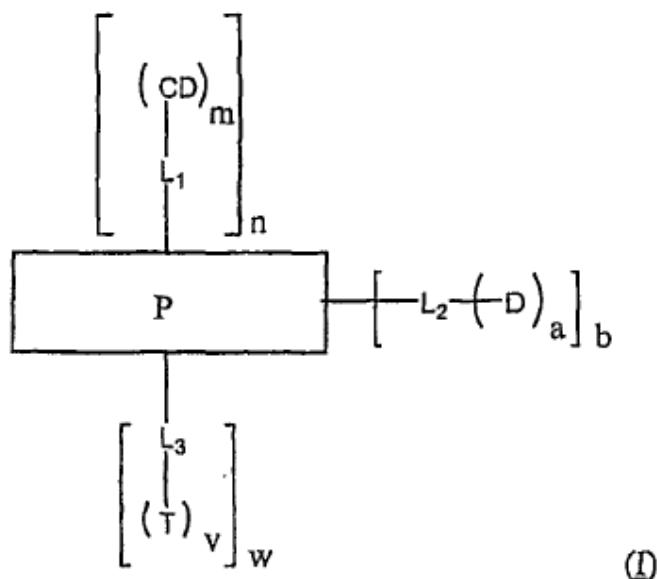
La presente descripción proporciona compuestos poliméricos que contienen ciclodextrina para el uso en el suministro en fármacos de estos agentes terapéuticos. La descripción también proporciona compuestos para el uso en el suministro controlado de fármacos que son capaces de liberar un agente terapéutico a una velocidad establecida como objetivo, predecible y controlada.

Por consiguiente, un caso de la presente descripción es un conjugado polimérico que comprende restos de ciclodextrina, un agente terapéutico y un agente opcional de establecimiento de objetivos de ligandos. El polímero puede ser lineal o ramificado y se puede formar por vía de la policondensación de monómeros que contienen ciclodextrina, la copolimerización entre uno o más monómeros que contienen ciclodextrina y uno o más comonómeros que no contienen restos de ciclodextrina. Además, la presente descripción también contempla polímeros que contienen ciclodextrina formados mediante el injerto de restos de ciclodextrina a un polímero ya

formado. Los restos de ciclodextrina contemplados por la presente descripción incluyen, pero no están limitadas a  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrinas y formas oxidadas de las mismas. Dependiendo de la relación deseada de fármaco/polímero, el agente terapéutico se puede unir a un monómero por vía de un conector opcional antes del paso de polimerización o se puede injertar subsecuentemente en el polímero por vía de un conector opcional. De igual manera, el ligando de establecimiento de objetivos puede unirse a un monómero por vía de un conector opcional antes del paso de polimerización o se puede injertar subsecuentemente en el polímero por vía de un conector opcional o se puede unir al polímero como un complejo de inclusión o interacciones de hospedante-invitado.

5

Para ilustrarlo más, un ejemplo de la descripción es un compuesto polimérico representado por la fórmula I:



10 en la que

P representa una cadena polimérica lineal o ramificada;

CD representa un resto cíclico tal como un resto de ciclodextrina;

$L_1$ ,  $L_2$  y  $L_3$ , independientemente de cada vez que aparecen, pueden estar ausentes o pueden representar un grupo conector;

15 D, independientemente de cada vez que aparece, representa un agente terapéutico o un profármaco del mismo;

T, independientemente de cada vez que aparece, representa un ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo;

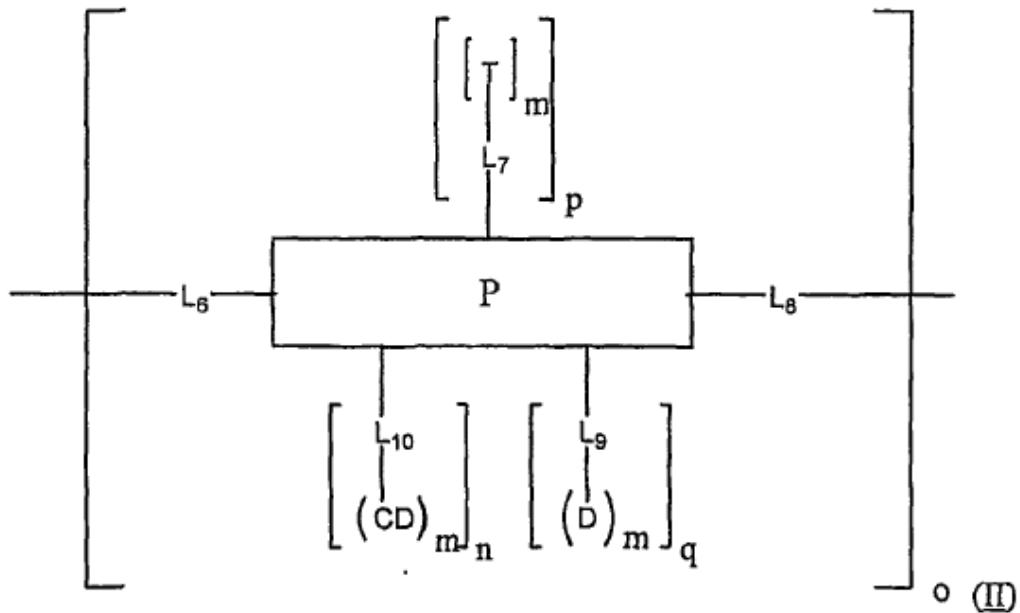
a, m y v, independientemente de cada vez que aparecen, representan números enteros en el intervalo de 1 a 10 (preferiblemente 1 a 8, 1 a 5, o incluso 1 a 3);

20 b representa un número entero en el intervalo de 1 a aproximadamente 30.000 (preferiblemente &lt;25.000, &lt;20.000, &lt;15.000, &lt;10.000, &lt;5.000, &lt;1.000, &lt;500, &lt;100, &lt;50, &lt;25, &lt;10 o incluso &lt;5); y

n y w, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 0 a aproximadamente 30.000 (preferiblemente <25.000, <20.000, <15.000, <10.000, <5.000, <1.000, <500, <100, <50, <25, <10 o incluso <5)

25 donde la cadena de polímero comprende restos de ciclodextrina o n es al menos 1.

Otro ejemplo de la presente descripción es un compuesto representado por la fórmula II:



en donde

P representa una unidad monomérica de un polímero;

5 T, independientemente de cada vez que aparece, representa un ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo;

L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub> y L<sub>10</sub>, independientemente de cada vez que aparecen, pueden estar ausentes o pueden representar un grupo conector;

10 CD, independientemente de cada vez que aparece, representa un resto cíclico, tal como un resto de ciclodextrina o un derivado de la misma;

D, independientemente de cada vez que aparece, representa un agente terapéutico o una forma de profármaco del mismo;

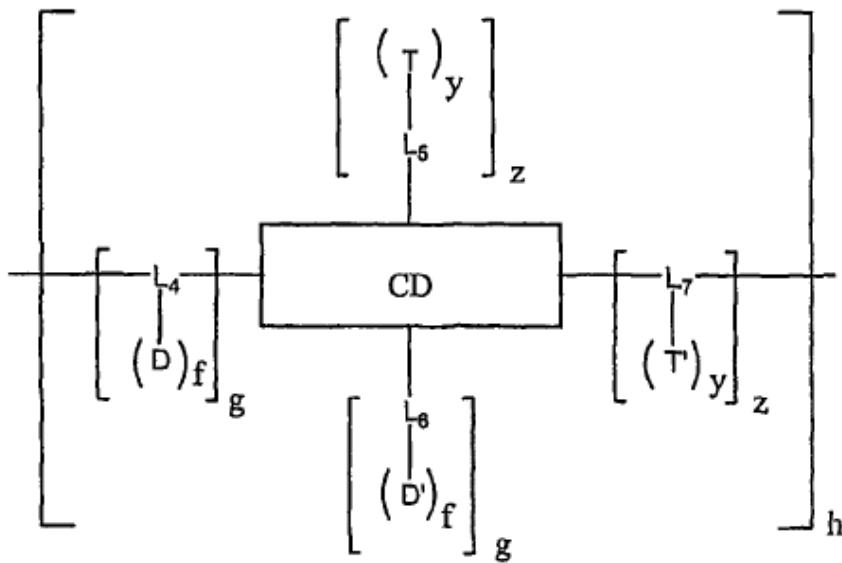
m, independientemente de cada vez que aparece, representa un número entero en el intervalo de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 8, 1 a 5 o incluso 1 a 3);

15 o representa un número entero en el intervalo de 1 a aproximadamente 30,000 (preferiblemente <25,000, <20,000, <15,000, <10,000, <5,000, <1,000, <500, <100, <50, <25, <10, o incluso <5); y

p, n y q, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 0 a 10 (preferiblemente de 0 a 8, 0 a 5, 0 a 3 o incluso 0 a aproximadamente 2),

en donde CD y D están presentes preferiblemente cada uno en al menos 1 ubicación (preferiblemente al menos 5, 10, 25, 50 o incluso >100 ubicaciones) en el compuesto.

20 Otro ejemplo de la presente descripción es un compuesto representado por la fórmula III:



en donde

CD representa un resto cíclico, tal como un resto de ciclodextrina o un derivado de la misma;

5 L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub> y L<sub>7</sub>, independientemente de cada vez que aparecen, pueden estar ausentes o pueden representar un grupo conector;

D y D', independientemente de cada vez que aparecen, representan el mismo o diferente agente terapéutico o profármacos del mismo;

T y T', independientemente de cada vez que aparecen, representan el mismo o diferente ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo;

10 f e y, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 1 y 10 (preferiblemente de 1 a 8, 1 a 5 o incluso 1 a 3);

g y z, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 0 y 10 (preferiblemente 0 a 8, 0 a 5, 0 a 3 o incluso 0 a aproximadamente 2); y

15 h representa un número entero en el intervalo de 1 y 30.000 (preferiblemente <25.000, <20.000, <15.000, <10.000, <5.000, <1.000, <500, <100, <50, <25, <10 o incluso <5),

en donde al menos una aparición (y preferiblemente al menos 5, 10 o incluso al menos 20, 50 o >100 apariciones) de g representa un número entero mayor que 0.

También se describe en la presente memoria un método para preparar los conjugados poliméricos que contienen ciclodextrina, terapéuticos que se describen en la presente memoria.

20 También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un compuesto o polímero descrito anteriormente.

También se describe en la presente memoria una forma de dosificación farmacéutica que comprende un conjugado polimérico descrito en la presente memoria.

25 También se describe en la presente memoria un método para tratar a un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los conjugados poliméricos descritos en este texto.

También se describe en la presente memoria un método para conducir un negocio farmacéutico que comprende administrar, autorizar o distribuir equipos que contienen o se relacionan con cualquiera de los conjugados poliméricos descritos en la presente memoria.

30 En ciertos casos, estos conjugados poliméricos, terapéuticos mejoran la estabilidad y/o solubilidad en el fármaco del agente terapéutico cuando se utilizan *in vivo*. Además, al seleccionar de una variedad de grupos conectores, los conjugados poliméricos proporcionan métodos para la liberación controlada de los agentes terapéuticos y/o bioactivos o mejoran la seguridad y/o eficacia terapéutica *in vivo* del agente terapéutico/bioactivo. En ciertos casos, los conjugados poliméricos son bioerosionables o biodegradables.

### Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 muestra estrategias para variar los conjugados poliméricos para regular sus características.

La figura 2 demuestra el efecto de la longitud de la atadura peptídica sobre la velocidad de liberación del fármaco para el polímero de CD cargado en el fármaco.

5 La figura 3 presenta el efecto que la camptotecina de atadura tiene sobre la estabilidad mejorada de camptotecina, por ejemplo, inhibiendo la apertura de anillos de lactona.

La figura 4 muestra los estudios de apertura de anillos de lactona en un amortiguador de KH<sub>2</sub>P04 pH 7,4.

Las figuras 5a y 5b muestran el control de polimerización al ajustar el tiempo de polimerización.

10 La figura 6 ilustra la liberación de CPT de **HG6** y **HGG6** a 37°C después de 24 horas en soluciones amortiguadoras con pHs que varían de 1,1 a 13,1.

La figura 7 exhibe el análisis de HPLC de la degradación del polímero de CD-BisCys-SS-Peg3400.

La figura 8 muestra la curva de crecimiento tumoral como una función del tiempo para D5W, CPT, irinotecan, **LGGG10** a sus dosis no tóxicas, más altas sometidas a prueba (18 mg de CPT/kg) y los otros tres conjugados con un polímero de alto peso molecular (**HGGG6**, **HG6**, **HGGG10**) en sus MTDs en ratones de xenoinjerto.

15 La figura 9 presenta las curvas de crecimiento tumoral promedio para **HGGG6**, **HG6** y **HGGG10** en ratones de xenoinjerto.

La figura 10 presenta las curvas de crecimiento tumoral promedio para **LGGG10** y **HGGG10** cada uno dosificado a 9 mg de CPT/kg en ratones de xenoinjerto.

20 La figura 11 presenta las pérdidas de peso corporal promedio (MBW, por sus siglas en inglés) como una función del tiempo transcrita en un diagrama para D5W, CPT, irinotecan y los tres conjugados que contienen un polímero de alto peso molecular en sus MTDs en ratones de xenoinjerto.

La figura 12 muestra la correlación de la concentración de CPT (ng/mg de tejido) con. el tamaño del tumor (en mg) en ratones de xenoinjerto.

### Descripción Detallada de la Invención

25 *I. Vista general*

La presente descripción se refiere a composiciones novedosas de compuestos poliméricos, terapéuticos que contienen ciclodextrina diseñados para el suministro en fármacos de agentes terapéuticos. En ciertos casos, estos polímeros que contienen ciclodextrina mejoran la estabilidad y/o solubilidad del fármaco y/o reduce la toxicidad y/o mejoran la eficacia de la molécula pequeña, terapéutica cuando se utiliza *in vivo*. En ciertos casos, los polímeros se pueden utilizar para el suministro de agentes terapéuticos, tales como camptotecina, taxol, doxorrubicina y anfotericina. Además, al seleccionar de una variedad de grupos conectores y/o ligandos de establecimiento de objetivos, la velocidad de liberación de fármacos desde los polímeros puede ser atenuada para el suministro controlado. La descripción también se refiere a métodos para tratar sujetos con las composiciones terapéuticas descritas en este texto. La descripción además se refiere a métodos para conducir un negocio farmacéutico que comprenden fabricar, autorizar o distribuir equipos que contienen o que se relacionan con los compuestos poliméricos descritos en este texto.

Más generalmente, la presente descripción proporciona conjugados poliméricos, biocompatibles, solubles en agua que comprenden un polímero biocompatible, soluble en agua que está unido covalentemente a porciones bioactivas a través de uniones que son escindidas bajo condiciones biológicas para liberar las porciones bioactivas. En ciertos tales casos, el polímero comprende porciones cíclicas que alternan con porciones conectoras que acoplan las estructuras cíclicas, por ejemplo, en polímeros lineales o ramificados, preferiblemente polímeros lineales. Las porciones cíclicas pueden ser cualquier estructura cíclica, adecuada, tal como ciclodextrinas, éteres de corona (por ejemplo, 18-corona-6, 15-corona-5, 12-corona-4, etcétera), oligopeptidos cíclicos (por ejemplo, que comprenden de 5 a 10 residuos de aminoácidos), criptands o criptatos (por ejemplo, criptand [2.2.2], criptand-2,1,1, y complejos de los mismos), calixarenos o cavitands o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, la estructura cíclica es (o está modificada para ser) soluble en agua. En ciertos casos, por ejemplo, donde se desea un polímero lineal, la estructura cíclica se selecciona de tal manera que bajo condiciones de polimerización, exactamente dos porciones de cada estructura cíclica son reactivas con las porciones conectoras, de tal manera que el polímero resultante comprende (o consiste esencialmente de) una serie alternante de porciones cíclicas y porciones conectoras, tal como al menos cuatro de cada tipo de porción. Las porciones cíclicas, difuncionalizadas, adecuadas incluyen muchas que son comercialmente disponibles y/o idóneas para la preparación utilizando protocolos publicados. En ciertos casos, los conjugados son solubles en agua a una concentración de al menos 0,1 g/ml, preferiblemente al menos 0,25 g/ml.

El polímero puede ser un polication, un polianión o un polímero no iónico. Un polímero policationílico o polianiónico tiene al menos un sitio que lleva una carga positiva o negativa, respectivamente. En ciertos tales casos, al menos una porción conectora y una porción cíclica comprenden este sitio cargado, de manera que cada aparición de esa porción incluye un sitio cargado.

- 5 El agente bioactivo, el cual puede ser un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un adyuvante (tal como radiosensibilizador o un compuesto que carezca de actividad significante administrado solo pero que aumenta la potencia de la actividad del otro agente terapéutico), preferiblemente forma hasta al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o incluso 35% en peso del conjugado. En los casos preferidos, la administración del polímero a un paciente da por resultado la liberación del agente bioactivo durante un periodo de al menos 6 horas, preferiblemente al menos 12 o 18 horas. Por ejemplo, el agente puede ser liberado durante un periodo de tiempo que varia de 6 horas a un mes, 6 horas a dos semanas, 6 horas a 3 días, etcétera. En ciertos casos, la velocidad de liberación del fármaco es dependiente principalmente de la velocidad de la hidrólisis (lo opuesto a la escisión enzimática), por ejemplo, la velocidad de liberación cambia por menos de un factor de 5, preferiblemente menos de un factor de 2, en presencia de enzimas hidrolíticas. En otros casos, la velocidad de liberación del fármaco puede ser dependiente principalmente de la velocidad de la escisión enzimática.
- 10
- 15

Los conjugados poliméricos de la presente descripción pueden ser útiles para mejorar la solubilidad y/o estabilidad de un agente bioactivo/terapéutico, para reducir las interacciones de fármaco-fármaco, para reducir las interacciones con elementos sanguíneos que incluyen proteínas plasmáticas, para reducir o eliminar la inmunogenicidad, para proteger al agente del metabolismo, para modular la cinética de liberación de fármaco, para mejorar el tiempo de circulación, para mejorar el periodo de vida media del fármaco (por ejemplo, en el suero o en tejidos seleccionados, tales como tumores), para atenuar la toxicidad, para mejorar la eficacia, para normalizar el metabolismo del fármaco a través de sujetos de diferentes especies, etnias y/o razas y/o para mejorar el suministro establecido como objetivo en células o tejidos específicos. Los compuestos pobemente solubles y/o tóxicos pueden beneficiarse particularmente de la incorporación en los compuestos poliméricos de la descripción.

## 25 II. Definiciones

### (a) Términos Generales

Un "adyuvante", como se utiliza el término en este texto, es un compuesto que tiene poco o nada de valor terapéutico por sí mismo, pero que incrementa la efectividad de un agente terapéutico. Los adyuvantes ejemplares incluyen radiosensibilizadores, agentes intensificadores de la transfección (tales como cloroquina y análogos de la misma), agentes quimiotácticos y quimioatrayentes, péptidos que modulan la adhesión celular y/o movilidad celular, agentes para permeabilizar células, inhibidores de la resistencia a múltiples fármacos y/o bombas de descarga, etcétera.

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

1005

1010

1015

1020

1025

1030

1035

1040

1045

1050

1055

1060

1065

1070

1075

1080

1085

1090

1095

1100

1105

1110

1115

1120

1125

1130

1135

1140

1145

1150

1155

1160

1165

1170

1175

1180

1185

1190

1195

1200

1205

1210

1215

1220

1225

1230

1235

1240

1245

1250

1255

1260

1265

1270

1275

1280

1285

1290

1295

1300

1305

1310

1315

1320

1325

1330

1335

1340

1345

1350

1355

1360

1365

1370

1375

1380

1385

1390

1395

1400

1405

1410

1415

1420

1425

1430

1435

1440

1445

1450

1455

1460

1465

1470

1475

1480

1485

1490

1495

1500

1505

1510

1515

1520

1525

1530

1535

1540

1545

1550

1555

1560

1565

1570

1575

1580

1585

1590

1595

1600

1605

1610

1615

1620

1625

1630

1635

1640

1645

1650

1655

1660

1665

1670

1675

1680

1685

1690

1695

1700

1705

1710

1715

1720

1725

1730

1735

1740

1745

1750

1755

1760

1765

1770

1775

1780

1785

1790

1795

1800

1805

1810

1815

1820

1825

1830

1835

1840

1845

1850

1855

1860

1865

1870

1875

1880

1885

1890

1895

1900

1905

1910

1915

1920

1925

1930

1935

1940

1945

1950

1955

1960

1965

1970

1975

1980

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

2025

2030

2035

2040

2045

2050

2055

2060

2065

2070

2075

2080

2085

2090

2095

2100

2105

2110

2115

2120

2125

2130

2135

2140

2145

2150

2155

2160

2165

2170

2175

2180

2185

2190

2195

2200

2205

2210

2215

2220

2225

2230

2235

2240

2245

2250

2255

2260

2265

2270

2275

2280

2285

2290

2295

2300

2305

2310

2315

2320

2325

2330

2335

2340

2345

2350

2355

2360

2365

2370

2375

2380

2385

2390

2395

2400

2405

2410

2415

2420

2425

2430

2435

2440

2445

2450

2455

2460

2465

2470

2475

2480

2485

2490

2495

2500

2505

2510

2515

2520

2525

2530

2535

2540

2545

2550

2555

2560

2565

2570

2575

2580

2585

2590

2595

2600

2605

2610

2615

2620

2625

2630

2635

2640

2645

2650

2655

2660

2665

2670

2675

2680

2685

2690

2695

2700

2705

2710

2715

2720

2725

2730

2735

2740

2745

2750

2755

2760

2765

2770

2775

2780

2785

2790

2795

2800

2805

2810

2815

2820

2825

2830

2835

2840

2845

2850

2855

2860

2865

2870

2875

2880

2885

2890

2895

2900

2905

2910

2915

2920

2925

2930

2935

2940

2945

2950

2955

2960

2965

2970

2975

2980

2985

2990

2995

3000

3005

3010

3015

3020

3025

3030

3035

3040

3045

3050

3055

3060

3065

3070

3075

3080

3085

3090

3095

3100

3105

3110

3115

3120

3125

3130

3135

3140

3145

3150

3155

3160

3165

3170

3175

3180

3185

3190

3195

3200

3205

3210

3215

3220

3225

3230

3235

3240

3245

3250

3255

3260

3265

3270

3275

3280

3285

3290

3295

3300

3305

3310

3315

3320

3325

3330

3335

3340

3345

3350

3355

3360

3365

3370

3375

3380

3385

3390

3395

3400

3405

3410

3415

3420

3425

3430

3435

3440

3445

3450

3455

3460

3465

3470

3475

3480

3485

3490

3495

3500

3505

3510

3515

3520

3525

3530

3535

3540

3545

3550

3555

3560

3565

3570

3575

3580

3585

3590

3595

3600

3605

3610

3615

3620

3625

3630

3635

3640

3645

3650

3655

3660

3665

3670

3675

3680

3685

3690

3695

3700

3705

3710

3715

3720

3725

3730

3735

3740

3745

3750

3755

3760

3765

3770

3775

3780

3785

3790

3795

3800

3805

3810

3815

3820

3825

3830

3835

3840

3845

3850

3855

3860

3865

3870

3875

3880

3885

3890

3895

3900

3905

3910

3915

3920

3925

3930

3935

3940

3945

3950

3955

3960

3965

3970

3975

3980

3985

3990

3995

4000

4005

4010

4015

4020

4025

4030

4035

4040

4045

4050

4055

4060

4065

4070

4075

4080

4085

4090

4095

4100

4105

4110

4115

4120

4125

4130

4135

4140

4145

4150

4155

4160

4165

4170

4175

4180

4185

4190

4195

4200

4205

4210

4215

4220

4225

4230

4235

4240

4245

4250

4255

4260

4265

4270

4275

4280

4285

4290

4295

4300

4305

4310

4315

4320

4325

4330

4335

4340

4345

4350

4355

4360

4365

4370

4375

4380

4385

4390

4395

4400

4405

4410

4415

4420

4425

4430

4435

4440

4445

4450

4455

4460

4465

4470

4475

4480

4485

4490

4495

4500

4505

4510

4515

4520

4525

4530

4535

4540

4545

4550

4555

4560

4565

4570

4575

4580

4585

4590

4595

4600

4605

4610

4615

4620

4625

4630

4635

4640

4645

4650

4655

4660

4665

4670

4675

4680

4685

4690

4695

4700

4705

4710

4715

4720

4725

4730

4735

4740

4745

4750

4755

4760

4765

4770

4775

4780

4785

4790

4795

4800

4805

4810

4815

4820

4825

4830

4835

4840

4845

4850

4855

4860

4865

4870

4875

4880

4885

4890

4895

4900

4905

4910

4915

4920

4925

4930

4935

4940

4945

4950

4955

4960

4965

4970

4975

4980

4985

4990

4995

5000

5005

5010

5015

5020

5025

5030

5035

5040

5045

5050

5055

5060

5065

5070

5075

5080

5085

5090

5095

5100

5105

5110

5115

5120

5125

5130

5135

5140

5145

5150

5155

5160

5165

5170

5175

5180

5185

5190

5195

5200

5205

5210

5215

5220

5225

5230

5235

5240

5245

5250

5255

5260

5265

5270

5275

5280

5285

5290

5295

5300

5305

5310

5315

5320

5325

5330

5335

5340

5345

5350

5355

5360

5365

5370

5375

5380

5385

5390

5395

5400

5405

5410

5415

5420

5425

5430

5435

5440

5445

5450

5455

5460

5465

5470

5475

5480

5485

5490

5495

5500

5505

5510

5515

5520

5525

5530

5535

5540

5545

5550

5555

5560

5565

5570

5575

5580

5585

5590

5595

5600

5605

5610

5615

5620

5625

5630

5635

5640

5645

5650

5655

5660

5665

5670

5675

5680

5685

5690

5695

5700

5705

5710

57

es necesario que alguna composición principal tenga una pureza de 100% para considerarse biocompatible. Por lo tanto, una composición principal puede comprender 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o incluso menos de los polímeros biocompatibles, por ejemplo, incluyendo los polímeros y otros materiales y excipientes descritos en este texto, y aún ser biocompatibles.

- 5 Para determinar si un polímero u otro material es biocompatible, puede ser necesario conducir un análisis de toxicidad. Estos ensayos son bien conocidos en el campo. Un ejemplo de este ensayo se puede realizar con células vivas de carcinoma, tal como las células tumorales GT3TKB, de la siguiente manera: la muestra es degradada en NaOH 1 M a 37°C hasta que se observa la degradación completa. La solución entonces se neutraliza con HC1 1 M. Aproximadamente 200 µL de varias concentraciones de los productos de muestra degradados se colocan en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos y se siembran con células de carcinoma gástrico de humano (GT3TKB) a 104/densidad del pocillo. Los productos de muestra degradados son incubados con las células GT3TKB durante 48 horas. Los resultados del ensayo se pueden transcribir a un diagrama como el % de crecimiento relativo contra la concentración de la muestra degradada en el pocillo de cultivo de tejido. Además, los polímeros y formulaciones de la presente descripción también pueden ser evaluados mediante pruebas *in vivo* bien conocidas, tales como implantes subcutáneos en ratas para confirmar que no causan niveles significantes de irritación e inflamación en los sitios de implante subcutáneo.

El término "biodegradable" es reconocido en el campo e incluye polímeros, composiciones y formulaciones, tales como aquellos descritos en este texto, que se proponen para la degradación durante el uso. Los polímeros biodegradables difieren típicamente de los polímeros no biodegradables en que los primeros pueden ser degradados durante el uso. En ciertos casos, este uso involucra el uso *in vivo*, tal como la terapia *in vivo* y en otros ciertos casos, este uso involucra el uso *in vitro*. En general, la degradación atribuible a la biodegradabilidad involucra la degradación de un polímero biodegradable en sus subunidades componentes, o digestión, por ejemplo, mediante un procedimiento bioquímico del polímero en subunidades no poliméricas, más pequeñas. En ciertos casos, se pueden identificar generalmente dos tipos diferentes de biodegradación. Por ejemplo, un tipo de biodegradación puede involucrar la escisión de enlaces (ya sea covalente o de otra manera) en la estructura principal del polímero. En esta biodegradación resultan típicamente monómeros y oligómeros, y aún más típicamente, esta biodegradación ocurre mediante la escisión de un enlace que conecta una o más subunidades de un polímero. En contraste, otro tipo de biodegradación puede involucrar la escisión de un enlace (ya sea covalente o de otra manera) interno a la cadena lateral o que conecta una cadena lateral con la estructura principal del polímero. Por ejemplo, un agente terapéutico u otra porción química unida como una cadena lateral a la estructura principal del polímero se puede liberar mediante la biodegradación. En ciertas modalidades, uno o el otro o ambos tipos generales de biodegradación pueden ocurrir durante el uso de un polímero.

Como se utiliza en este texto, el término "biodegradación" incluye ambos tipos generales de biodegradación. La velocidad de degradación de un polímero biodegradable depende frecuentemente en parte de una variedad de factores, que incluyen la identidad química del enlace responsable de cualquier degradación, el peso molecular, cristalinidad, bioestabilidad y grado de reticulación de este polímero, las características físicas (por ejemplo, forma y tamaño) de un implante y el modo y ubicación de la administración. Por ejemplo, mientras mayor sea el peso molecular, mayor será el grado de cristalinidad y/o mayor será la bioestabilidad. La biodegradación de cualquier polímero biodegradable es usualmente más lenta. El término "biodegradable" se propone para cubrir los materiales y procedimientos también denominados "bioerosionables".

En ciertos casos en donde el polímero biodegradable también tiene un agente terapéutico u otro material asociado con este, la velocidad de biodegradación de este polímero puede estar caracterizada por una velocidad de liberación de estos materiales. En estas circunstancias, la velocidad de biodegradación puede depender no únicamente de la identidad química y las características físicas del polímero, sino también de la identidad del(los) material(es) incorporado(s) en el mismo. La degradación de las composiciones principales incluyen no únicamente la escisión de los enlaces intramoleculares, por ejemplo, mediante la oxidación y/o la hidrólisis, sino también la disruptión de uniones intermoleculares, tal como la disociación de los complejos de hospedante/invitado por la formación de complejos competitivos con hospedantes de inclusión extraños.

En ciertos casos, las formulaciones poliméricas de la presente descripción son biodegradadas dentro de un periodo que es aceptable en la aplicación deseada. En ciertos casos, tal como en la terapia *in vivo*, esta degradación ocurre en un periodo usualmente menor que aproximadamente cinco años, un año, seis meses, tres meses, un mes, quince días, cinco días, tres días o aún un día con la exposición a una solución fisiológica con un pH entre 6 y 8 que tiene una temperatura de entre 25 y 37°C. En otros casos, el polímero se degrada en un periodo entre aproximadamente una hora y varias semanas, dependiendo de la aplicación deseada.

55 Como se utiliza en este texto, el término "bioerosionable" se refiere a polímeros que suministran cantidades efectivas, sostenidas de agente terapéutico al tejido objetivo durante los períodos de tiempo extendidos, deseados. De esta manera, un polímero de acuerdo con la descripción en el ambiente biológico del tejido del hospedante y similares, en un aspecto, se sujeta a enzimas hidrolíticas y especies oxidantes bajo, y en proporción a, la respuesta inflamatoria del hospedante. Esto da por resultado la liberación del agente terapéutico por vía de la ruptura de las uniones enlazadas, covalentes. De esta manera, en ciertos casos, los materiales de la descripción utilizan el proceso de reparación de la curación de heridas del propio mamífero para ser degradados con lo cual, como se describiera

anteriormente en este texto.

Los polímeros biodegradables ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímero de ácido poliláctico-glicólico (PLGA), han sido investigados extensivamente para la formulación de nanoparticulas. Estos polímeros son poliésteres que, con el implante en el cuerpo, se someten a la hidrólisis simple. Los productos de esta hidrólisis son porciones

5 biológicamente compatibles y metabolizables (por ejemplo, ácido láctico y ácido glicólico), las cuales son removidas eventualmente del cuerpo por el ciclo de ácido cítrico. Los productos poliméricos de la biodegradación se forman a una velocidad muy lenta y, por lo tanto, no afectan la función celular normal. Varios estudios de implantes con estos polímeros han probado ser seguros en las aplicaciones de suministro de fármacos, utilizados en forma de matrices, microesferas, materiales para el implante de huesos, suturas quirúrgicas y también en aplicaciones anticonceptivas

10 por sus efectos a largo plazo. Estos polímeros también se utilizan como materiales de injerto para órganos artificiales y recientemente como membranas de base en las investigaciones de ingeniería de tejidos. Nature Med. 824-826 (1996). De esta manera, estos polímeros han sido sometidos a prueba en cuanto al tiempo en varias aplicaciones y han probado ser seguros para el uso en humanos. Más importantemente, estos polímeros son aprobados por la FDA para el uso en humanos.

15 Cuando se utilizan polímeros para el suministro de agentes farmacológicamente activos *in vivo*, es esencial que los polímeros mismos no sean tóxicos y que se degraden en productos de degradación no tóxicos a medida que el polímero es erosionado por los fluidos corporales. Sin embargo, muchos polímeros biodegradables, sintéticos producen oligómeros y monómeros con la erosión *in vivo* que interactúan de manera adversa con el tejido circundante. D. F. Williams, J. Mater. Sci. 1233 (1982). Para minimizar la toxicidad del portador polimérico, intacto y 20 sus productos de degradación, los polímeros han sido diseñados en base a metabolitos de origen natural. Preferiblemente, los ejemplos más extensivamente estudiados de estos polímeros son los poliésteres derivados de ácido láctico o glicólico y poliamidas derivadas de aminoácidos.

25 Se conoce una variedad de polímeros bioerosionables o biodegradables y se utilizan para la liberación controlada de agentes farmacéuticos. Estos polímeros se describen en, por ejemplo, la patente norteamericana No. 4,291,013; la patente norteamericana No. 4,347,234; la patente norteamericana No. 4,525,495; la patente norteamericana No. 4,570,629; la patente norteamericana No. 4,572,832; la patente norteamericana No. 4,58 7,268; la patente norteamericana No. 4,638,045; la patente norteamericana No. 4,675,381; la patente norteamericana No. 4,745,160; y la patente norteamericana No. 5,219,980.

30 Una unión biohidrolizable (por ejemplo, éster, amida, carbonato, carbamatos o imida) se refiere a una unión que es escindida (por ejemplo, un éster es escindido para forma un hidroxilo y un ácido carboxílico) bajo condiciones fisiológicas. Las condiciones fisiológicas incluyen ambientes ácidos y básicos del tracto digestivo (por ejemplo, estómago, intestinos, etcétera), el ambiente ácido de un tumor, la escisión enzimática, metabolismo y otros procedimientos biológicos y se refiere preferiblemente a condiciones fisiológicas en un animal vertebrado, tal como un mamífero.

35 Como se utiliza en este texto, los términos "precursor de comonómero A", "conector", "grupo conector" y "porción conectora" se refieren a cualquier compuesto simétrico o asimétrico de cadena recta o ramificada, el cual con la reacción con un precursor monomérico de ciclodextrina u otra porción cíclica, adecuada enlaza dos de estas porciones conjuntamente. En ciertos casos, un precursor de comonómero A es un compuesto que contiene al menos 40 dos grupos funcionales a través de los cuales se puede lograr la reacción y de esta manera el enlace de los monómeros de ciclodextrina. Los ejemplos de grupos funcionales, los cuales pueden ser los mismos o diferentes, terminales e internos, de cada precursor de comonómero A incluyen, pero no están limitados a, los grupos amino, ácido, imidazol, hidroxilo, tio, haluro de acilo, -C=C- o -C=C- y derivados de los mismos. En los casos preferidos, los dos grupos funcionales son los mismos y están localizados en las terminaciones del comonómero. En ciertos casos, 45 un precursor de comonómero A contiene uno o más grupos pendientes con al menos un grupo funcional a través del cual se puede lograr la reacción y de esta manera el enlace del agente terapéutico o ligando de establecimiento de objetivos o se puede lograr la polimerización ramificada. Los ejemplos de grupos funcionales, los cuales pueden ser los mismos o diferentes, terminales o internos, de cada grupo pendiente del precursor de comonómero A incluyen, pero no están limitados a, grupos amino, ácido, imidazol, hidroxilo, tiol, haluro de acilo, etileno y etino y derivados de los mismos. En ciertos casos, el grupo pendiente es un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono (preferiblemente 50 de 1 a 6 átomos de carbono) de cadena ramificada, cíclica o recta, (no)sustituido, o arilalquilo que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos, por ejemplo N, O, S, dentro de la cadena o el anillo.

55 Con la copolimerización de un precursor de comonómero A con un precursor de monómero de ciclodextrina, dos monómeros de ciclodextrina se pueden enlazar conjuntamente mediante la unión del lado de hidroxilo primario de un monómero de ciclodextrina con el lado de hidroxilo primario de otro monómero de ciclodextrina, al unir el lado de hidroxilo secundario de un monómero de ciclodextrina con el lado de hidroxilo secundario de otro monómero de ciclodextrina o al unir el lado de hidroxilo primario de un monómero de ciclodextrina con el lado de hidroxilo secundario de otro monómero de ciclodextrina. Por consiguiente, las combinaciones de estos enlaces pueden existir en el copolímero final. Tanto el precursor de comonómero A como el comonómero A del copolímero final pueden ser neutros, catiónicos (por ejemplo, al contener grupos protonados tales como, por ejemplo, grupos amonio cuaternario) 60 o aniónicos (por ejemplo, al contener grupos desprotonados tales como, por ejemplo, sulfato, fosfato, borinato o carboxilato) . La carga del comonómero A del copolímero se puede ajustar al ajustar las condiciones de pH. Los

ejemplos de precursores de comonómero A adecuados incluyen, pero no están limitados a, succinimida (por ejemplo, ditiobis(propionato de succinimidilo) DSP y suberato de dis-succinimidilo (DSS)), glutamatos y aspartatos).

Los polímeros que contienen ciclodextrina de la presente descripción pueden, ser lineales, ramificados o injertados. Como se utiliza en este texto, el término "polímero que contiene ciclodextrina, lineal" se refiere a un polímero que

- 5 comprende moléculas de ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ) ciclodextrina o derivados de los mismos que son insertados dentro de una cadena polimérica. Como se utiliza en este texto, el término "polímero que contiene ciclodextrina, injertado" se refiere a un polímero que comprende moléculas de ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ) ciclodextrina o derivados de mismas que están pendientes de la cadena polimérica. El término "polímero de injerto" utilizado en este texto se refiere a una molécula polimérica que tiene porciones adicionales unidas como grupos pendientes junto con una estructura principal del polímero. El término "polimerización de injerto" representa una polimerización en la cual una cadena lateral es injertada en una cadena polimérica, la cadena lateral que consiste de uno o varios de otros monómeros. Las propiedades del copolímero de injerto obtenidas tales como, por ejemplo solubilidad, punto de fusión, absorción de agua, humectabilidad, propiedades mecánicas, comportamiento de adsorción, etcétera, se desvían más o menos pronunciadamente de aquellas del polímero inicial como una función del tipo y la cantidad de los monómeros injertados. El término "relación de injerto", utilizado en este texto, significa el porcentaje en peso de la cantidad de los monómeros injertados en base al peso del polímero. Como se utiliza en este texto, un polímero que contiene ciclodextrina,  $H$  injertado se refiere a una estructura principal del polímero con una pluralidad de puntos de ramificación, en donde cada punto de ramificación es un punto de inicio de aún otra cadena de la estructura principal del polímero y cada sección de la estructura principal del polímero puede tener una pluralidad de moléculas de ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ) ciclodextrina, o derivados de las mismas, insertadas o injertadas en la cadena.

La expresión "resto de ciclodextrina" se refiere a moléculas de ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ) ciclodextrina o derivados de las mismas, las cuales pueden estar en sus formas oxidadas o reducidas. Los restos de ciclodextrina pueden comprender conectores opcionales. Los agentes terapéuticos, opcionales y/o ligandos de establecimiento de objetivos pueden ser enlazados adicionalmente a esas porciones por vía de un conector opcional. El enlace puede ser covalente (opcionalmente por vía de enlaces biohidrolizables, por ejemplo, esteres, amidas, carbamatos y carbonatos) o puede ser un complejo de hospedante-invitado entre el derivado de ciclodextrina y el agente terapéutico y/o ligando de establecimiento de objetivos o los conectores opcionales de cada uno. Los restos de ciclodextrina pueden incluir además una o más porciones de carbohidratos, preferiblemente porciones de carbohidratos simples, tales como galactosa, unidas al núcleo cíclico, ya sea directamente (es decir, por vía de un enlace de carbohidrato) o a través de un grupo conector.

El término "ED<sub>50</sub>" significa la dosis de un fármaco que produce 50% de su respuesta o efecto máximo.

Una "cantidad efectiva" de un compuesto principal, con respecto al método de tratamiento principal, se refiere a una cantidad del agente terapéutico en una preparación que, cuando se aplica como parte de un régimen de dosificación deseado, proporciona un beneficio de acuerdo con estándares clínicamente aceptables para el tratamiento o profilaxis de un trastorno particular.

La expresión "proveedores de atención sanitaria" se refiere a individuos u organizaciones que proporcionan servicios de atención sanitaria a una persona, comunidad, etcétera. Los ejemplos de "proveedores de atención sanitaria" incluyen doctores, hospitales, comunidades de jubilación de cuidado continuo, instalaciones de enfermería calificada, instalaciones de cuidado subagudo, clínicas, clínicas de múltiples especialidades, centros ambulatorios autoestables, agencias de salud domiciliarias y Organizaciones para el mantenimiento de la salud (HMO's, por sus siglas en inglés).

La(s) "instrucción(es)" utilizada (s) en este texto significan documentos que describen materiales o metodologías relevantes que pertenecen a un equipo. Estos materiales pueden incluir cualquier combinación de los siguientes: información de antecedentes, lista de componentes y su información de disponibilidad (información de adquisición, etcétera), protocolos breves o detallados para el uso del equipo, medición de dificultades, referencias, soporte técnico y cualquier otro documento relacionado. Las instrucciones pueden suministrarse con el equipo o como un componente de miembros separados, ya sea como una forma de papel o una forma electrónica que puede suministrarse en un dispositivo de memoria leible por computadora o puede ser descargado de un sitio Web de Internet o como una presentación registrada. Las instrucciones pueden comprender uno o múltiples documentos y se propone que incluya actualizaciones futuras.

El "equipo" utilizado en este texto significa una colección de al menos dos componentes que constituyen el equipo. Conjuntamente, los componentes constituyen una unidad funcional para un propósito dado. Los componentes de miembros individuales pueden ser empacados físicamente en conjunto o por separado. Por ejemplo, un equipo que comprende una instrucción para el uso del equipo puede o no incluir físicamente la instrucción con otros componentes de miembros individuales. En cambio, la instrucción puede suministrarse como un componente de medios separados, ya sea en forma de papel o en forma electrónica que puede suministrarse en un dispositivo de memoria leible por computadora o puede ser descargado de un sitio Web de Internet o como una presentación registrada.

El término "LD<sub>50</sub>" significa la dosis de un fármaco que es letal en 50% de los sujetos de prueba.

Un "paciente" o "sujeto" a ser tratado por el método principal puede significar un sujeto ya sea humano o no humano.

Las "polimerizaciones" de la presente descripción incluyen mecanismos radicales, aniónicos y catiónicos, así como también reacciones de moléculas biofuncionales (análogas a la formación de nilón, por ejemplo la reacción de moléculas cada una de las cuales lleva dos o más porciones reactivas diferentes que reaccionan entre sí (pero,

5 preferiblemente, son desfavorecidas de la reacción intramolecularmente por restricciones estéricas, conformacionales u otras restricciones), o la reacción de dos o más compuestos diferentes, cada compuesto que lleva dos o más porciones reactivas que reaccionan solamente con las porciones reactivas de diferentes compuestos (es decir, intermolecularmente)), así como también polimerizaciones catalizadas por metales, tales como metátesis de olefinas y otras reacciones de polimerización conocidas para aquellas personas expertas en el campo.

10 El término tratamiento "profiláctico o terapéutico" es reconocido en el campo e incluye la administración al hospedante de una o más de las composiciones principales. Si se administra antes de la manifestación clínica de la condición indeseada (por ejemplo una enfermedad u otro estado indeseado del animal hospedante) entonces el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al hospedante contra el desarrollo de la condición indeseada, mientras que si se administra después de la manifestación de la condición indeseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, se propone para disminuir, mejorar o estabilizar la condición indeseada, existente o los efectos colaterales de la misma).

15 El término "prevenir" es reconocido en el campo y cuando se utiliza con relación a una condición, tal como una recurrencia local (por ejemplo, dolor), una enfermedad tal como el cáncer, un complejo de síndromes tales como insuficiencia cardíaca o cualquier otra condición médica, es bien entendido el campo e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia de, o retarda el comienzo de, síntomas de una condición médica en un sujeto con relación a un sujeto que no recibe la composición. De esta manera, la prevención del cáncer incluye, por ejemplo, la reducción del número de crecimientos cancerosos, detectables en una población de pacientes que reciben un tratamiento profiláctico con una relación a una población de control no tratada y/o el retardo de la aparición de los crecimientos cancerosos, detectables en una población tratada contra una población de control no tratada, por ejemplo, mediante una cantidad estadística y/o clínicamente significante. La prevención de una infección incluye, por ejemplo, la reducción del número de diagnósticos de la infección en una población tratada contra una población de control no tratada y/o el retardo del comienzo de los síntomas de la infección en una población tratada contra una población de control no tratada. La prevención del dolor incluye, por ejemplo, la reducción de la frecuencia de, o alternativamente el retardo de, sensaciones de dolor experimentadas por sujetos en una población tratada contra una población de control no tratada.

20 Como se utiliza en este texto, la expresión "agente terapéutico" incluye cualquier compuesto o composición biológicamente activo de origen sintético o natural de material que, cuando se administra a un organismo (animal humano o no humano), induce un efecto farmacológico, inmunogénico y/o fisiológico deseado mediante la acción local y/o sistémica. Por lo tanto, el término incluye aquellos compuestos o productos químicos considerados tradicionalmente como fármacos, vacunas y agentes biofarmacéuticos que incluyen moléculas, tales como proteínas, péptidos, hormonas, ácidos nucleicos, construcciones génicas y similares. Más particularmente, el término "agente terapéutico" incluye compuestos o composiciones para el uso en todas las áreas terapéuticas, principales que incluyen, pero no están limitados a, adyuvantes; agentes antiinfecciosos tales como antibióticos y agentes antivirales; analgésicos y combinaciones analgésicas, anoréxicos, agentes anti-inflamatorios, anti-epilépticos, anestésicos locales y generales, hipnóticos, sedantes, agentes antipsicóticos, agentes neurolépticos, antidepresivos, ansiolíticos, antagonistas, agentes de bloqueo de neuronas, agentes anticolinérgicos y colinomiméticos, agentes antimuscarínicos y muscarínicos, antiadrenérgicos, antiarrítmicos, agentes antihipertensos, hormonas y nutrientes, antiarritmicos, agentes antiasmáticos, anticonvulsivos, antihistaminas, antinauseosos, antineoplásicos, antipruríticos, antipiréticos; antiespasmódicos, preparaciones cardiovasculares (que incluyen bloqueadores de canales de calcio, beta-bloqueadores, beta-agonistas y antiarrítmicos), antihipertensos, diuréticos, vasodilatadores; estimuladores del sistema nervioso central; preparaciones para la tos y el resfriado; descongestionantes; agentes de diagnóstico; hormonas; estimuladores del crecimiento óseo e inhibidores de resorción ósea; imunosupresores; relajantes musculares; psicoestimulantes; sedantes; tranquilizantes; proteínas, péptidos y fragmentos de los mismos (ya sea de origen natural, sintetizados químicamente o producidos de manera recombinante); y moléculas de ácido nucleico (formas poliméricas de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos (ARN) o deoxirribonucleótidos (ADN) que incluyen moléculas tanto de cadena doble como individual, construcciones génicas, vectores de expresión, moléculas antisentido y similares), moléculas pequeñas (por ejemplo, doxorubicina) y otras macromoléculas biológicamente activas tales como, por ejemplo, proteínas y enzimas. El agente puede ser un agente biológicamente activo utilizado en aplicaciones médicas, inclusive veterinarias, y en la agricultura, tal como con plantas, así como también otras áreas. El término agente terapéutico también incluye sin limitación, medicamentos; vitaminas, complementos minerales; sustancias utilizadas para el tratamiento, prevención, diagnosis, curación o mitigación de una enfermedad o malignidad; o sustancias que afectan la estructura o función del cuerpo; o pro-fármacos, los cuales se vuelven biológicamente activos o más activos después de que han sido colocados en un ambiente fisiológico, predeterminado.

25 60 Como se utiliza en este texto, la expresión "baja solubilidad acuosa" se refiere a compuestos insolubles en agua que tienen pobre solubilidad en agua, esto es <5 mg/ml en un pH fisiológico (6,5-7,4). Preferiblemente, su solubilidad en agua es <1 mg/ml, más preferiblemente <0,1 mg/ml. Es deseable que el fármaco sea estable en el agua como una

dispersión; de otra manera, puede ser deseable una forma sólida liofilizada o secada por aspersión.

Los ejemplos de algunos fármacos insolubles en agua, preferidos incluyen agentes inmunosupresivos, tales como ciclosporinas que incluyen ciclosporina (ciclosporina A), agentes inmunoactivos, agentes antivirales y antifungales, agentes antineoplásicos, analgésicos y agentes anti-inflamatorios, antibióticos, anti-epilépticos, anestésicos, hipnóticos, sedantes, agentes antipsicóticos, agentes neurolépticos, antidepresivos, ansiolíticos, agentes anticonvulsivos, antagonistas, agentes bloqueadores de neuronas, anticolinérgicos y agentes colinomiméticos, agentes antimuscarínicos y muscarínicos, antiadrenérgicos y antiarritmicos, agentes antihipertensos, hormonas y nutrientes. Una descripción detallada de estos y otros fármacos adecuados se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Edición, 1990, Mack Publishing Co. Filadelfia, Pa.

10 La expresión "índice terapéutico" se refiere al Índice terapéutico de un fármaco definido como. LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto, con respecto a un método de tratamiento, se refiere a una cantidad del(s) compuesto(s) en una preparación que, cuando se administra como parte de un régimen de dosificación deseado (a un mamífero, preferiblemente un humano) alivia un síntoma, mejora una condición o disminuye la velocidad del comienzo de las condiciones de enfermedad de acuerdo con estándares clínicamente aceptables para el trastorno o condición que es tratado o el propósito cosmético, por ejemplo, en una relación razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico.

Una "dosificación diaria terapéuticamente efectiva" de un compuesto, con respecto a un método de tratamiento, se refiere a una cantidad del(s) compuesto(s) en una preparación que, cuando se administra como parte de un régimen de dosificación diario, deseado (a un mamífero, preferiblemente un humano) alivia un síntoma, mejora una condición o disminuye la velocidad del comienzo de las condiciones de enfermedad de acuerdo con estándares clínicamente aceptables para el trastorno o condición que es tratado o el propósito cosmético, por ejemplo, en una relación razonable de beneficio/riesgo que es aplicable a cualquier tratamiento médico.

(b) *Términos Químicos*

Una cadena alifática comprende las clases de alquilo, alquenilo y alquinilo definidas posteriormente. Una cadena alifática, recta está limitada a radicales de cadena de carbono no ramificada. Como se utiliza en este texto, el término "grupo alifático" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático, de cadena recta, cadena ramificada o cíclica e incluye grupos alifáticos, saturados e insaturados, tales como un grupo alquilo, un grupo alquenilo y un grupo alquinilo.

Alquilo se refiere a un radical de cadena de carbono ramificada o no ramificada, completamente saturada que tiene el número de átomos de carbono especificado, o hasta 30 átomos de carbono si no se hace una especificación. Por ejemplo, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono se refiere a radicales tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo y aquellos radicales que son isómeros posicionales de esos radicales. Alquilo de 10 a 30 átomos de carbono incluye decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, heneicosilo, docosilo, tricosilo y tetracosilo. En las modalidades preferidas, un grupo alquilo de cadena recta o cadena ramificada tiene 30 o menos átomos de carbono en su estructura principal (por ejemplo, de 1 a 30 átomos de carbono para las cadenas rectas, de 3 a 30 átomos de carbono para las cadenas ramificadas) y más preferiblemente 20 o menos. De igual manera, los grupos cicloalquilo preferidos tienen de 3 a 10 átomos de carbono en su estructura de anillo y más preferiblemente tienen 5, 6 o 7 átomos de carbono en la estructura de anillo.

Además, el término "alquilo" (o "alquilo inferior") utilizando por toda la especificación, los ejemplos y las reivindicaciones se propone para incluir "grupos alquilo no sustituidos" y "grupos alquilo sustituidos", los últimos de los cuales se refieren a porciones de alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un átomo de hidrógeno en uno o más átomos de carbono de la estructura principal del hidrocarburo. Estos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, hidroxilo, carbonilo (tal como carboxilo, alcoxcarbonilo, formilo o acilo), tiocarbonilo (tal como tioéster, tioacetato o tioformiato), alcoxi, fosforilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, ciano, nitro, sulfhidrilo, alquilitio, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclico, aralquilo o una porción aromática o heteroaromática. Se entenderá por aquellas personas expertas en el campo que las porciones sustituidas en la cadena de hidrocarburo pueden ser sustituidas por si mismas, si es apropiado. Por ejemplo, los sustituyentes de un grupo alquilo sustituido pueden incluir formas sustituidas y no sustituidas de amino, azido, imino, amido, fosforilo (que incluye fosfonato y fosfinato), sulfonilo (que incluye sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato) y grupos sililo, así como también éteres, alquilitios, carbonilos (que incluyen cetonas, aldehídos, carboxilatos y esteres), -CF<sub>3</sub>, -CN y similares. Los grupos alquilo sustituidos, ejemplares se describen posteriormente. Los grupos cicloalquilo pueden ser sustituidos adicionalmente por alquilos, alquenilos, alcoxilos, alquilitios, aminoalquilos, alquilos sustituidos por carbonilo, -CF<sub>3</sub>, -CN y similares.

A menos que el número de átomos de carbono se especifique de otra manera, "alquilo inferior", como se utiliza en este texto, significa un grupo alquilo, como se definiera anteriormente, pero que tiene de uno a diez átomos de carbono, más preferiblemente de uno a seis átomos de carbono en su estructura principal, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, y terc-butilo. De igual manera, "alquenilo inferior" y "alquinilo inferior"

tienen longitudes de cadena similares. Por toda la solicitud, los grupos alquilo preferidos son grupos alquilo inferiores. En los casos preferidos, un sustituyente designado en este texto como alquilo es alquilo inferior.

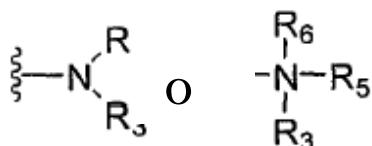
El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo, como se definiera anteriormente, que tiene un radical de azufre unido al mismo. En los casos preferidos, la porción "alquiltio" es representada por uno de -(S)-alquilo, -(S)-alquenilo, -(S)-alquinilo y -(S)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>1</sub>, en donde m y R<sub>1</sub> son definidos posteriormente. Los grupos alquiltio representativos incluyen metiltio, etiltio y similares.

Alquenilo se refiere a cualquier radical de cadena de carbono saturada, ramificada o no ramificada que tiene el número de átomos de carbono especificado, o hasta 26 átomos de carbono si no se especifica una limitación en el número de átomos de carbono; y que tiene 1 o más enlaces dobles en el radical. Alquenilo de 6 a 26 átomos de carbono es ejemplificado por hexenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo, undecenilo, dodenilo, tridecenilo, tetradecenilo, pentadecenilo, hexadecenilo, heptadecenilo, octadecenilo, nonadecenilo, eicosenilo, heneicosenoilo, docosenilo, tricosenilo y tetracosenilo, en sus diversas formas isoméricas, donde la(s) unión(es) insaturada(s) se puede localizar en cualquier parte en el radical y puede tener la configuración ya sea (Z) o (E) alrededor de la(s) unión(es) doble (s).

Alquinilo se refiere a radicales de hidrocarbilo del dominio de alquenilo, pero que tienen 1 o más uniones triples en el radical.

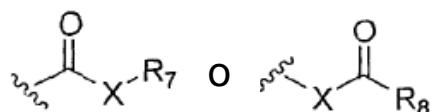
Los términos ""alcoxilo" o "alcoxi" utilizados en este texto se refieren a un grupo alquilo, como se define posteriormente, que tiene un radical de oxígeno unido al mismo. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, terc-butoxi y similares. Un "éter" es dos hidrocarburos enlazados covalentemente por un átomo de oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un grupo alquilo que vuelve ese grupo alquilo un éter es o se asemeja a un grupo alcoxilo, tal como se puede representar por uno de -O-alquilo, -O-alquenilo, -O-alquinilo, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>1</sub>, donde m y R<sub>1</sub> se describen posteriormente.

Los términos "amina" y "amino" son reconocidos en el campo y se refieren a aminas tanto sustituidas como no sustituidas, por ejemplo, una porción que puede ser representada por las fórmulas generales:



en las que R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, alquenilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>1</sub> o R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> tomados junto con el átomo de N al cual están unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura de anillo; R<sub>1</sub> representa un grupo alquenilo, arilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclico o policíclico; y m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8. En los casos preferidos, solo uno de R<sub>3</sub> o R<sub>5</sub> puede ser un grupo carbonilo, por ejemplo, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y el átomo de nitrógeno juntos no forman una imida. En los casos aún más preferidas, R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> (y opcionalmente R<sub>6</sub>) representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, alquenilo, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>1</sub>. De esta manera, el término "alquilamina" utilizado en este texto significa un grupo amina, como se definiera anteriormente, que tiene un grupo alquilo sustituido o no sustituido unido al mismo, es decir, al menos uno de R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> es un grupo alquilo. En ciertos casos, un grupo amino o una alquilamina es básica, lo que significa que tiene un pKa > 7,00. Las formas protonadas de estos grupos funcionales tienen pKas con relación al agua superiores a 7,00.

El término "carbonilo" es reconocido en el campo e incluye estas porciones como se puede representar por la fórmula general:



en las que X es un enlace o representa un átomo de oxígeno o azufre y R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, alquenilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>1</sub> o una sal farmacéuticamente aceptable, R<sub>8</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, alquenilo o -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>1</sub>, donde m y R<sub>1</sub> son como se definiera anteriormente. Donde X es un átomo de oxígeno y R<sub>7</sub> o R<sub>8</sub> no es hidrógeno, la fórmula representa un "éster". Donde X es un átomo de oxígeno, y R<sub>7</sub> es como se definiera anteriormente, la porción es referida en este texto como un grupo carboxilo y particularmente cuando R<sub>7</sub> es un átomo de hidrógeno, la fórmula representa un "ácido carboxílico". Donde X es un átomo de oxígeno, y R<sub>8</sub> es un átomo hidrógeno, la fórmula representa un "formiato". En general, donde el átomo de oxígeno de la fórmula anterior es reemplazado por azufre, la fórmula representa un grupo "tiocarbonilo". Donde X es un átomo de azufre y R<sub>7</sub> o R<sub>8</sub> no es hidrógeno, la fórmula representa un grupo "tioéster". Donde X es un átomo de

azufre y R7 es hidrógeno, la fórmula representa un grupo de "ácido tiocarboxílico". Donde X es un átomo de azufre y R8 es hidrógeno, la fórmula representa un grupo "tioformiato". Por otra parte, donde X es un enlace y R7 no es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "cetona". Donde X es un enlace, y R7 es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "aldehido".

- 5 El término "derivatizado" se refiere a moléculas químicamente modificadoras. Las modificaciones químicas pueden ser artificiales, tales como la formación de fármacos, naturales, tales como la formación de metabolitos. El artífice experto reconocerla fácilmente la variedad de maneras en que se pueden modificar las moléculas, tales como oxidaciones, reducciones, sustituciones electrofílicas/nucleofílicas, alquilaciones, formaciones de éster/amida y similares. Por ejemplo, las ciclodextrinas de la presente descripción pueden ser modificadas químicamente por medio de la aminación, tosilación o yodación antes de unirlas covalentemente a la matriz polimérica. De igual manera, los agentes terapéuticos pueden ser modificados químicamente mediante la preparación de profármacos (por ejemplo, glicina-camptotecina).

Los términos "grupo heterocíclico" o "grupo heterocíclico" se refieren a estructuras de anillo de 3 a 10 miembros, más preferiblemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policíclicos. Los grupos heterocíclico incluyen, por ejemplo, tiofeno, tianreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatiina, porrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinnolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenarsazina, fenotiazina, furazan, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como azetidinonas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas y similares. El anillo heterocíclico puede ser sustituido en una o más porciones por estos sustituyentes como se describiera anteriormente, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfato, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, sulfamoilo, sulfinito, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehido, éster, heterocíclico, una porción aromática o heteroaromática, -CF<sub>3</sub>, -GK o similares.

25 Como se utiliza en este texto, el término "sustituido" se contempla para incluir todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en este texto anteriormente. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y los mismos o diferentes para los compuestos orgánicos apropiados. Para los propósitos de esta descripción, los heteroátomos, tales como nitrógeno, pueden tener sustituyentes ce hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en este texto que satisfaga las valencias de los heteroátomos. Esta descripción no se propone que sea limitada de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos.

35 El termino "hidrocarbilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente comprendido de cadenas de carbono o anillos de hasta 26 átomos de carbono a los cuales se unen átomos de hidrógeno. El término incluye grupos alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo y arilo, grupos que tienen una mezcla de uniones saturadas e insaturadas, anillos carbocíclicos e incluye combinaciones de estos grupos. Se puede referir a estructuras cíclicas, de cadena ramificada, de cadena recta o combinaciones de las mismas.

40 El término "hidrocarbileno" se refiere a un radical hidrocarbilo divalente. Los ejemplos representativos incluyen alquileno, fenileno o ciclohexileno. Preferiblemente, la cadena de hidrocarbileno está completamente saturada y/o tiene una cadena de 1 a 10 átomos de carbono.

Como se utiliza en este texto, el término "nitro" significa -NO<sub>2</sub>; el término "halógeno" indica -F, -Cl, -Br o -I; el término "sulfídrico" significa -SH; el término "hidroxilo" significa -OH; y el término "sulfonilo" significa -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

45 Se entenderá que "sustitución" o "sustituido por" incluye la condición implícita que esta sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente y que la sustitución da por resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no se somete espontáneamente a la transformación tal como mediante el reordenamiento, ciclización, eliminación, etcétera.

50 Las sustituciones análogas se pueden hacer a grupos alquenilo y alquinilo para producir, por ejemplo, aminoalquenilos, aminoalquinilos, amidoalquenilos, amidoalquinilos, iminoalquenilos, iminoalquinilos, tioalquenilos, tioalquinilos, alquenilos sustituidos por carbonilo o alquinilos.

Como se utiliza en en este texto, la definición de cada expresión, por ejemplo, alquilo, m, n, etcétera, cuando ocurre más de una vez en cualquier estructura, se propone que sea independiente de su definición en otra parte en la misma estructura.,

55 Los términos triflilo, tosilo mesilo y nonaflilo son reconocidos en el campo y se refieren a grupos trifluorometanosulfonilo, p-toluensulfonilo, metanosulfonilo y nonafluorobutanosulfonilo, respectivamente. Los términos triflato, tosilato, mesilato y nonaflato son reconocidos en el campo y se refieren a grupos funcionales de éster de trifluorometanosulfonato, éster de p-toluensulfonato, éster de metanosulfonato y éster de nonafluorobutanosulfonato y moléculas que contienen los grupos, respectivamente.

Las abreviaciones Me, Et, Ph, Ms representan metilo, etilo, fenilo y metanosulfonilo, respectivamente. Una lista más completa de las abreviaciones utilizadas por químicos orgánicos de experiencia ordinaria en el campo aparece en el primer artículo de cada volumen de the Journal of Organic Chemistry; esta lista es presentada típicamente en una tabla titulada Standard List of Abbreviations. Las abreviaciones contenidas en la lista y todas las abreviaciones utilizadas por químicos orgánicos de experiencia ordinaria en el campo, se incorporan por este acto a manera de referencia.

Ciertos compuestos de la presente descripción pueden existir en formas geométricas o estereoisoméricas particulares. La presente descripción contempla todos estos compuestos, que incluyen cis- y trans-isómeros, (R)- y (S)-enantiómeros, diastereómeros, (d)-isómeros, (l)-isómeros, las mezclas racémicas de los mismos y otras mezclas de los mismos, que se encuentran dentro del alcance de la descripción. Los átomos de carbono asimétricos, adicionales pueden estar presentes en un sustituyente, tal como un grupo alquilo. Todos estos isómeros, así como también mezclas de los mismos, se propone que estén incluidos en esta descripción.

Si, por ejemplo, se desea un enantiómero particular de un compuesto de la presente descripción, se puede preparar mediante la síntesis asimétrica o mediante la derivatización con un auxiliar quiral, donde la mezcla diastereomérica, resultante es separada y el grupo auxiliar es escindido para proporcionar los enantiómero deseados, puros. Alternativamente, donde la molécula contiene un grupo funcional, básico, tal como amino, o un grupo funcional ácido, tal como hidroxilo, las sales diastereoméricas pueden formarse con un ácido ópticamente activo, apropiado o una base, seguido por la resolución de los diastereómeros formados de esta manera mediante la cristalización fraccional o por medios cromatográficos bien conocidos en el campo y la recuperación subsecuente de los enantiómeros puros.

Los equivalentes contemplados de los compuestos descritos anteriormente incluyen compuestos que corresponden de otra manera a los mismos y que tienen las mismas propiedades generales de los mismos, en donde se hacen una o más variaciones simples de los sustituyentes que no afectan adversamente la eficacia del compuesto. En general, los compuestos de la presente descripción se pueden preparar mediante los métodos ilustrados en los esquemas de reacción generales, por ejemplo, como se describe posteriormente, o mediante modificaciones de los mismos, utilizando materiales de inicio fácilmente disponibles, reactivos y procedimiento de síntesis convencionales. En estas reacciones, también es posible hacer uso de variantes mismas que son conocidas, pero no se mencionan en este texto.

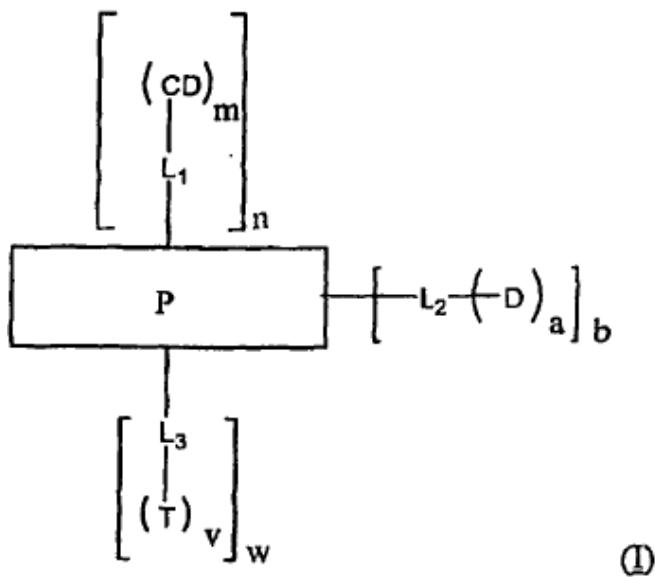
Para propósitos de esta descripción, los elementos químicos se definen de acuerdo con la tabla periódica de los elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 67-Edition, 1986-87, cubierta interior. También para propósitos de esta descripción, el término "hidrocarburo" se contempla para incluir todos los compuestos permisibles que tienen al menos un átomo de hidrógeno y un átomo de carbono. En un aspecto amplio, los hidrocarburos permisibles incluyen compuestos cíclicos y acíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos, orgánicos los cuales pueden ser sustituidos o no sustituidos.

### 35 III. Aplicaciones Ejemplares del Método y las Composiciones

#### (a) Composiciones Ejemplares

La presente descripción incluye conjugados poliméricos, tales como conjugados poliméricos que contienen ciclodextrina, en donde uno o más agentes terapéuticos/bioactivos están unidos covalentemente. En ciertos casos, el agente terapéutico es una molécula pequeña, macromolécula, anticuerpo, péptido, proteína, enzima, ácido nucleico o un polímero que tenga una función terapéutica. Los polímeros incluyen polímeros que contienen ciclodextrina, lineales o ramificados y polímeros injertados con ciclodextrina. Los polímeros que contienen ciclodextrina, ejemplares que pueden ser modificados como se describe en este texto se enseñan en la patente norteamericana No. 6,509,323, solicitud de patente norteamericana publicada No. 2002/151523 y solicitud de patente norteamericana número de serie 10/372723 (publicacada como US2004/0087024). Estos polímeros son útiles como portadores para el suministro terapéutico de moléculas pequeñas y pueden mejorar la estabilidad y solubilidad del fármaco cuando se utilizan *in vivo*.

Por consiguiente, un caso de la presente descripción es un compuesto polimérico representado por la fórmula I:



en la que

P representa una cadena polimérica lineal o ramificada;

CD representa un resto cíclico, tal como un resto de ciclodextrina;

5      L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub>, independientemente de cada vez que aparecen, pueden estar ausentes o pueden representar un grupo conector;

D, independientemente de cada vez que aparece, representa un agente terapéutico o un profármaco del mismo;

T, independientemente de cada vez que aparece, representa un ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo;

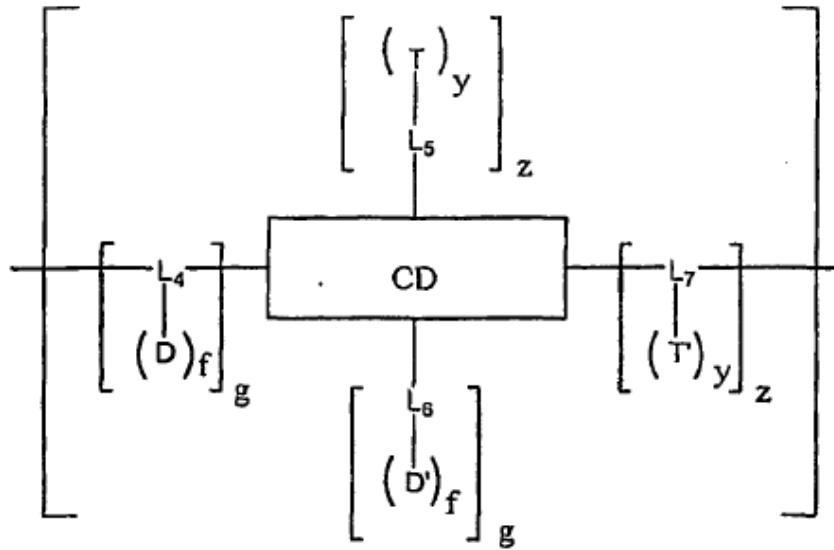
10     a, m, y v, independientemente de cada vez que aparecen, representan números enteros en el intervalo de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 8, 1 a 5 o incluso 1 a 3);

n y w, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 0 a aproximadamente 30.000 (preferiblemente <25.000, <20.000, <15.000, <10.000, <5.000, <1.000, <500, <100, <50, <25, <10, o incluso <5); y

15     b representa un numero entero en el intervalo de 1 a aproximadamente 30.000 (preferiblemente <25.000, <20.000, <15.000, <10.000, <5.000, <1.000, <500, <100, <50, <25, <10, o incluso <5),

en donde cualquier P comprende restos de ciclodextrina o N es al menos 1.

En ciertos casos, P contiene una pluralidad de restos de ciclodextrina dentro de la cadena polimérica lo que es opuesto a los restos de ciclodextrina que son injertadas en grupos pendientes fuera de la cadena polimérica. De esta manera, en ciertos casos, la cadena polimérica de la fórmula I además comprende n' unidades de U, en donde n' representa un número entero en el intervalo de 1 a aproximadamente 30.000 (preferiblemente <25.000, <20.000, <15.000, <10.000, <5.000, <1.000, <500, <100, <50, <25, <10, o incluso <5); y U es representado por la fórmula general:



en la que

CD representa un resto cíclico tal como un resto de ciclodextrina, o un derivado de la misma;

5 L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub> y L<sub>7</sub>, independientemente de cada vez que aparecen, pueden estar ausentes o pueden representar un grupo conector;

D y D', independientemente de cada vez que aparecen, representan el mismo o diferente agente terapéutico o formas de profármaco del mismo;

T y T', independientemente de cada vez que aparecen, representan el mismo o diferente ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo;

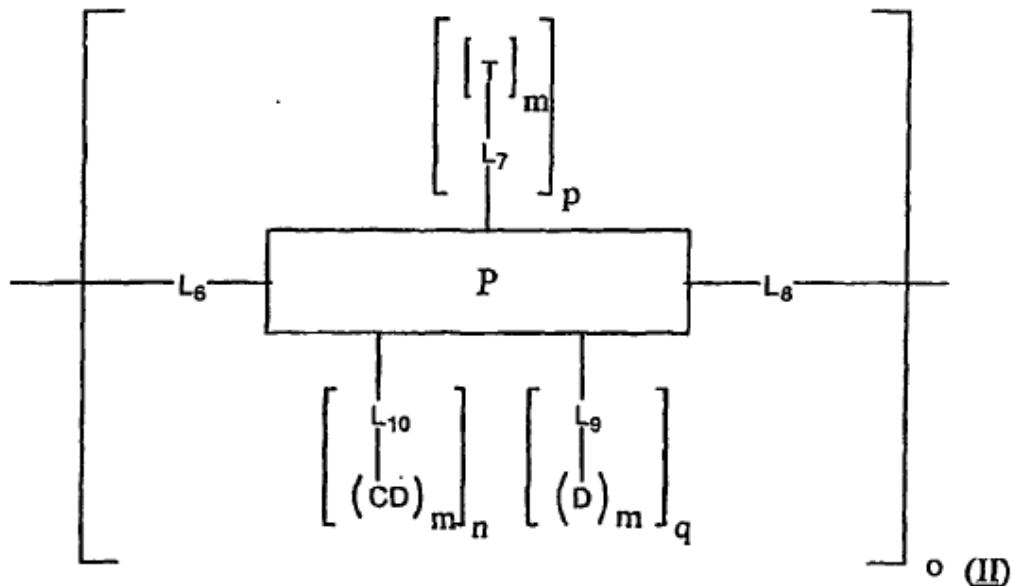
10 f e y, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 1 y 10; y

g y z, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 0 y 10.

En los casos preferidos, L<sub>4</sub> y L<sub>7</sub> representan grupos conectores.

En ciertos casos, el polímero se puede seleccionar de polisacáridos y otros polímeros biocompatibles no proteínicos y combinaciones de los mismos, que contienen al menos un grupo hidroxilo terminal, tal como polivinilpirrolidona, 15 polí(oxietilen)glicol (PEG), anhídrido polisuccínico, ácido polisébásico, PEG-fosfato, poliglutamato, polietilenimina, diviniléter de anhídrido maleico (DIVMA), celulosa, pululanos, inulina, alcohol polivinílico (PVA), N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), dextrano y almidón de hidroxietilo (HES) y tienen grupos pendientes, opcionales para el injerto de agentes terapéuticos, ligandos de establecimiento de objetivos y/o restos de ciclodextrina. En ciertos casos, el polímero puede ser biodegradable, tal como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polialquil-20 2-cianoacrilatos), polianhídridos y poliorthoésteres o puede ser bioerosionable, tal como copolímeros de polilactida-glicólido y derivados de los mismos, poliaminoácidos no peptídicos, poliiminocarbonatos, ácidos poli-alfa-aminoácidos, polialquil-ciano-acrilato, polifosfazenos o poliaspartato de aciloximetilo y copolímeros de poliglutamato y mezclas de los mismos.

También se describen en la presente memoria un compuesto polimérico representado por la fórmula II:



en la que

**P** representa una unidad monomérica de un polímero;

5      **T**, independientemente de cada vez que aparece, representa un ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo;

**L<sub>6</sub>**, **L<sub>7</sub>**, **L<sub>8</sub>**, **L<sub>9</sub>** y **L<sub>10</sub>**, independientemente de cada vez que aparecen, pueden estar ausentes o pueden representar un grupo conector;

10     **CD**, independientemente de cada vez que aparece, representa un resto de ciclodextrina o un derivado de la misma;

10     **D**, independientemente de cada vez que aparece, representa un agente terapéutico o una forma de profármaco del mismo;

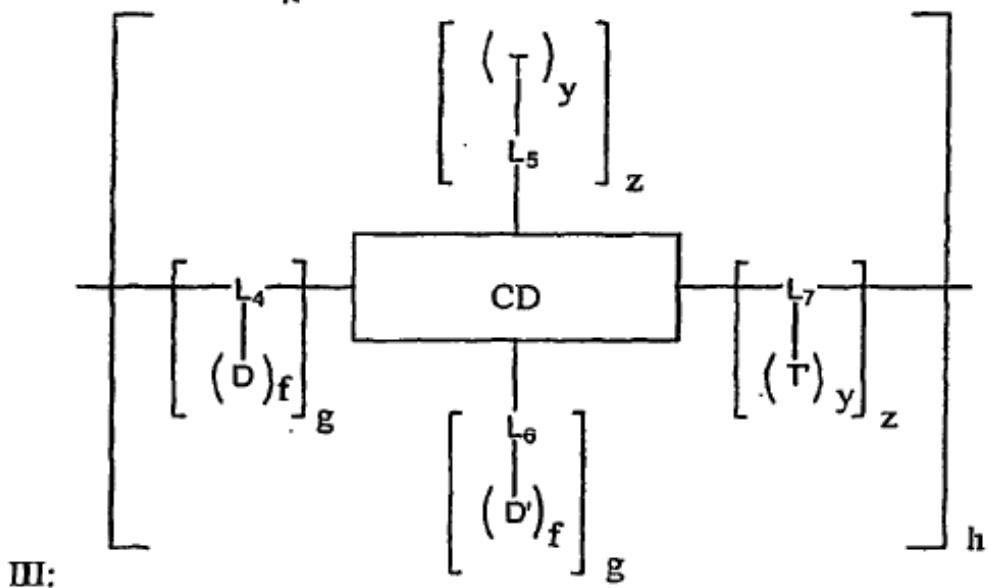
15     **m**, independientemente de cada vez que aparece, representa un número entero en el intervalo de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 8, 1 a 5 o incluso 1 a 3);

15     **o** representa un número entero en el intervalo de 1 a aproximadamente 30.000 (preferiblemente <25.000, <20.000, <15.000, <10.000, <5.000, <1.000, <500, <100, <50, <25, <10, o incluso <5); y

15     **p**, **n** y **q**, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 0 a 10 (preferiblemente de 0 a 8, 0 a 5, 0 a 3 o incluso 0 a aproximadamente 2);

en donde CD y D están presentes preferiblemente cada uno en al menos 1 ubicación (preferiblemente al menos 5, 10, 25 o incluso 50 o 100 ubicaciones) en el compuesto.

20    También se describe en la presente memoria un compuesto representado por la fórmula (III)



en la que

CD representa un resto cíclico, tal como un resto de ciclodextrina o un derivado de la misma;

5 L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub> y L<sub>7</sub>, independientemente de cada vez que aparecen, pueden estar ausentes o pueden representar un grupo conector;

D y D', independientemente de cada vez que aparecen, representan el mismo o diferente agente terapéutico o profármacos del mismo;

T y T', independientemente de cada vez que aparecen, representan el mismo o diferente ligando de establecimiento de objetivos o precursor del mismo;

10 f e y, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 1 y 10 (preferiblemente 1 a 8, 1 a 5 o incluso 1 a 3);

g y z, independientemente de cada vez que aparecen, representan un número entero en el intervalo de 0 y 10 (preferiblemente 0 a 8, 0 a 5, 0 a 3 o incluso 0 a aproximadamente 2); y

15 h representa un número entero en el intervalo de 1 y 30.000 (preferiblemente <25.000, <20.000, <15.000, <10.000, <5.000, <1.000, <500, <100, <50, <25, <10 o incluso <5),

en donde al menos una aparición (y preferiblemente al menos 5, 10 o incluso al menos 20, 50 o 100 apariciones) de g representa un número entero mayor que 0.

En los casos preferidos, L<sub>4</sub> y L<sub>7</sub> representan grupos conectores.

20 En ciertos casos, los polímeros subyacentes son polímeros que contienen ciclodextrina, lineales, por ejemplo, la estructura principal del polímero incluye restos de ciclodextrina. Por ejemplo, el polímero puede ser un polímero de ciclodextrina, lineal, soluble en agua que es producido al proporcionar al menos un derivado de ciclodextrina modificado para llevar un sitio reactivo en cada una de las exactamente dos posiciones y hacer reaccionar el derivado de ciclodextrina con un conector que tenga exactamente dos porciones reactivas capaces de formar un enlace covalente con los sitios reactivos bajo condiciones de polimerización que promueven la reacción de los sitios reactivos con las porciones reactivas para formar enlaces covalentes entre el conector y el derivado de ciclodextrina,

25 con lo cual se produce un polímero lineal que comprende unidades alternantes de derivados de ciclodextrina y conectores. Alternativamente, el polímero puede ser un polímero de ciclodextrina, lineal, soluble en agua que tiene una estructura principal del polímero, lineal, el polímero que comprende una pluralidad de restos de ciclodextrina sustituida o no sustituida y porciones conectoras en la estructura principal del polímero, lineal, en donde cada uno de

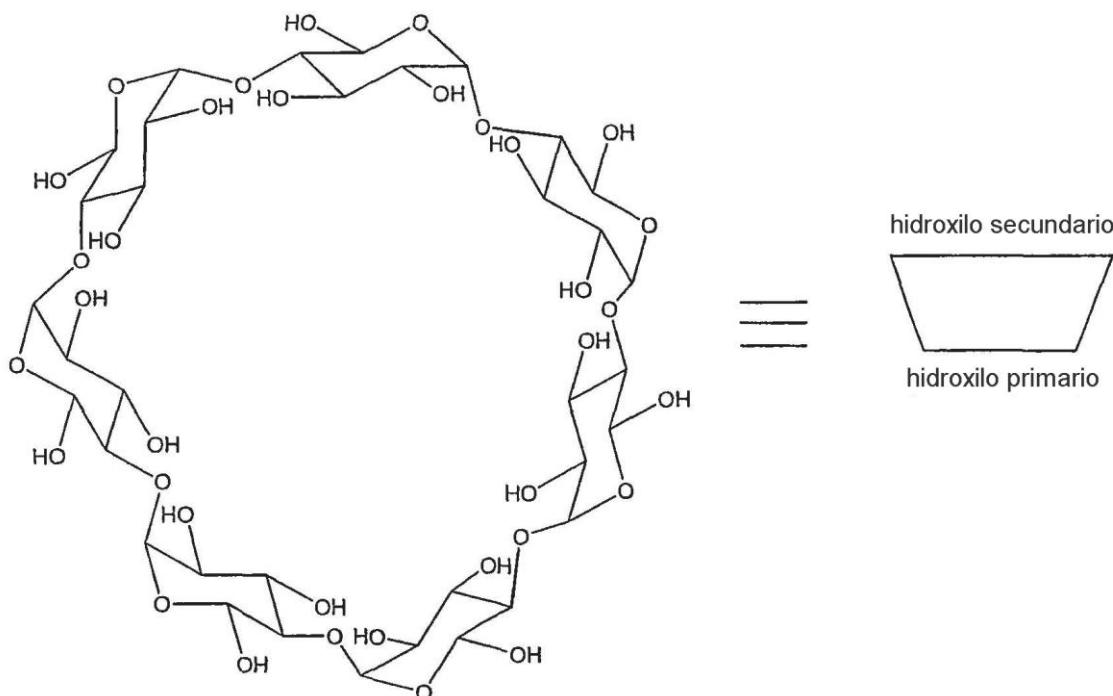
30 los restos de ciclodextrina, diferente de un resto de ciclodextrina en la terminación de una cadena polimérica, está unida a dos de las porciones conectoras, cada porción conectora enlaza covalentemente dos restos de ciclodextrina. En aún otro caso más, el polímero es un polímero de ciclodextrina, lineal, soluble en agua que comprende una pluralidad de restos de ciclodextrina enlazados covalentemente por una pluralidad de porciones conectoras, en donde cada resto de ciclodextrina, diferente de un resto de ciclodextrina en la terminación de una cadena polimérica, está unida a dos porciones conectoras para formar un polímero de ciclodextrina lineal.

- El (los) grupo(s) conector(es) puede(n) ser una cadena de alquíleno, una cadena de polietilenglicol (PEG), anhídrido polisuccínico, ácido poli-L-glutámico, poli(etilenimina), olígosacárido, cadena de aminoácidos o cualquier otro enlace adecuado. En ciertos casos, el grupo conector mismo puede ser estable bajo condiciones fisiológicas, tal como una cadena de alquíleno, o puede ser escindible bajo condiciones fisiológicas, tal como por una enzima (por ejemplo el enlace contiene una secuencia de péptidos que es un substrato para una peptidasa), o mediante la hidrólisis (por ejemplo, el enlace contiene un grupo hidrolizable, tal como un éster o tioéster). Los grupos conectores pueden ser biológicamente inactivos, tal como un PEG, ácido poliglicólico o cadena de ácido poliláctico o pueden ser biológicamente activos, tal como un oligo- o polipéptido que, cuando es escindido de las porciones, se une a un receptor, desactiva una enzima, etcétera. Varios grupos conectores, oligoméricos que son biológicamente compatibles y/o bioerosionables son conocidos en el campo y la selección del enlace puede influir en las propiedades finales del material, tal como si es durable cuando se implanta, si se deforma gradualmente o se encoge después del implante o si se degrada gradualmente y es absorbido por el cuerpo. El grupo conector puede ser unido a las porciones por cualquier unión adecuada o grupo funcional, que incluyen uniones de carbono-carbono, esteres, éteres, amidas, aminas, carbonatos, carbamatos, sulfonamidas, etcétera.
- En ciertos casos, el(los) grupo(s) conector (es) de la presente descripción representa (n) un grupo hidrocarbíleno en donde uno o más grupos metileno son reemplazados opcionalmente por un grupo Y (con la condición que ninguno de los grupos Y sea adyacente entre sí), en donde cada Y, independientemente de cada vez que aparece, se selecciona de arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo o -O-, C=X) (en donde X es NR<sub>1</sub>, O o S) , -OC(O)-, -C(=O)O, -NR<sub>1</sub>-, NR<sub>1</sub>CO-, -C(O)NR<sub>1</sub>-, -S(O)<sub>n</sub>- (en donde n es 0, 1 o 2), -OC(O)-NR<sub>1</sub>, -NR<sub>1</sub>-C(O)-NR<sub>1</sub>-, -NR<sub>1</sub>-C(NR<sub>1</sub>)-NR<sub>1</sub>- y -B(OR<sub>1</sub>)-; y R<sub>1</sub>, independientemente de cada vez que aparece, representa H o un grupo alquilo inferior.
- En ciertos casos, el grupo conector representa un aminoácido derivatizado o no derivatizado. En ciertos casos, los grupos conectores con uno o más grupos carboxilo terminales pueden ser conjugados al polímero. En ciertos casos, uno o más de estos grupos carboxilo terminales pueden ser terminados al unirlos covalentemente a un agente terapéutico, resto de establecimiento de objetivos o resto de ciclodextrina por vía de una unión de (tio)éster o amida. En todavía otras modalidades, los grupos conectores con uno o más grupos hidroxilo, tiol o amino terminales pueden ser incorporados en el polímero. En los casos preferidos, uno o más de estos grupos hidroxilo terminales pueden ser terminados al unirlos covalentemente a un agente terapéutico, una resto de establecimiento de objetivos o un resto de ciclodextrina por vía de una unión de (tio)éster, amida, carbonato, carbamato, tiocarbonato o tiocarbamato. En ciertos casos, estos enlaces de (tio)éster, amida, (tio)carbonato o (tio)carbamatos-pueden ser biohidrolizables, es decir, capaces de ser hidrolizados bajo condiciones biológicas.
- En ciertos casos, los polímeros descritos anteriormente tienen polidispersidades menores que aproximadamente 3 o aún menores que aproximadamente 2.
- En ciertos casos, el agente terapéutico es una molécula pequeña, péptido, proteína o polímero que tiene una función terapéutica. En ciertos casos, el agente es un agente terapéutico anti-cáncer (tal como camptotecina o derivados relacionados), anti-fungal, anti-bacteriano, anti-micótico o anti-viral. En ciertos casos, el agente es un agonista de receptores. En ciertos casos, el agente es un antagonista de receptores. En ciertos casos, el agente terapéutico es un inhibidor de proteasa. Además, un polímero de la presente descripción puede contener una clase de agente terapéutico o puede contener más de una clase de agente terapéutico. Por ejemplo, dos o más fármacos diferentes para el cáncer o un fármaco para el cáncer y un inmunosupresivo o un antibiótico y un agente anti-inflamatorio pueden ser injertados en el polímero por vía de conectores opcionales. Al seleccionar diferentes conectores para diferentes fármacos, la liberación de cada fármaco puede ser atenuada para lograr la dosificación y la eficacia máximas.
- Un caso de la presente descripción proporciona un suministro mejorado de ciertos agentes terapéuticos de moléculas pequeñas, hidrófobos al conjugarlos covalentemente a polímeros que contienen ciclodextrina. Esta conjugación mejora la solubilidad acuosa y, por lo tanto, la biodisponibilidad de los agentes terapéuticos. Por consiguiente, en un caso de la descripción, el agente terapéutico es un compuesto hidrófobo con un logaritmo P >0,4, >0,6, >0,8, >1, >2, >3, >4 o incluso >5. En otros casos, un agente terapéutico, hidrófobo, tal como la camptotecina, se puede conjugar con otro compuesto, tal como un -aminoácido, antes de unir covalentemente el conjugado al polímero. Los ejemplos de moléculas de camptotecina derivadas de aminoácido se ilustran en el esquema V.
- Los conjugados poliméricos de la presente descripción tienen preferiblemente pesos moleculares en el intervalo de 10.000 a 500.000; 30.000 a 200.000; o incluso 70.000 a 150.000 uma.
- En ciertos casos, los restos de ciclodextrina forman al menos aproximadamente 2%, 5% o 10% en peso, hasta 20%, 30%, 50% o incluso 80% en peso del polímero modificado por ciclodextrina. En ciertos casos, los agentes terapéuticos, o ligandos de establecimiento de objetivos forman al menos aproximadamente 1%, 5%, 10% o 15%, 20%, 25%, 30% o incluso 35% en peso del polímero modificado por ciclodextrina. El peso molecular promedio en número (M<sub>n</sub>) también puede variar ampliamente, pero se encuentra generalmente en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 500.000 daltons, preferiblemente de aproximadamente 5000 a aproximadamente 200.000 daltons y, aún más preferiblemente, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente

100.000. Mucho más preferiblemente, el  $M_n$  varía entre aproximadamente 12.000 y 65.000 daltons. En otros ciertos casos, el  $M_n$  varía entre aproximadamente 3.000 y 150.000 daltons. Dentro de una muestra dada de un polímero principal, puede estar presente un amplio intervalo de pesos moleculares. Por ejemplo, las moléculas dentro de la muestra pueden tener pesos moleculares que difieren por un factor de 2, 5, 10, 20, 50, 100 o más, o que difieren del peso molecular promedio por un factor de 2, 5, 10, 20, 50, 100 o más.

- 5 Los restos de ciclodextrina ejemplares incluyen estructuras cíclicas que consisten esencialmente de 7 a 9 porciones de sacáridos, tales como ciclodextrina y ciclodextrina oxidada. Un resto de ciclodextrina comprende opcionalmente una porción conectora que forma un enlace covalente entre la estructura cíclica y la estructura principal del polímero, que tiene preferiblemente de 1 a 20 átomos en la cadena, tal como cadenas de alquilo, que incluyen derivados de ácido dicarboxílico" (tales como derivados de ácido glutárico, derivados de ácido succínico y similares) y cadenas de heteroalquilo, tales como cadenas de oligoetilenglicol.
- 10

Las ciclodextrinas son polisacáridos cíclicos que contienen unidades de D-(+)-glucopiranosa de origen natural en un enlace  $\alpha$ -(1,4). Las ciclodextrinas más comunes son alfa (( $\alpha$ )-ciclodextrinas, beta (( $\beta$ )-ciclodextrinas y gamma ( $\gamma$ )-ciclodextrinas que contienen, respectivamente, seis, siete u ocho unidades de glucopiranosa. Estructuralmente, la naturaleza cíclica de una ciclodextrina desarrolla una forma de bocel o dona que tiene una cavidad apolar o hidrófoba, interior, los grupos hidroxilo secundarios situados en un lado del bocel de ciclodextrina y los grupos hidroxilo primarios en el otro. De esta manera, utilizando la ( $\beta$ -ciclodextrina como un ejemplo, con frecuencia una ciclodextrina es representada esquemáticamente como sigue.



- 20 El lado en el cual los grupos hidroxilo secundarios están localizados tiene un diámetro más amplio que el lado en el cual están localizados los grupos hidroxilo primarios. La presente descripción contempla enlaces covalentes a los restos de ciclodextrina en los grupos hidroxilo primarios y/o secundarios. La naturaleza hidrófoba de la cavidad interior de ciclodextrina permite los complejos de inclusión de hospedante-invitado de una variedad de compuestos, por ejemplo, adamantano. (Comprehensive Supramolecular Chemistry, Volumen 3, J. L. Atwood y colaboradores, eds., Pergamon Press (1996); T. Cserhati, Analytical Biochemistry, 225:328-332 (1995); Husain y colaboradores, Applied Spectroscopy, 46:652-658 (1992); FR 2 665 169). Los métodos adicionales para modificar los polímeros se describen en Suh, J. y Noh, Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1327-1330.
- 25

En ciertos casos, la presente descripción contempla un polímero que contiene ciclodextrina, soluble en agua, lineal, en donde una pluralidad de porciones bioactivas son unidas covalentemente al polímero a través de uniones que son escindidas bajo condiciones biológicas para liberar las porciones bioactivas, en donde la administración del polímero a un paciente da por resultado la liberación del agente bioactivo durante un periodo de al menos 2, 3, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 24, 36, 48 o incluso 72 horas.

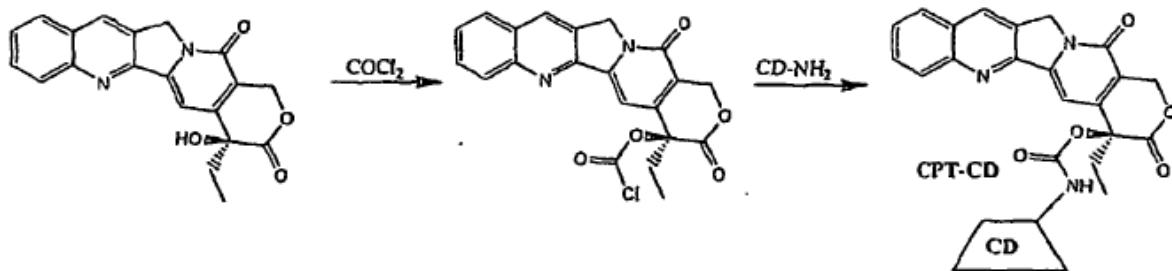
30 En ciertos casos, la presente descripción contempla la atenuación de la velocidad de liberación del agente terapéutico al introducir varios grupos de enlace entre el agente terapéutico y/o ligando de establecimiento de objetivos y el polímero. De esta manera, en ciertos casos, los agentes terapéuticos, poliméricos de la presente descripción son composiciones para el suministro controlado de agentes terapéuticos. Una persona experta en el campo también reconocería que al etiquetar el agente terapéutico y/o ligandos de establecimiento de objetivos con

35

radionúcleos o al formar complejos de núcleos activos de RMN, por ejemplo, tecnecio, gadolinio o dispropasio, los polímeros de la presente descripción pueden lograr una utilidad doble de diagnóstico/terapéutica.

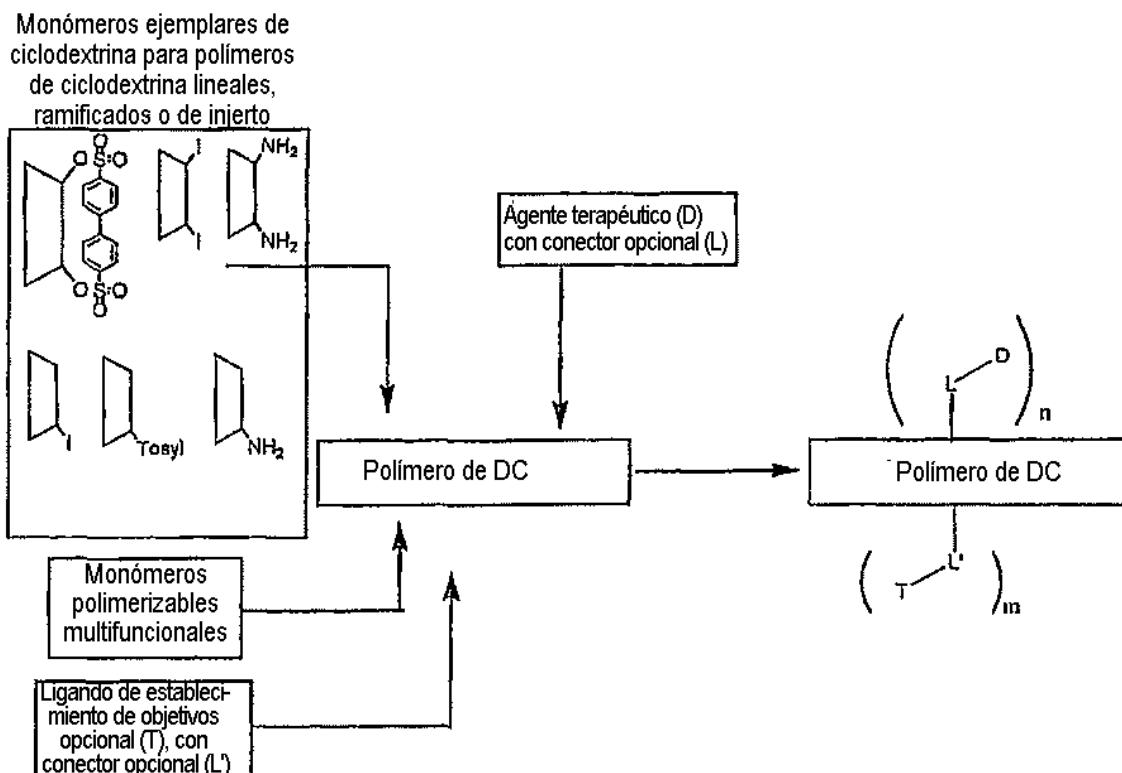
- En otros casos, los compuestos poliméricos estabilizan la forma bioactiva de un agente terapéutico que existe en equilibrio entre una forma activa e inactiva. Por ejemplo, la conjugación del agente terapéutico a los polímeros de la 5 presente descripción puede cambiar el equilibrio entre dos formas tautoméricas del agente al tautómero bioactivo. En otro caso, los compuestos poliméricos pueden atenuar el equilibrio entre formas lacónicas y ácidas de un agente terapéutico.
- Un método para determinar el peso molecular es mediante la cromatografía de permeación de gel ("CPG", por sus 10 siglas en, inglés), por ejemplo, columnas de lecho mezclado, disolvente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , detector de dispersión de luz y dn/dc fuera de línea. Otros métodos son conocidos en el campo.
- En otros casos, el conjugado polimérico de la descripción puede ser un material flexible o fluido. Cuando el polímero utilizado es fluido por si mismo, la composición polimérica de la descripción, aún cuando sea viscosa, no necesita incluir un disolvente biocompatible para ser fluido, aunque aún pueden estar presentes pequeñas cantidades o 15 cantidades residuales de disolventes biocompatibles.
- Mientras que es posible que el polímero biodegradable o el agente biológicamente activo pueda ser disuelto en una 20 pequeña cantidad de un disolvente que no sea tóxico para producir más eficientemente una distribución monolítica, amorfía o una dispersión fina del agente biológicamente activo en la composición flexible o fluida, es una ventaja de la descripción que, en un caso preferido, no es necesario un disolvente para formar- una composición fluida. Además, el uso de disolventes es evitado preferiblemente debido a que, una vez que una composición polimérica 25 que contiene disolvente es colocada total o parcialmente dentro del cuerpo, el disolvente se disipa o difunde lejos del polímero y debe ser procesado y eliminado por el cuerpo, colocando una carga extra en la capacidad de eliminación del cuerpo en un momento cuando la enfermedad (y/u otros tratamientos para la enfermedad) ya la puede haber afectado perniciosamente.
- Sin embargo, cuando se utiliza un disolvente para facilitar la mezcla o para mantener la fluidez del conjugado 30 polimérico de la descripción, no debe ser tóxico, de otra manera biocompatible, y se debe utilizar en cantidades relativamente pequeñas. Los disolventes que son tóxicos no se deben utilizar en ningún material que sea colocado aún parcialmente dentro de un cuerpo viviente. Este disolvente tampoco debe causar una irritación sustancial en el tejido o necrosis en el sitio de la administración.
- Los ejemplos de disolventes biocompatibles, adecuados, cuando se utilizan, incluyen N-metil-2-pirrolidona, 2- 35 pirrolidona, etanol, propilenglicol, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, metil-etyl-cetona, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, tetrahidrofurano, caprolactama, ácido oleico o 1-dodecilazacilcoheptanona. Los disolventes preferidos incluyen N-metilpirrolidona, 2-pirrolidona, sulfóxido de dimetilo y acetona debido a su capacidad de disolución y su biocompatibilidad.
- En ciertos casos; los conjugados poliméricos, principales son solubles en uno o más disolventes orgánicos, comunes 40 por la facilidad de fabricación y procesamiento. Los disolventes orgánicos, comunes incluyen disolventes tales como cloroformo, diclorometano, dicloroetano, 2-butanona, acetato de butilo, butirato de etilo, acetona, acetato de etilo, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, dimetilformamida y sulfóxido de dimetilo.
- Un aspecto de la presente descripción contempla la unión de un agente terapéutico, hidrófobo, tal como (S)-20- 45 camptotecina a polímeros que contienen ciclodextrina, lineales o ramificados para un mejor suministro del fármaco. La (S)-20-camptotecina (CPT), un alcaloide aislado de *Camptitheca accuminata* a finales de la década de 1950, se descubrió que exhibe actividad anticancerígena al inhibir la acción de la topoisomerasa I durante la fase S del ciclo celular. Su aplicación en el tratamiento del cáncer en humanos, sin embargo, está limitada debido a varios factores, especialmente sus interacciones indeseables con albúmina de suero humano, inestabilidad de la forma de lactona bioactiva y pobre solubilidad acuosa. A fin de evitar este problema, se han desarrollado muchos análogos de CPT 50 para mejorar la estabilidad y la solubilidad acuosa de la lactona. El topotecan y el irinotecan son análogos de CPT que ya han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer en humanos. También se describen en esta memoria varios tipos de polímeros que contienen ciclodextrina, lineales, ramificados o injertados en donde la (S)-20-camptotecina es unida covalentemente al polímero. En ciertos casos, el fármaco es enlazado covalentemente por vía de una unión biohidrolizable seleccionada de un éster, amida, carbamatos o carbonato.
- Un esquema de síntesis ejemplar para la unión de manera covalente de una CD derivatizada a la 20 (S)-camptotecina se muestra en el esquema I.

Esquema I



Sin la intención de limitar el alcance de la descripción, una estrategia general para sintetizar polímeros que contienen ciclodextrina, lineales, ramificados o injertados (polímero de CD) para cargar un agente terapéutico tal como camptotecina y un ligando de establecimiento de objetivos opcional se muestra en el esquema II.

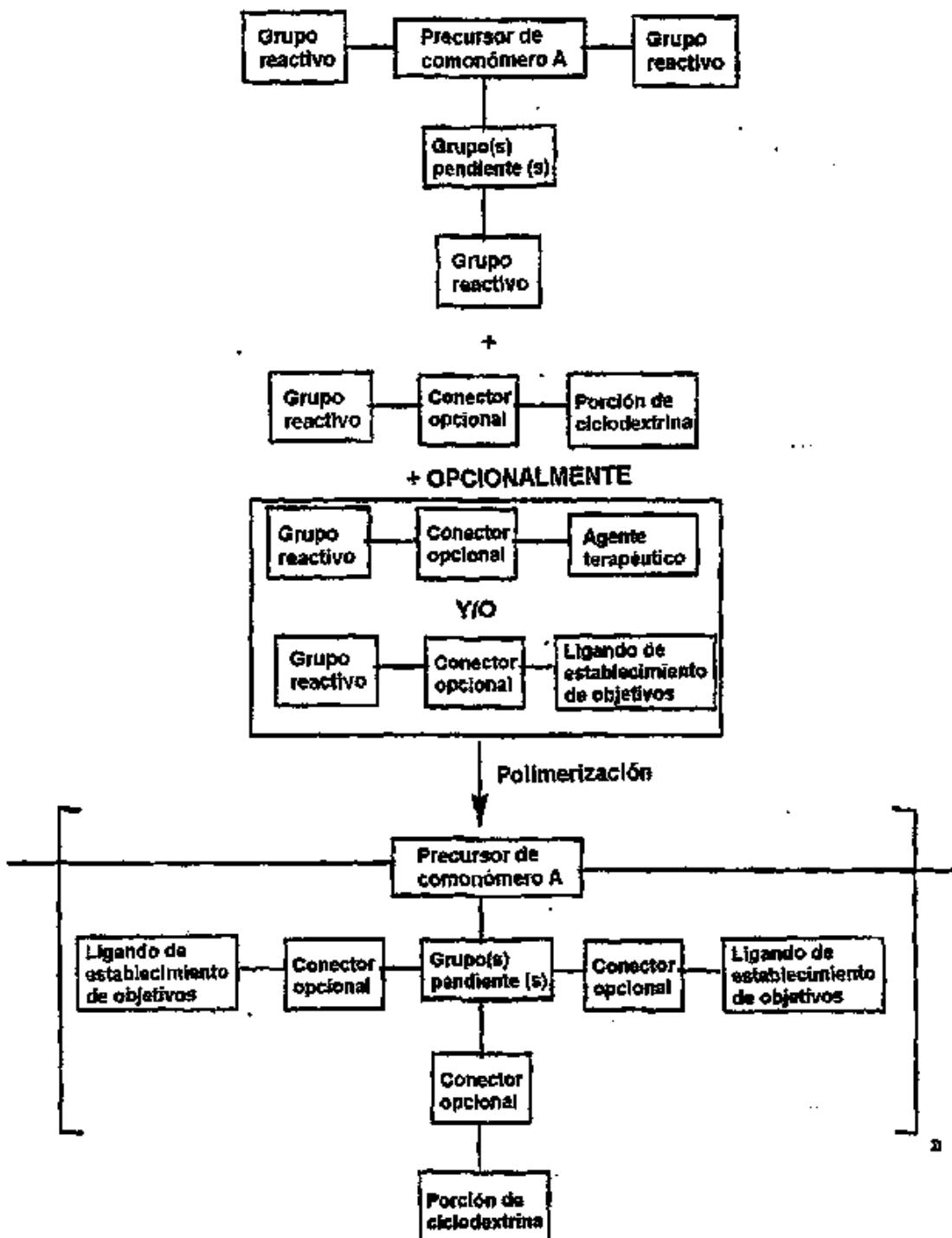
5 Esquema II



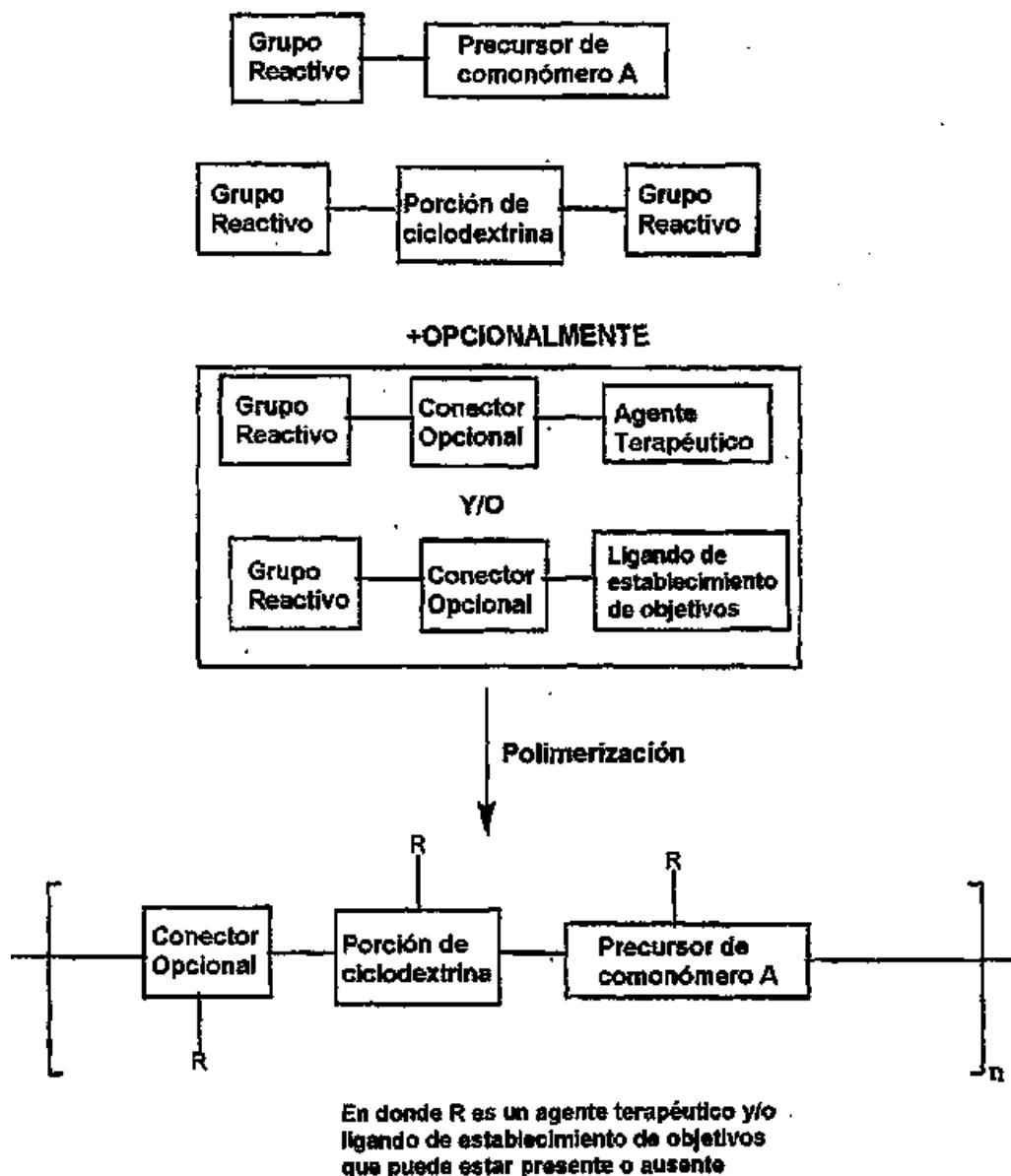
Para ilustración adicional, sin la intención de ser limitante, los precursores de comonómero A, restos de ciclodextrina, agentes terapéuticos y/o ligandos de establecimiento de objetivos pueden ser ensamblados como se muestra en los esquemas de reacción IIa-IIb. Se debe observar que en los esquemas de reacción IIa-b, en cualquier reacción dada puede haber más de un precursor de comonómero A, resto de ciclodextrina, agente terapéutico o ligando de establecimiento de objetivos que sea del mismo tipo o diferente. Además, antes de la polimerización, uno o más del precursor de comonómero A, resto de ciclodextrina, agente terapéutico o ligando de establecimiento de objetivos pueden ser enlazados covalentemente entre sí en uno o más pasos separados.

10 Esquema IIIa: Esquema general para polímeros de injerto. El precursor de comonómero A, el resto de ciclodextrina, el agente terapéutico y el ligando para establecimiento de objetivos son como se definiera anteriormente. Además, una persona experta en el campo puede seleccionar de una variedad de grupos reactivos, por ejemplo, hidroxilos, carboxilos, haluros/ aminas y etenos activados, etilenos o grupos aromáticos a fin de lograr la polimerización. Los ejemplos adicionales de grupos reactivos se describen en Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, .5<sup>a</sup> Edición, 2000.

15

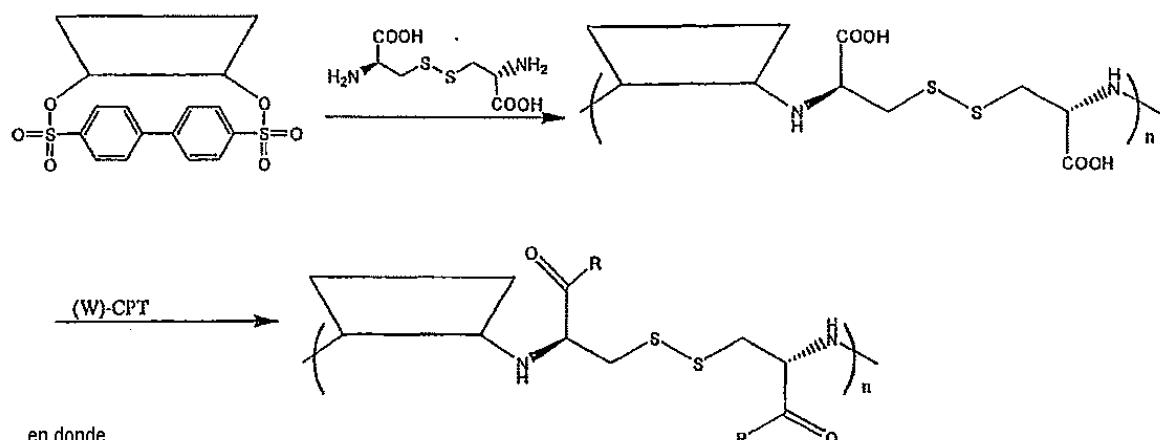


Esquema IIb: Esquema general para preparar polímeros que contienen ciclodextrina, lineales. Una persona experta en el campo reconocerá que al seleccionar un precursor de comonómero A que tenga múltiples grupos reactivos se puede lograr la ramificación del polímero.

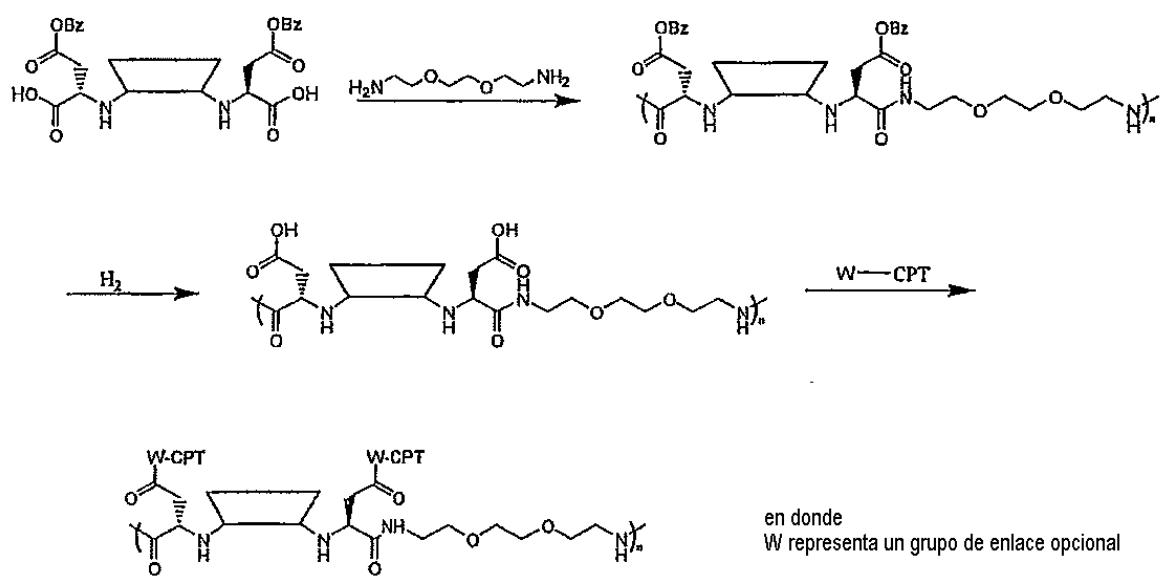


Los ejemplos de diferentes formas para sintetizar los polímeros de ciclodextrina-CPT lineales se muestran en los esquemas III-VIII.

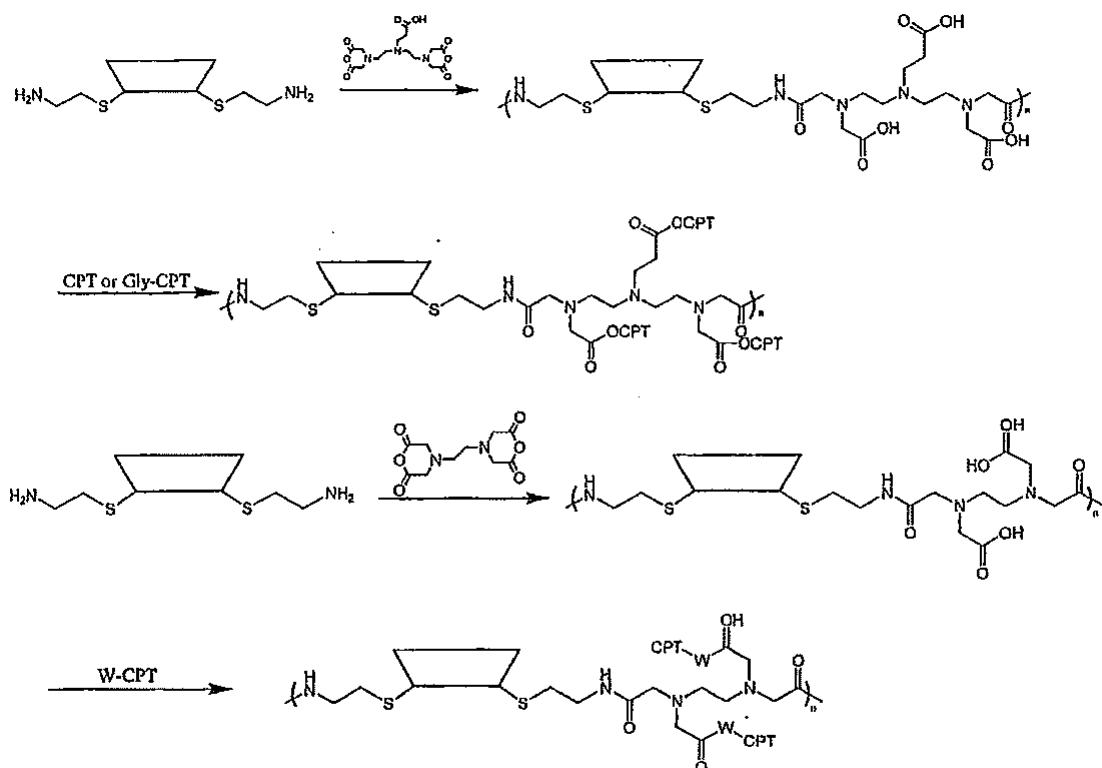
Esquema III



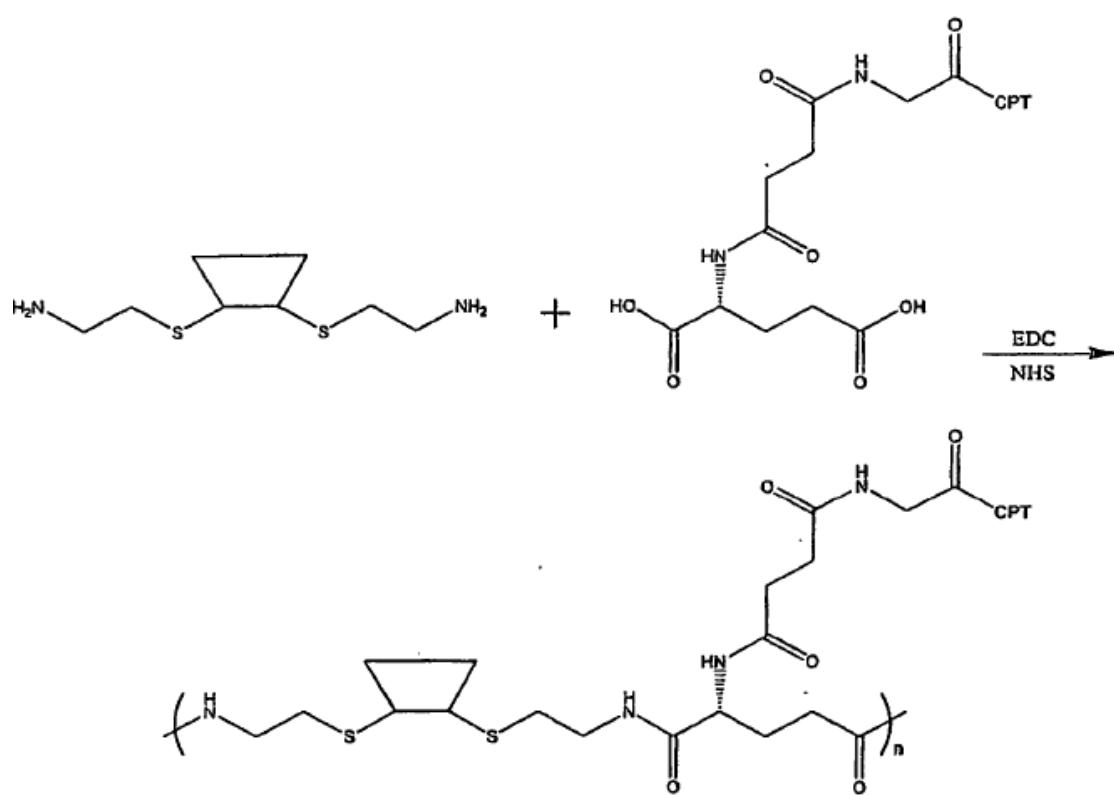
Esquema IV



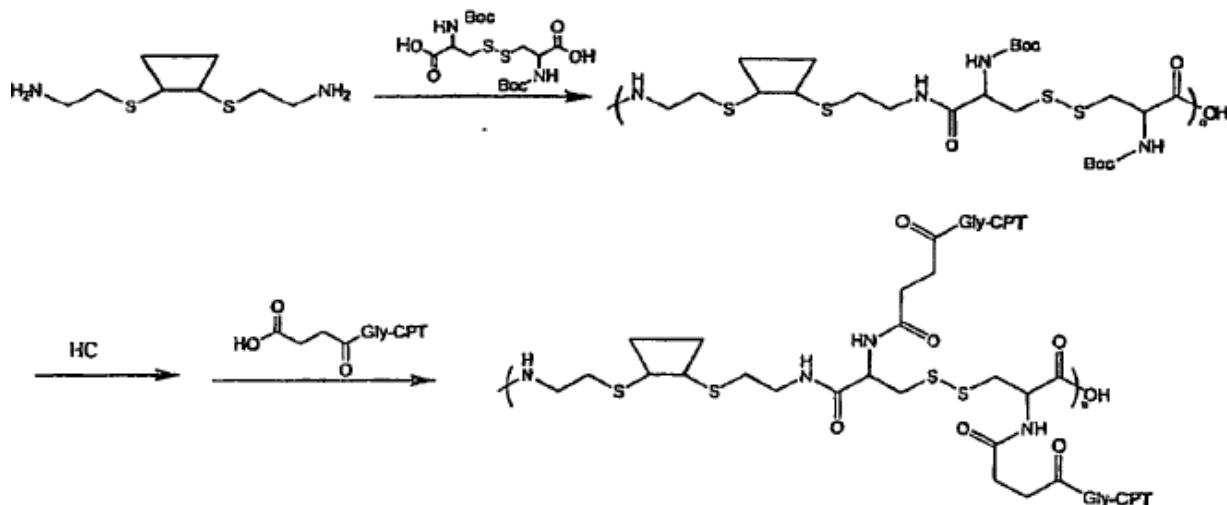
Esquema V



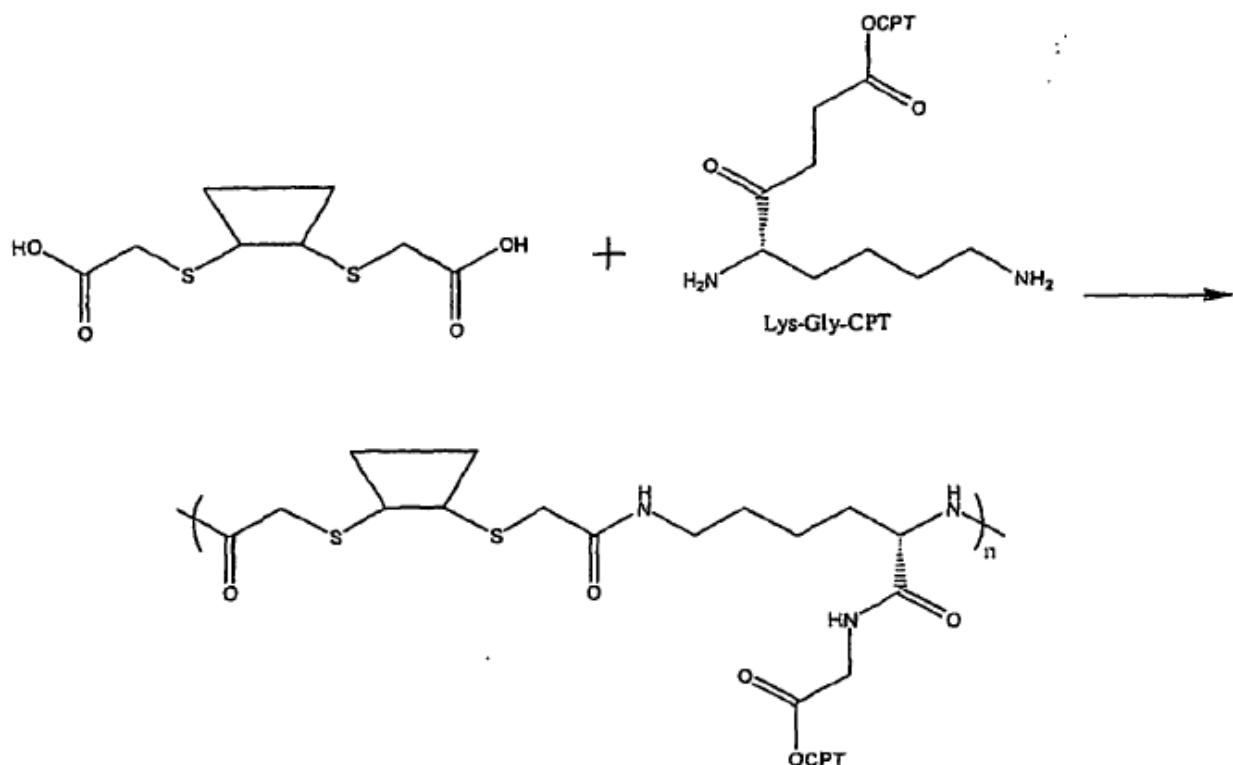
Esquema VI



Esquema VII



Esquema VIII

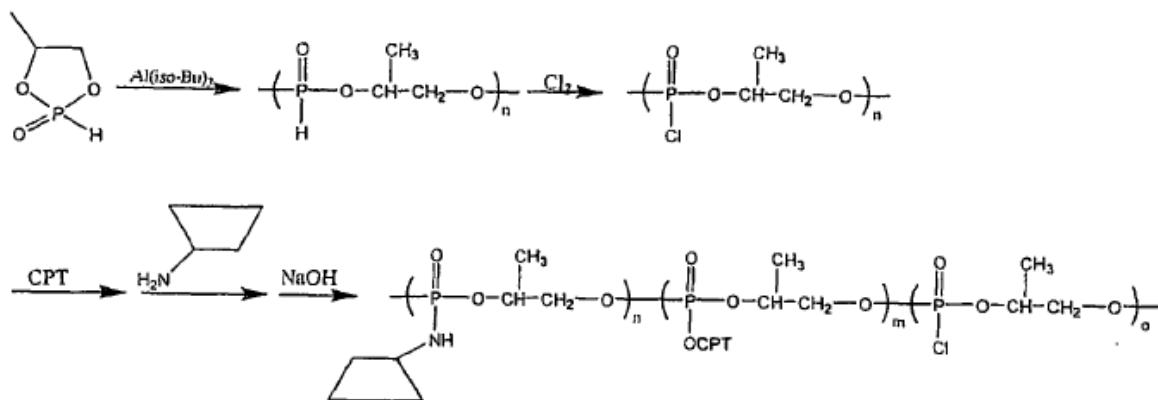


- 5 Los ejemplos para insertar ciclodextrinas en las cadenas laterales de subunidades de polímeros que contienen CPT se muestran en los esquemas de reacción IX-XII. Cada subunidad se puede repetir cualquier número de veces y una subunidad puede presentarse con sustancialmente la misma frecuencia, más frecuentemente o menos frecuentemente que otra subunidad, de tal manera que ambas subunidades pueden presentarse en aproximadamente la misma cantidad o en cantidades diferentes, las cuales pueden diferir ligeramente o se pueden disparar altamente, por ejemplo, una subunidad está presente cerca de la exclusión de la otra.

- 10 En ciertos casos, los polímeros son copolímeros aleatorios, en los cuales las diferentes subunidades y/u otras unidades monoméricas son distribuidas aleatoriamente por toda la cadena polimérica. De esta manera, donde aparece la fórmula  $X_mY_nZ_0$ , en donde X, Y y Z son subunidades poliméricas, estas subunidades pueden ser interpuestas aleatoriamente por toda la estructura principal del polímero. En parte, el término "aleatorio" se propone para referirse a la situación en la cual la distribución o incorporación particular de unidades monoméricas en un polímero que tiene más de un tipo de unidades monoméricas no es dirigida o controlada directamente por el

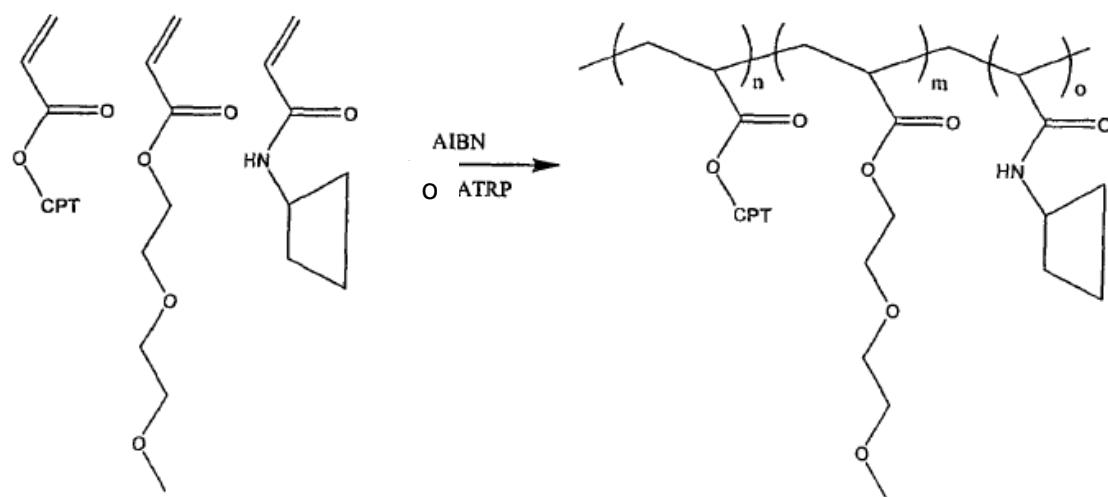
protocolo sintético, sino que en cambio resulta de las características inherentes para el sistema polimérico, tal como la reactividad, cantidades de subunidades y otras características de la reacción sintética u otros métodos de preparación, procesamiento o tratamiento.

Esquema IX

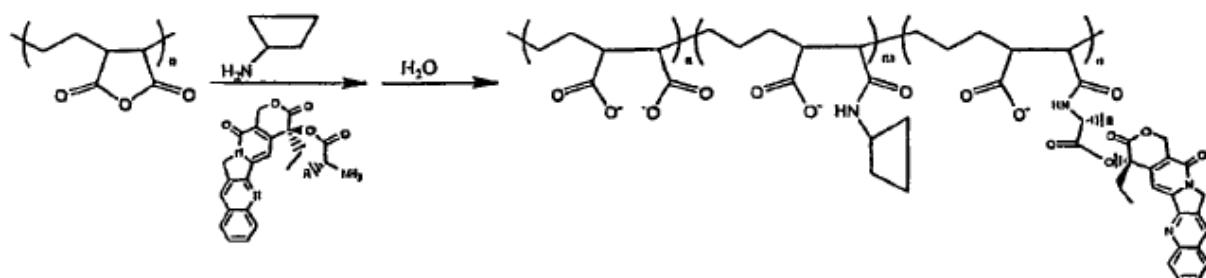


5

Esquema X

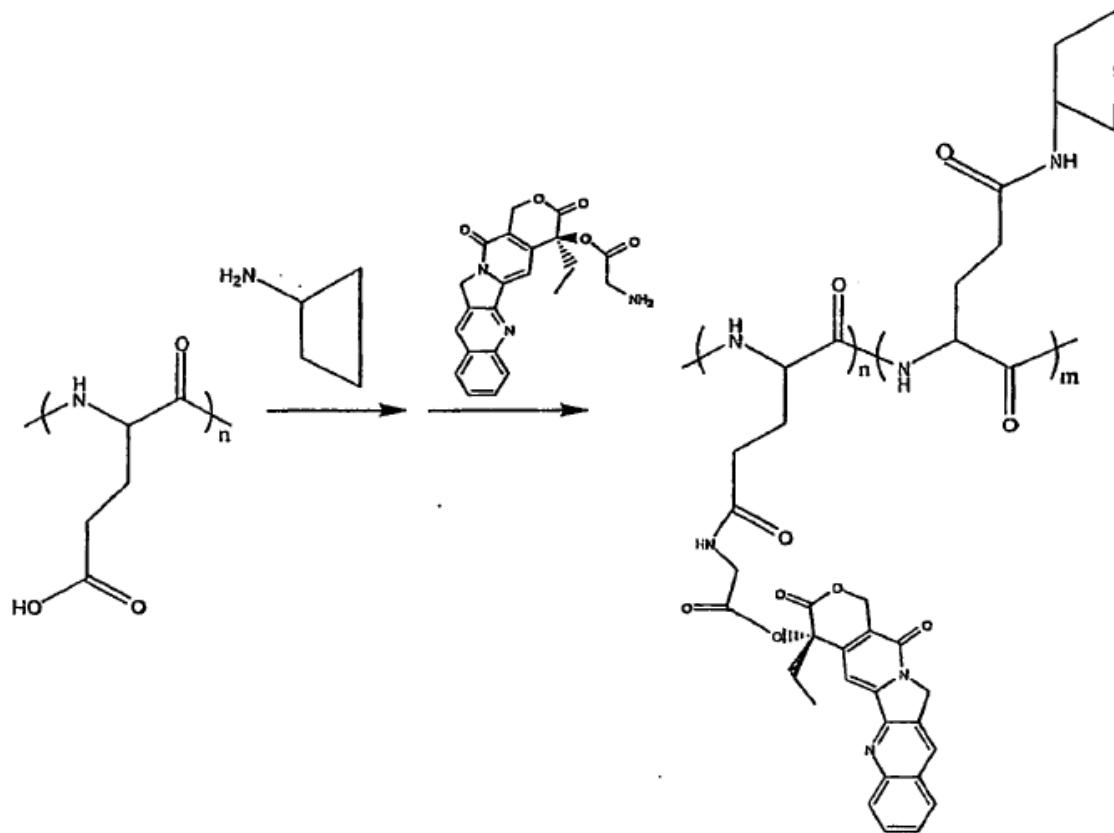


Esquema XI



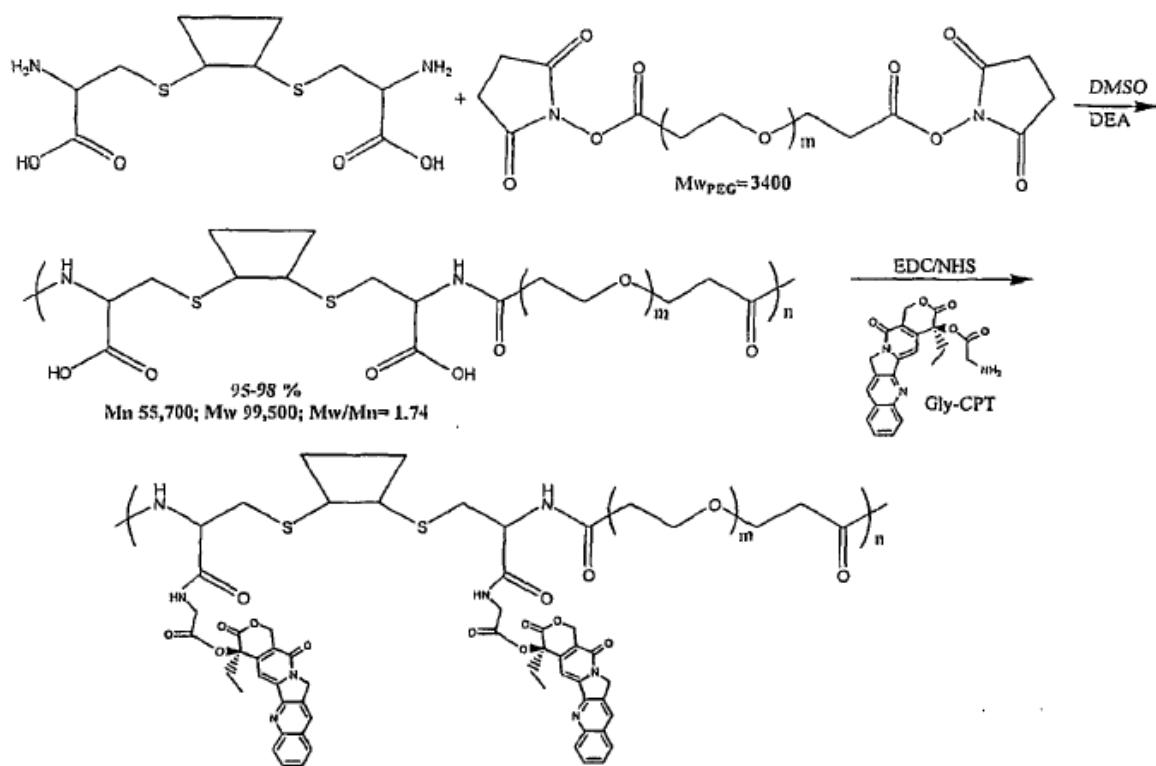
10

Esquema XII

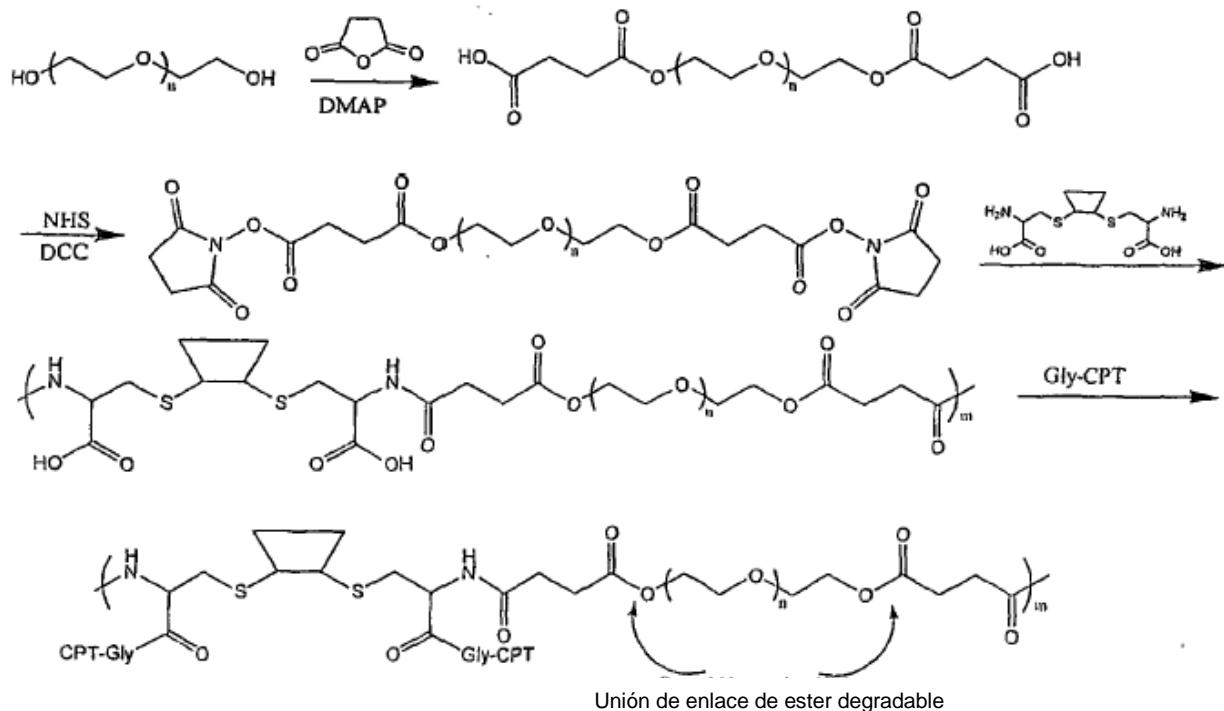


La presente descripción además contempla polímeros de CD sintetizados utilizando un monómero de CD-biscisteína y un éster de Di-NHS, tal como PEG-DiSPA o PEG-BTC como se muestra en los esquemas de reacción XIII-XIV.

5 Esquema XIII



Esquema XIV



También se definen en la memoria varias estrategias para incrementar la carga de fármaco como se muestra en la figura 1.

5 (B) *Ligando de establecimiento de Objetivos*

Como se mencionara anteriormente, un aspecto de la presente descripción contempla unir un agente terapéutico a los conjugados poliméricos descritos en este texto.

En ciertos casos, el conjugado polimérico además comprende un ligando de establecimiento de objetivos. De esta manera, en ciertos casos, un ligando de establecimiento de objetivos de receptores, células y/o tejidos, o un precursor del mismo se acopla a un conjugado polimérico. Como se utiliza en este texto, el término "ligando de establecimiento de objetivos" se refiere a cualquier material o sustancia que pueda promover el establecimiento de objetivos de receptores, células y/o tejidos *in vivo* o *in vitro* con las composiciones de la presente descripción. El ligando de establecimiento de objetivos puede ser sintético, semisintético o de origen natural. Los materiales o sustancias que pueden servir como ligandos de establecimiento de objetivos incluyen, por ejemplo, proteínas, que incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hormonas, análogos de hormonas, glicoproteínas y lectinas, péptidos, polipéptidos, aminoácidos, azúcares, sacáridos, que incluyen monosacáridos y polisacáridos, carbohidratos, moléculas pequeñas, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides, hormonas, cofactores, agentes bioactivos y material genética, que incluye nucleósidos, nucleótidos, construcciones de ácido nucleótido y polinucleótidos. Como se utiliza en este texto, el término "precursor" para un ligando de establecimiento de objetivos se refiere a cualquier material o sustancia que pueda convertirse en un ligando de establecimiento de objetivos. Esta conversión puede involucrar, por ejemplo, fijar un precursor a un ligando de establecimiento de objetivos. Las porciones precursoras de establecimiento de objetivos ejemplares incluyen grupos maleimida, grupos disulfuro, tales como disulfuro de orto-piridilo, grupos vinilsulfona, grupos azida y grupos  $\alpha$ -yodo-acetilo. La unión del ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo al polímero se puede realizar de varias maneras que incluyen, pero no están limitadas a, la formación de quelatos, unión covalente o formación de complejos de hospedante-invitado. En ciertos casos, un grupo conector, opcional puede estar presente entre el ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo y el polímero, en donde el grupo conector es unido al polímero por vía de la formación de quelatos, unión covalente o formación de complejos de hospedante-invitado. Por ejemplo, el extremo terminal de un grupo conector puede unirse al ligando de establecimiento de objetivos mientras que el otro puede unirse a un grupo adamantano, u otra de estas porciones hidrófobas, que forma un complejo de hospedante-invitado con un resto de ciclodextrina. De esta manera, el ligando de establecimiento de objetivos puede unirse a un resto de ciclodextrina injertada, a un resto de ciclodextrina dentro de la cadena polimérica o a la cadena polimérica misma. El número de ligandos de establecimiento de objetivos por cadena polimérica puede variar de acuerdo con varios factores que incluyen, pero no están limitados a, la identidad del agente terapéutico, la naturaleza de la enfermedad, el tipo de

cadena polimérica. Las estructuras de los posibles grupos conectores son las mismas como los grupos conectores definidos en otra parte en esta solicitud.

*(c) Composiciones Farmacéuticas, Formulaciones y Dosificaciones*

- En parte, una composición polimérica, biocompatible de la presente descripción incluye un polímero biocompatible y opcionalmente biodegradable, tal como uno que tiene las unidades monoméricas, recurrentes mostradas en una de las fórmulas anteriores, que incluye opcionalmente cualquiera de otros polímeros biocompatibles y opcionalmente biodegradables que se mencionan anteriormente o son conocidos en la técnica. En ciertos casos, las composiciones no son pirogénicas, por ejemplo, no desencadenan la elevación de la temperatura corporal de un paciente por más de una cantidad clínicamente aceptable.
- Las composiciones principales pueden contener un "fármaco", "agente terapéutico", "medicamento" o "sustancia bioactiva", los cuales son sustancias biológicas, fisiológica o farmacológicamente activas que actúan local o sistémicamente en el cuerpo humano o animal. Por ejemplo, una composición principal puede incluir cualquiera de los otros compuestos descritos anteriormente.
- Se pueden utilizar varias formas de los medicamentos o materiales biológicamente activos que sean capaces de liberarse de la matriz polimérica en tejidos o fluidos adyacentes. Pueden ser moléculas hidrófobas, moléculas neutras, moléculas polares o complejos moleculares que hacen posible la unión de hidrógeno. Pueden estar en la forma de éteres, esteres, amidas y similares, inclusive profármacos que son activados biológicamente cuando se inyectan en el cuerpo humano o animal, por ejemplo, mediante la escisión de un éster o amida. Un agente terapéutico en una composición principal puede variar ampliamente con el propósito para la composición.
- Los plastificantes y agentes estabilizadores conocidos en el campo se pueden incorporar en los polímeros de la presente descripción. En ciertos casos, los aditivos tales como plastificantes y agentes de estabilización se seleccionan por su biocompatibilidad. En ciertos casos, los aditivos son tensioactivos pulmonares, tales como 1,2-dipalmitoilfosfatidicolina (DPPC) y L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (PC).
- Una composición de esta descripción puede contener además una o más sustancias adyuvantes, tales como materiales de relleno, agentes espesadores o similares. En otros casos, los materiales que sirven como adyuvantes pueden estar asociados con la matriz polimérica. Estos materiales adicionales pueden afectar las características de la matriz polimérica que resulta.
- Por ejemplo, los materiales de relleno, tales como albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) o albúmina de suero de ratón (MSA; por sus siglas en inglés), pueden estar asociados con la matriz polimérica. En ciertos casos, la cantidad del material de relleno puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50% en peso o más de la matriz polimérica o aproximadamente 2,5, 5, 10, 25, o 40 por ciento. La incorporación de estos materiales de relleno puede afectar la biodegradación del material polimérico y/o la velocidad de liberación sostenida de cualquier sustancia encapsulada. Otros materiales de relleno conocidos para aquellas personas expertas en el campo, tales como carbohidratos, azúcares, almidones, sacáridos, celulosas y polisacáridos, que incluyen manitosa y sacarosa, se pueden utilizar en ciertos casos de la presente descripción.
- En otros casos, los intensificadores de la esferonización facilitan la producción de las matrices poliméricas, principales que son generalmente de forma esférica. Las sustancias tales como zeina, celulosa microcristalina o celulosa microcristalina co-procesada con carboximetilcelulosa de sodio pueden conferir plasticidad a las composiciones principales así como también, resistencia e integridad del implante. En los casos particulares, durante la esferonización, las piezas extruidas que son rígidas, pero no plásticas, dan por resultado la formación de implantes en forma de pesas de gimnasia y/o una alta proporción de finos y piezas extruidas que son plásticas, pero no rígidas, tienden a aglomerarse y formar implantes excesivamente grandes. En tales casos, es deseable un balance entre rigidez y plasticidad. El porcentaje del intensificador de la esferonización en una formulación varía típicamente de 10 a 90% (p/p).
- En ciertos casos, una composición principal incluye un excipiente. Un excipiente particular se puede seleccionar en base a su punto de fusión, solubilidad en un disolvente seleccionado (por ejemplo, un disolvente que disuelve el polímero y/o el agente terapéutico), y las características resultantes de las micropartículas.
- Los excipientes pueden comprender un cierto porcentaje, aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, o un porcentaje superior de las composiciones principales.
- Los amortiguadores, ácidos y bases se pueden incorporar en las composiciones principales para ajustar su pH. Los agentes para incrementar la distancia de difusión de los agentes liberados de la matriz polimérica también se pueden incluir.
- Los desintegrantes son sustancias que, en presencia de un líquido, promueven la disrupción de las composiciones principales. Los desintegrantes se utilizan más frecuentemente en implantes, en los cuales la función del desintegrante es contrarrestar o neutralizar el efecto de cualquier material de unión utilizado en la formulación principal. En general, el mecanismo de desintegración involucra la absorción de humedad e hinchamiento por un

material insoluble.

Los ejemplos de desintegrantes incluyen croscarmelosa de sodio y crospovidona, las cuales, en ciertos casos, se pueden incorporar en las matrices poliméricas en el intervalo de aproximadamente 1-20% del peso total de la matriz. En otros casos, los materiales de relleno solubles, tales como azúcares (manitol y lactosa), también se pueden adicionar para facilitar la desintegración de los implantes.

Se pueden utilizar otros materiales para favorecer o controlar la velocidad de liberación deseada de un agente terapéutico para un protocolo de tratamiento particular. Por ejemplo, si la liberación sostenida es muy lenta para una aplicación particular, se puede adicionar un agente de formación de poros para generar poros adicionales en la matriz. Cualquier material soluble en agua, biocompatible se puede utilizar como el agente de formación de poros.

Estos pueden hacer posible la disolución, difusión o dispersión fuera del sistema polimérico formado después de lo cual se generan poros y canales microporosos en el sistema. La cantidad de agente de formación de poros (y el tamaño de las partículas dispersadas de este agente de formación de poros, si es apropiado) dentro de la composición debe afectar el tamaño y el número de los poros en el sistema polimérico.

Los agentes de formación de poros incluyen cualquier sustancia orgánica o inorgánica, farmacéuticamente aceptable que sea miscible sustancialmente en agua y los fluidos corporales y se disipará desde la formación y la matriz formada en un medio acuoso o fluidos corporales o sustancias inmiscibles en agua que degradan rápidamente a las sustancias solubles en agua.

Los agentes de formación de poros, adecuados incluyen, por ejemplo, azúcares tales como sacarosa y dextrosa, sales tales como cloruro de sodio y carbonato de sodio y polímeros tales como hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y PVP. El tamaño y grado de los poros puede variarse sobre un amplio intervalo al cambiar el peso molecular y porcentaje del agente de formación de poros incorporado en el sistema polimérico.

La carga, lipofilicidad o hidrofilicidad de cualquier matriz polimérica, principal se puede modificar al unir en alguna forma un compuesto apropiado a la superficie de la matriz. Por ejemplo, se pueden utilizar tensioactivos para aumentar la humectabilidad de composiciones pobremente solubles o hidrófobas. Los ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen dextrano, polisorbatos y laurel-sulfato de sodio. En general, los tensioactivos se utilizan en bajas concentraciones, generalmente menos de aproximadamente 5%.

Las sustancias aglutinantes son materiales adhesivos que se pueden incorporar en formulaciones poliméricas para unir y mantener la integridad de la matriz. Las sustancias aglutinantes se pueden adicionar como un polvo seco o como una solución. Los azúcares y polímeros naturales y sintéticos pueden actuar como sustancias aglutinantes.

Los materiales adicionados específicamente como sustancias aglutinantes se incluyen generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,5%-15% p/p de la formulación de la matriz. Ciertos materiales, tales como celulosa microcristalina, también utilizados como intensificadores de la esferonización, también tienen propiedades de unión adicionales.

Se pueden aplicar varios revestimientos para modificar las propiedades de las matrices.

Tres tipos ejemplares de revestimientos son revestimientos de sellado, satinado y entéricos. Otros tipos de revestimientos que tienen varias propiedades de disolución o erosión se pueden utilizar para modificar adicionalmente el comportamiento de las matrices principales y estos revestimientos son fácilmente conocidos para una persona experta en el campo.

Un revestimiento de sellado puede prevenir la captación en exceso de humedad por las matrices durante la aplicación de revestimientos entéricos a base de agua. El revestimiento de satinado mejora generalmente la manipulación de las matrices terminadas. Los materiales solubles en agua, tales como hidroxipropilcelulosa, se pueden utilizar para implantes con revestimiento de sellado y revestimiento de satinado. El revestimiento de sellado y el revestimiento de satinado son pulverizados generalmente sobre las matrices hasta que se ha obtenido un incremento en peso entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 5%, frecuentemente de aproximadamente 1% para un revestimiento de sellado y aproximadamente 3% para un revestimiento de satinado.

Los revestimientos entéricos consisten de polímeros que son insolubles en el pH bajo (menor que 3,0) del estómago, pero son solubles en el pH elevado (mayor que 4,0) del intestino delgado. Los polímeros tales como EUDRAGIT<sup>MR</sup>, RohmTech, Inc., Malden, Mass., y AQUATERIC<sup>MR</sup>, FMC Corp., Filadelfia, Penn., se pueden utilizar y son estratificados como membranas delgadas sobre implantes de solución o suspensión acuosa o por medio de un método de secado por aspersión. El revestimiento entérico es pulverizado generalmente a un incremento en peso de aproximadamente 1% a aproximadamente 30%, de preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 15% y puede contener adyuvantes de revestimiento, tales como plastificantes, tensioactivos, agentes de separación que reducen la pegajosidad de los implantes durante el revestimiento y ajustadores de permeabilidad del revestimiento.

Las presentes composiciones pueden contener adicionalmente uno o más aditivos adicionales, tales como un refuerzo fibroso, colorantes, perfumes, modificadores de caucho, agentes modificadores, etcétera. En la práctica, cada uno de estos aditivos opcionales debe ser compatible con el polímero resultante y su uso propuesto. Los

ejemplos del refuerzo fibroso adecuado incluyen microfibrillas de PGA, microfibrillas de colágeno, microfibrillas de celulosa y microfibrillas de olefina. La cantidad de cada uno de estos aditivos optionales empleados en la composición es una cantidad necesaria para lograr el efecto deseado.

5 Los conjugados poliméricos, terapéuticos descritos en este texto se pueden administrar en varias formulaciones farmacéuticas dependiendo del trastorno a ser tratado y la edad, condición y peso corporal del paciente, como es bien sabido en el campo. Por ejemplo, donde los compuestos deben ser administrados oralmente, estos se pueden formular como tabletas, cápsulas, granulos, polvos o jarabes; o para la administración parenteral, se pueden formular como inyecciones (intravenosas, intramusculares o subcutáneas), preparaciones de infusión de gotas o supositorios. Para la aplicación mediante la ruta de la membrana mucosa oftálmica, se pueden formular como gotas para los ojos o ungüentos para los ojos. Estas formulaciones se pueden preparar por medios convencionales, y, si se desea, el ingrediente activo se puede mezclar con cualquier aditivo convencional, tal como un excipiente, una sustancia aglutinante, agente desintegrante, lubricante, correctivo, agente de solubilización, auxiliar de suspensión, agente emulsionante o agente de revestimiento. Aunque la dosificación variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y gravedad del trastorno que es tratado o prevenido, la ruta de administración y la forma del fármaco, en general, se recomienda una dosificación diaria de 0,01 a 2000 mg del agente terapéutico para un paciente humano adulto y esto se puede administrar en una sola dosis 6 en dosis divididas.

10 20 15 El tiempo preciso de administración y/o cantidad de conjugado polimérico, terapéutico que producirá los resultados más efectivos en términos de eficacia de tratamiento en un paciente dado dependerá de la actividad, farmacocinética y biodisponibilidad de un compuesto particular, condición fisiológica del paciente (que incluye edad, sexo, tipo y etapa de la enfermedad, condición física general, respuesta a una dosificación dada y tipo de medicación), ruta de administración, etcétera. Sin embargo, las guías anteriores se pueden utilizar como la base para una regulación fina del tratamiento, por ejemplo, para determinar el tiempo óptimo y/o cantidad de administración, que requerirá no más que la experimentación de rutina que consiste en supervisar al sujeto y ajustar la dosificación y/o sincronización.

25 30 La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en este texto para referirse a aquellos conjugados poliméricos, terapéuticos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio exacto del médico, adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, en proporción con una relación razonable de beneficio/riesgo.

35 40 45 La frase "portador farmacéuticamente aceptable" utilizada en este texto significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un material de relleno, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulamiento líquido o sólido, involucrado en llevar o transportar el "agente químico, principal de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, celulosa de etilo y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de semilla de soya; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) esteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina, isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones amortiguadoras de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles, no tóxicas que se emplean en las formulaciones farmacéuticas.

50 55 60 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales de adición de ácido orgánicas e inorgánicas, relativamente no tóxicas de los conjugados poliméricos, terapéuticos. Estas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y la purificación de los conjugados poliméricos, terapéuticos o al hacer reaccionar por separado un polímero purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislar la sal formada de esta manera. Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tátrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y lauriulfosfonato y similares. (Véase, por ejemplo, Berge y colaboradores, (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. SCI.* 66:1-19).

65 En otros casos, los conjugados poliméricos, terapéuticos que son útiles en los métodos de la presente descripción pueden contener uno o más grupos funcionales, ácidos y, de esta manera, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de bases, orgánicas e inorgánicas, relativamente no tóxicas del(los) polímero(s). Estas sales se pueden preparar de igual manera in situ durante el aislamiento final y la purificación del(los) polímero(s), o mediante la reacción por separado del (los) polímero(s) purificado(s) en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión de metal farmacéuticamente aceptable, con amoniaco, o con una amina primaria, secundaria o terciaria, orgánica,

farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. Las aminas orgánicas, representativas que son útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (véase, por ejemplo, Berge y colaboradores, *supra*).

5 Los agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril-sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como también agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, agentes dulcificantes, saborizantes y aromatizantes, conservadores y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones.

10 Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes formadores de quelatos de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

15 Las formulaciones útiles en los métodos de la presente descripción incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (que incluye oftálmica, ótica, bucal y sublingual), rectal, vaginal, aerosol y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en formas de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquier método bien conocido en el campo de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedante que es tratado, el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad del compuesto que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, fuera de cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento del ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 10 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

20 25 Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen el paso que consiste en poner en asociación un(unos) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) con el portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan al poner en asociación uniforme e íntimamente un conjugado polimérico, terapéutico con portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dar forma al producto.

30 35 Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar en la forma de cápsulas, sellos, pildoras, tabletas, gomas, pastillas rombóticas (utilizando una base saborizada, usualmente sacarosa y goma acacia o tragacanto), polvos, granulos o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite o como un elixir o jarabe o como pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno que contiene una cantidad predeterminada de un(unos) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) como un ingrediente activo. Un compuesto también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

40 Una tableta se puede hacer mediante la compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar utilizando sustancia aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmelcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservador, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente tensoactivo o de dispersión. Las tabletas moldeadas se pueden hacer al moldear en una máquina adecuada una mezcla del péptido en polvo o peptidomimético humedecido con un diluyente líquido, inerte.

45 50 55 Las tabletas, y otras formas de" dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, pildoras y granulos, se pueden grabar opcionalmente o se pueden preparar con revestimientos y cubiertas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en el campo de la formulación farmacéutica. Estas también se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en las mismas utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmelcelulosa en proporciones variantes para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Estas se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante la filtración a través de un filtro de retención de bacterias o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas, estériles, las cuales se pueden disolver en agua estéril o algún otro medio inyectable, estéril inmediatamente antes del uso. Esas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificadores y pueden ser de una composición que liberen el(los) ingrediente(s) activo(s) únicamente, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustamiento que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede estar en una forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en el campo, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes de solubilización y emulsionantes, tales como alcohol etílico alcohol

- isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuate, maiz, germen, olivo, ricino y ajonjolí), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicos y esteres de ácidos grasos de sorbitan y mezclas de los mismos.
- Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes dulcificantes, saborizantes, colorantes, aromatizantes y conservadores.
- Las suspensiones, además de los conjugados poliméricos, terapéuticos, activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen-sorbitol y esteres de sorbitan, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.
- Las formulaciones para la administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, el cual se puede preparar al mezclar uno o más conjugados poliméricos, terapéuticos con uno o más excipientes no irritantes, adecuados o portadores que comprenden por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorio o un salicilato, y el cual es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en la cavidad rectal o vaginal y liberará el agente activo.
- Las formulaciones que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas y formulaciones de pulverización que contienen estos portadores que en el campo se sabe que son apropiados,
- Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un(unos) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) incluyen polvos, pulverizaciones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El componente activo se puede mezclar bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservador, amortiguador o impelente que se pueda requerir.
- Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además del(los) ligando(s), excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicos, silíconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.
- Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de un(nos) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s), excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente impelentes acostumbrados, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos, volátiles, tales como butano y propano.
- El(los) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) se puede(n) administrar alternativamente mediante el aerosol. Esto se realiza al preparar un aerosol acuoso, preparación liposómica o partículas sólidas que contienen el compuesto. Se podría utilizar una suspensión no acuosa (por ejemplo, impelente de fluorocarburo). Los nebulizadores sónicos se prefieren debido a que minimizan la exposición del agente al esfuerzo cortante, lo cual puede dar por resultado la degradación del compuesto.
- Ordinariamente, un aerosol acuoso se hace al formular una solución o suspensión acuosa, del agente junto con portadores y estabilizadores farmacéuticamente aceptables, convencionales. Los portadores y estabilizadores varian con los requerimientos del compuesto particular, pero incluyen tipicamente tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronics o polietilenglicol), proteínas inocuas como albúmina de suero, esteres de sorbitan, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, amortiguadores, sales, azucares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles se preparan generalmente a partir de soluciones isotónicas.
- Los parches transdérricos tienen la ventaja adicional de proporcionar un suministro controlado de un(unos) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) al cuerpo. Estas formas de dosificación se pueden hacer al disolver o dispersar el agente en el medio apropiado. Los intensificadores de la absorción también se pueden utilizar para incrementar el flujo del ligando a través de la piel. La velocidad de este flujo se puede controlar ya sea al proporcionar una membrana para el control de la velocidad o al dispersar el agente peptidomimético en una matriz polimérica o gel.
- Las formulaciones oftálmicas, ungüentos para los ojos, polvos, soluciones y similares también están contemplados como que están dentro del alcance de esta descripción.
- Las composiciones farmacéuticas de esta descripción que son adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden ser reconstituidos en soluciones inyectables, estériles o dispersiones justo antes del uso, los cuales pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostatos, solutos los cuales vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor propuesto o agentes de suspensión o espesamiento.
- Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos, adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y

similares) y mezclas adecuada de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de olivo y esteres orgánicos, inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

- 5 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifungales, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsóbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica, inyectable se puede 10 llevar aproximadamente por la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monostearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, a fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable disminuir la velocidad de la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede realizar mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfó que tiene pobre solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco 15 entonces depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada parenteralmente se realiza al disolver o suspender el fármaco en un vehículo oleoso.

Las formas de depósito inyectables se hacen al formar matrices microencapsuladas de conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) en polímeros biodegradables, tales como poliláctida-poliglicólido. Dependiendo de la relación del 20 fármaco con el polímero, y la naturaleza del polímero particular que se emplea, la velocidad de liberación del fármaco se puede controlar. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polí(orthoésteres) y polí(anhídridos). Las formas inyectables de depósito también se preparan al atrapar el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

25 Cuando el(es) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) de la presente descripción son administrados como agentes farmacéuticos, a humanos y animales, se pueden proporcionar per se o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1 a 99,5% (más preferiblemente, 0,5 a 90%) de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

30 Las preparaciones de agentes se pueden proporcionar por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Estas se proporcionan por supuesto, mediante formas adecuadas para cada ruta de administración. Por ejemplo, se administran en forma de tabletas o cápsulas mediante la inyección, inhalación, loción para los ojos, ungüento, suppositorio, infusión; por vía tópica mediante loción o ungüento; y por vía rectal mediante supositorios. Se prefiere la administración oral.

35 Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" utilizadas en este texto significan modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, usualmente mediante la inyección, e incluyen, sin limitación, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaco, intradérmico, intraperitoneal, transtraqueal, subcutáneo, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidal, inyección intraespinal e intraesternal e infusión.

40 Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" utilizadas en este texto significan la administración de un conjugado polimérico, terapéutico, fármaco u otro material diferente de directamente en el sistema nervioso central, de tal manera que entre al sistema del paciente y, de esta manera, esté sujeto al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, la administración subcutánea.

45 Este(estos) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s) se puede(n) administrar a humanos y otros animales para la terapia mediante cualquier ruta de administración adecuada, que incluye mediante la ruta oral, nasal, como mediante, por ejemplo, una pulverización, rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, como mediante polvos, ungüentos o • gotas, inclusive bucal y sublingual.

50 Sin importar la ruta de administración seleccionada, el(es) conjugado(s) polimérico(s), terapéutico(s), que se pueden utilizar en una forma hidratada, adecuada y/o las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por medio de métodos convencionales que son conocidos para aquellas personas expertas en el campo.

55 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta descripción pueden variarse para mantener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica, deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente.

(c) *Estructuras Físicas de las Composiciones Principales*

55 Los polímeros principales se pueden generar en una variedad de formas. Por ejemplo, en ciertos casos, las matrices poliméricas, principales se pueden presentar en la forma de micropartículas o nanopartículas. Las microesferas

comprenden típicamente una matriz polimérica biodegradable que incorpora un fármaco. Las microesferas se pueden formar por medio de una amplia variedad de técnicas conocidas para aquellas personas expertas en el campo. Los ejemplos de técnicas de formación de microesferas incluyen, pero no están limitados a, (a) separación de fases mediante la emulsificación y evaporación subsecuente de disolventes orgánicos (que incluyen métodos de emulsión de complejos, tales como emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite y emulsiones de agua-aceite-agua; (b) separación de coacervación de fases; (c) dispersión por fusión; . (d) deposición interfacial; (e) polimerización in situ; (f) secado por aspersión y congelación por aspersión; (g) revestimiento de suspensión aéreo; y (h) revestimiento en cacerola y pulverización. Estos métodos, así como también las propiedades y características de las microesferas se describen en, por ejemplo, la patente norteamericana No. 4,652,441; la patente norteamericana No. 5,100,669; la patente norteamericana No. 4,526,938; WO 93/24150; EPA 0258780 A2; la patente norteamericana No. 4,438,253; y la patente norteamericana No. 5,330,768.

Para preparar microesferas de la presente descripción, se pueden emplear varios métodos dependiendo de la aplicación deseada de los vehículos de suministro. Los métodos adecuados incluyen, pero no están limitados a, secado por aspersión, liofilización, secado por aire, secado al vacío, secado en lecho fluidizado, molienda, co-precipitación y extracción crítica de fluido. En el caso del secado por aspersión, liofilización, secado con aire, secado al vacío, secado en lecho fluidizado, y extracción crítica de fluido; los componentes (poliol estabilizador, material bioactivo, amortiguadores, etcétera) se disuelven o suspenden primero en condiciones acuosas. En el caso de la molienda, los componentes se mezclan en la forma seca y se muelen por medio de cualquier método conocido en el campo. En el caso de la co-precipitación, los componentes se mezclan en condiciones orgánicas y se procesan como se describe posteriormente. El secado por pulverización se puede utilizar para cargar el poliol estabilizador con el material bioactivo. Los componentes se mezclan bajo condiciones acuosas y se secan utilizando boquillas de precisión para producir gotitas extremadamente uniformes en una cámara • de secado. Las máquinas para el secado por aspersión adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, los secadores por aspersión Buchi, NIRO, fIPV y Lab-plant utilizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La forma de microparticulas y nanoparticulas se puede terminar mediante la microscopía electrónica de barrido. Las nanoparticulas de forma esférica se utilizan en ciertas modalidades, para la circulación a través del torrente sanguíneo. Si se desea, las partículas se pueden fabricar utilizando técnicas conocidas en otras formas que son más útiles para una aplicación específica.

Además del suministro intracelular de un agente terapéutico, también es posible que las partículas de las composiciones principales, tales como microparticulas o nanoparticulas, se puedan someter a la endocitosis, para obtener con lo cual acceso a la célula. La frecuencia de este proceso de endocitosis dependerá probablemente del tamaño de cualquier partícula.

En ciertos casos, se pueden utilizar artículos sólidos que son útiles en la definición de la forma y para proporcionar rigidez y resistencia estructural a las matrices poliméricas. Por ejemplo, se puede formar un polímero en una malla u otro tejido para el implante. Dn polímero también se puede fabricar como un dispositivo stent o como una derivación, adaptado para mantener áreas abiertas dentro de los tejidos corporales o para drenar fluido desde una cavidad corporal o lumen corporal en otro. Además, un polímero se puede fabricar como un dren o un tubo adecuado para remover fluido de un sitio post-operativo y en algunos casos adaptable para el uso con sistemas de drenaje de sección cerrada, tales como drenajes Jackson-Pratt y similares que son familiares en el campo.

Las propiedades mecánicas del polímero pueden ser importantes para la procesabilidad de la fabricación de artículos moldeados o comprimidos para el implante. Por ejemplo, la temperatura de transición del estado vitreo puede variar ampliamente pero debe ser suficientemente más baja que la temperatura de descomposición para dar lugar a técnicas de fabricación convencionales, tales como el moldeo por compresión, extrusión y moldeo por inyección.

#### 45 (d) *Biodegradabilidad y Características de Liberación*

En ciertos casos, los polímeros y mezclas de la presente descripción, con el contacto con fluidos corporales, se someten a la degradación gradual. La vida de un polímero biodegradable *in vivo* depende de, entre otras cosas, su peso molecular, cristalinidad, bioestabilidad y el grado de reticulación. En general, mientras mayor sea el peso molecular, mayor sea el grado de cristalinidad y mayor sea la bioestabilidad, más lenta será la degradación.

Si se formula una composición principal con un agente terapéutico u otro material, resulta generalmente la liberación de este agente u otro material durante un periodo sostenido y extendido en comparación con la liberación de una solución salina, isotónica. Este perfil de liberación puede dar por resultado un suministro prolongado (digamos sobre 1 a aproximadamente 2.000 horas, o alternativamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 800 horas) de cantidades efectivas (por ejemplo, aproximadamente 0,0001 mg/kg/hora a aproximadamente 1,0 mg/kg/hora) del agente o cualquier otro material asociado con el polímero.

Una variedad de factores puede afectar la velocidad deseada de hidrólisis de los polímeros de la descripción, la suavidad deseada y la flexibilidad de la matriz sólida, resultante, la velocidad y grado de liberación del material biodegradable. Algunos de estos factores incluyen la selección/identidad de varias subunidades, la pureza

enantiomérica o diastereomérica de las subunidades monoméricas, homogeneidades de subunidades encontradas en el polímero y la longitud del polímero. Por ejemplo, la presente descripción contempla heteropolímeros con enlaces variantes y/o la inclusión de otros elementos monoméricos en el polímero, a fin de controlar, por ejemplo, la velocidad de biodegradación de la matriz.

- 5 Para ilustración adicional, se puede obtener un amplio intervalo de velocidades de degradación al ajustar las hidrofobicidades de las estructuras principales o cadenas laterales de los polímeros mientras que aún se mantiene una biodegradabilidad suficiente para el uso propuesto de cualquiera de estos polímeros. Este resultado se puede lograr al variar los diversos grupos funcionales del polímero. Por ejemplo, la combinación de una estructura principal, hidrófoba y un enlace hidrófilo produce la degradación heterogénea debido a que se favorece la escisión mientras 10 que se impide la penetración del agua.

Un protocolo aceptado generalmente en el campo que se puede utilizar para determinar la velocidad de liberación de cualquier agente terapéutico u otro material cargado en las matrices poliméricas de la presente descripción involucra la degradación de cualquiera de estas matrices en una solución de PBS 0,1 M (pH 7,4) a 37°C, un ensayo conocido 15 en el campo. Para propósitos de la presente descripción, el término "protocolo de PBS" se utiliza en este texto para referirse a este protocolo.

En ciertos casos, las velocidades de liberación de diferentes sistemas poliméricos de la presente descripción se 20 pueden comparar al sujetarlos a este protocolo. En ciertos casos, puede ser necesario procesar sistemas poliméricos en la misma forma para permitir que se hagan las comparaciones directas y relativamente precisas de diferentes sistemas. Por ejemplo, la presente descripción enseña varios medios diferentes para formular las matrices poliméricas de la presente descripción. Estas comparaciones pueden indicar que cualquier sistema polimérico libera material incorporado a una velocidad de aproximadamente 2 o menos a aproximadamente 1000 o más veces más 25 rápido que otro sistema polimérico.

Alternativamente, una comparación puede revelar una diferencia de velocidad de aproximadamente 3, 5, 7, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o 750 veces. Las diferencias de velocidad aún más altas están contempladas por la presente 30 descripción y los protocolos de velocidad de liberación.

En ciertos casos, cuando se formulan de cierta manera, la velocidad de liberación de los sistemas poliméricos de la presente descripción puede presentarse como mono- o bi-fásica.

La liberación de cualquier material incorporado en la matriz polimérica, que se proporciona frecuentemente .como 35 una microesfera, se puede caracterizar en ciertos casos por una velocidad de liberación incrementada, inicial, que puede liberar de aproximadamente 5 a aproximadamente 50% o más de cualquier material incorporado, o alternativamente de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30 o 40%, seguido por una velocidad de liberación de menor magnitud.

La velocidad de liberación de cualquier material incorporado también se puede caracterizar por la cantidad de este 40 material liberado al día por mg de matriz polimérica. Por ejemplo, en ciertos casos, la velocidad de liberación puede variar de aproximadamente 1 ng o menos de cualquier material incorporado al dia por mg de sistema polimérico a aproximadamente 500 o más ng/día/mg. Alternativamente, la velocidad de liberación puede ser de aproximadamente 0,05, 0,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 ng/día/mg. En todavía otros casos, la velocidad de liberación de cualquier material incorporado puede ser de 10,000 ng/día/mg, o incluso superior. En ciertos casos, los materiales incorporados y caracterizados por estos protocolos de velocidad de liberación pueden incluir agentes terapéuticos, materiales de relleno y otras sustancias.

En otro aspecto, la velocidad de liberación de cualquier material desde cualquier matriz polimérica de la presente descripción se puede presentar como el periodo de vida media de este material en la matriz.

Además del aspecto que involucra protocolos para la determinación *in vitro* de las velocidades de liberación, los protocolos *in vivo*, con lo cual en ciertos casos las velocidades de liberación para los sistemas poliméricos se pueden 45 determinar *in vivo*, también están contemplados por la presente descripción. Otros ensayos útiles para determinar la liberación de cualquier- material de los polímeros del presente sistema son conocidos en el campo.

(e) *Implantes y Sistemas de Suministro*

En su forma más simple, un sistema de suministro biodegradable para un agente terapéutico consiste de una dispersión de este agente terapéutico en una matriz polimérica. En otros casos, un artículo se usa para el implante, inyección o de otra manera se coloca total o parcialmente dentro del cuerpo, el artículo comprende las 50 composiciones principales. Es particularmente importante que este artículo de por resultado una irritación de tejido mínima cuando se implanta o inyecta en el tejido vasculado.

Los sistemas de suministro biodegradables, y artículos de los mismos, se pueden preparar de una variedad de formas conocidas en el campo. En polímero principal puede ser procesado por fusión utilizando técnicas de moldeo 55 por extrusión o inyección convencionales o esos productos se pueden preparar mediante la -disolución en un disolvente apropiado, seguido por la formación del dispositivo y la remoción subsecuente del disolvente mediante la

evaporación o extracción.

Una vez que un sistema o artículo de implante está en su lugar, debe permanecer en contacto al menos parcial con un fluido biológico, tal como la sangre, secreciones de órganos internos, membranas mucosas, fluido cerebroespinal y similares para permitir la liberación sostenida de cualquier agente terapéutico, encapsulado.

5      (f)    *Métodos de Preparación*

Generalmente, los compuestos de la presente descripción se pueden preparar en una de dos maneras: los monómeros que llevan agentes terapéuticos, ligandos de establecimiento de objetivos, y/o restos de ciclodextrina se pueden copolimerizar, o las estructuras principales del polímero se pueden derivatizar con agentes terapéuticos, ligandos de establecimiento de objetivos y/o restos de ciclodextrina.

10     De esta manera, en un caso, la presente descripción contempla la síntesis de compuestos de la descripción al hacer reaccionar monómeros M-L-CD y M-L-D (y, opcionalmente, M-L-T), en donde

CD representa un resto cíclico, tal como una molécula de ciclodextrina, o un derivado de la misma;

L, independientemente de cada vez que aparece, puede estar ausente o representar un grupo conector;

15     D, independientemente de cada vez que aparece, representa el mismo o diferente agente terapéutico o profármacos del mismo;

T, independientemente de cada vez que aparece, representa el mismo o diferente ligando de establecimiento de objetivos o un precursor del mismo; y

20     M, representa una subunidad monomérica que lleva una o más porciones reactivas que pueden someterse a una reacción de polimerización con uno o más de otros M en los monómeros en la mezcla de reacción, bajo condiciones que causan que tome lugar la polimerización de los monómeros.

En ciertos casos, la mezcla de reacción pude comprender además monómeros que no llevan porciones CD, T o D, por ejemplo, para separar las unidades monoméricas, derivadas por todo el polímero.

25     En un caso alternativo, la descripción contempla sintetizar un compuesto de la presente descripción mediante la reacción de un polímero P (el polímero que lleva una pluralidad de grupos reactivos tales como ácidos carboxílicos, alcoholes, tioles, aminas, epóxidos, etcétera) con agentes de injerto X-L-CD e Y-L-D (y, opcionalmente, Z-L-T), en donde

CD representa un resto cíclico, tal como una molécula de ciclodextrina, o un derivado de la misma;

L, independientemente de cada vez que aparece, puede estar ausente o representar un grupo conector;

30     D, independientemente de cada vez que aparece, representa el mismo o diferente agente terapéutico o profármacos del mismo;

T, independientemente de cada vez que aparece, representa el mismo o diferente ligando de establecimiento de objetivos o precursor del mismo;

35     X, independientemente de cada vez que aparece, representa un grupo reactivo, tal como ácidos carboxílicos, alcoholes, tioles, aminas, epóxidos, etcétera, capaz de formar un enlace covalente con un grupo reactivo del polímero; y

40     Y y Z, independientemente de cada vez que aparecen, representan hospedantes de inclusión o grupos reactivos, tales como ácidos carboxílicos, alcoholes, tioles, aminas, epóxidos, etcétera, capaces de formar un enlace covalente con un grupo reactivo del polímero o complejos de inclusión con porciones CD injertadas al polímero, bajo condiciones que causan que los agentes de injerto formen enlaces covalentes y/o complejos de inclusión, como sea apropiado, con el polímero o porciones injertadas al polímero.

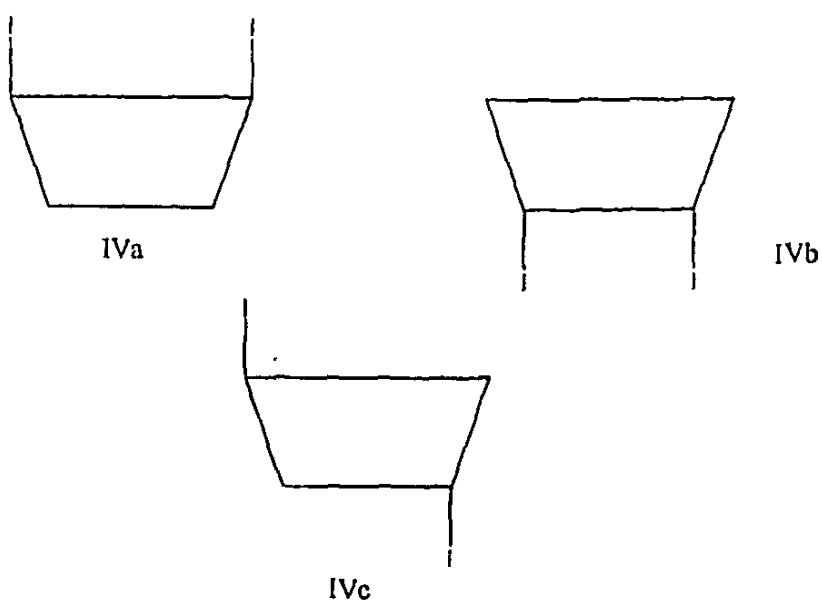
45     Por ejemplo, si el polímero incluye alcoholes, tioles o aminas como grupos reactivos, los agentes de injerto pueden incluir grupos reactivos que reaccionan con ellos, tales como isocianatos, isotiocianatos, cloruros ácidos, anhídridos ácidos, epóxidos, cetonas, cloruros de sulfonilo, ácidos carboxílicos activados (por ejemplo, ácidos carboxílicos tratados con un agente activador tal como PyBrOP, carbonildiimidazol u otro reactivo que reaccione con un ácido carboxílico para formar una porción susceptible al ataque nucleofílico), u otras porciones electrofilicas conocidas para aquellas personas expertas en el campo. En ciertos casos, puede ser necesario que un catalizador cause que la reacción tome lugar (por ejemplo, un ácido Lewis, un catalizador de metal de transición, una base de amina, etcétera) como será entendido por aquellas personas expertas en el campo.

50     En ciertos casos, los diferentes agentes de injerto se hacen reaccionar con el polímero simultáneamente o en realidad simultáneamente (por ejemplo, en una reacción en una vasija), o se hacen reaccionar secuencialmente con

el polímero (opcionalmente con un paso de purificación y/o lavado entre las reacciones).

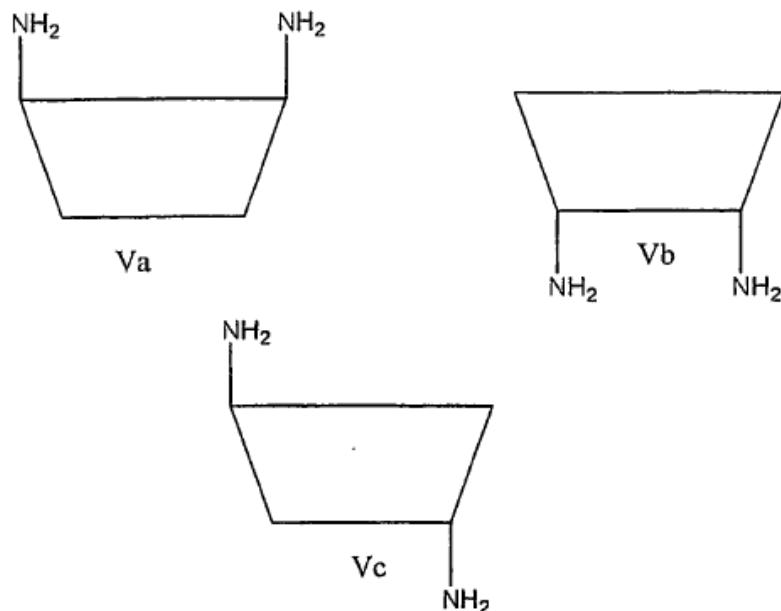
También se describe en esta memoria un método para fabricar los polímeros que contienen ciclodextrina, lineales o ramificados que son representados por las fórmulas I-III. Mientras que la descripción posterior se enfoca en la preparación de moléculas de ciclodextrina lineal, una persona experta en el campo reconocerla fácilmente que los métodos descritos se pueden adaptar para producir polímeros ramificados al seleccionar un precursor de comonómero A apropiado.

Por consiguiente, un caso de la descripción es un método para preparar un copolímero de ciclodextrina lineal. De acuerdo con la descripción, un copolímero de ciclodextrina lineal de la descripción se puede preparar al copolimerizar un precursor de irtonómero de ciclodextrina disustituido por un grupo saliente,, apropiado con un precursor de comonómero A capaz de desplazar los grupos salientes. El grupo saliente, el cual puede ser el mismo o diferente, puede ser cualquier grupo saliente conocido en el campo que pueda ser desplazado con la copolimerización con un precursor de comonómero A. En un caso preferido, un copolímero de ciclodextrina lineal se puede preparar mediante la yodación de un precursor de monómero de ciclodextrina para formar un precursor de monómero de ciclodextrina diyodado y copolimerizar el precursor de monómero de ciclodextrina diyodado con un precursor de comonómero A para formar un copolímero de ciclodextrina lineal que tiene una unidad de repetición de la fórmula II o III, o una combinación de los mismos, cada uno como se describiera anteriormente. Mientras que los ejemplos presentados a continuación describen restos de ciclodextrina yodados, una persona experta en el campo reconocerla fácilmente que la presente descripción contempla e incluye los restos de ciclodextrina en donde otros grupos salientes, tales como alquilo o arilsulfonato pueden estar presentes en lugar grupos yodo. En un caso preferido, un método para preparar un copolímero de ciclodextrina lineal de la descripción al yodar un precursor de monómero de ciclodextrina como se describiera anteriormente para formar un precursor de monómero de ciclodextrina diyodado de las fórmulas IVa, IVb, IVc o una mezcla de las mismas:



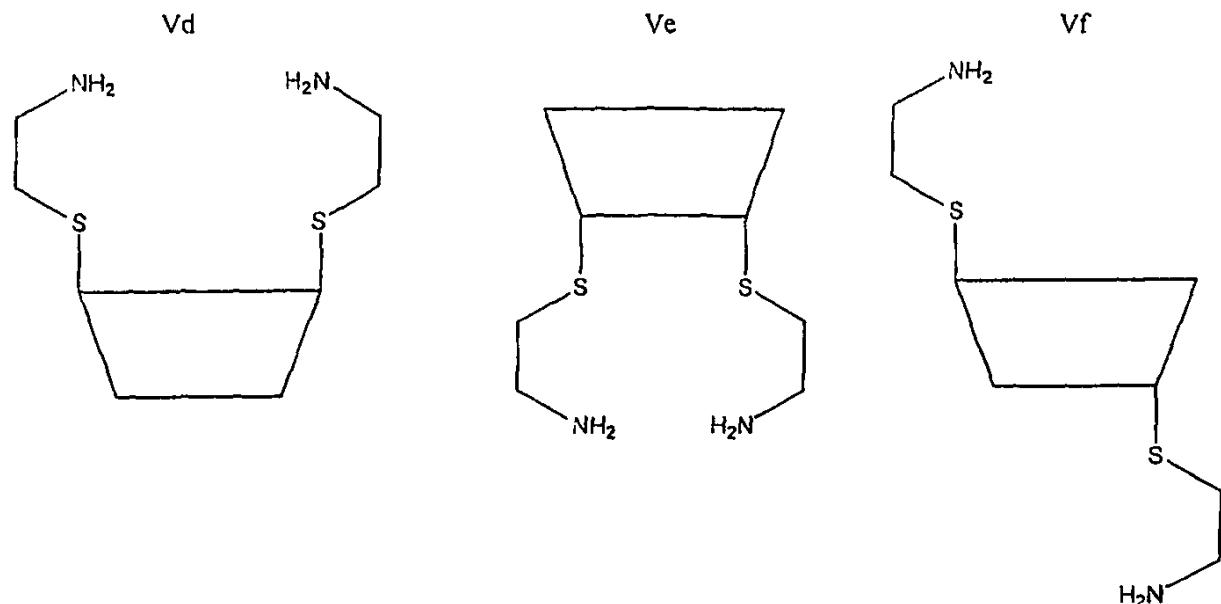
La ciclodextrina diyodada se puede preparar por cualquier medio conocido en el campo (Tabushi y colaboradores, J. Am. Chem. 106, 5267-5270 (1984); Tabushi y colaboradores, J. Am. Chem. 106, 4580-4584 (1984)). Por ejemplo, la  $\beta$ -ciclodextrina se puede hacer reaccionar con cloruro de bifenil-4,4'-disulfonio en presencia de piridina anhidra para formar una p-ciclodextrina cuyo extremo es cloruro de bifenil-4,4'-disulfonio, la cual entonces se puede hacer reaccionar con yoduro de potasio para proporcionar la diyodo- $\beta$ -ciclodextrina. El precursor de monómero de ciclodextrina es yodado en solo dos posiciones. Mediante la copolimerización, el precursor de monómero de ciclodextrina diyodado con un precursor de comonómero A, como se muestra anteriormente, se puede preparar un polímero de ciclodextrina lineal que tiene una unidad de repetición de las fórmulas Ia, Ib o una combinación de las mismas, también como se describiera anteriormente. Si es apropiado, los grupos yodo pueden ser reemplazados por otros grupos salientes, conocidos.

También de acuerdo con la descripción, los grupos yodo u otro grupo saliente, apropiado se puede desplazar por un grupo que permita la reacción con un precursor de comonómero A, como se describiera anteriormente. Por ejemplo, un precursor de monómero de ciclodextrina diyodado de las fórmulas IVa, IVb, IVc o una mezcla de las mismas se puede aminar para formar un precursor de monómero de ciclodextrina diaminado de las fórmulas Va, Vb, Vc o una mezcla de las mismas:



El precursor de monómero de ciclodextrina diaminado se puede preparar por cualquier medio conocido en el campo. (Tabushi y colaboradores, Tetrahedron Lett. 18:11527-1530 (1977); Mungall y colaboradores, J. Org. Chem. 1659-1662 (1975)). Por ejemplo, una divodo- $\beta$ -ciclodextrina se puede hacer reaccionar con azida de sodio y entonces se

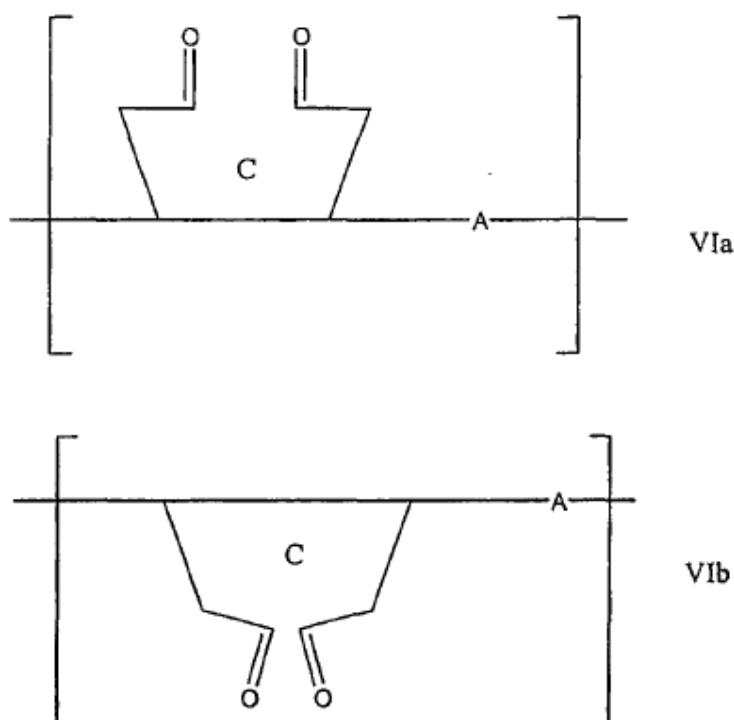
- 5 1982 (1973)). Por ejemplo, una diyodo- $\beta$ -ciclodextrina se puede hacer reactivar con azida de sodio y el exceso se  
puede reducir para formar una diamino- $\beta$ -ciclodextrina). El precursor de monómero de ciclodextrina es aminoado en  
solo dos posiciones. El precursor de monómero de ciclodextrina diaminado entonces puede ser copolimerizado con  
un precursor de comonómero A, como se describiera anteriormente, para producir un copolímero de ciclodextrina  
lineal que tiene una unidad de repetición de las fórmulas II-III o una combinación de las mismas, también como se  
describiera anteriormente. Sin embargo, la funcionalidad de amino de un precursor de monómero de ciclodextrina  
diaminado no necesita ser unida directamente al resto de ciclodextrina. Alternativamente, la funcionalidad de amino  
u otra funcionalidad nucleofílica se puede introducir mediante el desplazamiento del grupo yodo u otro grupo  
saliente, apropiado de un precursor de monómero de ciclodextrina con un grupo amino que contiene porciones tales  
como, por ejemplo,  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  (o una molécula di-nucleofílica representada más generalmente por  $\text{HW}-$   
10  $(\text{CR}_1\text{R}_2)_n-\text{WH}$  en donde W, independientemente de cada vez que aparece, representa O, S o NR<sub>1</sub>; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>,  
independientemente de cada vez que aparecen, representan H, alquilo (no)sustituido, arilo (no)sustituido,  
heteroalquilo (no)sustituido, heteroarilo (no)sustituido) con una base apropiada, tal como hidruro de metal, carbonato  
15 de álcali o alcalino o amina terciaria para formar un precursor de monómero de ciclodextrina diaminado de las  
fórmulas Vd, Ve, Vf o una mezcla de las mismas:



- 20 Un copolímero que contiene ciclodextrina, oxidado, lineal de la descripción también se puede preparar mediante la

oxidación de un copolímero que contiene ciclodextrina, lineal, reducido de la descripción como se describe posteriormente. Este método se puede llevar a cabo siempre y cuando el comonómero A no contenga una porción o grupo sensible a la oxidación, tal como, por ejemplo, un tiol.

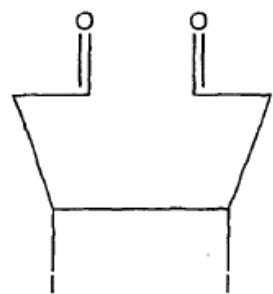
- 5 De acuerdo con la descripción, un copolímero de ciclodextrina lineal de la descripción se puede oxidar para introducir al menos un monómero de ciclodextrina oxidado en el copolímero de tal manera que el monómero de ciclodextrina oxidado sea una parte integral de la estructura principal del polímero. Un copolímero de ciclodextrina lineal que contiene al menos un monómero de ciclodextrina oxidado se define como un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal o un polímero que contiene ciclodextrina oxidado, lineal. El monómero de ciclodextrina puede ser oxidado en el lado de hidroxilo ya sea secundario o primario del resto de ciclodextrina. Si está presente más de un monómero de ciclodextrina oxidado en un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal de la descripción, pueden estar presentes los mismos o diferentes monómeros de ciclodextrina oxidados en ya sea el lado de hidroxilo primario, el lado de hidroxilo secundario o ambos. Para propósitos de ilustración, un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal con grupos hidroxilo secundarios, oxidados tiene, por ejemplo, al menos una unidad de las fórmulas VIa o VIb:
- 10



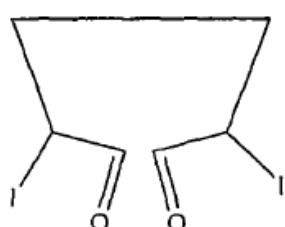
- 15 En las fórmulas VIa y VIb, C es un monómero de ciclodextrina oxidado, sustituido o no sustituido y A es un comonómero unido, es decir, unido covalente, a la ciclodextrina oxidada C. También en las fórmulas VIa y VIb, la oxidación de los grupos hidroxilo secundarios conduce a la apertura de anillos del resto de ciclodextrina y la formación de grupos aldehido.

- 20 Un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal se puede preparar mediante la oxidación de un copolímero de ciclodextrina lineal como se describiera anteriormente. La oxidación de un copolímero de ciclodextrina lineal de la descripción se puede realizar mediante técnicas de oxidación conocidas en el campo. (Hisamatsu y colaboradores, Starch 44:188-191 (1992)). Preferiblemente, se utiliza un oxidante, tal como, por ejemplo, peroxodato de sodio. Una persona experta en el campo entenderá que bajo condiciones de oxidación estándar el grado de oxidación puede variar o puede ser variado por el copolímero. De esta manera, en un caso de la descripción, un copolímero oxidado, lineal de la descripción puede contener un monómero de ciclodextrina, oxidado. En otro caso, sustancialmente todos los monómeros de ciclodextrina del copolímero se oxidarían.
- 25

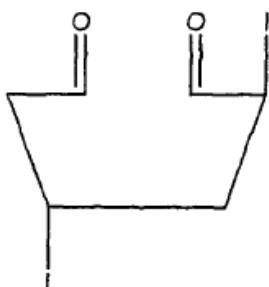
- Otro método para preparar un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal de la descripción involucra la oxidación de un precursor de monómero de ciclodextrina diyodado o diaminado, como se describiera anteriormente, para formar un precursor de monómero de ciclodextrina diyodado o diaminado, oxidado y la copolimerización -del precursor de monómero de ciclodextrina diyodado o diaminado, oxidado con un precursor de comonómero A. En un caso preferido, un precursor de monómero de ciclodextrina, diyodado, oxidado de las fórmulas VIIa, VIIb, VIIc o una mezcla de las mismas:
- 30



VIIa

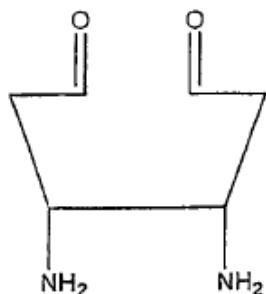


VIIb

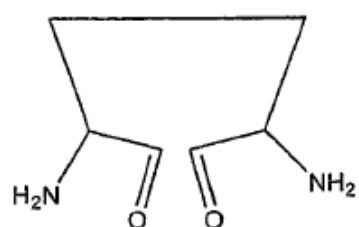


VIIc

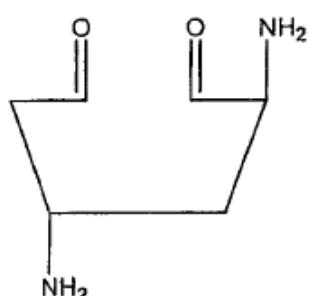
se puede preparar mediante la oxidación de un precursor de monómero de ciclodextrina diyodado de las fórmulas IVa, IVb, IVc o una mezcla de las mismas, como se describiera anteriormente. En otro caso preferido, un precursor de monómero de ciclodextrina diaminado, oxidado de las fórmulas VIIIa, VIIIb, VIIIc o una mezcla de las mismas:



VIIIa

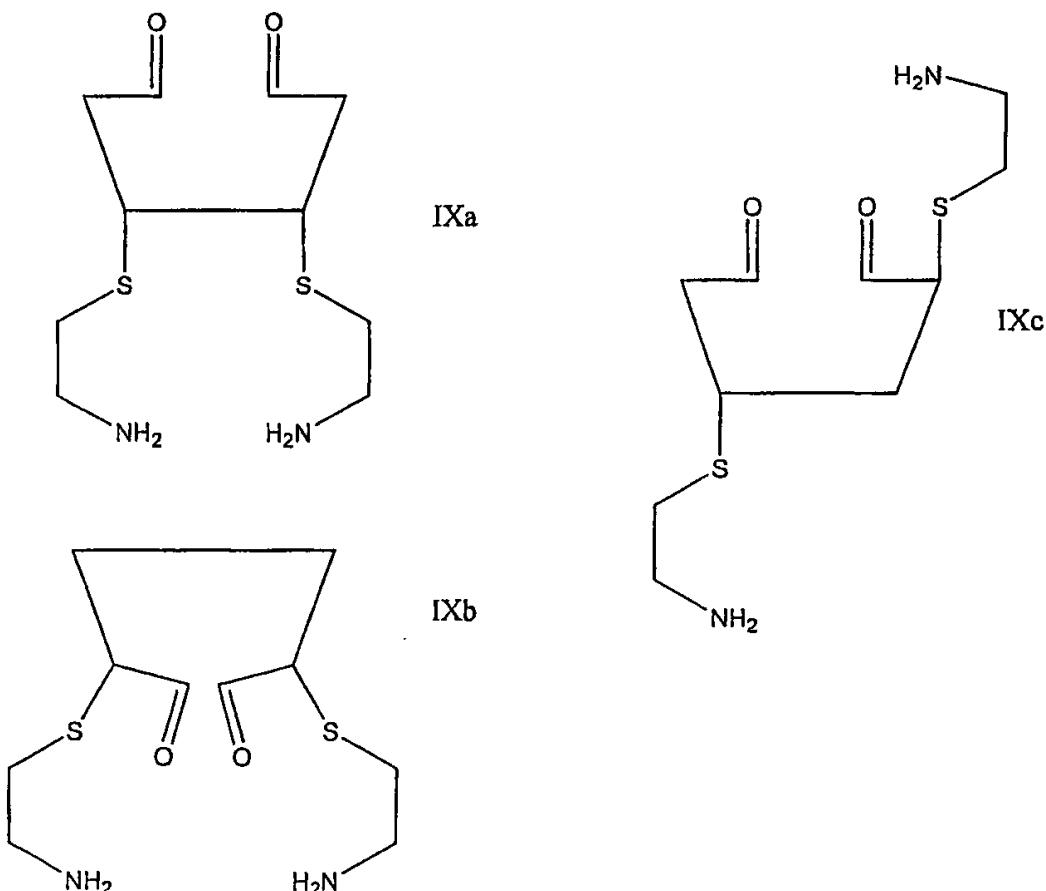


VIIIb



VIIIc

se puede preparar mediante la aminación de un precursor de monómero de ciclodextrina diyodado, oxidado de las fórmulas VIIa, VIIb, VIIc o una mezcla de las mismas, como se describiera anteriormente. En todavía otra modalidad preferida, un precursor de monómero de ciclodextrina diaminado, oxidado de las fórmulas IXa, IXb, IXc o una mezcla de las mismas:



se puede preparar mediante el desplazamiento del grupo yodo u otros grupos salientes, apropiados de un precursor de monómero de ciclodextrina, oxidado que es disustituido por un grupo de yodo u otro grupo saliente, apropiado con el grupo amino u otro grupo nucleofílico que contiene una porción tal como, por ejemplo,  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  (o una

- 5 molécula -di-nucleofílica representada más generalmente por  $\text{HW-(CR}_1\text{R}_2)_n\text{-WH}$  en donde W, independientemente de cada vez que aparece, representa O, S o NR<sub>1</sub>; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, independientemente de cada vez que aparecen, representan H, alquilo (no)sustituido, arilo (no)sustituido, heteroalquilo (no)sustituido, heteroarilo (no)sustituido) con una base apropiada, tal como hidruro de metal, carbonato de álcali o alcalino o amina terciaria.

- 10 Alternativamente, un precursor de monómero de ciclodextrina diyodado o diaminado, oxidado, como se describiera anteriormente, se puede preparar al oxidar un precursor de monómero de ciclodextrina para formar un precursor de monómero de ciclodextrina oxidado y entonces diyodar y/o diaminar el monómero de ciclodextrina oxidado, como se describiera anteriormente. Como se describiera anteriormente, el resto de ciclodextrina se puede modificar con otros grupos salientes diferentes de los grupos yodo y otro grupo amino que contiene funcionalidades. El precursor de monómero de ciclodextrina diyodado o diaminado, oxidado entonces se puede copolimerizar con un precursor de comonómero A, como se describiera anteriormente, para formar un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal de la descripción.

15 Un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal también se puede modificar adicionalmente mediante la unión de al menos un ligando al copolímero. El ligando es como se describiera anteriormente.

- 20 De acuerdo con la descripción, un copolímero de ciclodextrina lineal o un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal se puede unir a o se puede injertar en un substrato. El substrato puede ser cualquier substrato reconocido por aquellas personas de experiencia ordinaria en el campo. En otro caso preferido de la descripción, un copolímero de ciclodextrina lineal o un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal puede ser reticulado a un polímero para formar, respectivamente, un copolímero de ciclodextrina reticulado o un copolímero de ciclodextrina oxidado, reticulado. El polímero puede ser cualquier polímero que hace posible la reticulación con un copolímero de ciclodextrina lineal u oxidado, lineal de la descripción (por ejemplo, polímero de polietilenglicol (PEG), polímero de polietileno). El polímero también puede ser el mismo o diferente copolímero de ciclodextrina lineal o copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal. De esta manera, por ejemplo, un copolímero de ciclodextrina lineal puede ser reticulado a cualquier polímero que incluye, pero no está limitado a, el mismo, otro copolímero de ciclodextrina lineal y un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal. Un copolímero de ciclodextrina lineal, reticulado de la descripción se puede preparar mediante la reacción de un copolímero de ciclodextrina lineal con un polímero en presencia de un agente de reticulación. Un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal, reticulado de la descripción se puede preparar mediante

la reacción de un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal con un polímero en presencia de un agente de reticulación apropiado. El agente de reticulación puede ser cualquier agente de reticulación conocido en el campo. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen dihidrazidas y disulfuros. En un caso preferido, el agente de reticulación es un grupo lábil de tal manera que un copolímero reticulado pueda ser desreticulado si se desea.

- 5 Un copolímero de ciclodextrina lineal y un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal de la descripción puede ser caracterizado por cualquier medio conocido en el campo. Estos métodos o técnicas de caracterización incluyen, pero no están limitados a, la cromatografía de permeación de gel (GPC), espectrometría de masas de ionización por desorción de rayos láser asistida por una matriz en tiempo de vuelo (espectrometría de masas MALDI-TOF), RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , dispersión de luz y titulación.
- 10 La descripción también proporciona una composición de ciclodextrina que contiene al menos un copolímero de ciclodextrina lineal y al menos un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal de la descripción como se describiera anteriormente. Por consiguiente, cualquiera o ambos del copolímero de ciclodextrina lineal y el copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal se pueden reticular a otro polímero y/o unir a un ligando como se describiera anteriormente. Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la descripción contienen un agente terapéutico y un copolímero de ciclodextrina lineal o un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal, que incluye copolímeros reticulados, de la descripción. Un copolímero de ciclodextrina lineal, un copolímero de ciclodextrina oxidado, lineal y sus derivados reticulados son como describiera anteriormente. El agente terapéutico puede ser cualquier agente terapéutico, biológicamente activo, de origen sintético o natural que incluye aquellos conocidos en el campo. Los ejemplos de agentes terapéuticos, adecuados incluyen, pero no están limitados a, antibióticos, esteroides, 20 polinucleótidos (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ARNm, ARN de doble cadena y oligonucleótidos antisentido), plásmidos, péptidos, fragmentos de péptidos, moléculas pequeñas (por ejemplo, doxorubicina) y otras macromoléculas biológicamente activas, tales como, por ejemplo, proteínas y enzimas.

*(g) Métodos de Negocio*

- 25 También se describen en esta memoria ciertos métodos para hacer negocio. En particular, la práctica de los métodos de la descripción puede hacer posible composiciones terapéuticas, novedosas y formulaciones mejoradas de las mismas. Este paso técnico, cuando se combina con uno o más pasos adicionales, proporciona nuevos planteamientos para conducir un negocio farmacéutico, o preferiblemente un negocio de ciencias biológicas. Por ejemplo, este agente terapéutico preparado por medio del método de la descripción se puede someter a prueba por su eficacia como agente terapéutico en una variedad de modelos de enfermedad, las composiciones terapéuticas, potenciales entonces se someten a prueba por su toxicidad y otro perfilado de seguridad antes de formular, empacar y subsecuentemente comercializar la formulación resultante para el tratamiento de una enfermedad. Alternativamente, los derechos para desarrollar y comercializar estas formulaciones o para conducir estos pasos pueden ser autorizados a una tercera parte por consideración. Por consiguiente, en ciertos casos, la presente descripción proporciona un método para conducir un negocio farmacéutico, que comprende:
- 35 a. preparar una formulación o equipo que incluya una composición farmacéutica de cualquiera de los compuestos de las fórmulas I a III; y
- b. comercializar a los profesionales del servicio sanitario los beneficios del uso de la formulación o equipo en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

En otros casos, la presente descripción incluye un método para conducir un negocio farmacéutico, que comprende:

- 40 a. proporcionar una red de distribución para vender una composición farmacéutica de cualquiera de los compuestos de las fórmulas I a III; y
- b. proporcionar material de instrucción a pacientes y médicos para el uso de la preparación en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

- 45 En ciertos casos, la presente descripción proporciona un método para conducir un negocio farmacéutico, que comprende:
  - a. determinar una formulación y dosificación apropiadas de una composición farmacéutica de cualquiera de los compuestos de las fórmulas I a III;
  - b. conducir un perfilado terapéutico de las formulaciones identificadas en el paso (a), por su eficacia y toxicidad en animales; y
  - c. proporcionar una red de distribución para vender una preparación o preparaciones identificadas en el paso (b) como que tienen un perfil terapéutico, aceptable.

Un paso adicional comprende proporcionar grupos de venta para comercializar la preparación a los profesionales del servicio sanitario.

En todavía otros casos, la presente descripción proporciona un-método para conducir un negocio farmacéutico,

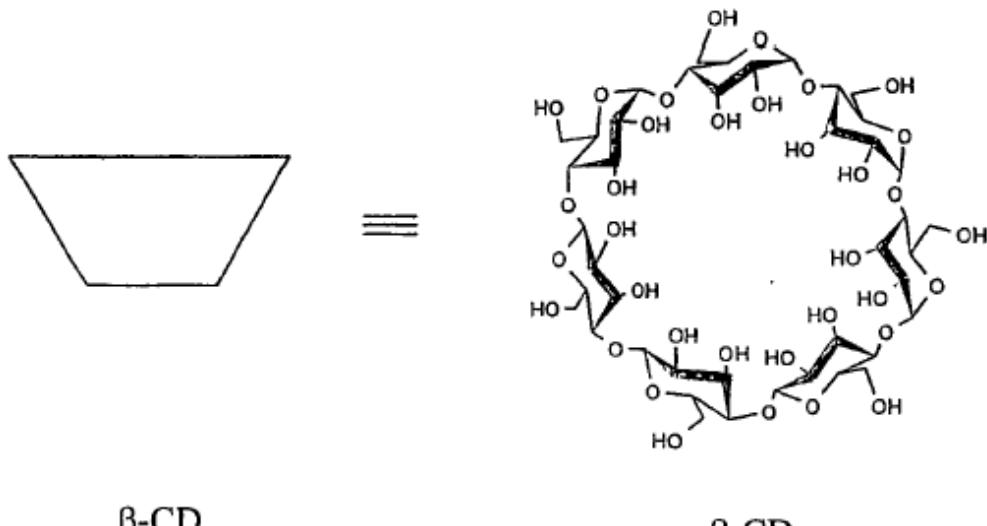
comprende:

a. determinar una formulación y dosificación apropiadas de una composición farmacéutica de cualquiera de los compuestos de las fórmulas I a III; y

b. autorizar, a una tercera parte, los derechos para el desarrollo adicional y venta de la formulación.

## 5 Ejemplificación

Materiales. La  $\beta$ -ciclodextrina, " $\beta$ -CD" (Cerestar USA, Inc. of Hammond, IN) se secó *in vacuo* ( $<0,1$  mTorr) a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas antes del uso.



10 Todos los disolventes anhidros, disolventes de grado de HPLC y otros disolventes orgánicos, comunes se adquirieron de proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional. El cloruro de bifenil-4,4'-disulfonilo (Aldrich Chemical Company, Inc. of Milwaukee, WI) se recristalizó de cloroformo/hexanos. El yoduro de potasio se pulverizó con un mortero y pistilo y se secó en un horno a  $200^{\circ}\text{C}$ . La dipropanoicsuccinimida de polietilenglicol (PEG-DiSPA, Peso Molecular 3400), la dibutanoicsuccinimida de polietilenglicol (PEG-DiSBA, Peso Molecular 3400) y el dibenzotrizolcarbonato de polietilenglicol (PEG-DiBTC, Peso Molecular 3400) se adquirieron de Nektar (Huntsville, AL). El di-p-nitrofenolcarbonato de polietilenglicol (PEG-DiNPC, Peso Molecular 3400) se adquirió de Sigma (St. Louis, MO). La CPT se adquirió de Boehringer Ingelheira (Ingelheim, Alemania). El plasma de humano se adquirió de Sigma y se reconstruyó con agua DI. El plasma de ratón se preparó mediante la remoción con centrifuga de células sanguíneas de muestras de sangre recientes colectadas de ratonas BALB/C (Charles River). La  $6^{\text{A}},6^{\text{D}}$ -diyodo- $6^{\text{A}},{6^{\text{D}}}$ -didesoxi- $\beta$ -ciclodextrina (CDDI, esquema 2) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento reportado previamente por Hwang y colaboradores, (Bioconjugate Chem. 12, 280-290).

15 El agua desionizada ( $18-\text{M}\Omega\text{-cm}$ ) se obtuvo al pasar agua desionizada, local a través de un sistema de purificación Barnstead E-pure. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AMX 500 MHz o un espectrómetro Varian 300 MHz. El análisis de espectros de masas (EM) se realizó utilizando ya sea un espectrómetro de masas de electropulverización equipado con una trampa de iones LCQ (Thermo Finnigan) y equipado con una fuente de ionización de electropulverización o un espectrómetro de masas MALDI-TOF (Voyager DE- PRO, Applied Biosystems). Los pesos moleculares de las muestras poliméricas se analizaron en un sistema GPC equipado con una bomba inteligente Hitachi L-6200, un detector Anspec RI (ERC-7512, Erma, Inc.), un detector Precisión Detectors DLS (PD 2020), y columnas de permeación de gel dobles (PL-Aquagel-OH-40 8  $\mu\text{m}$ , 300 mm x 7,5 mm, Polymer Laboratory) calibradas utilizando un estándar de polietilenglicol y eluidas utilizando PBS (1x) a una concentración de 20-50 mg/ml y a una velocidad de flujo de 0,7 ml/minuto a temperatura ambiente. Los derivados de CD se analizaron con una columna de fase inversa O-18 en un sistema de HPLC equipado con un detector de radiación UV (System Gold 168 Detector, Beckman Coulter) y un detector de dispersión de luz evaporativo (ELS) (Sedex 75, Sedere, Francia). La CPT, los derivados de CPT y los conjugados de polímero-CPT se analizaron en sistemas de HPLC con una columna de fase inversa C-18 (HIRPB-4438, 4,6 x 150 mm, Richard Scientific) equipada con un detector fluorescente (FD-500, GTI/Spectro Vision, Groton Technology, Inc.) utilizando un gradiente de amortiguador de fosfato de potasio (pH 4,1) y acetonitrilo. Las longitudes de onda de excitación y emisión del detector de fluorescencia se ajustaron a 370 nm y 440 nm, respectivamente..

20

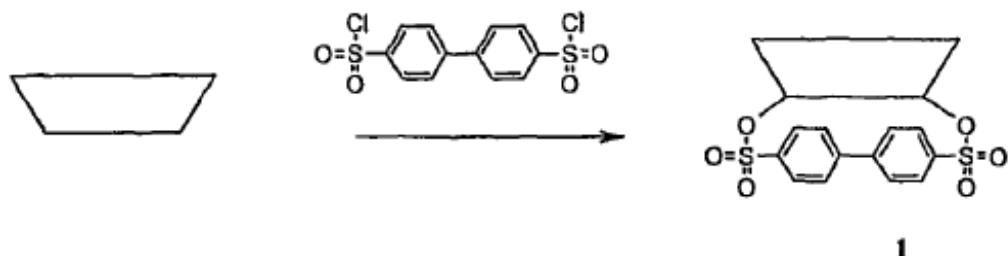
25

30

35

Ejemplo de referencia 1:  $\beta$ -Ciclodextrina cuyo extremo es Bifenil-4,4'-Disulfonil-A,D, 1 (Tabushi y colaboradores J. Am. Chem. Soc. 106, 5267-5270 (1984))

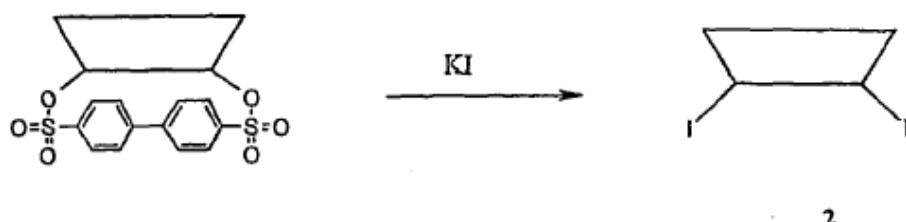
Esquema XV



Un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con una barra agitadora, magnética, un adaptador Schlenk y un septo se cargó con 7,92 g (6,98 mmol) de  $\beta$ -ciclodextrina seca y 250 ml de piridina anhidra (Aldrich Chemical Company, Inc.). La solución resultante se agitó a 50°C bajo nitrógeno mientras que se adicionaban 2,204 g (6,28 mmol) de cloruro de bifenil-4,4"-disulfonilo en cuatro porciones iguales en intervalos de 15 minutos. Después de la agitación a 50°C durante 3 horas adicionales, el disolvente se removió *in vacuo* y el residuo se sujetó a la cromatografía en columna de fase inversa utilizando una elusión de gradiente de acetonitrilo al 0-40% en agua. Las fracciones se analizaron mediante la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y las fracciones apropiadas se combinaron. Despues de la remoción del volumen de acetonitrilo en un evaporador giratorio, la suspensión acuosa, resultante se liofilizó a sequedad. Esto proporcionó 3,39 g (38%) del compuesto 1 como un sólido incoloro.

Ejemplo de referencia 2: 6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-Diyodo-6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-Didesoxi- $\beta$ -Ciclodextrina, 2 (Tabushi y colaboradores *J. Am. Chem.* **106**, 4580-4584 (1984))

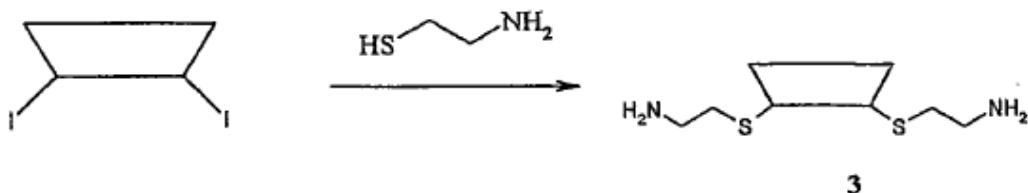
Esquema XVI



Un tubo de centrífuga de 40 ml equipado con una barra agitadora, magnética, un adaptador Schlenk y un septo se cargó con 1,02 g (7,2 mmol) del compuesto 1, 3,54-g (21,3 mmol) de yoduro de potasio en polvo, seco (Aldrich) y 15 ml de N,N-dimetilformamida anhidra (DMF) (Aldrich). La suspensión resultante se agitó a 80°C bajo nitrógeno durante 2 horas. Despues del enfriamiento a temperatura ambiente, los sólidos se separaron mediante la filtración y el sobrenadante se colectó. El precipitado sólido se lavó con una segunda porción de DMF anhidro y los sobrenadantes se combinaron y se concentraron *in vacuo*. El residuo luego se disolvió en 14 ml de agua y se enfrió en un baño de hielo antes de que se adicionaran 0,75 ml (7,3 mmol) de tetracloroetileno (Aldrich) con agitación rápida. El producto precipitado se filtró en una frita de vidrio intermedia y se lavó con una pequeña porción de acetona antes de que se secase bajo vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> durante 14 horas. Esto proporcionó 0,90 g (92%) del compuesto 2 como un sólido de color blanco.

Ejemplo de referencia 3: 6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-Bis-(2-Aminoetiltiolo)-6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-Didesoxi- $\beta$ -Ciclodextrina, 3 (Tabushi, I; Shimokawa, K; Fugita, K. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 1527-1530)

Esquema XVII



Un matraz Schlenk de 25 ml equipado con una barra agitadora, magnética y un septo se cargó con 0,91 ml (7,37 mtnol) de una solución de 2-aminoetiltioloato de sodio 0,81 M en etanol. (Fieser, L.F.; Fieser, M. *Reagents for Organic Synthesis*; Wiley: Nueva York, 1967; Volumen 3, páginas 265-266). La solución se evaporó a sequedad y el sólido se disolvió nuevamente en 5 ml de DMF anhidro (Aldrich). Se adicionó 6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-diyodo-6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-didesoxi- $\beta$ -ciclodextrina (2)

(100 mg,  $7,38 \times 10^{-5}$  mol) y la suspensión resultante se agitó a 60°C bajo nitrógeno durante 2 horas. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, la solución se concentró *in vacuo* y el residuo se disolvió nuevamente en agua. Despues de la acidificación con HCl 0,1 N, la solución se aplicó a una columna de intercambio iónico Toyopearl SP-650M (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y el producto se eluyó con un gradiente de bicarbonato de amonio 0 a 0,4 M. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron a sequedad. Esto proporcionó 80 mg (79%) del compuesto 3 como un polvo de-color blanco.

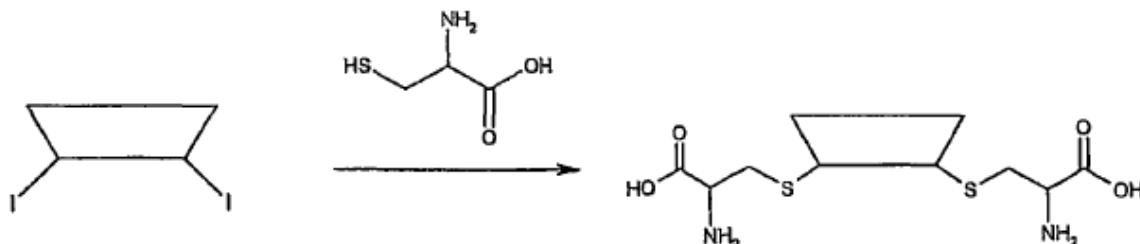
#### Síntesis Alternativa de dicisteamina β-CD 3

A una solución de 4,69 g (3,17 mmol) del compuesto 2 en 100 ml de agua desgasificada se adicionaron 0,489 g (6,34 mmol) de cisteamina recientemente sublimada. La solución se agitó bajo reflujo durante 2 horas. Despues del enfriamiento a temperatura ambiente y la acidificación con HCl 1N, la solución se aplicó a una columna de Intercambio iónico Toyopearl SP-650M (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y el producto se eluyó con un gradiente de bicarbonato de amonio 0 a 0,2 M. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron a sequedad. Este procedimiento proporcionó 1,87 g (rendimiento del 39%) de un sólido de color blanco. El sólido se caracterizó mediante la CCD (gel de sílice, n-PrOH-AcOEt-H<sub>2</sub>O-NH<sub>3</sub> ac 5/3/3/1, detección por ninhidrina) y exhibió una mancha principal que correspondía al compuesto 3. El espectro de masas con ionización por deserción de rayo láser asistida por una matriz (MALDI) en tiempo de vuelo (TOF) se registró en un instrumento ÉLITE de 2 metros suministrado por PerSeptive Biosystems, Inc. MALDI-TOF m/z calculado para el compuesto 3: 1252, encontrado: 1253,5 [M+H]<sup>+</sup>, 1275,5 [M+Na]<sup>+</sup>, 1291,4 [M+K]<sup>+</sup>.

RMN <sup>13</sup>C (Bruker 500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ ppm: 32,1 (S-CH<sub>2</sub>) y 38,8 (CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 32,9 (C6 adyacente a S), 60,2 (C6 adyacente a OH), 70,8, 71,4, 72,5 (C2, C3, C5), 81,8 (C4), 101,7 (C1).

Ejemplo 4: 6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-Bis-(2-Amino-2-Carboxiletiltio)-6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-Didesoxi-β-Ciclodextrina, 4 (CD-BisCys)

#### Esquema XVIII

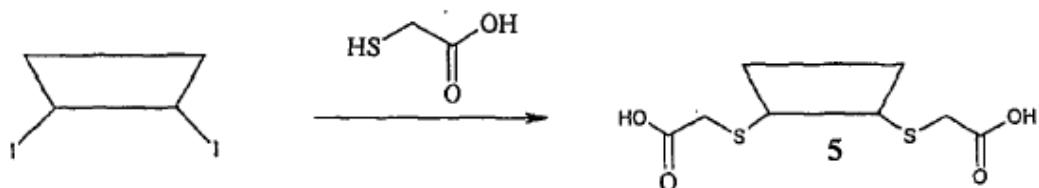


4

167 ml de amortiguador de carbonato de sodio 0,1 M se desgasificaron durante 45 minutos en un matraz de fondo redondo de 2 cuellos de 500 ml equipado con una barra agitadora, magnética, un condensador y un septo. A esta solución se adicionaron 1,96 g (16,2 mmol) de L-cisteina y 10,0 g (73,8 mmol) de diyodo, desoxi-β-ciclodextrina 2. La suspensión resultante se calentó a una temperatura de reflujo durante 4,5 horas hasta que la solución se volvió HPLCa (incolora). La solución luego se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó a pH 3 utilizando HCl 1N. El producto se precipitó mediante la adición lenta de acetona (3 veces la relación en peso de la solución). Esto proporcionó 9,0 g de material crudo que contenía CD-biscisteína (90,0%), ciclodextrina sin reaccionar, CD-monocisteína y cistina. El sólido resultante se sujetó a una cromatografía en columna de intercambio iónico (SuperQ650M, Tosoh Bioscience) utilizando una elusión de gradiente de bicarbonato de amonio 0-0,4M. Todas las fracciones se analizaron mediante la CIAR. Las fracciones deseadas se combinaron y el disolvente se redujo a 100 ml bajo vacío. El producto final se precipitó ya sea mediante la adición de acetona o mediante la adición de metanol (3 veces la relación en peso de la solución). El compuesto 4 se obtuvo en un rendimiento del 60-90%. RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 5,08 (m, 7H, CD-2-CH), 3,79-3,94 (m, 30H, CD-3,4-CH, CD-CH<sub>2</sub>, Cys-CH), 3,49-3,62 (m, 14H, CD-5, 6-CH), 2,92-3,30 (m, 4H, Cys-CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) δ 172,3, 101,9, 83,9, 81,6, 81,5, 73,3, 72,2, 72,0, 60,7, 54,0, 34,0, 30,6. ESI/EM (m/z): 1342 [M]<sup>+</sup>, 1364 [M + Na]<sup>+</sup>. La pureza del compuesto 4 se confirmó mediante la HPLC.

Ejemplo de referencia 5: 6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-Bis-(Carboxilmetiltio)-6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-Didesoxi-β-Ciclodextrina, 5 (CDDM)

#### 40 Esquema XIX

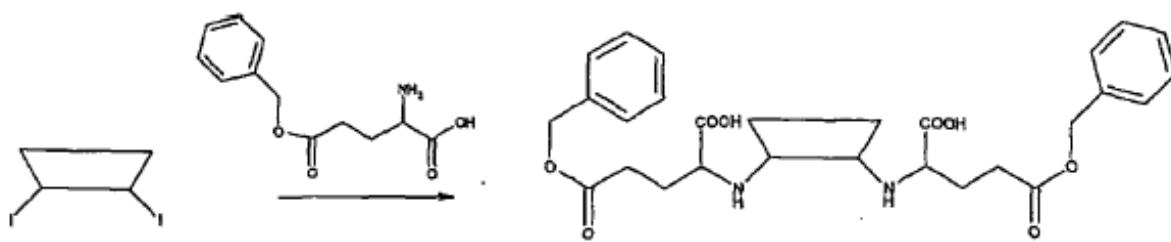


50 ml de una solución de carbonato de sodio 0,1 M se desgasificaron durante 2 horas en un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 100 ml, equipado con una barra agitadora, magnética, un condensador y un septo. El ácido mercaptoacético (0,46 ml, 6,64 mmol) se introdujo con una jeringa en el matraz y el pH de la solución se ajustó a 9,3

5 con hidróxido de sodio 1N. A esta solución resultante se adicionaron 3,00 g (2,21 mmol) de diyodo- $\beta$ -ciclodextrina 2 y se calentó a 80°C durante una hora. La temperatura de la solución se incrementó 10°C cada hora hasta que llegó a 100°C. Despues de 3 horas a la temperatura de refluxo, la solución incolora, HPLCa se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó a pH 3,5 utilizando HCl 1N. El producto crudo se trituró por la adición lenta de acetona (3 veces la relación en peso de la solución). El sólido resultante se sujetó a la cromatografía en columna de intercambio 10 aniónico utilizando una elusión de gradiente de una solución de bicarbonato de amonio 0-0,4 M. Esto proporcionó 1,8 g (63,4%) del compuesto 5 como un sólido incoloro. ESI/EM (*m/z*): 1281 [M]<sup>+</sup>. La pureza de este compuesto se confirmó mediante la HPLC.

Ejemplo de referencia 6: CD-Bis (Ácido glutámico- $\gamma$ -Ester bencílico) 6

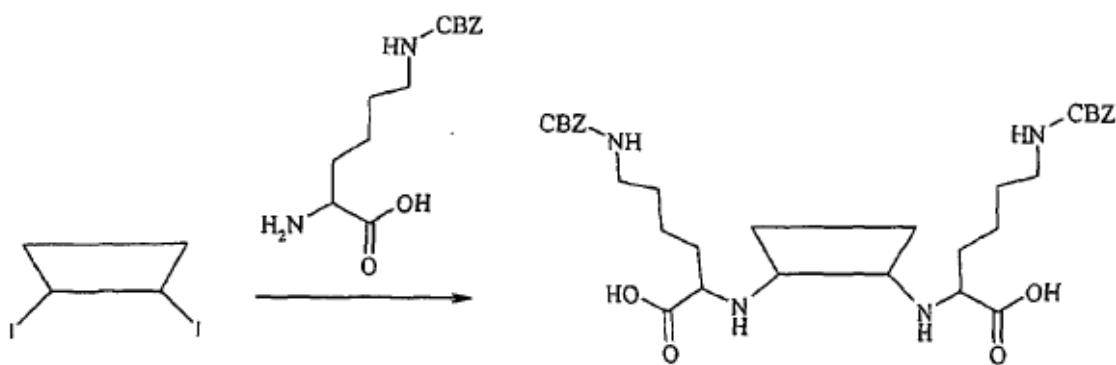
Esquema XX



15 Un matraz de fondo redondo de 50 ml equipado con una barra agitadora, magnética y un condensador y un septo se cargó con 0,101 g (0,425 mmol) de H-Glu(Obzl)-OH y 0,15 g (0,106 mmol) de la dio-yodo- $\beta$ -ciclodextrina 2 en 5 ml de una solución de carbonato de sodio, desgasificada 0,1 M. La mezcla de la solución se calentó a 100°C durante 2 horas. La solución luego se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó a pH 4 antes de la diálsis en membranas 20 500 MWCO durante 24 horas. El rendimiento del compuesto 6 fue 0,142 g (83,6%).

Ejemplo de referencia 7: CD-BisLys(Z) 7

Esquema XXI



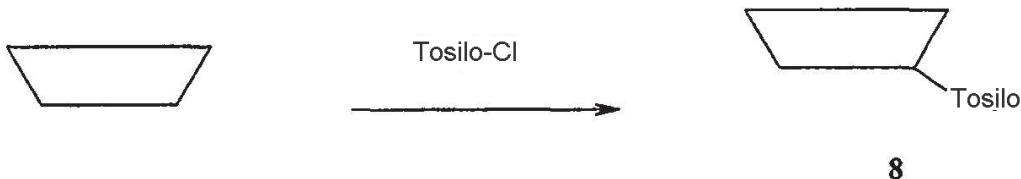
7

25 Un matraz de fondo redondo de 50 ifiL equipado con una barra agitadora, magnética y un condensador y un septo se cargó con 0,124 g (0,443 mmol) de H-Lisina(Z)-OH y 0,15 g (0,111 mmol) de di-yodo- $\beta$ -ciclodextrina 2 en 5 ml de una solución de carbonato de sodio, desgasificado 0,1M. La mezcla de la solución se calentó a 100°C durante 4

horas. La solución luego se filtró y el pH del producto filtrado se ajustó a 8,5 antes de la diálisis en membranas 500 MWCO durante 24 horas. El rendimiento del compuesto **7** fue 0,124 g (68,9%).

Ejemplo de referencia 8: Síntesis de  $\beta$ -Ciclodextrin-Tosilato, **8** (Melton, L.D., y Slessor, K.N., *Carbohydrate Research*, 18, página 29 (1971))

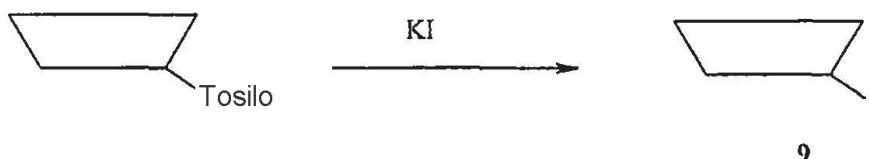
5 Esquema XXII



Un matraz de fondo redondo de 500 mL equipado con una barra agitadora, magnética, un adaptador al vacío y un septo se cargó con una solución de  $\beta$ -ciclodextrina seca (8,530 g, 7,51 mmol) y 200 mL de piridina seca. La solución se enfrió a 0°C antes de que se adicionaran 1,29 g (6,76 mmol) de cloruro de tosilo. La solución resultante se dejó calentar a temperatura ambiente durante toda la noche. La piridina se removió tanto como fue posible *in vacuo*. El residuo resultante luego se recristalizó dos veces de 40 mL de agua caliente para producir 7,54 (88%) de un sólido cristalino de color blanco **8**.

Ejemplo de referencia 9: Síntesis de Yodo- $\beta$ -Ciclodextrina, **9**

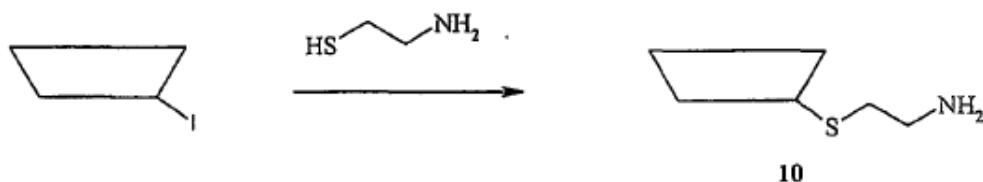
Esquema XXIII



15 Un matraz de fondo redondo con una barra agitadora, magnética y un adaptador Schlenk se cargó con el compuesto **8**, 15 equivalentes de yoduro de potasio y DMF. La mezcla resultante se calentó a 80°C durante 3 horas, después de lo cual la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla luego se filtró para remover el producto precipitado y el producto filtrado se evaporó a sequedad y se disolvió nuevamente en agua a 0°C. Se adicionó tetracloroetileno y la suspensión espesa, resultante se agitó vigorosamente a 0°C durante 20 minutos. El sólido **9** se colectó en una frita de vidrio intermedia, se trituró con acetona y se almacenó sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Ejemplo de referencia 10: Síntesis de Cisteamina- $\beta$ -Ciclodextrina, **10**

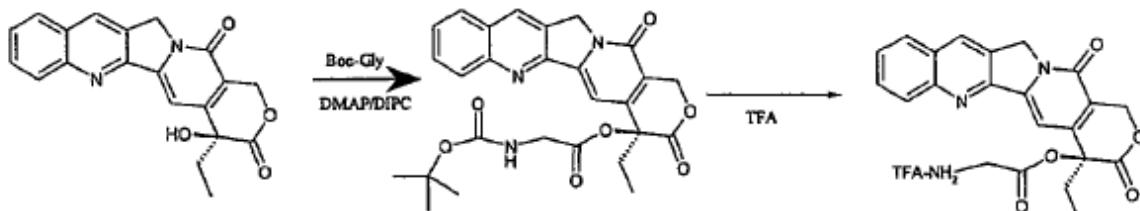
Esquema XXIV



25 A una solución del compuesto **9** en 100 mL de agua desgasificada se adicionó 1 eq. de cisteamina recientemente sublimada. La solución se agitó bajo reflujo durante 2 horas. Despues de ser enfriada a temperatura ambiente y acidificada con HCl 1N, la solución se aplicó a una columna de intercambio iónico Toyopearl SP-650M (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y el producto se eluyó con un gradiente de bicarbonato de amonio. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron a sequedad para producir el compuesto **10**.

30 Ejemplo 11: Síntesis de Gly-CPT **11** (Greenwald y colaboradores, *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 551-562)

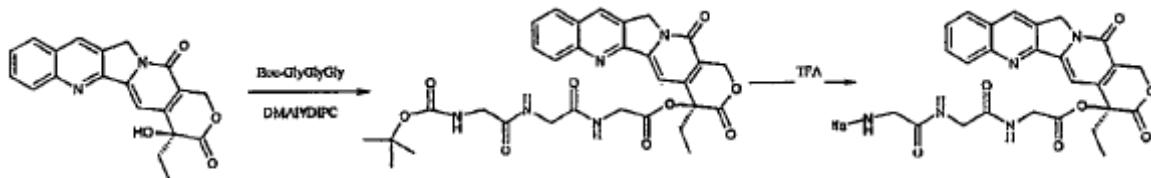
Esquema XXV



La t-Boc-glicina (0,9 g, 4,7 mmol) se disolvió en 350 ml de cloruro de metileno anhidro a temperatura ambiente y a esta solución se adicionaron DIPC (0,75 ml, 4,7 mmol), DMAP (382 mg, 3,13 mmol) y camptotecina (0,55 g, 1,57 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se dejó durante 16 horas. La 5 solución se lavó con HCl 0,1 N, se secó y se evaporó bajo presión reducida para producir un sólido de color blanco, el cual se recristalizó de metanol para proporcionar el camptotecin-20-éster de t-Boc-glicina: RMN <sup>2</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) 7,5-8,8 (m), 7,3 (s), 5,5 (s), 5,3 (s), 4 (m), 2,1 (m), 1,6 (s), 1,3 (d), 0,9 (t). El camptotecin-20-éster de t-Boc-glicina (0,595 g, 1,06 mmol) se disolvió en una mezcla de cloruro de metileno (1,5 ml) y TITA (7,5 ml) y se agitó a 10 temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se removió y el residuo se recristalizó de cloruro de metileno y éter para proporcionar 0,45 g del compuesto 11. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,7-8,5 (m); 7,2 (s), 5,6 (s), 5,4 (s), 4,4 (m), 2,2 (m), 1,6 (d), 1,0 (t), RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 168,6, 166,6, 156,5, 152,2, 147,9, 146,2, 144,3, 131,9, 130,6, 129,7, 128,8, 128,6, 128,0, 127,8, 119,0, 95,0, 77,6, 66,6, 50,5, 47,9, 30,2, 15,9, 7,9, ESI/EM (m/z) esperado 405; encontrado 406 (M+H).

#### Ejemplo de referencia 12: Síntesis de GlyGlyGly-CPT 12

#### 15 Esquema XXVI



El t-Boc-GlyGlyGly (1,359 g, 4,7 mmol) se disolvió en 350 ml de cloruro de metileno anhidro a temperatura ambiente y a esta solución se adicionaron DIPC (0,75 ml, 4,7 mmol), DMAP (382 mg, 3,13 mmol) y camptotecina-(0,55 g, 1,57 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se dejó durante 16 horas. La 20 solución se lavó con HCl 0,1 N, se secó y se evaporó bajo presión reducida para producir un sólido de color blanco, el cual se recristalizó de metanol para proporcionar el camptotecin-20-éster de t-Boc-GlyGlyGly: RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,40 (s) , 8,25 (d), 7,91 (d), 7,78 (m), 7,65 (t), 7,26 (s), 7,05 (amplio, s), 5,65 (d), 5,40 (d), 5,25 (s), 5,10 (amplio, s), 3,75-4,42 (m), 2,15-2,35 (m), 1,45 (s), 0,95 (t). El camptotecin-20-éster de t-Boc-GlyGlyGly (1,5 g, 1,06 mmol) se disolvió en una mezcla de cloruro de metileno (10 ml) y TFA (10 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 25 hora. El disolvente se removió bajo vacío y el residuo se disolvió nuevamente en cloruro de metileno. La solución se vertió en éter para proporcionar el presente producto precipitado (amarillo). El producto precipitado se filtró y se lavó con éter frio para proporcionar 1,31 g del compuesto 12. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,79 (s), 7,75-8,61 (m), 7,10 (s), 5,55 (s), 3,90-4,37 (m), 3,86 (s), 3,54 (s), 2,11-2,23 (m), 0,95 (t). ESI/EM (m/z) esperado 519; encontrado 520 (M+H).

#### Estabilidad del enlace de éster de CPT-péptido

30 Los compuestos 11 y 12 se disolvieron en un amortiguador de PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente para preparar una solución de aproximadamente 500, µg/ml. Esta solución se diluyó adicionalmente en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 8,5% a 10 µg/ml. La velocidad de la hidrólisis se analizó utilizando la HPLC equipada con una columna C<sub>18</sub> de RP (fase inversa) y un detector fluorescente utilizando 50/50 (v/v) de amortiguador de acetonitrilo/fosfato de potasio (pH 4,1). Se integraron los picos del compuesto 11 (o 12) y la CPT liberada (forma de lactona). La estabilidad de la unión de éster en una 35 solución acuosa es dependiente de la longitud del péptido. De esta manera, la velocidad de liberación del fármaco (velocidad de hidrólisis) se puede regular al ajustar la longitud del péptido. Véase figura 2.

#### Estabilidad de Lactona de CPT, 11 y 12 en Solución Salina Amortiguada con Fosfato (PBS)

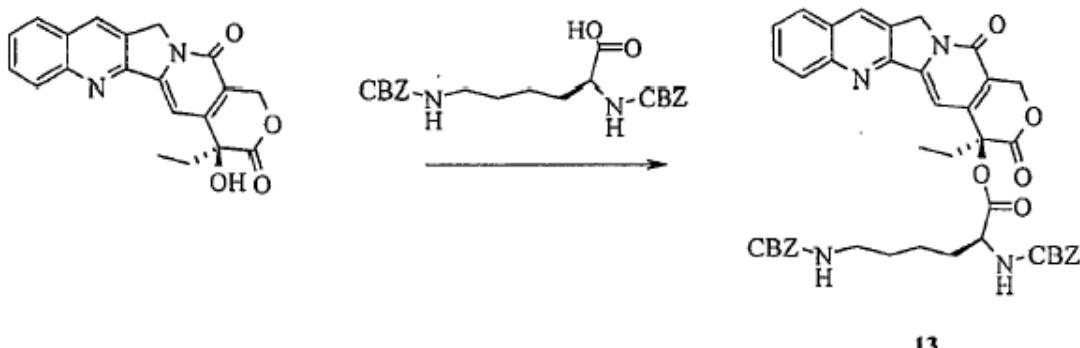
La CPT, el compuesto 11 o el compuesto 12 se disolvieron en DMSO a 1 mg/ml y luego se diluyeron a 1 µg/ml con PBS (1x, pH 7,4). 30 µL de la solución se inyectaron en la HPLC a temperatura ambiente en intervalos de tiempo seleccionados. El área pico de la forma de lactona de CPT, compuesto 11 o compuesto 12 se integraron.

La velocidad de la apertura de anillos de lactona para el compuesto **11**, el compuesto **12** y la CPT se estudiaron en un amortiguador de PBS (pH 7,4). Tanto el compuesto **11** como el compuesto **12** fueron muy estables contra la apertura de anillos y no se detectaron formas de carboxilato del compuesto **11** y el compuesto **12** por todo el estudio (7 horas). Por otra parte, más de 60% de la forma de lactona de CPT se transformó a su forma de carboxilato en el mismo periodo de tiempo. (Véase figura 3).

5

Ejemplo de referencia 13: Síntesis de Lys(BisCBZ)-CPT **13**

Esquema XXVII



- 10 La *N,N*-bisCBZ-Lisina (311 mg, 0,75 mmol) se disolvió en 56 ml de cloruro de metileno anhídromo a temperatura ambiente. A esta solución se adicionaron DIPC (0,12 ml, 0,75 mmol), DMAP (0,61 mg, 0,5 mmol) y camptotecina (0,087 g, 0,25 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se dejó durante 16 horas. La solución se lavó con HCl 0,1 N, se secó y se evaporó bajo presión reducida para producir un sólido de color amarillo HPLC, el cual se recristalizó de metanol para proporcionar el camptotecin-20-éster de *N,N*-bisCBZ-Lys **13**. La purificación del compuesto **13** fue satisfactoria en base al análisis de la CCD y la HPLC.
- 15 La hidrólisis del compuesto **13** en una solución acuosa es muy lenta y no se puede detectar utilizando la HPLC equipada con un detector de radiación DV. La velocidad de la hidrólisis de la unión de éster del conector de CPT-péptido se puede regular no únicamente al ajustar la longitud del péptido, como se muestra en el **ejemplo 12**, sino también al utilizar un diferente aminoácido enlazado directamente con las CPT's 20-OH.

- 20 La transformación de la forma de lactona a la forma de carboxilato de CPT y el compuesto **13** también se sometió a prueba en un amortiguador de PBS. Se encontró que la transformación de la forma de lactona a la forma de carboxilato del compuesto **13** fue mucho más lenta que aquella de la CPT suelta, indicando que la forma de lactona (forma activa del fármaco) se puede estabilizar al formar un éster con el -OH de CPT en su posición 20. (Véase la figura 4).

Ejemplo de referencia 14: Síntesis de Lys-Gly-CPT **14**

- 25 El compuesto **11** se disolvió en dicloroformo. Se adicionó *N,N*-DiBoc-Lys-NHS (1,0 eq.) seguido por trietilamina (1,0 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se extrajo dos veces con agua y luego se secó con MgSO<sub>4</sub>. El disolvente se removió bajo vacío para producir la *N,N*-diBoc-Lys-Gly-CPT. A este compuesto se adicionó una mezcla de igual volumen de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y TFA y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente luego se removió bajo vacío. El residuo se disolvió nuevamente en CHCl<sub>3</sub>. El éter se adicionó a la solución para moler el producto 14. El producto precipitado se lavó varias veces con éter y luego se secó bajo vacío. Se purificó utilizando una cromatografía en columna de gel de sílice para proporcionar el compuesto 14 en forma de sal de TFA pura.

Ejemplo de referencia 15: Síntesis de Suc-Gly-CPT **15**

- 35 Una solución de anhídrido succínico se mezcló con el compuesto **11** (1 eq.) en CHCl<sub>3</sub> seco en presencia de una cantidad catalítica de DMAP y DIEA (1 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas para producir el compuesto **15**. El compuesto **15** se purificó mediante la cristalización.

Ejemplo de referencia 16: Síntesis de Glu-Suc-Gly-CPT **16**

- 40 El compuesto **15** se convirtió a su éster de NHS utilizando el método de DCC/NHS tradicional. El éster de NHS del compuesto **15** luego se hizo reaccionar con ácido glutámico (1,0 eq.) en DMSO en presencia de trietilamina. La solución se adicionó a éter para precipitar el compuesto **16**. El compuesto **16** se purificó mediante la cristalización.

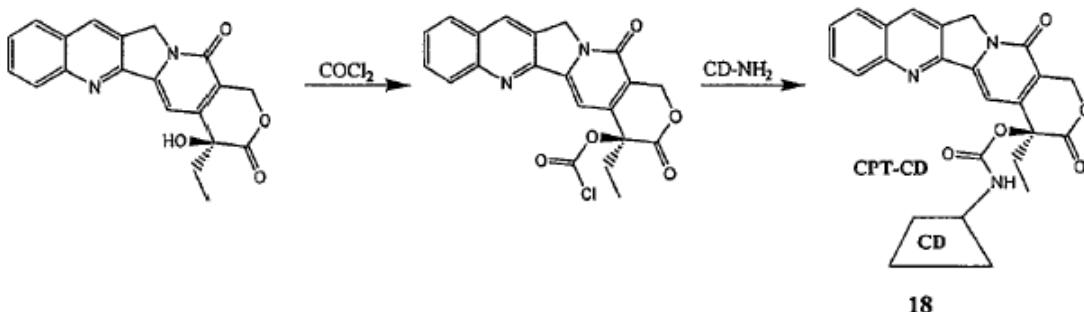
Ejemplo de referencia 17: Síntesis de Glu-Bis(GlyCPT) **17**

El compuesto **11** y Bac-Glu (NHS) -NHS (0,4 eq.) se mezclaron en CHCl<sub>3</sub> bajo argón antes de que se adicionara trietilamina (1 eq.) a la mezcla. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y luego se lavó con agua acida. La capa orgánica se secó y luego el disolvente se removió bajo vacío. El compuesto resultante se purificó utilizando una cromatografía en columna de gel de sílice. El compuesto purificado luego se disolvió en una mezcla-de igual volumen de TFA y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se vertió en éter. El producto precipitado **17** se lavó con éter y se secó bajo vacío.

5

Ejemplo de referencia 18: Síntesis de Ciclodextrin-Camtotecina **18**

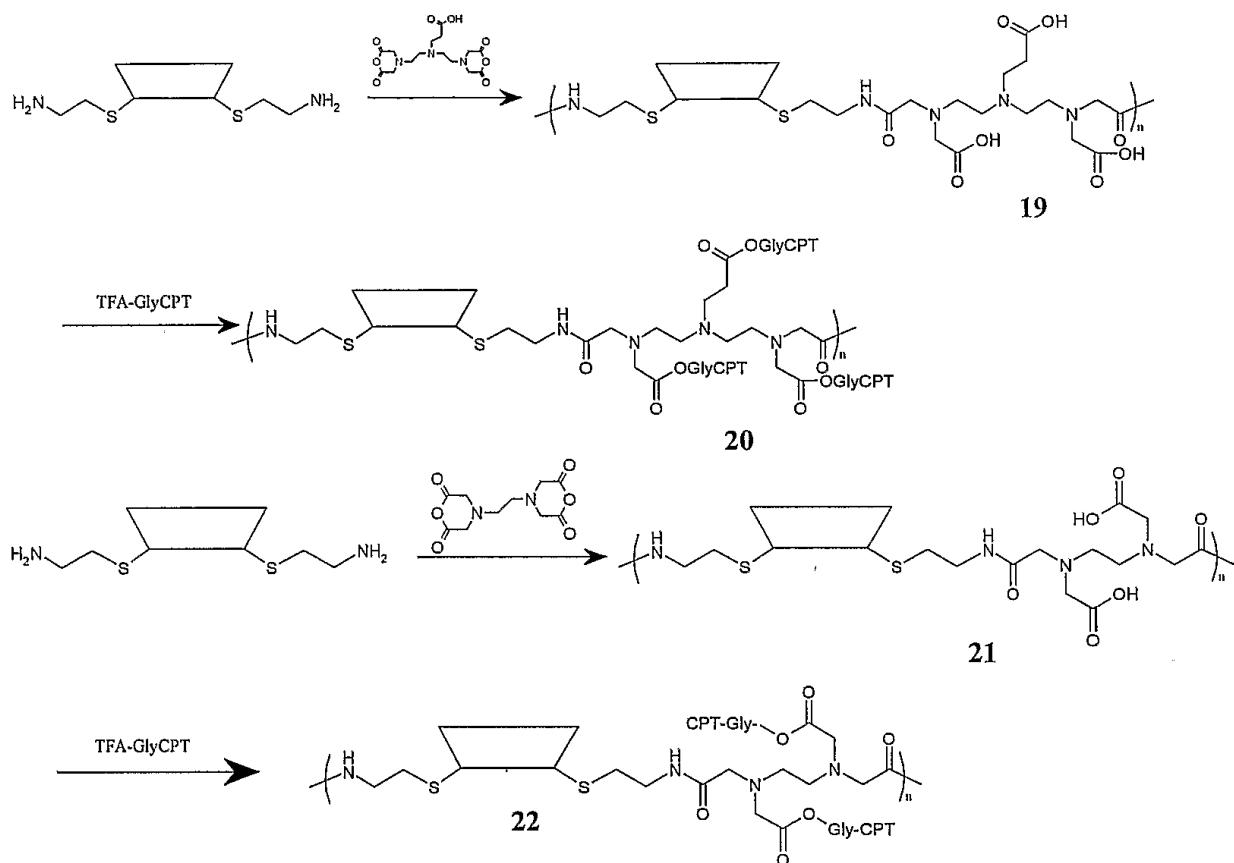
Esquema XXVIII



- 10 La CPT (197 mg, 0,566 mmol) se colocó en un vacío durante 30 minutos. Se adicionó cloroformo seco (100 ml) bajo argón. Se adicionó fosgeno (1,34 ml, 20% en solución de tolueno) a 0°C. El baño de hielo se removió y la solución se calentó a temperatura ambiente. Dos horas después,, el disolvente se removió bajo alto vacío. Se adicionó DMSO seco (50 ml) al residuo, seguido por 200 mg de CD-NH<sub>2</sub> (Cyclodextrin Technology, Inc.) y trietilamina (4 ml, exceso). 16 horas después; la solución se vertió en 200 ml de éter. El producto precipitado se lavó extensivamente con éter y luego se secó. Se obtuvieron 167 mg de polvo de color amarillo (**18**) (rendimiento del 62%). Análisis en CCD (gel de silice) del compuesto **18**: R<sub>f</sub> = 0 (desarrollado con CHCl<sub>3</sub>/MeOH v/v = 5/1). Análisis en CCD de la CPT: R<sub>f</sub> = 0,65 (desarrollado con CHCl<sub>3</sub>/MeOH v/v = 5/1). Solubilidad: >10 mg/ml en agua. Esto indica que la solubilidad de CPT en agua se puede incrementar sustancialmente cuando se une covalentemente a la molécula de ciclodextrina (solubilidad de CPT suelta en agua <0,004 mg/ml).
- 15
- 16 horas después; la solución se vertió en 200 ml de éter. El producto precipitado se lavó extensivamente con éter y luego se secó. Se obtuvieron 167 mg de polvo de color amarillo (**18**) (rendimiento del 62%). Análisis en CCD (gel de silice) del compuesto **18**: R<sub>f</sub> = 0 (desarrollado con CHCl<sub>3</sub>/MeOH v/v = 5/1). Análisis en CCD de la CPT: R<sub>f</sub> = 0,65 (desarrollado con CHCl<sub>3</sub>/MeOH v/v = 5/1). Solubilidad: >10 mg/ml en agua. Esto indica que la solubilidad de CPT en agua se puede incrementar sustancialmente cuando se une covalentemente a la molécula de ciclodextrina (solubilidad de CPT suelta en agua <0,004 mg/ml).

- 20 Ejemplo de referencia 19: Síntesis del Copolímero de CDDC-Dianhidrido **19**, **21** y su conjugado de CPT **20**, **22**

Esquema XXIX



A: El dianhídrido tetraacético de etilendiamina (25,6 mg, 0,1 mmol) y el CDDC (**3**, 125,3 mg, 0,1 mmol) se disolvieron en 2 ml de DMSO seco. La solución se calentó a 50°C durante 72 horas. Se adicionó agua a la mezcla, seguida por la adición de NaOH 1 N a pH alrededor de 12. El polímero se dializó en una membrana 10,000 MWCO durante 24 horas. La precipitación se observó en la membrana de diálisis. El sólido se removió y la solución restante se dializó nuevamente en una membrana 10.000 MWCO durante 24 horas. Se obtuvo un polvo de color blanco **19** (75 mg) después de la liofilización.

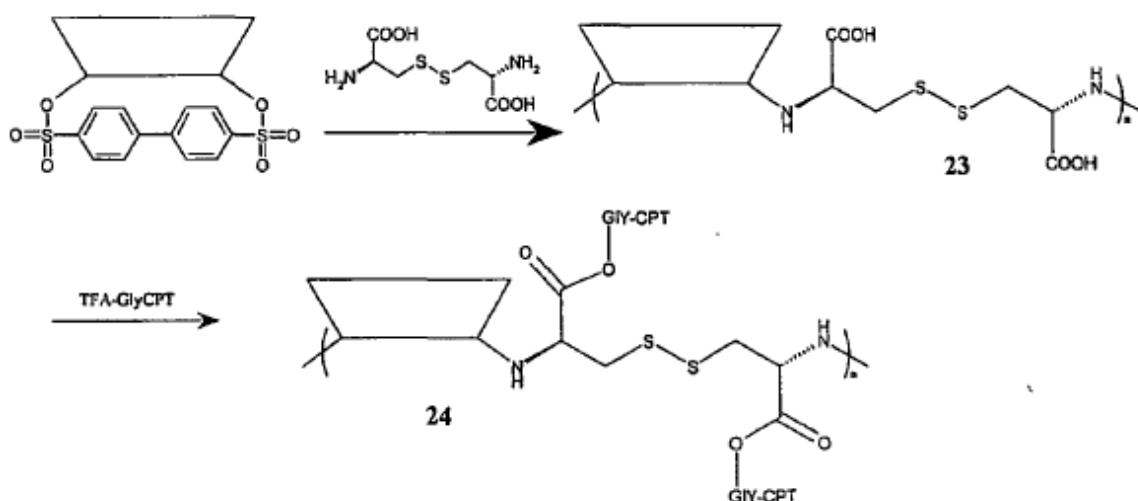
5 B: El dianhídrido pentaacético de dietilentriamina (8,5 mg, 0,024 mmol) y el CDDC, **3** (30 mg, 0,024 mmol) se disolvieron en 1-metil-2-piridinona (2 ml). La mezcla se agitó a 64°C durante 4 días y luego se dializó en una membrana 10.000 MWCO durante 2 días. Se obtuvo un polvo de color blanco **21** (3 mg) después de la liofilización.

10 El compuesto **11** se adicionó a la solución de polímero (**19**)/DMSO en presencia de EDC (2 eq.), NHS (1 eq.) y DIEA (1,0 eq.). La solución se agitó durante 16 horas y luego se vertió en éter. El producto precipitado se lavó extensivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta que no se observó fármaco suelto en la solución de lavado. El compuesto **20** se obtuvo después del secado bajo alto vacío.

15 El compuesto **11** se adicionó a la solución de polímero (**21**)/DMSO en presencia de EDC (2 eq.), NHS (1 eq.) y DIEA (1,0 eq.). La solución se agitó durante 16 horas y luego se precipitó en éter. El producto precipitado se lavó extensivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta que no se observó fármaco suelto en la solución de lavado. El compuesto **22** se obtuvo después del secado bajo alto vacío.

20 Ejemplo de referencia 20: Síntesis del Copolímero de CCD-Cys **23** y su conjugado de CPT **24**

Esquema XXX



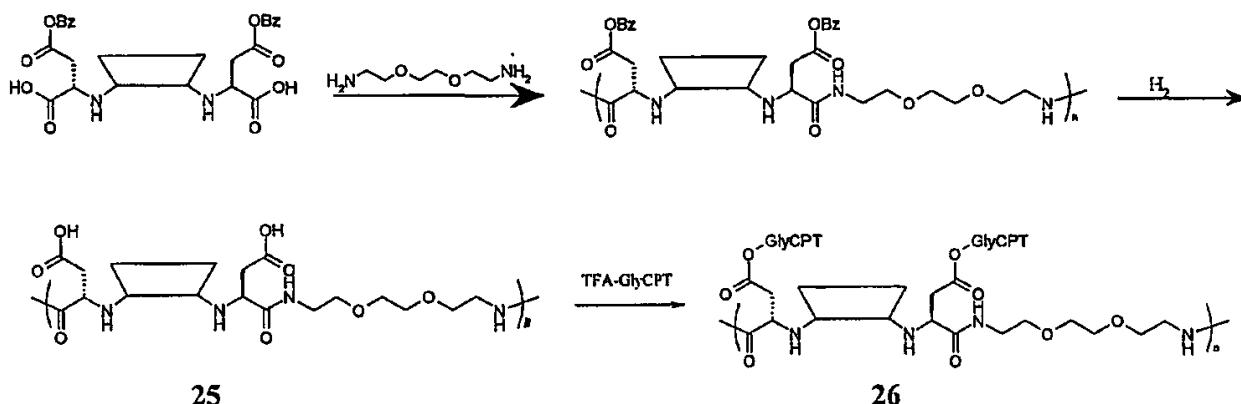
El CCD 1 (141,3 mg, 0,1 mmol) y cistina (24 mg, 0,1 mmol) se disolvieron en DMSO seco (0,3 ml) y piridina (0,1 ml). La mezcla se agitó bajo argón durante toda la noche a 72°C. Se adicionó agua (10 ml). El producto precipitado se filtró y el producto filtrado se dializó en una membrana 10.000 MWCO (Spectra/Por 7) durante 48 horas. Se obtuvo un polvo de color blanco **23** (8 mg).

5

El compuesto **11** se mezcló con el compuesto **23** en DMSO. El EDC (2 eq.), NHS (1. eg.) y DIEA (1,0 eq.) se adicionaron a la solución. La solución se agitó durante 16 horas y luego se precipitó con éter. El producto precipitado se lavó extensivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta que no se observó fármaco suelto en la solución de lavado. El compuesto **24** se obtuvo después del secado bajo alto vacío.

10 Ejemplo de referencia 21: Síntesis del Copolímero de CD-BisGlu-Diamina **25** y su conjugado de CPT **26**

Esquema XXXI



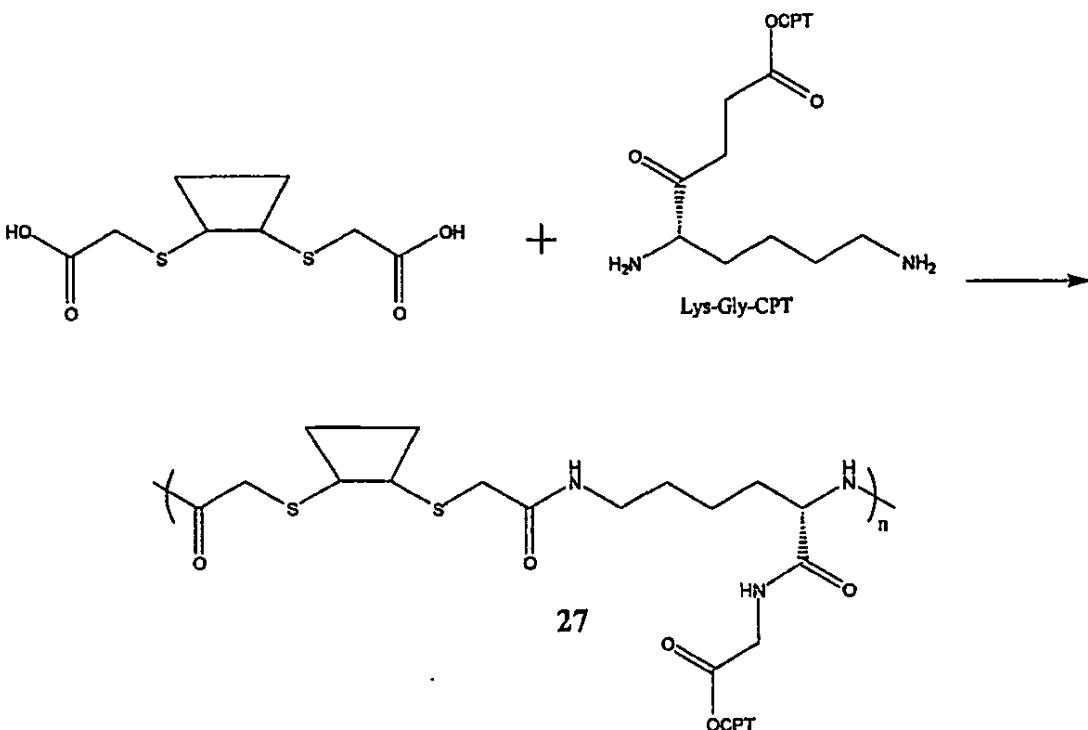
El CD-bis (ácido glutámico-γ-éster bencílico) **6** y etilenglicolbisetilamina se disolvieron en DMSO seco. El EDC (3 eq.) y sulfo-NHS (2 eq. ) se adicionaron a la mezcla. La solución se agitó bajo argón durante 2 días a temperatura ambiente. La solución luego se transfirió a una membrana de diálsis 10.000 MWCO y se dializó durante 48 horas. Después de la liofilización, se obtuvo un polvo de color blanco. El sólido luego se disolvió en DMSO y una mezcla de disolvente de netanol y se trató con H<sub>2</sub> en presencia del catalizador de Pd al 10%/C durante 24 horas. La solución se vertió en éter para moler el producto. El compuesto **25** se obtuvo después del secado bajo vacío.

15

El compuesto **11** se mezcló con el compuesto **25** en una solución de DMSO. El EDC (2 eq.), NHS (1 eq.) y DIEA (1,0 eq. ) se adicionaron a la solución. La solución se agitó durante 16 horas y luego se precipitó con éter. El producto precipitado se lavó extensivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta que no se observó fármaco suelto en la solución de lavado. El compuesto **26** se obtuvo después del secado bajo alto vacío.

Ejemplo de referencia 22: Síntesis del Polímero de CDDM-Lis(GlyCPT) **27**

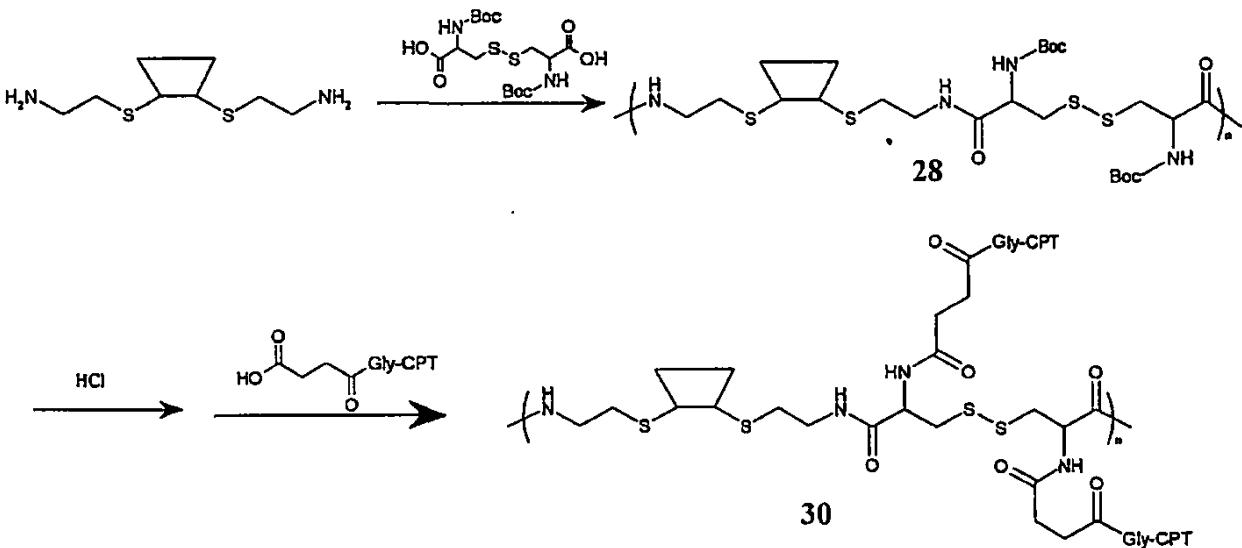
Esquema XXXII



El CDDM, **5**, y Lys-Gly-CPT, **14**, se disolvieron en DMSO seco. El EDC (3 eq.) y el sulfo-NHS (2 eq.) se adicionaron a la mezcla. La solución se agitó bajo argón durante 2 días a temperatura ambiente. La solución luego se vertió en éter. El producto precipitado **27** se secó bajo vacío.

- 5 Ejemplo de referencia 23: Síntesis del Copolímero de CDDC-Cys(Boc) **28**, Copolímero de CDDC-Cys **29** y su Conjugado de CPT **30**

Esquema XXXIII



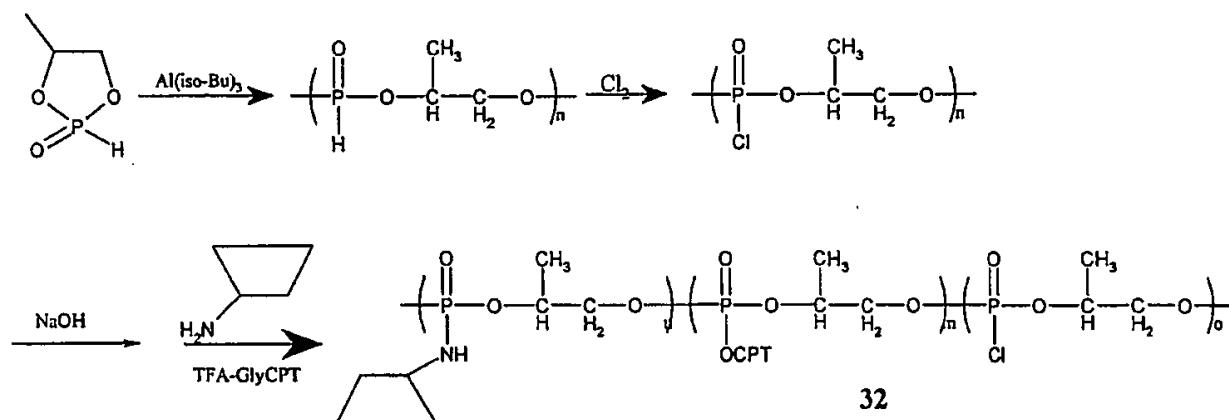
- 10 El CDDC (**3**) y la N,N-DiBoc-Cistina se disolvieron en DMSO seco. El EDC (3 eq.) y el sulfo-NHS (2 eq.) se adicionaron a la mezcla. La solución se agitó bajo argón durante 2 días a temperatura ambiente. La solución luego se transfirió a una membrana de diáisisis 10.000 MWCO y se dializó durante 48 horas. Después de la liofilización se obtuvo un polvo de color blanco, polímero de CDDC-Cys(Boc) **28**. Al polvo de color blanco **28** se adicionó una mezcla de HCl y una solución de DMSO. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se dializó contra agua durante 24 horas utilizando la membrana 10.000 MWCO. El compuesto **29** se obtuvo como un sólido de color blanco.

El Suc-Gly-CPT **15** se mezcló con el compuesto **29** en una solución de DMSO. El EDC (2 eq.), NHS (1 eq.) y DIEA

(1,0 eq.) se adicionaron a la solución. La solución se agitó durante 16 horas bajo argón y luego se precipitó con éter. El producto precipitado se lavó con éter hasta que no se observó fármaco suelto en la solución de lavado. El compuesto **30** se obtuvo después del secado bajo alto vacío.

Ejemplo de referencia 24: Síntesis del Polímero de CD-Polifosfoéster biodegradable **31** y sus conjugados de CPT **32**

5 Esquema XXXIV

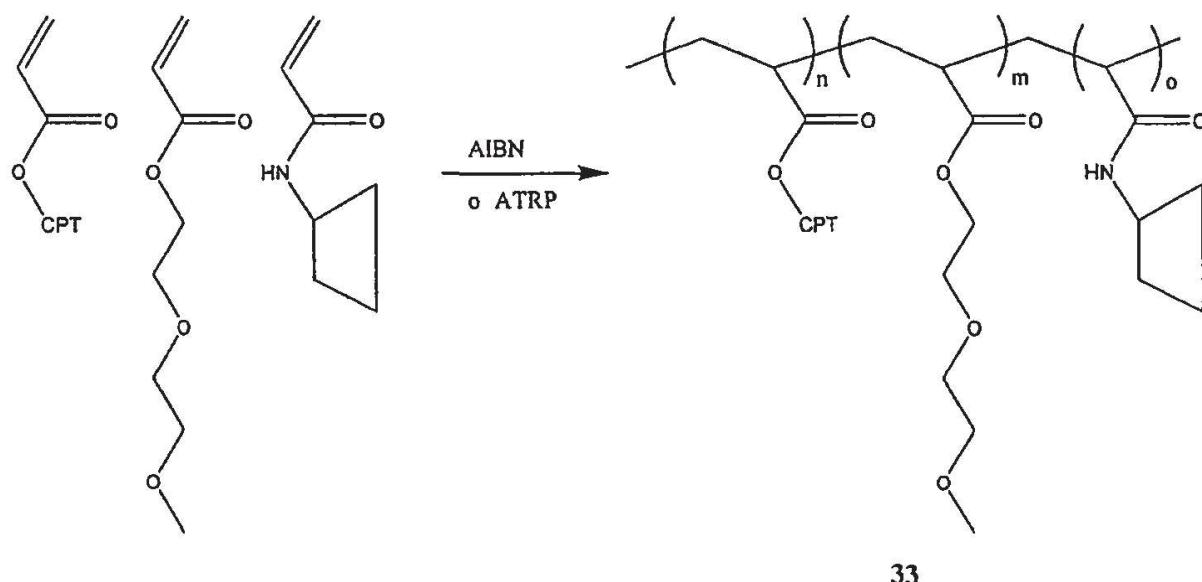


La síntesis del polifosfoéster biodegradable se puede encontrar en Wang J y colaboradores, *JACS*, **2001**, 123, 9480-9481.

- 10 El polifosfoéster se mezcló con el compuesto **10** (0,5 eq. de unidad de repetición) en DMSO. El EDC (2 eq.), NHS (1 eq.) y DMEA (1,0 eq.) se adicionaron a la solución. La solución se agitó durante 16 horas y luego se precipitó con éter. El CD-polifosfoéster **31** obtenido se disolvió en DMSO. A la solución se adicionó el compuesto **11** (0,5 eq. de unidad de repetición), EDC (2 eq.), NHS (1 eq.) y DMEA (1,0 eq.). La solución se agitó durante 16 horas y luego se precipitó con éter. El producto precipitado se lavó extensivamente con éter hasta que no se observó fármaco suelto en la solución de lavado. El compuesto **32** se obtuvo después del secado bajo alto vacío.
- 15

Ejemplo de referencia 25: Síntesis del conjugado de Copolímero de CD-CPT **33** con la estructura principal de polietileno por vía de la polimerización de radicales

Esquema XXXV

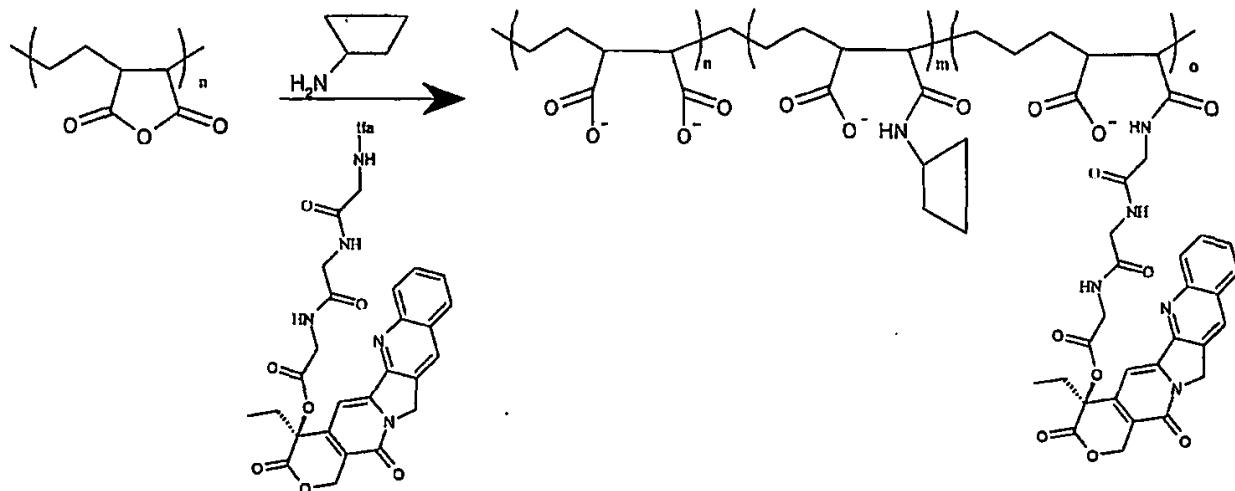


- 20 Los monómeros de acrilato de CPT, monometiléter de trietilenglicol y CD-monocistamina se pueden sintetizar de N-acriloxisuccinimida (Polysciences, Inc.). Estos monómeros se mezclaron en una relación 1:1:1 en DMSO seco. El AIBN se adiciona a la mezcla bajo argón. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24-48 horas hasta

que la solución se volvió viscosa. El conjugado de polímero-CPT **33** se precipitó con éter y se secó bajo vacío.

Ejemplo de referencia 26: Síntesis de CD-injerto-poli(anhídrido etilen-*alt*-maleico)-GlyGlyGlyCPT **34**

Esquema XXXVI

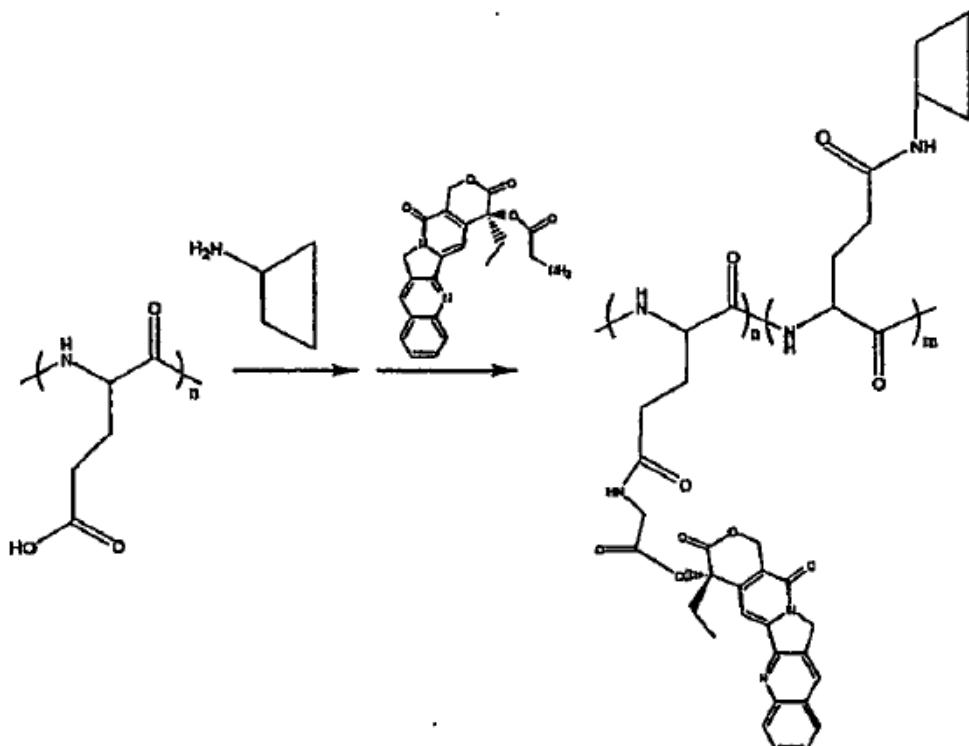


**34**

- 5 El poli(anhídrido etilen-*alt*-maleico) (Aldrich) se disolvió en DMSO. Se adicionaron el compuesto **10** (0,4 eq. de unidad de repetición) y el compuesto **12** (0,4 eq. de repetición). La solución se calentó a 70°C durante 16 horas y luego se precipitó con éter. El CD-injerto-poli(anhídrido etilen-*alt*-maleico)-GlyGlyGlyCPT **34** se secó bajo alto vacío.

Ejemplo de referencia 27: Síntesis del Conjugado de Poliglutamato-CD-CPT **35**

Esquema XXXVII



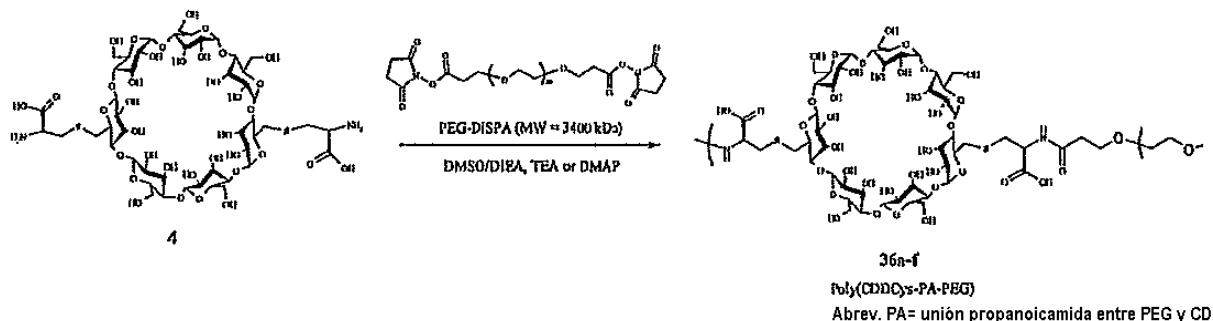
**35**

El poliglutamato (de Sigma-Aldrich) se mezcla con el compuesto **10** (0,5 eq. de unidad de repetición) y el compuesto **11** (0,5 eq. de unidad de repetición) en DMSO. El EDC (3 eq.), NHS (2 eq.) y DIEA (1,0 eq.) se adicionaron a la solución. La solución se agitó durante 16 horas y luego se precipitó con éter. Después del secado bajo alto vacío, se obtuvo el conjugado de poliglutamato-CD-CPT **35**.

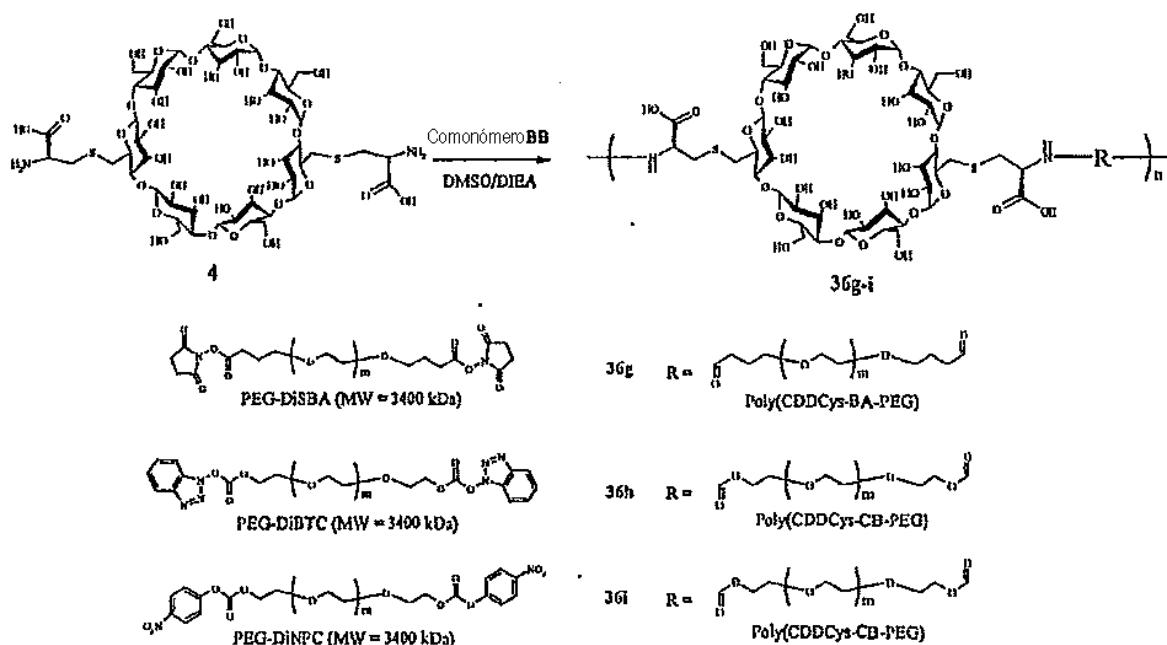
5 Ejemplo 28: Síntesis y Caracterización de los Copolímeros de CD-BisCys-Peg3400 **36** y sus Conjugados de CPT **37**.

A. Síntesis y Caracterización de los Copolímeros de CD-BisCys-Peg3400 **36**

Esquema XXXVIIa



Esquema XXXVIIb



Abrev. BA= unión de butanoicamida: CB= unión de carbamato

10

Síntesis de Poli(CDDCys-PA-PEG), **36a**. El compuesto **4** (después de la precipitación con acetona, 63 mg, 0,047 mmol) y PEG-DiSPA (peso molecular 3400, 160 mg, 0,047 mmol) se secaron bajo vacío durante 8 horas. El DMSO anhidro (1,26 ml) se adicionó a la mezcla bajo argón. Después de 10 minutos de agitación, se adicionó la diisopropiletilamina anhidra (DIEA, 19 µL, 2,3 eq.) bajo argón. La mezcla de reacción se agitó bajo argón durante 120 horas. La solución que contenía el polímero se dializó utilizando una membrana 10.000 MWCO (Spectra/Por 7) contra agua durante 48 horas y se liofilizó para producir 196 mg del compuesto **36a** (90%, tabla 1).  $M_w = 57,4 \text{ kDa}$ ,  $M_n = 41,7 \text{ kDa}$ ,  $M_w/M_n = 1,38$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) δ 5,08 (m, CD-2-H), 4,27 (m, Cys-CH), 2,72-3,76 (m, CD-3,4,5,6-CH, CD-CH<sub>2</sub>, PBG-CH<sub>2</sub>), 2,44 (m, Cys-CH<sub>2</sub>).

15

Las síntesis de los otros poli (CDDCys-PA-PEG) (**36b-f**), Poli(CDDCys-BA-PEG) (**36g**, no es de la invención) y Poli(CDDCys-CB-PEG) (**36h-i**; no es de la invención) se lograron bajo una condición de polimerización similar a aquella del compuesto **36a**. Los detalles para las condiciones de polimerización, selección de monómero, peso molecular del polímero, polidispersidad y rendimientos se listan en la tabla 1.

**36g:** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) δ 5,10 (m, CD-2-H), 4,25-4,37 (m, Cys-CH), 2,72-3,86 (m, CD-3,4,5,6-CH, CD-CH<sub>2</sub>, PEG-CH<sub>2</sub>),

2,21 (m, Cys-CH<sub>2</sub>-!). **36h-i:** RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 5,05 (m, CD-2-H), 4,56 (m, Cys-CH), 2,70-3,93 (m, CD-3,4,5,6-CH, CD-CH<sub>2</sub>, PEG-CH<sub>2</sub>) , 2,38 (m, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-NH-), 2,34 (m, Cys-CH<sub>2</sub>), 1,90 (m, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-NH-).

La adición de una base orgánica no nucleofílica (tal como DIEA) fue esencial para esta polimerización ya que no se observaron cambios de viscosidad de las soluciones de polimerización después de 48 horas si no se adicionó una base. Cuando se adicionaron 2,3 eq. de DIEA, la viscosidad de la solución de polimerización incrementó dramáticamente después de 4-6 horas de reacción. La DIEA desprotoña los grupos amino del compuesto **4** para volverlos más nucleofílicos para el acoplamiento con PEG-DiSPA. Esencialmente no hubo diferencia en las polimerizaciones si se utilizaran otras bases, tales como TEA o DMAP, (**36b-c**, tabla 1). La polimerización que utiliza el compuesto **4** recuperado por los dos métodos de precipitación diferentes (acetona y metanol) produjo los polímeros con diferentes pesos moleculares. El compuesto **4** que se purificó por medio del método de metanol-precipitación (no contiene cistina suelta) proporcionó, el polímero de peso molecular más alto (**36d-e**) comparado al compuesto **4** menos puro se obtuvo del método de acetona-precipitación (**36a**). La polimerización del compuesto **4** con PEG-DiSPA produjo típicamente rendimientos del polímero mayores que 90%.

El compuesto **4** se polimerizó con otros monómeros activados, tales como PEG-DiSBA, PEG-DiBTC y PEG-DiNPC. La reacción del compuesto **4** con PEG-DiSBA proporcionó el polímero **36g** con enlaces similares como los compuestos **36a-f** (enlace de amida, pero no más del grupo -CH<sub>2</sub> que los compuestos **36a-f** en el conector) con M<sub>w</sub> sobre 100 kDa, mientras que la reacción del compuesto **4** con PEG-DiBTC y PEG-DiNPC generó los polímeros **36h** y **36i**, respectivamente, con la conexión de la porción de carbamato y M<sub>w</sub>'s sobre 50 kDa (tabla 1).

**Tabla 1.** Polimerización del compuesto **4** con PEG disfuncionalizado

CDP	Comonómero de PEG	Base	Tiempo de polimerización (h)	M <sub>w</sub> (kDa)	M <sub>n</sub> (kDa)	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	Rendimiento (%)
36a <sup>a</sup>	PEG-DiSPA	DIEA	120	57,4	41,7	1,38	90
36b <sup>a</sup>	PEG-DiSPA	DMAP	120	54,2	38,1	1,42	91
36c <sup>a</sup>	PEG-DiSPA	TEA	120	57,4	42,6	1,35	91
36d <sup>b</sup>	PEG-DiSPA	DIEA	120	93,6	58,0	1,48	96
36e <sup>b</sup>	PEG-DiSPA	DIEA	144	97,3	58,0	1,67	94
36f <sup>b</sup>	PEG-DiSPA	DIEA	2	35,3	25,6	1,38	95
36g	PEG-DiSBA	DIEA	120	114,7	77,9	1,47	96
36h	PEG-DiBTC	DIEA	120	67,6	39,4	1,47	95
36i	PEG-DiNPC	DIEA	120	86,5	57,2	1,51	96

<sup>a</sup> el compuesto **4** se lavó con acetona antes de la polimerización.

<sup>b</sup> el compuesto **4** se lavó con metanol antes de la polimerización,

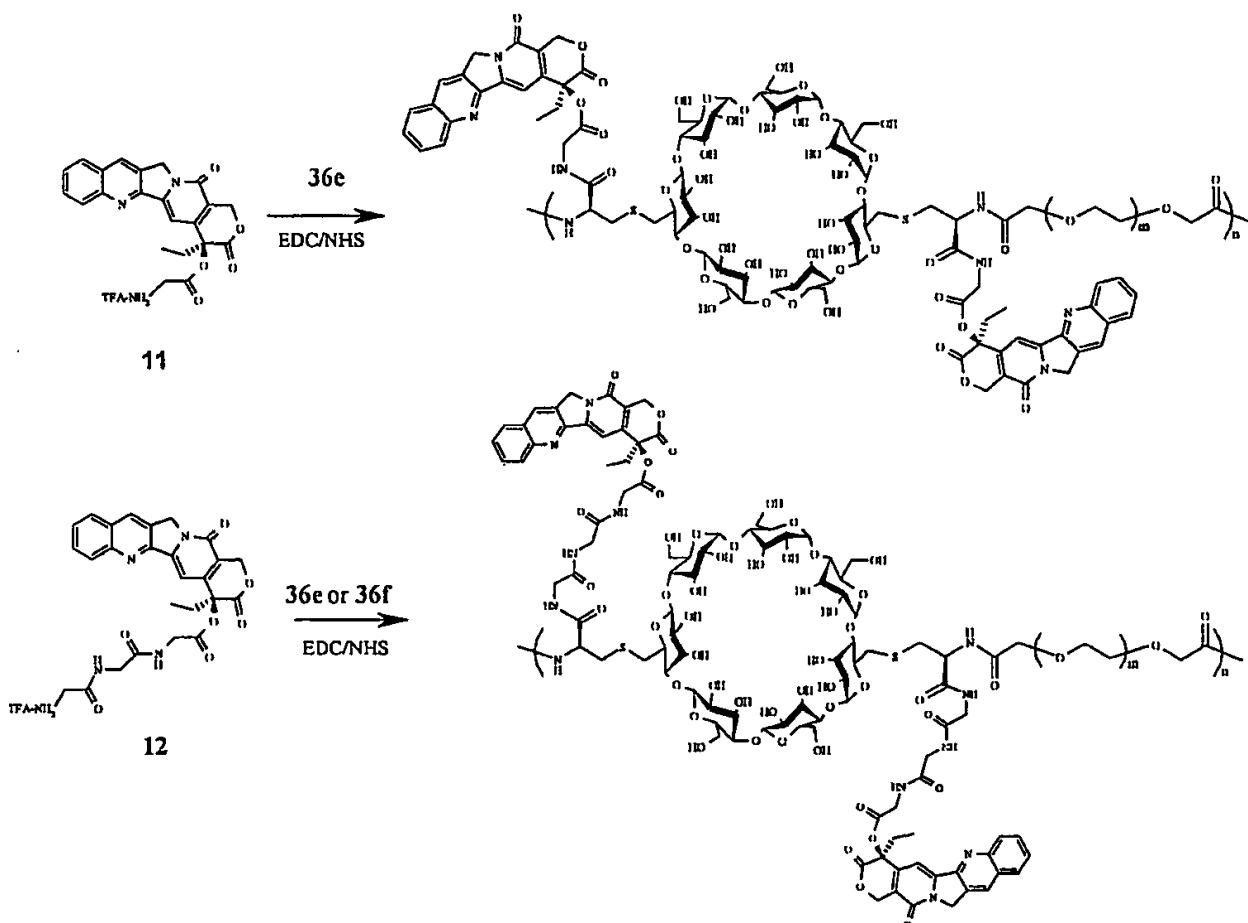
Los polímeros **36a-i** son altamente solubles en solución acuosa. Estos se pueden disolver fácilmente en agua o solución salina amortiguada con fosfato (PBS) en concentraciones de al menos 200 mg/ml. La solubilidad de estos polímeros en solución acuosa en concentraciones más altas que 200 mg/ml no se intentó debido a la alta viscosidad. Estos polímeros también fueron solubles en DMF, DMSO y metanol, ligeramente solubles en CH<sub>3</sub>CN y CHCl<sub>3</sub>, pero insolubles en THF y éter etílico.

Control de Peso Molecular de los Polímeros de CD. El compuesto **4** (después de la precipitación con metanol) (56,2 mg, 0,0419 mmol) y el PEG-DiSPA (147 mg, 0,0419 mmol) se secaron bajo vacío durante 4-8 horas. A la mezcla se adicionó DMSO seco (1,1 ml) bajo argón. Después de 10 minutos de agitación, se adicionó DIEA (16  $\mu$ L, 2,2 eq.) bajo argón, una porción de la solución de polimerización (150  $\mu$ L) se removió y se precipitó con éter en tiempos seleccionados (2 horas, 18 horas, 43 horas, 70 horas, 168 horas y 288 horas). Los pesos moleculares de los polímeros precipitados se determinaron como se describe anteriormente.

Como se muestra en las figuras 5a y 5b, los pesos moleculares del compuesto **36** se pueden controlar al ajustar el tiempo de polimerización.

#### B. Síntesis de los Conjugados de Poli(CDDCys-PA-PEG)-CPT (HGGG6, LGGG10, HG6, HGGG10).

Esquema XXXIX



Síntesis de Poli(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly-CPT (**HGGG6**; no es de la invención). El compuesto **36a** (1,37 g, 0,30 mmol de unidad de repetición) se disolvió en DMSO seco (136 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos. El compuesto **12** (419 mg, 0,712 mmol, 2,36 eq.), DIEA (0,092 ml, 0,712 mmol, 2,36 eq.), EDC (172 mg, 0,903 mmol, 3 eq.) y NHS (76 mg, 0,662 mmol, 2,2 eq.) se adicionaron a la solución polimérica y se agitó durante aproximadamente 15 horas. El polímero se precipitó con éter etílico (1 L). El éter se vertió y el producto precipitado se lavó con CH<sub>3</sub>CN (3 x 100, ml). El producto precipitado se disolvió en agua 600 ml. Algo del sólido insoluble se filtró a través de filtros de 0,2 µm. La solución se dializó utilizando una membrana 25.000 MWCO (Spectra/Por 7) durante 10 horas a 10-15°C en agua DI. El agua de la diálsis se cambió cada 60 minutos. La solución de conjugado de polímero-fármaco se esterilizó al pasarla a través de filtros de 0,2 µM. La solución se liofilizó para producir un sólido de color amarillo **HGGG6** (1,42 g, rendimiento del 85%).

Síntesis de Poli(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly-CPT (**LGGG10**, no es de la invención). La conjugación del compuesto **12** al compuesto **36f** se realizó de manera similar a aquella utilizada para producir el **HGGG6** excepto que este conjugado se dializó con una membrana 10.000 MWCO (Spectra/Por 7) en lugar de la membrana 25.000 MWCO. El rendimiento de **LGGG10** fue 83%.

Síntesis de Poli(CDDCys-PA-PEG)-Gly-CPT (**HG6**). La conjugación del compuesto **11** al compuesto **36e** se realizó de manera similar a aquella utilizada para producir el **HGGG6**. El rendimiento de **HG6** fue 83%.

Síntesis de Poli(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly-CPT (**HGGG10**, no es de la invención). El compuesto **36e** (1,5 g, 0,33 mmol de unidad de repetición) se disolvió en DMSO seco (150 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos. El compuesto **12** (941 mg, 1,49 mmol, 4,5 eq.), DIEA (0,258 ml, 1,49 mmol, 4,5 eq.) , EDC (283 mg, 1,49 mmol, 4,5 eq.) y NHS (113 mg, 0,99 mmol, 3 eq.) se adicionaron a la solución polimérica y se agitó durante aproximadamente 24 horas. Otra porción de EDC (142 mg, 0,75 mmol, 2,3 eq.) y NHS (56 mg, 0,5 mmol, 1,5 eq.) se adicionaron a la solución de conjugación. El polímero se agitó durante 22 horas adicionales. El procedimiento de preparación fue el mismo como aquel para la síntesis de **HGGG6**. El rendimiento de **HGGG10** fue 77%.

Determinación del % en peso de CPT en los Conjugados. Las soluciones madre de HGGG6, LGGG10, HG6 y HGGG10 se prepararon en una concentración de 10 mg/ml en DMSO. Una alícuota de la solución madre correspondiente se diluyó a 100 µg/ml utilizando NaOH 1 N. La CPT se hidrolizó completamente en esta solución básica y se transformó a su forma de carboxilato dentro de 2 horas a temperatura ambiente. Una alícuota de esta

solución se diluyó a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  utilizando  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 8,5% y la forma de carbonato de CPT se transformó a su forma de lactona. 30  $\mu\text{L}$  de esta solución se inyectó en la HPLC. El área pico de la forma de lactona de CPT se integró y se comparó a una curva estándar.

El compuesto **11** y el compuesto **12** se conjugaron al compuesto **36e** o el compuesto **36f** (tabla 2) utilizando métodos de acoplamiento convencionales. Debido a la inestabilidad del conector de éster del compuesto **11** y el compuesto **12** en solución acuosa, la conjugación se condujo en DMSO anhídrido bajo argón. Se requirió una base orgánica para desprotonar las sales de TFA del compuesto **11** y el compuesto **12** para facilitar el acoplamiento. Para la conjugación del polímero con el compuesto **12**, el porcentaje en peso (% en peso) de la carga de fármaco fue alrededor de 6-10%. La carga de fármaco máxima, teórica es alrededor de 13% utilizando PEG con un peso molecular de 3400 Da; los valores máximos se pueden incrementar al disminuir el peso molecular de los segmentos de PEG. Las solubilidades de todos los conjugados en agua o PBS fueron más de 200 mg/ml (equivalente a 12-20 mg de CPT/ml por carga de fármaco de 6-10% en peso, respectivamente). Los detalles para **HGGG6**, **LGGG10**, **HG6** y **HGGG10** se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Propiedades de conjugados de polímero-CPT

Conjugado <sup>3</sup>	$M_w$ de polímero precursor ( $\times 10^{13}$ )	$M_w/M_n^b$	Conector	CPT (% en peso)
HGGG6	97	1,7	triglicina	6,1
LGGG10	35	1,6	trígiicina	10,2
HG6	97	1,7	glicina	6,8
HGGG10	97	1,7	triglicina	9,6

<sup>a</sup> Abreviaciones: **H** = polímero de alto  $M_w$  (97 kDa), **L** = polímero de bajo  $M_w$  (35 kDa), **GGG** = conector de triglicina, **G** = conector de glicina, **6** = carga de fármaco alrededor de 6% en peso, **10** = carga de fármaco alrededor de 10% en peso.

<sup>b</sup> Polidispersidad del polímero medida por las técnicas de dispersión de luz (26).

### 15 C. Liberación de CPT de HGGG6 y HG6

La liberación de CPT en PBS. **HGGG6** y **HG6** se prepararon en 1 mg/ml en PBS (1x, pH 7,4). Una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la solución se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se incubó a 37°C. Las muestras incubadas se enfriaron rápidamente en intervalos de tiempo seleccionados y se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Cada solución se diluyó con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 8,5% a un volumen total de 5 ml en un matraz volumétrico. 30  $\mu\text{L}$  de esta solución se inyectó en la HPLC. El área pico de la forma de lactona de CPT se integró y se comparó a una curva estándar.

El análisis para la liberación de CPT de **HGGG6** y **HG6** en PBS que contenía acetil-colinesterasa (una esterasa, 100 unidades/ml), en amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,1, 0,1 M) y en el amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,1, 0,1 M) que contenía catepsina B (una cistein-proteinasa, 200  $\mu\text{M}$ , preactivada en hielo durante 30 minutos en este amortiguador que contenía DTT 2 mM y EDTA 1 mM) se realizaron de manera similar a aquella descrita anteriormente para PBS solo.

*Liberación de CPT en Plasma de Humano.* Una alícuota de solución madre de **HGGG6** y **HG6** se diluyó para proporcionar una concentración- final de 0,5 mg/ml en PBS (1x, pH 7,4). Esta solución se adicionó a un polvo liofilizado de plasma de humano para reconstituir de plasma de humano al 100% mediante la cantidad recomendada. La solución se dividió en un volumen igual (250  $\mu\text{L}$ ) a tubos Eppendorf de 1,5 ml, se incubó a 37°C y se detuvo en el punto de tiempo seleccionado. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Las muestras se separaron del plasma mediante columnas de extracción de fase sólida. El cartucho de extracción de fase sólida (cartucho Oasis HLB Ice de Waters) se pre-acondicionó con 1 ml de acetonitrilo y luego con 1 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 8,5% antes de la carga. Las mezclas se acidificaron con un volumen igual de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 8,5% después de la carga. Despues de que se cargó la solución acida en el cartucho, el lecho se lavó con 3 x 1 ml de agua. La CPT liberada y el conjugado polimérico se fluyeron con 3 x 1 ml de una mezcla de solución de acetonitrilo y amortiguador de fosfato de potasio (pH 4,1) (60/40 v/v). La solución eluida se diluyó a 5 ml de volumen total en un matraz volumétrico de 5 ml. 30  $\mu\text{L}$  de esta solución se inyectó en la HPLC. El área pico de la forma de lactona de CPT se integró y se comparó a una curva estándar.

La liberación de CPT de **HG6G6** y **HG6** en PBS que contenía plasma de humano al 4% (solución de PBS/plasma de humano de reconstituido = 96/4 (v/v)), en plasma de ratón y en albúmina de humano reconstituida (solución de PBS) se realizaron de manera similar a aquella descrita anteriormente para el plasma de humano.

En PBS (1x, pH 7,4), los periodos de vida media ( $t_{1/2}$ ) para liberar la CPT de **HG6** y **HGGG6** fueron 59 horas y 32 horas, respectivamente. Los períodos de vida media disminuyeron a 25 horas y 22 horas, respectivamente, en presencia de plasma de humano al 4% y a 1,7 horas y 1,6 horas, respectivamente, en plasma de humano al 100% ("HP") y 2,6 horas y 2,2 horas, respectivamente, en plasma de ratón al 100% ("MP"). Las velocidades de liberación

de CPT para tanto **HG6** como **HGGG6** en presencia de albúmina ("Alb") o acetil-colinesterasa ("Ac Cho") estuvieron en el mismo orden de magnitud como en PBS. En una solución amortiguadora a un pH menor que PBS (pH 6,1) con o sin la enzima catepsina B (activa a pH 6,1), menos que 50% de CPT conjugada total se liberó de tanto **HG6** como **HGGG6** por tiempos de hasta 144 horas (tabla 3).

5 Tabla 3. Periodo de vida media ( $t_{1/2}$ ,en hora) de la liberación de CPT de **HG6** y **HGGG6**<sup>3</sup>-

Conjugado	PBS <sup>b</sup>	HP <sup>c</sup> 4%	HP <sup>d</sup>	MP <sup>e</sup>	Alb <sup>f</sup>	Ac Cho <sup>g</sup>	Amortiguador pH 6,1 <sup>h</sup>	Cat B (pH 6,1) <sup>i</sup>
HG6	59	25	1,7	2,6	62	33	>144	>144
HGGG6	32	22	1,6	2,2	73	42	>144	>144

<sup>a</sup>  $t_{1/2}$  se define como tiempo (horas) para la liberación de la mitad de la CPT conjugada, total.

Abreviaciones: HP significa plasma de humano, MP significa plasma de ratón.

<sup>b</sup> amortiguador pH 7,4 de PBS 1x.

<sup>c</sup> Plasma de humano reconstituido mezclado con PBS (v/v = 4/96).

<sup>d</sup> Plasma de humano reconstituido.

<sup>e</sup> Plasma de ratón fresco.

<sup>f</sup> En amortiguador de PBS de albúmina de humano reconstituida.

<sup>g</sup> En presencia de solución de acetil-colinesterasa-PBS (100 unidades/ml).

<sup>h</sup> Amortiguador de fosfato pH 6,1 (0,1M)

<sup>i</sup> Amortiguador de fosfato pH 6,1 en presencia de Catepsina B

Liberación de CPT en Solución a Diferente pH. El **HGGG6** y el **HG6** se prepararon a 1 mg/ml en solución amortiguadora con pHs que varían de ácido (pH =1,2) a básico (pH = 13,1) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Una alícuota de cada solución se diluyó con H3PO4 al 8,5% a aproximadamente 100 //g/ml. 30 JJL de esta solución se inyectaron en la HPLC. El área pico de la forma de lactona de CPT se integró y se comparó a una curva estándar.

- 10 10 El pH de la solución acuosa tiene un efecto significante sobre las velocidades de liberación de CPT de tanto **HG6** como **HGGG6**. Las cantidades de CPT liberada de **HG6** y **HGGG6** a 37°C después de 24 horas en soluciones amortiguadoras con pHs que varian de 1,1 a 13,1 se ilustran en la figura 6. Las uniones de éster de glicinil-CPT de tanto **HG6** como **HGGG6** fueron muy estables en el pH ácido (1,1 a 6,4) ya que se liberó menos de 7% de CPT en 24 horas.
- 15 15 Valor  $IC_{50}$  por vía del ensayo de MET. La linea de células de carcinoma de ovario de humano A2780 se obtuvo de the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, Wiltshire, Reino Unido). Las líneas de células de adenocarcinoma colorectal de humano HT29, carcinoma de próstata de humano PC-3 y adenocarcinoma colónico de humano LS174T se obtuvieron de the American Type Culture Collection (Rockville, MD) . Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 5000 células/pocillo y se desarrollaron en un medio que contenía suero bovino fetal al 10% a 37 °C durante 24 horas en una atmósfera humidificada de CO2 al 5%. El medio se reemplazó con un medio fresco que contenía CPT," compuesto **36e**, **HGGG6** o **HG6** en concentraciones que variaban de 1 mM a 10  $\mu$ M de CPT y el compuesto **36e** (equivalente de CPT para **HGGG6** y **HG6**). En cada,concentración se trataron tres pocillos por placa. El efecto de los compuestos sobre el desarrollo de las células se midió por medio del ensayo de MTT después de 72 horas. El medio se removió, las células se enjuagaron con PBS, la solución de MTT se adicionó a una concentración de 0,5 mg/ml y las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C. El medio se removió y los cristales de formazan se solubilizaron en DMSO. La absorbancia se midió a 560 nm utilizando un lector de placas SPECTRAFluor Plus (Tecan, Durham, NC). El porcentaje de supervivencia de las células se calculó con relación a las células sin tratar y se determinaron los valores  $IC_{50}$  a partir de diagramas de dosis contra la supervivencia de las células. Los datos del valor IC50 de CPT, compuesto **36e**,**HGGG6** o **HG6** se listan en la tabla 4.
- 20 20
- 25 25

Tabla 4. Valor  $IC_{50}$  de CPT, polímero no conjugado **36e** y conjugados de CPT **HG6** y **HGGG6** en diversas líneas, de células

Línea de Células	<b>36e</b> ( $\mu\text{M}$ )	CPT ( $\mu\text{M}$ )	<b>HG6</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>HGGG6</b> ( $\mu\text{M}$ )
LS174T	>300	0,005	0,050	0,010
HT29	300	0,020	0,050	0,030
A2780	100	0,007	0,025	0,020
PC3	>300	0,075	0,25	0,15

Ejemplo de referencia 29: Poli-CD-BisCys-Peg3400-Ala-CPT **37**

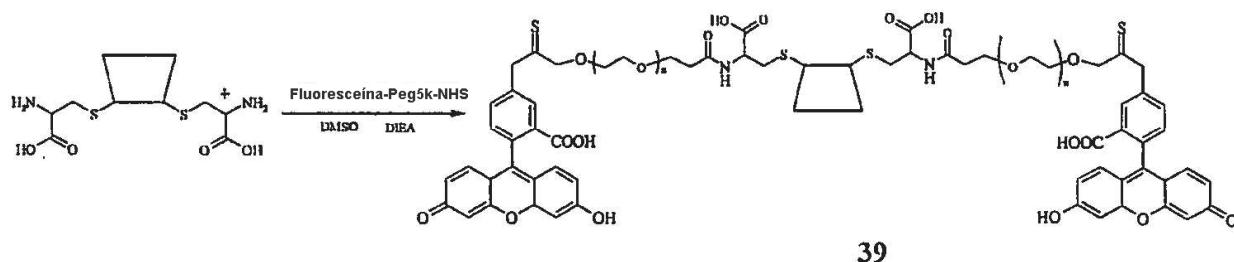
El compuesto **36e** (54 mg, 0,012 mmol de unidad de repetición) se disolvió en DMSO seco (226 ml) y se agitó durante 10 minutos. La TFA-Ala-CPT, la cual se preparó de manera similar al compuesto **11** (15 mg, 0,028 mmol, 2,36 eq.), DIEA (4,88 ml, 0,028 mmol, 2,36 eq.), DCC (24,52 mg, 0,12 mmol, 10 eq.) y NHS (13,6 mg, 0,12 mmol, 10 eq.) se adicionaron a la solución polimérica. La mezcla se agitó durante aproximadamente 16 horas. El polímero se precipitó con éter (40 ml) y se lavó con éter (2 x 30 ml) y con CH<sub>3</sub>CN (2 x 10 ml). Luego se disolvió nuevamente en una solución acuosa de pH 4 (10 ml) y se dializó a temperatura ambiente durante 48 horas utilizando una membrana 25.000 MWCO. La solución luego se pasó a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  esterilizado y luego se liofilizó para producir el compuesto **37** (46 mg, 85%). El porcentaje en peso de la carga de fármaco se calculó que era 5,5% utilizando la HPLC equipada con un detector de fluorescencia después de la liberación de CPT del compuesto **37** utilizando una base. La CPT libre en el compuesto **37** es <1%.

Ejemplo de referencia 30: Poli-CD-BisCys-Peg3400-Leu-CPT **38**

El compuesto **36e** (54 mg, 0,012 mmol de unidad de repetición) se disolvió en DMSO seco (226 ml) y se agitó durante 10 minutos. La TFA-Leu-CPT, la cual se preparó de manera similar al compuesto **11** (16 mg, 0,028 mmol, 2,36 eq.), DIEA (4,88 ml, 0,028 mmol, 2,36 eq.), DCC (24,52 mg, 0,12 mmol, 10 eq.) y NHS (13,6 mg, 0,12 mmol, 10 eq.) se adicionaron a la solución polimérica. La mezcla se agitó durante aproximadamente 16 horas. El polímero se precipitó con éter (40 ml) y se lavó con éter (2 x 30 ml) y con CH<sub>3</sub>CN (2 x 10 ml). Luego se disolvió nuevamente en una solución acuosa de pH 4 (10 ml) y se dializó a temperatura ambiente durante 48 horas utilizando una membrana 25.000 MWCO. La solución luego se pasó a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  esterilizado y luego se liofilizó para proporcionar el compuesto **38** (42 mg, 78%). El porcentaje en peso de la carga de fármaco se calculó que era 5,0% utilizando la HPLC equipada con un detector de fluorescencia después de la liberación de CPT del compuesto **38** utilizando una base. La CPT libre en el compuesto **38** es <1%.

Ejemplo de referencia 31: Síntesis de CD-BisCys-BisPeg-FITC **39**

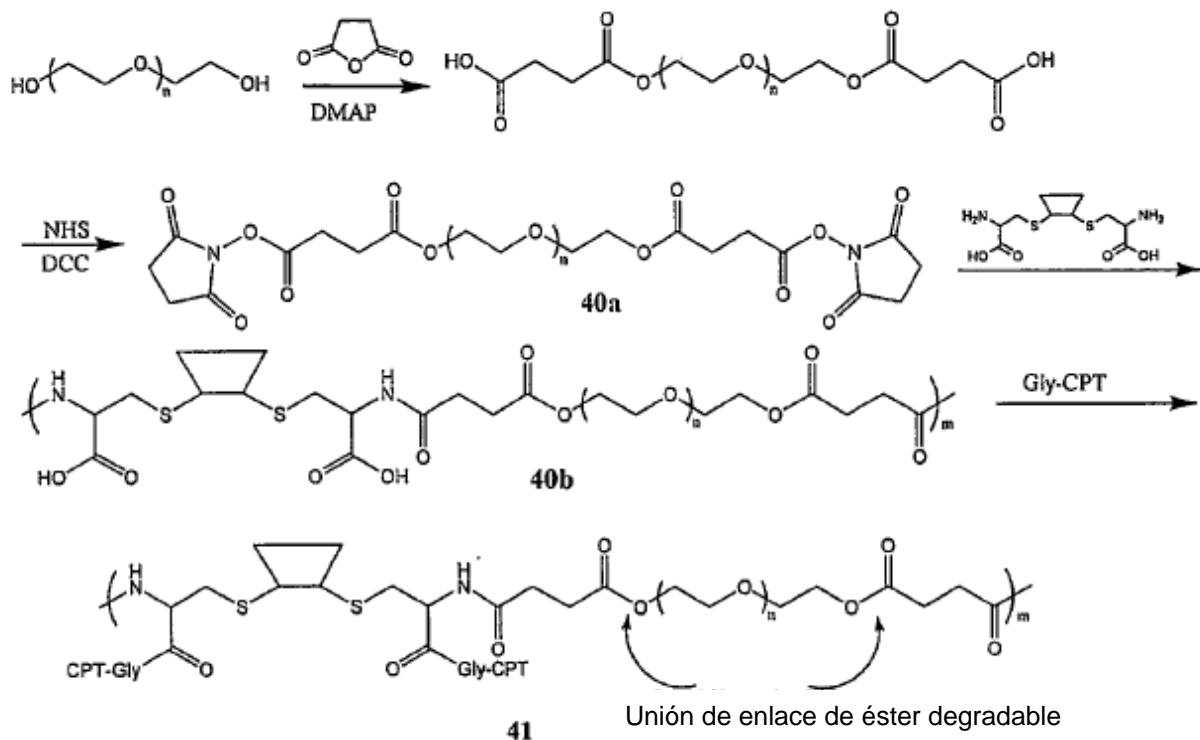
Esquema XXXX



El compuesto 4 (25 mg, 0,0186 mmol) y el FITC-Peg5000-NHS (Shearwater, 186 rag, 0,0373 mmol) se disolvieron en DMSO seco (2 ml). La DIEA (0,0094 ml, 0,056 mmol, 3 eq.) se adicionó a la mezcla. La mezcla se mantuvo en la oscuridad y se agitó durante 24 horas. Luego se adicionó agua (10 ml) y la solución se dializó en la oscuridad utilizando 10,000 MWCO durante 48 horas. Despues de la liofilización, se obtuvo el polímero de color amarillo **39**. El polímero se caracterizó mediante la EM y la RMN <sup>1</sup>H.

Ejemplo de referencia 32: Síntesis de Bis-Succinato de succinimidilo-Peg3400 (Bis-SS-PEG) (**40a**) y CD-BisCys-SS-Peg3400 biodegradable (**40b**) y su conjugado de CPT **41**

Esquema XXXXI



Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra agitadora, magnética y un septo se cargó con 10 g (2,99 mmol) de polietenglicol peso molecular 3350, 2,0 g (20 mmol) de anhídrido succínico y 50 ml de piridina anhidra. Después de la agitación de la solución a 50°C durante 16 horas, el disolvente se removió mediante un evaporador giratorio. El residuo de disolvió nuevamente en 30 ml de agua y se extrajo con 10 ml de cloroformo tres veces. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se filtró. El disolvente luego se concentró y se precipitó en éter dietílico. Esto dio por resultado 9,6 g de bis-succinimidilo Peg3400 en un rendimiento de 90,6%. El producto se analizó mediante la cromatografía líquida de alta resolución en columna de fase inversa.

Un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con una barra agitadora, magnética y un septo se cargó con 2 g (0,56 mmol) de bis-succinimidilo Peg34 00 y 10 ml de diclorometano anhidro. A esta solución se adicionaron 0,324 g (2,82 mmol) de succinimida de N-hidroxilo. La mezcla de solución luego se enfrió en un baño de hielo y se adicionaron 0,58 g (2,82 mmol) de 1,3-diciclohexilcarbodiímida. Después de dejar a temperatura ambiente durante 24 horas, la solución se filtró y se precipitó en 150 ml de éter dietílico. La disolución en 10 ml de diclorometano y la precipitación en éter dietílico se repitió dos veces. Esto proporcionó 1,74 g (82,9 %) de Bis-SS-PEG **40a**. Se analizó mediante la cromatografía líquida de alta resolución en columna de fase inversa.

## Polímero CD-BisCys-SS-Peg3400 40b

Un matraz en forma de perla de 50 ml se cargó con 100 mg (0,074 6 mmol) del compuesto 4 y 254 mg (0,074 6 mmol) del compuesto **40a**. Los sólidos combinados se secaron bajo vacío durante 24 horas antes de la adición de 1 ml de DMSO anhídrico y 2,2 equivalentes (0,164 mmol) de DIEA. La mezcla de disolución se agitó a temperatura ambiente durante 3 días y luego se precipitó en éter dietílico. Esto proporcionó 100% del compuesto **40b**. El peso molecular se analizó en un sistema de la HPLC Hitachi equipado con un detector Anspec RI, un detector Precisión Detectors DLS y una columna Progel-TSK G3000<sub>PWXL</sub> utilizando PBS 0,1 M como eluyente a una velocidad de flujo de 0,7 ml·min<sup>-1</sup>.  $M_w = 93,00$ ,  $M_n = 61.000$  y  $M_w/M_n = 1,5$ .

## Conjugado de CD-BisCys-SS-Peg3400-GlyGlyGly-CPT 41

El compuesto **40b** (201,8 mg, 0,044 mmol de unidad de repetición), TFA-GlyGlyGly-CPT **12** (66 mg, 0,105 mmol, 2,36 eq.), EDC (25,5 mg, 0,133 mmol, 3 eq.) y NHS (11 mg, 0,0977 mmol, 2,2 eq.) se disolvieron en DMSO seco (6 ml) y se agitó durante 30 minutos. Se adicionó DIEA (19  $\mu$ L, 0,105 mmol, 2,36 eq.) a la solución polimérica. La mezcla se agitó durante aproximadamente 41 horas. El polímero se trituró con éter dietilico (250 ml) y se lavó con acetonitrilo (3 x 25 ml). Luego se disolvió nuevamente en agua pH 4 (10 mg/ml) y se dializó a temperatura ambiente durante 24 horas utilizando una membrana 10.000 MWCO. La solución luego se pasó a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m esterilizado y luego se liofilizó para producir el compuesto **41** (128 mg, 52%). El porcentaje en peso de la carga de fármaco se calculó que era 6,95% utilizando la HPLC equipada con un detector de fluorescencia después de liberar la CPT del compuesto **41** utilizando una base.

La hidrólisis del compuesto 41 se ajustó en el plasma de humano (100% de solución) en 1 mg/ml. Las soluciones de alícuota (100  $\mu$ L) se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml y se incubaron en un baño de agua a 37°C. Luego, las muestras se acidificaron con 100  $\mu$ L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 8,5% y se cargó en un cartucho de extracción en fase sólida preacondicionado. Se eluyó con amortiguador de acetonitrile:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60:40 (v/v). La CPT libre (forma de lactona) se analizó en la HPLC/detector de fluorescencia utilizando un amortiguador de acetonitrilo/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El periodo de vida media se determinó que era 3 horas.

5 Degradación del Polímero CD-BisCys-SS-Peg3400 40b

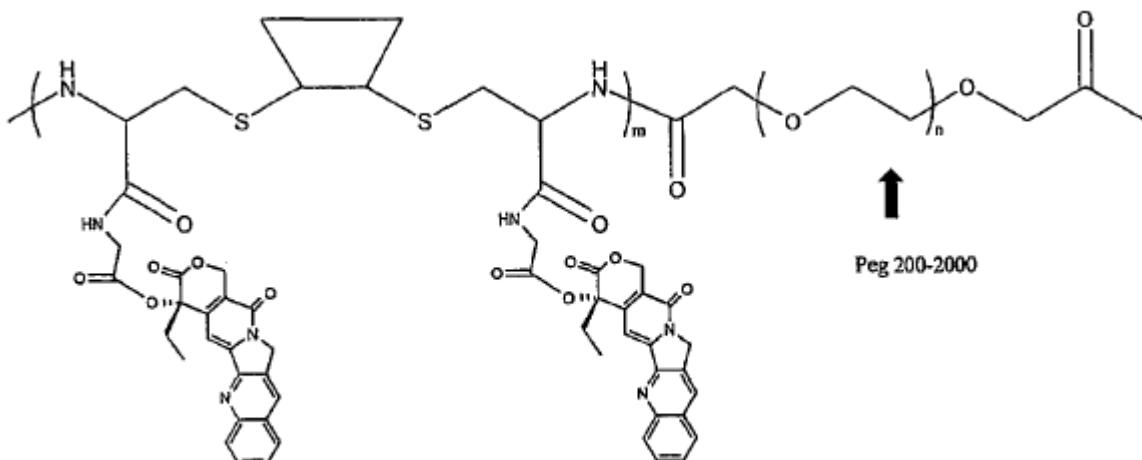
10 50 mg/ml de solución del compuesto **40b** se preparó en el plasma de humano reconstituido en solución de PBS (pH 7,4). Las alícuotas de 100  $\mu$ L se incubaron a 37°C. Cada tubo de muestra se tomó en un punto de tiempo específico y se trituró en 900  $\mu$ L de metanol frío. La solución se centrifugó y el sobrenadante se analizó en HPLC/detector de la ELS. El espectro resultante se muestra en la figura 7.

Métodos para incrementar el porcentaje en peso de la carga de fármaco

*Método I. Síntesis del Copolímero de CD-BisCys-Peg con un enlace de Peg corto y su conjugado de GlyCPT*

Ejemplo 33: Síntesis de CD-BisCys-Peg (PEG corto, por ejemplo, Peg200-Peg2000) y su Conjugado de CPT **42**

15 Esquema XXXXII



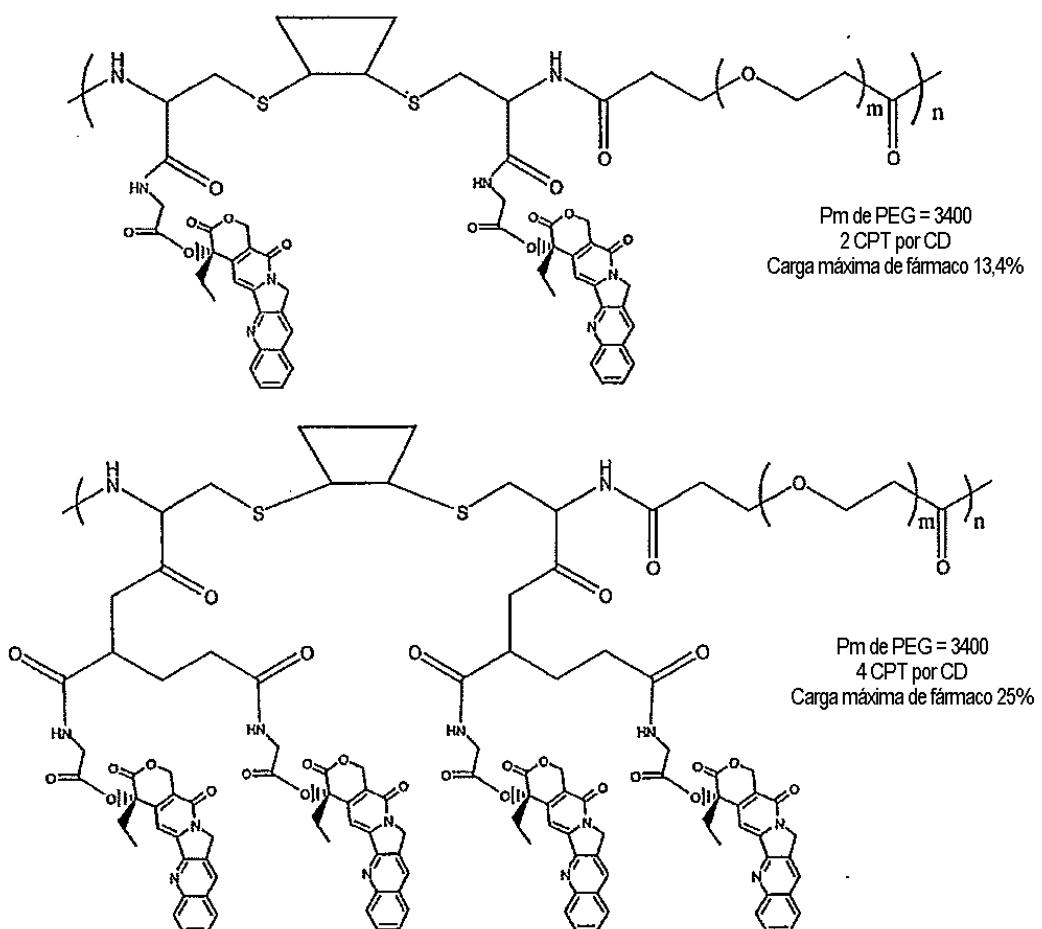
**42**

La síntesis del polímero y el conjugado de fármaco **42** son los mismos como para los compuestos **36**, **37** y **38** en el **ejemplo 28**.

*Método II. Síntesis del Copolímero de CD-BisCys-Peg con múltiples moléculas de fármaco en cada sitio de carga*

20 Ejemplo 34: Síntesis de CD-BisCys-Peg y su Conjugado de GluBis(GlyCPT) **43**.

Esquema XXXXIII



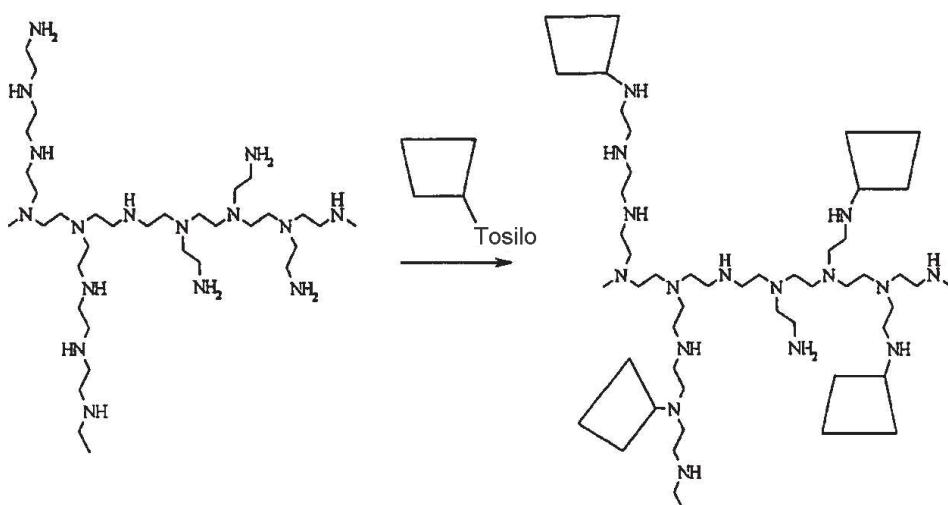
El compuesto **36** y Glu-Bis(Gly-CPT) **17** se disolvieron en DMSO. El EDC (3 eq.), NHS (2,2 eq.) y DIEA (2,2 eq.) se adicionaron a la solución. El CD-BisCys-Peg-GluBis (GlyCPT) **43** (no es de la invención) se precipitó con CH<sub>3</sub>CN y se lavó con el mismo disolvente hasta que no se detectó fármaco suelto utilizando radiación UV o la CCD. El compuesto **43** se secó bajo alto vacío.

5

Ejemplo de referencia 35: Síntesis del Conjugado de PEI-CD-CPT **44** (Polímero de CD ramificado con los conjugados de CPT)

A: Síntesis del polímero de PEI-ciclodextrina ramificado

Esquema XXXXIV

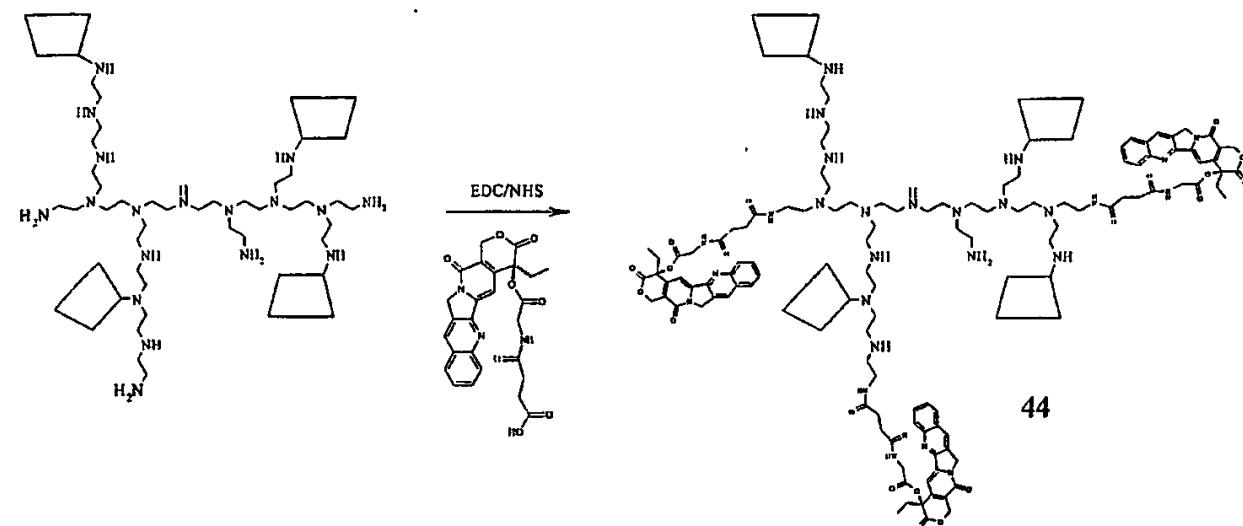


El PEI (29 mg, Aldrich peso molecular 25.000) se disolvió en DMSO seco (2 ml). El monotosilato de ciclodextrina (448 mg, Cyclodextrin Technologies Development, Inc.) se adicionó a la solución bajo N<sub>2</sub>. La solución turbia se volvió HPLCa después de que se agitara la mezcla a 70°C durante aproximadamente 1 hora. La solución se volvió de color ligeramente amarillo después de 48 horas a esta temperatura bajo N<sub>2</sub>.

- 5 La solución se transfirió a una membrana Spectra/Por MWCO 10.000 y se dializó contra agua durante 4 días. Luego se removió el agua mediante la liofilización. Se obtuvo un polvo de color blanco (120-140 mg) después de que se liofilizara la solución. La relación de ciclodextrina/PEI se calculó en base a la integración de protones de la RMN <sup>1</sup>H.

B: Síntesis del conjugado de PEI-CD-CPT ramificado

Esquema XXXV

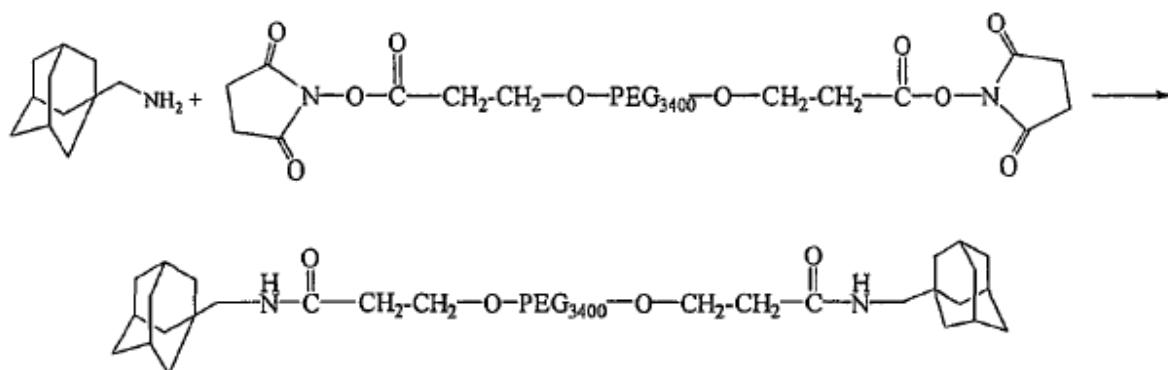


10

El PEI-CD y el Suc-Gly-CPT 15 (1,0 eq.) se disolvieron en DMSO. El EDC (3 eq.), NHS (2,2 eq.) y DIEA (1 eq.) se adicionaron a la solución. El PEI-CD-Gly-CPT 44 se precipitó con éter, se lavó extensivamente con este disolvente y se secó bajo alto vacío.

Ejemplo de referencia 36: Síntesis de Ad-PEG<sub>3400</sub>-AD 45

15 Esquema XXXVI



45

- 20 240 mg de 1-aminoadamantano (1,60 mmol, Aldrich) y 272 mg de PEG<sub>3400</sub>(SPA)<sub>2</sub> (0,080 mmol, Shearwater Polymers) se adicionaron a un frasquito de vidrio equipado con una barra agitadora. A esto se adicionaron 5 ml de diclorometano y la solución se agitó durante toda la noche. Al siguiente día, la solución se filtró para remover el subproducto de n-hidroxisuccinimida y el diclorometano se removió *in vacuo*. El residuo se disolvió en agua y se centrifugó para remover el 1-aminoadamantano en exceso. El sobrenadante luego se dializó durante toda la noche en un dispositivo Pierce's Slide-A-Lyzer con MWCO=3500. La solución luego se liofilizó para proporcionar 248 mg de un sólido mullido de color blanco de Ad-PEG<sub>3400</sub>-Ad 45.

Ejemplo de referencia 37: Síntesis de DiCiclodextrina PEG 46

362 mg de CD-NH<sub>2</sub> (0,32 mmol, Cyclodextrin Technology, Inc.) y 436 mg de PEG<sub>3400</sub>(SPA)<sub>2</sub> (0,128 mmol, Shearwater Polymers) se adicionaron a un frasquito de vidrio equipado con una barra agitadora. A este frasquito se adicionaron 4,36 ml de DMSO y la solución se agitó durante 72 horas. La solución se dializó utilizando una membrana 2000 MWCO durante 4 días en agua. El compuesto **46** (603 mg, 86%) se obtuvo como un polvo de color blanco después de la liofilización.

5

Ejemplo de referencia 38: Síntesis del Polímero de Inclusión **47** utilizando DiAD-Peg **45** y DiCD-PEG **46**

El compuesto **46** (54,6 mg, 0,01 mmol) y el compuesto **45** (34 mg, 0,01 mmol) se mezclaron en agua (0,27 ml) y se agitó durante toda la noche. La solución es muy viscosa. El polímero **47** se trituró con éter y se secó bajo vacío.

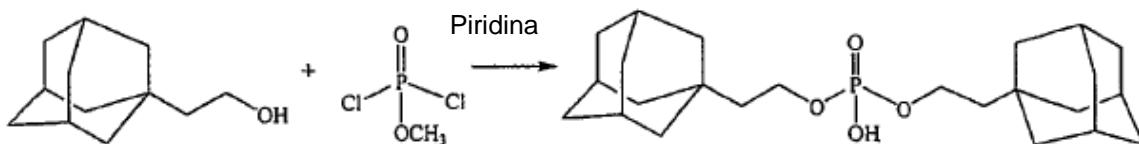
10

Ejemplo de referencia 39: Síntesis del Polímero de Inclusión CPT-Conjugado **48** entre DiCD-PEG **46** y un compuesto CPT-Di-AD

Síntesis del reticulador de diadamantano: Bis-(2(1-adamantil)etil)fosfato

(Zhang y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1676-1681)

Esquema XXXXVII



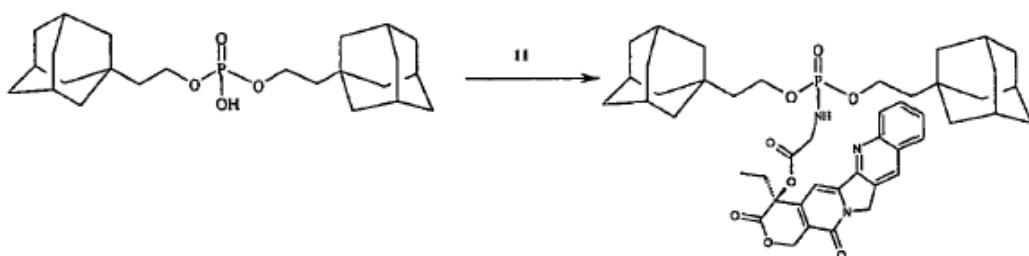
15

La piridina anhidra (10 ml, Aldrich, Milwaukee, WI) se enfrió en un baño de hielo y se adicionó gota a gota diclorofosfato de metilo (1,488 g, 10 mmol, Aldrich, Milwaukee, WI). La mezcla se mantuvo fría durante 15 minutos adicionales. Durante este periodo se formó un producto precipitado de diclorofosfato de N-metilpiridinio. Se adicionó 1-adamantano-etanol (4,758 g, 26,4 mmol, Aldrich, Milwaukee, WI) y la mezcla sellada se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego se vertió en una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10% (50 ml) y la piridina se evaporó bajo vacío. El sólido de color ligeramente amarillo se disolvió en 1 L de agua y se extrajo con éter (tres porciones de 150 ml). La fase acuosa se acidificó con HCl 2 N a pH 1, y luego se extrajo con tres porciones de 150 ml de CHCl<sub>3</sub>:n-BuOH (7:3). La capa orgánica, combinada (éter y CHCl<sub>3</sub>:n-BuOH) se lavó con agua y se formó un producto precipitado de color ligeramente amarillo en los disolventes mezclados, punto en el cual los disolventes se evaporaron bajo vacío. Se formó un sólido de color ligeramente amarillo y se recristalizó de acetona/hexano. El sólido se secó bajo vacío, rendimiento del 60%.

20

25

Esquema XXXXVIII



30

El Bis-(2(1-adamantil)etil)fosfato y el compuesto **11** se mezclaron en DMSO. El EDC (3 eq.), NHS (2,2 eq.) y DIEA (1 eq.) se adicionan a la solución. La solución se agitó bajo argón durante 16 horas. El Bis-(2(1-adamantil)etil)fosfato-Gly-CPT se precipitó con éter, se lavó extensivamente con este disolvente y se secó bajo alto vacío. Este compuesto y el Di-CD-PEG **46** se mezclaron en DMSO para formar el conjugado de inclusión de polimérico-CPT **48**.

Ejemplo de referencia 40: Síntesis de AD-Peg-Folato **49**

El siguiente procedimiento es la síntesis de AD-Peg<sub>5000</sub>-folato. Este método se puede adaptar para la síntesis de cualquier molécula tri-componente molécula invitada-Conector-Ligando.

35

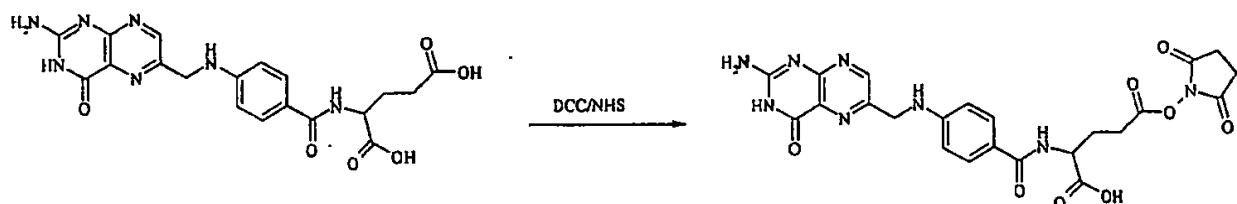
1. Síntesis de AD-Peg-NH<sub>2</sub>

266 mg de FMOC-PEG<sub>5000</sub>-NHS (78,2 umol, Shearwater Polymers, Huntsville AL) se adicionaron a un frasquito de vidrio equipado con una barra agitadora, magnética. Luego se adicionaron 10 eg. de 1-adamantano-metilamina (1,5 mmol, Aldrich) disueltos en 3 ml de diclorometano y la solución se agitó durante toda la noche a temperatura

ambiente. El disolvente se removió *in vacuo* y se adicionó agua a la solución restante para disolver el producto de PEG. La solución se centrifugó a 20K rcf durante 10 minutos, después de lo cual la adamantano-metilamina se separó en fases como un líquido más denso. La porción acuosa se colectó y el agua se removió *in vacuo*. El líquido viscoso, restante se disolvió nuevamente en piperidina al 20% en DMP para la desprotección de FMOC y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El disolvente se removió *in vacuo*, se lavó varias veces con DMF, se disolvió nuevamente en agua y se condujo en una columna de intercambio aniónico para remover el PEG sin reaccionar. Las primeras fracciones se colectaron y se lyophilizaron para producir 222 mg de un polvo mullido de color blanco (rendimiento del 76%) del producto deseado, el cual se confirmó mediante el análisis de MALDI-TOF.

## 2. Síntesis de *N*-Hidroxisuccinimida-folato (NHS-folato)

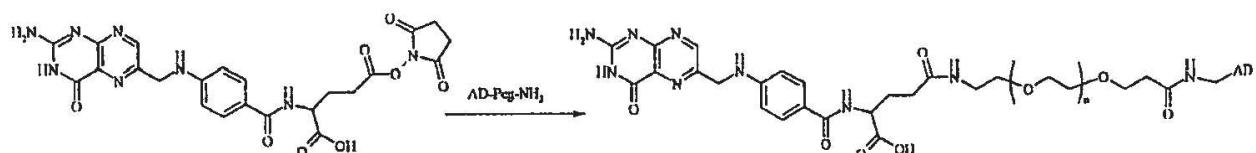
10 Esquema XXXIX



El NHS-folato se sintetizó de acuerdo con el método de Lee y Low (Lee, R. J; Low, P. S. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 3198-3204). El ácido fólico (5 g, 11,3 mmol; Sigma) se disolvió en DMSO (100 ml) y trietilamina (2,5 ml) y se hizo reaccionar con N-hidroxisuccinimida (2,6 g, 22,6 mmol) y diciclohexilcarbodiimida (4,7 g, 22,7 mmol) durante toda la noche a temperatura ambiente. La solución se filtró y se concentró bajo presión reducida. El NHS-folato se precipitó utilizando éter dietílico (producto precipitado de color amarillo-anaranjado) y se lavó 2-3 veces en éter anhidro, se secó bajo vacío y se almacenó a -20°C.

## 3. AD-Peg<sub>5000</sub>-folato

Esquema L



20 49

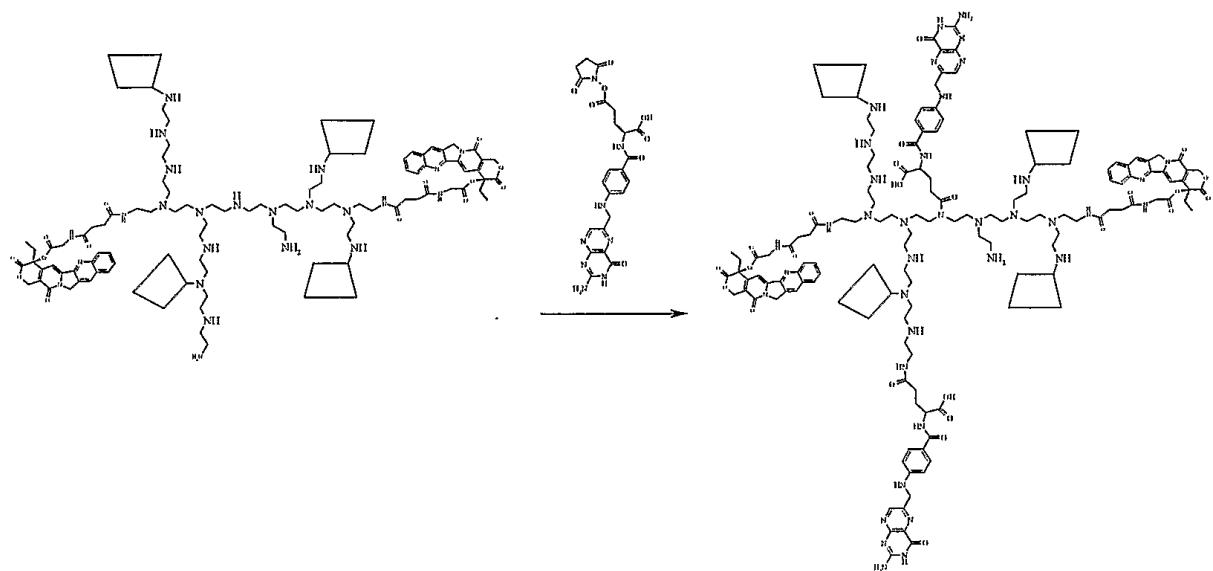
El AD-Peg<sub>5000</sub>-NH<sub>2</sub> y el NHS-folato se mezclaron en 1:1 eq. en solución de DMSO. Se adicionó DIEA (2 eq.). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de DMSO luego se dializó contra una membrana 3500 MWCO (Spectra/Por 7) durante 48 horas. El AD-Peg<sub>5000</sub>-folato **49** se obtuvo después de la lyophilización.

25 Ejemplo de referencia 41: Formulación del AD-Peg-Folato y un conjugado de CD-Polímero-CPT

Un procedimiento típico: Un conjugado de CD-polímero CPT se disolvió en un amortiguador D5W. Una solución de D5W que contenía 0,1-1 eq. (moles de unidad de repetición) de solución de AD-Peg-Folato se adicionó a la solución polimérica. Los tamaños de partícula del polímero se midieron antes y después de la adición de AD-Peg-Folato utilizando la dispersión de luz. Esta solución se utilizó para la prueba ya sea *in vitro* o *in vivo* para el análisis de los efectos de establecimiento de objetivos de folato.

30 Ejemplo de referencia 42: Enlace Covalente de un ligando de establecimiento de objetivos (por ejemplo, folato) a un conjugado polimérico de CD-CPT (por ejemplo-PEI-CD-GlyCPT) **50**

Esquema LI



El PEI-CD-GlyCPT 44 y el Folato-NHS (0,1-0,5 eq.) se mezclaron en DMSO y se agitaron durante 24 horas. El polímero se trituró con éter y se lavó extensivamente con este disolvente hasta que no se pudo detectar moléculas de folato sueltas. El conjugado de polímero de CD-CPT-folato resultante 50 se seca bajo vacío.

5 Ejemplo de referencia 43: Reticulación del polímero de CD-CPT utilizando Ad-Peg-Ad 51

Un procedimiento típico: El AD-Peg-AD 45 (0,01-0,1 eq. de unidad de repetición de polímero de CD) y el conjugado de polímero de CD-CPT se mezclaron en una cantidad mínima de DMSO. La solución viscosa, resultante se precipitó con éter y se secó bajo vacío para producir el polímero ligeramente reticulado 51. El compuesto 51 todavía debe mantener un tamaño de partícula pequeño en la solución, tiene buena solubilidad en agua y tiene un peso molecular más alto que el conjugado de polímero de CD-CPT precursor.

Ejemplo 44: Pruebas *in vivo* de conjugados poliméricos de camptotecina **HGGG6**, **LGGG10**, **HG6** y **HGGG10** (Sintetizados de acuerdo con el **ejemplo 28**).

A. Toxicidad *In Vivo* y Análisis Químico de la Sangre de la Dosificación con el Polímero Precursor 36e

La toxicidad del compuesto **36e** y sus efectos sobre la química de la sangre se evaluaron en ratonas desnudas Charles River (13-14 semanas de edad). Cuatro grupos de tratamiento de seis ratones cada uno se trataron con una solución de D5W del compuesto **36e** en una dosis de 240 mg/kg, 160 mg/kg, 80 mg/kg o D5W solo mediante la inyección i.v. en la vena de la cola en los días 1, 5 y 9, respectivamente. El volumen de dosificación se determinó en base a una relación de 200  $\mu$ L para un ratón de 20 g y se amplió a escala apropiadamente de acuerdo con el peso corporal, real del ratón. Los pesos corporales de los ratones se siguieron diariamente durante los primeros 5 días y luego dos veces a la semana, después. Las muestras de sangre (150-200  $\mu$ L) se colectaron de cada ratón mediante el sangrado retroorbital bajo isoflourano en el día 12. Las muestras de tres ratones en cada grupo se utilizaron para completar el análisis de conteo de sangre completa (CBC), mientras que las muestras de sangre de los tres ratones restantes en cada grupo se procesaron para el análisis químico de la sangre. El estudio se detuvo el día 23. Todos los ratones se sometieron a la eutanasia mediante la perforación cardíaca bajo CO<sub>2</sub> y la sangre de cada ratón se colectó para el CBC y el análisis químico de la sangre de la misma manera como en el día 12.

No hubo diferencia significante en los datos de la pérdida de peso corporal, CBC o química sanguínea entre cualquiera de los grupos tratados con el compuesto **36e** y el grupo de control D5W por todo el estudio y no se observaron efectos dependientes del tiempo durante los 2,3 días para todos los grupos tratados. El compuesto **36e** -fue bien tolerado por los ratones en la dosis máxima tratada (240 mg/kg).

30 B. Determinación de Dosis Máxima Tolerable (MTD) para los Conjugados de CDP-CPT

La MTD se determinó utilizando ratonas desnudas Charles River (15-16 semanas de edad) para **HG6**, **LGGG10** (no es de la invención), **HGGG10** (no es de la invención), 5% (p/v) de solución de dextrosa (D5W) de los conjugados de polímero-CPT se preparó recientemente antes de cada inyección. Las dosis para los grupos de tratamiento varió de 2,25 mg de CPT/icg a 54 mg de CPT/kg. La dosificación se administró intravenosamente (i.v.) mediante una inyección en la vena de la cola en los días 1, 5 y 9. El volumen de dosificación se determinó en base a una relación

de 200  $\mu\text{L}$  para un ratón de 20 g y se amplió a escala apropiadamente de acuerdo con el peso corporal real (BW) del ratón. Se utilizaron de tres a cinco ratones en cada grupo de tratamiento. Los pesos corporales de los ratones se siguieron diariamente durante los primeros 5 días y luego dos veces a la semana, después. La MTD se definió como la dosis más alta administrada que dio por resultado una disminución del peso corporal promedio del grupo de 5 menos de 20% o la dosis más alta administrada que no dio por resultado la muerte de algún animal en este grupo. La pérdida de peso corporal promedio, máxima y las muertes relacionadas con el tratamiento para todos los grupos tratados-se listan en la tabla 5.

Tabla 5. Respuesta de Tratamiento para el estudio de MTD. Las ratonas desnudas ( $n= 3-6$ ) se trataron i.v. mediante la inyección en la vena de la cola.

Agente	mg/kg <sup>a</sup>	% Max. de Pérdida de BW; Día <sup>b</sup>	N <sub>TR</sub> /N <sup>c</sup>
<b>DSW</b>	-	-2,5%; Día 3	0/6
<b>36e</b>	240	-2,0%; Día 3	0/6
<b>36e</b>	160	-3,5%; Día 13	0/6
<b>36e</b>	80	-2,3%; Día 3	0/6
<b>LGGG10</b>	54	-20,6%; Día 3	3/3
<b>LGGG10</b>	36	-9,3%; Día 13	0/3
<b>LGGG10</b>	18	0	0/3
<b>LGGG10</b>	9	0	0/5
<b>LGGG10</b>	4,5	-0,8%; Día 13	0/5
<b>HG6</b>	54	-28,5%; Día 3	3/3
<b>HG6</b>	36	-23,9%; Día 3	3/3
<b>HG6</b>	18	-22,1%; Día 3	3/3
<b>HG6</b>	9	-6,1%; Día 9	0/5
<b>HG6</b>	4,5	-4,4%; Día 5	0/5
<b>HG6</b>	2,25	-2,9%; Día 9	0/5
<b>HGGG10</b>	54	--	
<b>HGGG10</b>	36	-34%; Día 5	3/3
<b>HGGG10</b>	18	-16%; Día 3	1/3
<b>HGGG10</b>	9	-3,3%; Día 9	0/5
<b>HGGG10</b>	4,5	-2,5%; Día 9	0/5

<sup>a</sup> mg de CDP/kg para el copolímero de CDP y mg de CPT/kg para los tres conjugados sometidos a prueba.

<sup>b</sup> Pérdida de peso corporal máxima (BW) observada después de la inyección.

<sup>c</sup> Número de muertes relacionadas con el tratamiento (N<sub>TR</sub>) al número de ratones tratados (N)

- 10 La MTD de **LGGG10**, **HG6** y **HGGG10** se determinaron que con 36 mg de CPT/kg, 9 mg de CPT/kg y 9 mg de CPT/kg, respectivamente. En base a las similitudes estructurales entre **HGGG6** y **HGGG10**, se espera que la MTD para estos dos grupos sea similar. Por lo tanto, la MTD de **HGGG6** (no sometido a prueba) se supuso que era 9 mg de CET/kg.

#### C. Estudio de Eficacia Antitumoral

- 15 El estudio de eficacia antitumoral se realizó utilizando ratonas desnudas Charles River (15-16 semanas de edad) Un fragmento ( $1 \text{ mm}^3$ ) de tejido de carcinoma de colon de humano LS174T se implantó subcutáneamente (s.c.) en el costado derecho de cada ratón de prueba aproximadamente 14-18 días antes de la dosificación. El volumen del tumor se determinó al medir el tumor en dos dimensiones con calibradores y se calculó utilizando la fórmula: valor del tumor = ( $\text{longitud} \times \text{anchura}^2$ )/2. El volumen del tumor se convirtió al peso del tumor suponiendo que  $1 \text{ mm}^3$  es igual a 1 mg de tumor en peso. El tratamiento se inició cuando el tamaño del tumor promedio alcanzó aproximadamente 60-100 mg (día 1). Los animales se clasificaron en doce grupos. Cada grupo consistió de siete ratones con tamaños del tumor que variaban de 62,5-144,0 mg con los tamaños del tumor promedio del grupo de 88,6-90,7 mg. Los ratones en cada grupo se trataron de acuerdo con el protocolo listado en la tabla 6. Todos los 20

tratamientos con el conjugado se administraron intravenosamente mediante la inyección en la vena de la cola. Los tamaños del tumor se midieron dos veces a la semana por la duración del experimento. Al final del estudio, los tumores de cada ratón sometido a la eutanasia se recolectaron y se congelaron a -80°C.

Tabla 6. Protocolo de Dosificación para -el estudio de eficacia<sup>a</sup>

Grupo	Agente	Dosis (mg de CPT/kg) <sup>b</sup>	Ruta <sup>c</sup>	Programa <sup>d</sup>
1	D5W	-	i.v.	Q4D x 3
2	CPT	9	i.p.	Q4D x 2 <sup>e</sup>
3	Irinotecan	100 <sup>f</sup>	i.p.	Qwk x 3
4	HGGG6	9	i.v.	Q4D x 3
5	HGGG6	4,5	i.v..	Q4D x 3
6	LGGG10	36	i.v.	Q4D x 3
7	LGGG10	18	i.v..	Q4D x 3
8	LGGG10	9	i.v.	Q4D x 3
9	HG6	9	i.v.	Q4D x 3
10	HG6	9	i.v.	Q4D x 3
11	HGGG10	9	i.v.	Q4D x 3
12	HGGG10	4,5	i.v.	Q4D x 3

<sup>a</sup> Se utilizaron siete ratones en cada grupo

<sup>b</sup> Las dosis son equivalentes de la CPT excepto para el grupo 3

<sup>c</sup> i.p. = intraperitoneal, i.v. = intravenosa

<sup>d</sup> Los programas de administración fueron abreviados como: Q4D x 3 = tres inyecciones con intervalos de cuatro días, Qwk x 3 = tres inyecciones con un intervalo de una semana, la primera dosis se inició en el día 1 para todos los grupos.

<sup>e</sup> La tercera dosis programada no se administró debido a la toxicidad emergente

<sup>f</sup> 100 mg de irinotecan/kg.

- 5 Cada animal se sometió a la eutanasia cuando el peso del tumor alcanzó el tamaño a punto final predeterminado (1.500 mg). El tiempo para punto final (TTE) para cada ratón se calculó a partir de la ecuación: TTE = (logaritmo (punto final-b)/m, donde b y m son la intersección y la pendiente, respectivamente, de la línea obtenida por la regresión lineal de un conjunto de datos del crecimiento del tumor de logaritmo transformado comprendido de la primera observación que excedió el volumen de punto final del estudio y las tres observaciones consecutivas que precedieron inmediatamente la obtención del volumen de punto final. A los animales que no alcanzan el punto final se les asignó un valor de TTE igual al último día del estudio (114 días). A los animales clasificados como muertes relacionadas con el tratamiento (TR) se les asignó un valor de TTE igual al día de la muerte, Los animales clasificados como muerte no relacionada con el tratamiento (NTR) se excluyeron de los cálculos de TTE. El retardo de crecimiento del tumor (TGD), definido como el incremento en el tiempo promedio al punto final (TTE) en un grupo de tratamiento comparado con el grupo de control, se investigó un parámetro para evaluar la eficacia del tratamiento. La TGD se calculó como la diferencia entre el TTE promedio para un grupo de tratamiento y el TTE promedio del grupo de control (TGD = T - C) y se expresa en los días, y como un porcentaje del TTE promedio del grupo de control; % de TGD = (T-C)/C, donde T es igual al TTE promedio para grupos de tratamiento y C es igual al TTE promedio para el grupo de control 1.
- 10 20 Toxicidad. Los animales se pesaron diariamente en los días 1-5, luego dos veces a la semana, después. Los ratones se examinaron frecuentemente por los signos conocidos de cualquier efecto colateral, adverso relacionado con el fármaco. La toxicidad aceptable para los fármacos contra el cáncer en los ratones es definida por la NCI como una pérdida de peso corporal promedio del grupo menor que 20% durante el estudio y no más de una muerte tóxica entre los siete animales tratados.
- 15 25 Los resultados para este estudio de eficacia que incluyen los valores de TTE promedio, carga de tumor promedio en el día 114, respuesta al tratamiento y las muertes se resumen en la tabla 7.

Tabla 7.

Grupo	TTE Promedio <sup>a</sup>	T-C <sup>b</sup>	% de TGD <sup>c</sup>	Carga de Tumor Promedio en mg (N <sub>s</sub> <sup>d</sup> )	N <sub>TR</sub> <sup>e</sup> / N <sub>NTR</sub> <sup>f</sup> / N <sub>EU</sub> <sup>g</sup>	Pvs D5W <sup>h</sup>	P vs CPT <sup>i</sup>
1	34,9	-	-	-(0)	0/1/6	-	-
2	51,4	16,5	47%	-(0)	2/0/5	0,2128	-
3	68,7	33,8	97%	1152(3)	0/0/4	0,0002	0,0253
4	114,0	79,1	227%	256 (5)	1/0/1	0,0040	0,0115
5	65,6	30,7	88%	566 (2)	0/1/4	0,0046	0,1369
6	100,0	65,1	187%	666 (3)	4/0/0	- 0,0272	0,0289
7	75,6	40,7	117%	221 (3)	0/0/4	0,0018	0,0601
8	63,2	28,3	81%	700 (1)	1/0/5	0,0006	0,1064
9	114,0	79,1	227%	394(4)	0/0/3	0,0002	0,0028
10	74,2	39,3	113%	668 (2)	1/1/3	0,0016	0,0673
11	114,0	79,1	227%	500 (5)	1/0/1	0,0040	0,0050
12	78,0	43,1	123%	1010 (2)	0/0/6-	0,0006	0,0392

<sup>a</sup> TTE = Tiempo (Dias) para el punto final (1500 mg)<sup>b</sup> T-C = Diferencia entre TTE (Dias) del grupo tratado contra el grupo de control<sup>c</sup> % de TGD = [(T-C)/C]<sup>d</sup> Supervivencia de los ratones<sup>e</sup> N<sub>TR</sub> = Número de muertes relacionadas con el tratamiento<sup>f</sup> N<sub>NTR</sub> = Número de muertes no relacionadas con el tratamiento<sup>g</sup> N<sub>EU</sub> = Número de ratones sometidos a la eutanasia después de que alcanzaron el punto final<sup>h</sup> Valor P contra el grupo de tratamiento de D5W (Grupo 1)<sup>i</sup> Valor P contra el grupo de tratamiento de CPT (Grupo 2)

Se observó una muerte NTR en el dia 72 en los animales de control tratados con D5W. Los tumores en los otros seis ratones de control crecieron al tamaño de punto final de 1500 mg, produciendo un TTE promedio de 34,9 días (tabla 7).

- 5 Se reportaron dos muertes relacionadas con el tratamiento en el dia 9 para CPT a 9 mg/kg. De esta manera, la CPT se debe considerar que es tóxica a esta dosis en este experimento. El TTE promedio para este grupo fue 51,4 días, que corresponde a un valor T-C de 16,5 días y un TGD de 47%, con relación a los ratones de control sin tratar (*no significante*). No sobrevivió un animal en el grupo 2 para el dia 114.
- 10 El grupo 3 recibió irinotecan i.p. a 100 mg/kg (Qwk x 3). El TTE promedio para el grupo 3 fue 68,7 días, que corresponde a un valor T-C significante de 33,8 días y un TGD de 97%, con relación a los ratones de control (*P < 0,01*). Sobrevivieron tres animales en el día 114 con una carga de tumor promedio de 1.152 mg. No se registraron regresiones.
- 15 Los grupos 4 y 5 recibieron **HGGG6** i.v. Q4D x 3 en 9 y 4,5 mg de CPT/kg, respectivamente. Se observó una muerte relacionada con el tratamiento en el día 16 en el grupo 4 y se registró una muerte NTR en el día 37 en el grupo 5. El TTE promedio para el grupo 4 fue 114 días, el valor posible, máximo en este estudio. Este valor de TTE corresponde a un valor T-C significante de 79,1 días y un TGD de 227%, con relación al control (*P < 0,01*). Los tumores en los cinco ratones del grupo 4 no alcanzaron el punto final de 1.500 mg. Estos cinco ratones tuvieron una carga de tumor promedio de 256 mg en el día 114. El TTE promedio para el grupo 5 fue 65,6 días y corresponde a un valor T-C significante de 30,7 días y un TGD de 88%, con relación al control (*P < 0,01*).
- 20 Los grupos 6-8 se trajeron con **LGGG10** i.v. Q4D x 3 a 36, 18 y 9 mg de CPT/kg, respectivamente. Aunque no se observaron muertes en el estudio de MTD utilizando este conjugado en ratones que no llevan tumor a 3 6 mg de CPT/kg (tabla 5), se registraron cuatro muertes relacionadas con el tratamiento en el grupo 6 cuando a los ratones que llevan el tumor se les dio esta dosis, dos en el dia 16 y una en cada uno de los días 75 y 100. Estos resultados

indican que 36 mg de CPT/kg está probablemente sobre la MTD de **LGGG10**. Como se muestra en la tabla 5, no se registró una pérdida de peso corporal significante en el estudio de MTD cuando los ratones se dosificaron a 18 mg de CPT/kg, indicando que esta dosis está abajo de la MTD. Por lo tanto, la MTD de **LGGG10** se encuentra en alguna parte entre 18 a 36 mg de CPT/kg. El TTE promedio para el grupo 7 (18 mg de CPT/kg) fue 75,6 días. Este valor de TTE corresponde a un valor T-C significante de 40,7 días y un TGD de 117%, con relación a los ratones de control ( $P < 0,01$ ). Tres ratones en este grupo tuvieron una carga de tumor promedio de 221 mg en el día 114. Se registró una muerte TR tardía en el día 103 en el grupo 8 (9 mg de CPT/kg). El TTE promedio para el grupo 8 fue 63,2 días. Este valor de TTE corresponde a un valor T-C significante de 28,3 días y un TGD de 81%, con relación a los ratones de control sin tratar ( $P < 0,01$ ). Los ratones restantes en este grupo tuvieron una carga de tumor de 700 mg en el día 114.

Los grupos 9 y 10 se dosificaron con **HG6** i.v. Q4D x 3 a 9 y 4,5 mg de CPT/kg, respectivamente. Se registraron una muerte TR y una muerte NTR en el grupo 10 en los días 47 y 84, respectivamente. El TTE promedio para el grupo 9 fue el máximo, 114 días. Este valor de TTE corresponde a un valor T-C significante de 79,1 días y un TGD de 227%, con relación a los ratones de control sin tratar ( $P < 0,01$ ). Cuatro ratones en el grupo 9 tuvieron una carga de tumor promedio de 394 mg en el día 114. El TTE promedio para el grupo 10 fue 74,2 días. Este valor de TTE corresponde a un valor T-C significante de 39,3 días y un TGD de 113%, con relación a los ratones de control ( $P < 0,01$ ). Los dos ratones restantes en el grupo 10 tuvieron una carga de tumor promedio de 668 mg en el día 114.

Los grupos 11 y 12 se dosificaron con **HGGG10** i.v. Q4D x 3 a 9 y 4,5 mg de CPT/kg, respectivamente. Se registró una muerte relacionada con el tratamiento en el día 16 en el grupo 11. El TTE promedio para los grupos 11 y 12 fueron 114 días y 78 días, respectivamente. El valor de TTE para el grupo corresponde a un valor T-C significante de 79,1 días y un TGD de 227%, con relación a los ratones de control ( $P < 0,01$ ). Los tumores en cinco ratones en el grupo 11 no alcanzaron el punto final; estos cinco ratones tuvieron una carga de tumor promedio de 500 mg en el día 114. El valor de TTE del grupo 12 corresponde a un valor T-C significante de 43,1 días y un TGD de 123%, con relación a los ratones de control ( $P < 0,01$ ). Los dos ratones restantes en este grupo tuvieron una carga de tumor promedio de 1.010 mg en el día 114.

La curva de crecimiento del tumor como una función de tiempo para D5W, CPT, irinotecan, **LGGG10** en su dosis no tóxica más alta sometida a prueba {18 mg de CPT/kg} y los otros tres conjugados con el polímero de alto peso molecular (**HGGG6**, **HG6**, **HGGG10**) en sus MTDs se mostraron en la figura 8. Los tres conjugados de alto peso molecular administrados en sus MTDs exhibieron una inhibición del crecimiento del tumor más prolongada comparada con D5W, CPT e irinotecan. Las curvas de crecimiento del tumor promedio para **HGGG6**, **BG6** y **HGGG10** que se ilustran en la figura 9 muestran que existe una respuesta a la dosis distinta para todos estos tres polímeros cuando se dosifican en su MTD y a la mitad de su MTD. Las curvas de crecimiento del tumor promedio para **LGGG10** y **HGGG10** cada uno dosificado en 9 mg de CPT/kg como se ilustra en la figura 10 demuestra que el conjugado de polímero-fármaco de alto peso molecular tiene mayor efecto antitumoral cuando se compara con los conjugados de bajo peso molecular presumiblemente debido a la acumulación aumentada (efecto EPR) y eliminación renal reducida.

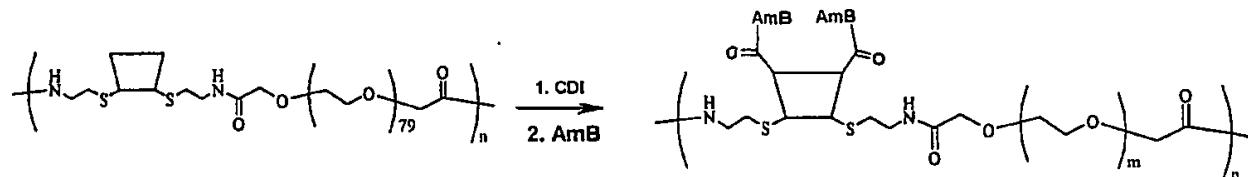
**Pérdida de Peso Corporal Promedio de los Ratones.** Las pérdidas de peso corporal promedio (MBW) como función de tiempo se transfirieron a un diagrama para D5W, CPT, irinotecan y los tres conjugados que contienen el polímero de alto peso molecular en sus MTDs (figura 11). Las pérdidas máximas de MBW observadas en el grupo 2 (CPT) y los dos conjugados con el conector de triglicina dosificado en sus MTDs (grupos 4 y 11) fueron 13,1%, 18,3% y 12,6%, respectivamente. La pérdida máxima de MBW de **HG6** (3,4%), el único conjugado con un conector de glicina, fue similar a la pérdida máxima de MBW para irinotecan (5,0%). Las pérdidas máximas, insignificantes de peso corporal promedio del grupo (<5%) se registraron en todos los otros grupos de tratamiento y en el grupo D5W. El peso corporal promedio volvió a los niveles de línea de base para todos los grupos de tratamiento después del cese de la terapia.

D. Correlación del Tamaño del tumor del ratón sometido a la eutanasia y la concentración de CPT en el tumor correspondiente

Cada tumor recolectado de los ratones en la terminación del estudio de ratones de xenoinjerto LS174T se descongeló y se colocó en un tubo de lisis de 2 ml (Lysing Matrix D, Qbiogen). 300  $\mu$ L de reactivo de lisis (Cellytic-MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction reagent) se adicionaron a cada tubo. El tejido se homogenizó en un homogenizador FastPrep FP12 (Qbiogen) a 5 m/s durante 40 segundos. La homogenización se repitió seis veces con un intervalo de 10 minutos entre la homogenización sucesiva. La solución homogenizada se centrifugó a 14000 g durante 15 minutos a 10°C. 90  $\mu$ L de la solución se introdujeron con una jeringa, a la cual se adicionaron 10  $\mu$ L de NaOH 1N. Una alícuota de 400  $\mu$ L de MeOH se adicionó a esta solución después de dejar reposar la solución homogenizada durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución se centrifugó durante 15 minutos a 14000 g. El sobrenadante (270  $\mu$ L) se mezcló con 30  $\mu$ L de HCl 1N y se inyectó en una HPLC para el análisis. La correlación de la concentración de CPT (ng/mg de tejido) con el tamaño de tumor (en mg) se ilustra en la figura 12. La concentración de CPT se correlacionó inversamente al tamaño del tumor.

Ejemplo de referencia 45: Síntesis de Poli(CDDC-PEG)-Anfotericina B 52 por vía de un conector de amida

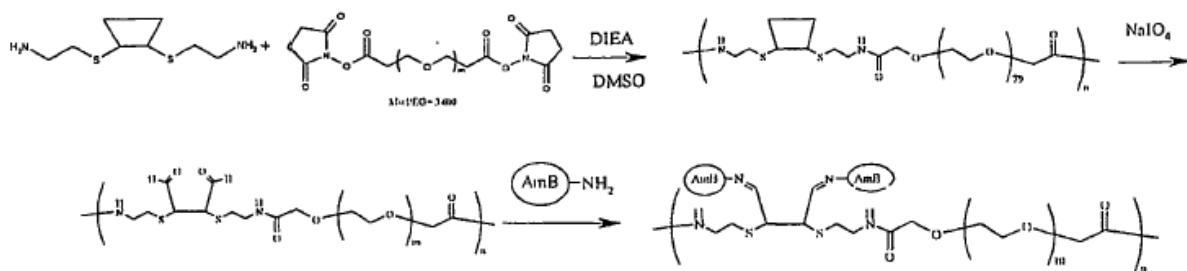
## Esquema LII



52

El poli(CDDCPEG) (788 mg) y el 1,1'-carbonil-diimidazol (CDI, 1,45 g, 50 eq.) se agitaron en DMSO anhidro (10 ml) en presencia de DMAP (429 mg, 20 eq.) durante 16 horas. Se adicionó éter (200 ml) a la mezcla para precipitar el poli(CDDC-PEG)-carbonil-imidazol. El sólido de color amarillo resultante se lavó con éter 2 x 200 ml y se secó bajo vacío. El sólido se disolvió en DMSO anhidro (15 ml), seguido por la adición de AmB (332 mg, 2 eq.) y DMAP (43,0 mg, 2 eq.). La solución se agitó en la oscuridad durante 48 horas y se dializó en agua utilizando una membrana 25000 MWCO durante 3 días. La solución luego se filtró utilizando un filtro de 0,2 µm y se liofilizó. Se obtuvo un sólido de color amarillo (920 mg) **52**. El % en peso de AmB es alrededor de 13%.

10 Ejemplo de referencia 46: Síntesis de Poli(CDDC-PEG)-Anfotericina B **53** por vía de un conector de imina

**53**

15 El compuesto **3** y PEG-DiSPA (relación 1:1) se secaron bajo vacío a temperatura ambiente. El DMSO (10 mg del compuesto **3**/ml de DMSO) se adicionó al sólido, y siguió la adición de DIEA (2 eq.) a la mezcla. El polímero se trituró con éter en exceso 5 días después y se dializó utilizando una membrana 25000 MWCO durante 48 horas. El rendimiento de poli(CDDC-PEG) es de 80-95%. El peso molecular del polímero se determinó utilizando GPC que era 70-100 kDa.

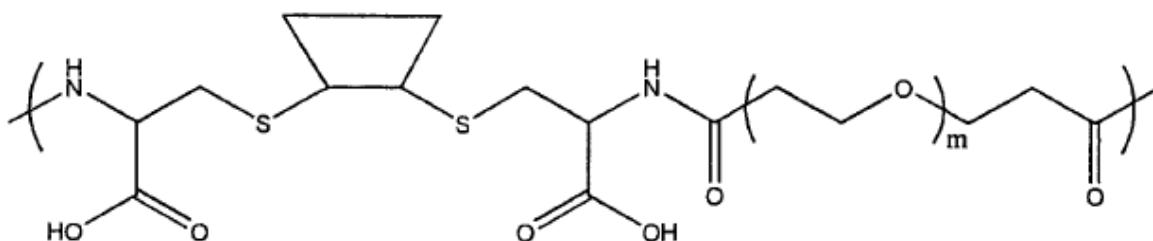
20 El poli(CDDC-PEG) (1,124 g, 0,25 mmol) se disolvió en agua (55 ml). Se adicionó NaIO4 (0,264 g, 5 eq.). La solución se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos y se almacenó a 4°C durante 24 horas en la oscuridad. La solución de BaCl2 se adicionó (5,05 eq.) a la solución para proporcionar una precipitación inmediata de Ba(IO4)2. El producto precipitado se filtró. La solución saturada de Na2CO3 se adicionó para ajustar el pH a 11. La anfotericina B (343 mg, 1,5 eq.) luego se adicionó a la solución y se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 48 horas. El pH de la solución se mantuvo para ser 11 al adicionar NaOH (0,1N) por toda la reacción. La solución se dializó a 4°C durante 48 horas utilizando una membrana 25000 MWCO y se liofilizó para proporcionar 1,03 g del conjugado de polímero-AmB **53** como un polvo de color amarillo. El % en peso de AmB se determinó que era 18 utilizando un espectrómetro de radiación UV a 405 nm.

## D. Referencias

30 Los polímeros que contienen ciclodextrina adicional que se pueden modificar de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, así como también los métodos para preparar estos polímeros, se describen en las solicitudes de patente norteamericanas Nos. 09/203,556, 09/339,818, 09/453,707, 10/021,294 y 10/021,312 (publicadas como US 6.509.323, US 7.091.192, US 7.375.096, US 7.166.302 y US 7.018.609 respectivamente).

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un polímero que contiene ciclodextrina lineal, comprendiendo el proceso hacer reaccionar un polímero formado por la unidad repetitiva de fórmula B:



(B)

5 donde

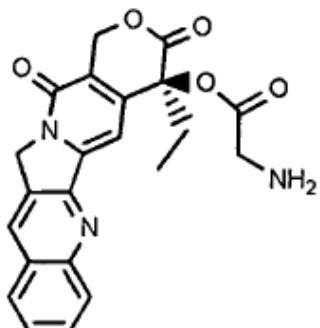


representa un resto de ciclodextrina; y



representa un polietilenglicol;

10 con un compuesto de fórmula C:



(C)

donde el polímero formado por la unidad repetitiva de fórmula B y el compuesto de fórmula C se hacen reaccionar en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

2. Un proceso según la reivindicación 1, en el que el resto de ciclodextrina es un resto de  $\beta$ -ciclodextrina.

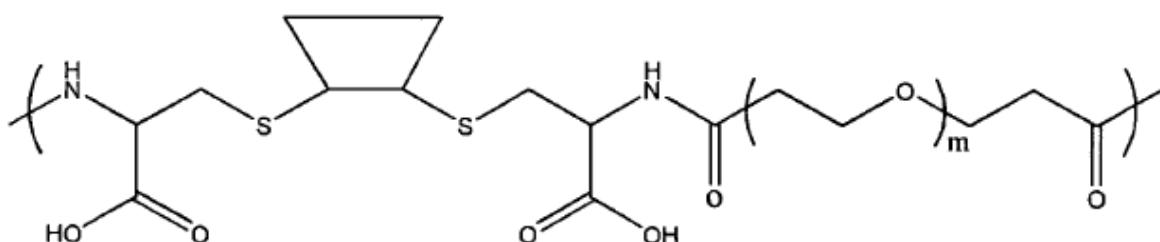
15 3. Un proceso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el proceso comprende además formar una preparación farmacéutica que comprende el polímero que contiene ciclodextrina lineal.

4. Un polímero que contiene ciclodextrina lineal que se puede obtener por el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

20 5. Una preparación farmacéutica que comprende el polímero de la reivindicación 4 o un éster, sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo; y un excipiente farmacéutico.

6. Un polímero de la reivindicación 4, para usar como sustancia terapéutica.

7. Un polímero formado por la unidad repetitiva de fórmula B:



(B)

donde



representa un resto de ciclodextrina; y

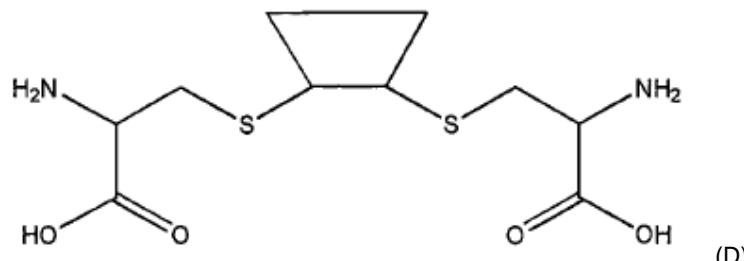


5

representa un polietilenglicol;

8. Un polímero según la reivindicación 7, en el que el resto de ciclodextrina es un resto de  $\beta$ -ciclodextrina.

9. Un proceso para producir el polímero de la reivindicación 7, en el que el proceso comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula D:



10

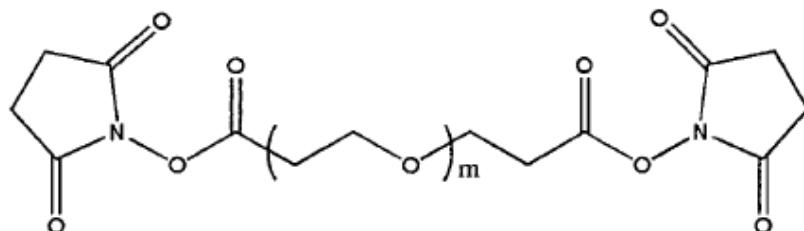
(D)

donde



representa un resto de ciclodextrina;

con un compuesto de fórmula E:



(E)

15

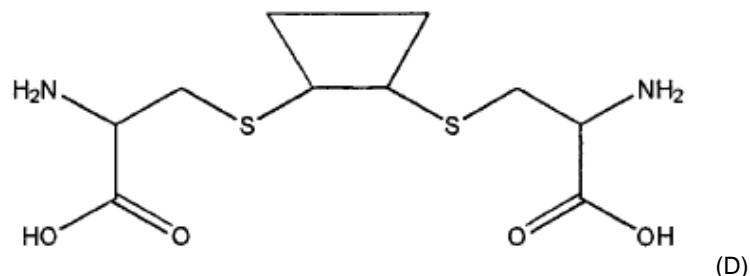
donde



representa un polietilenglicol;

donde el compuesto de fórmula D y el compuesto de fórmula E se hacen reaccionar en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) y diisopropiletilamina (DIEA).

- 5 10. Un compuesto de fórmula D:



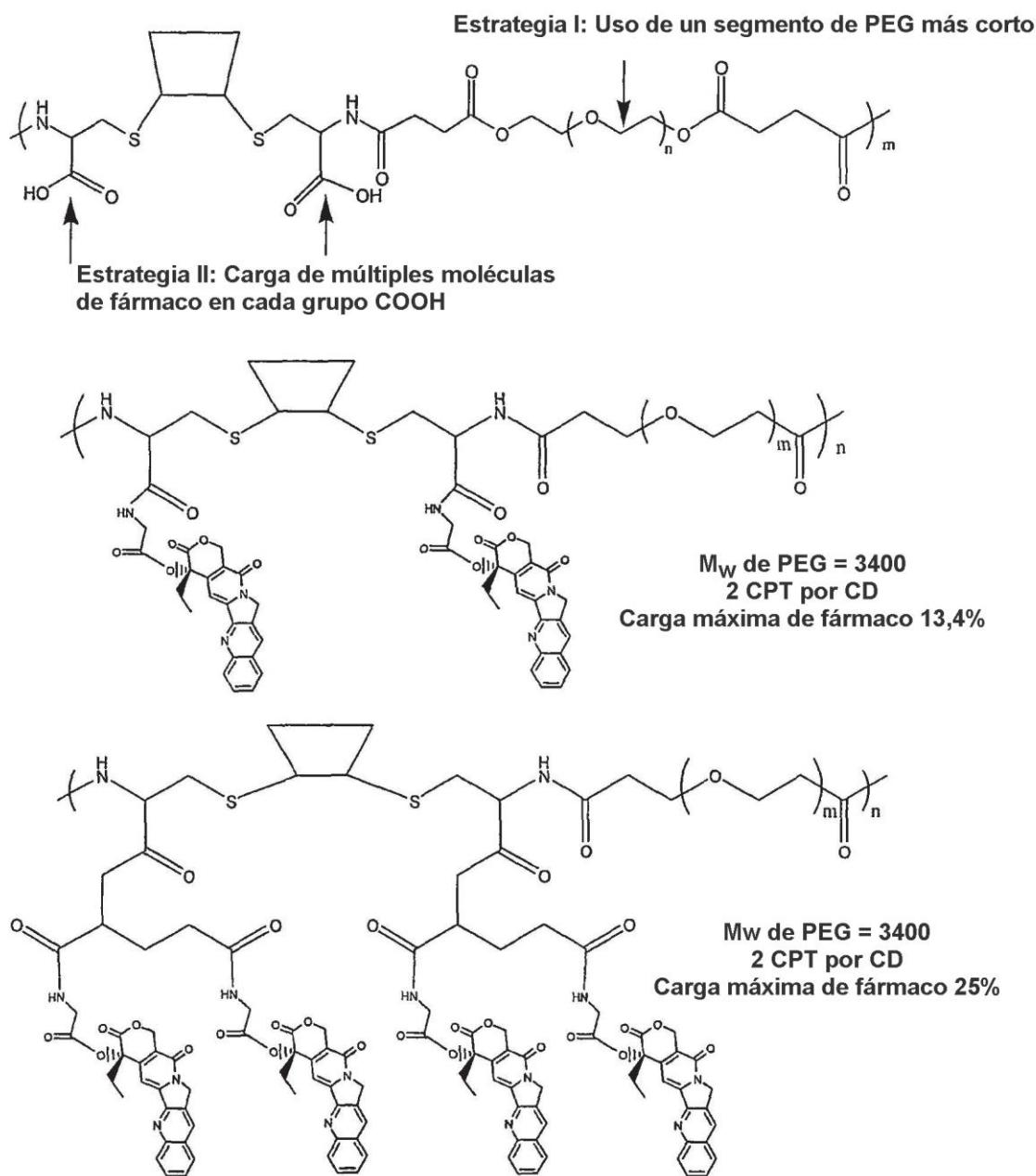
donde



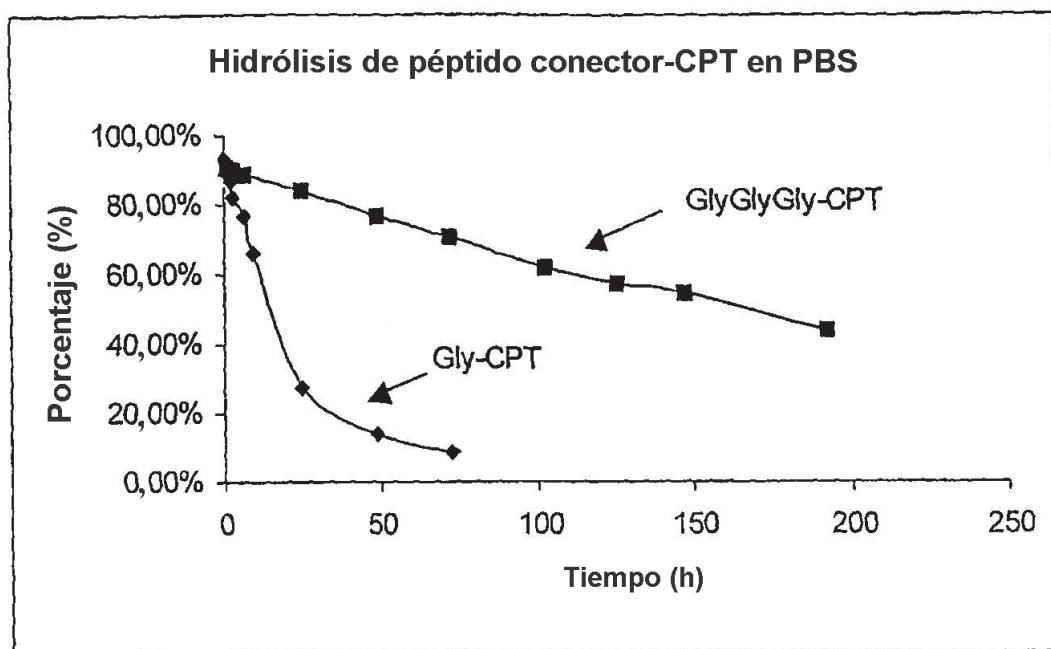
representa un resto de ciclodextrina.

11. Un compuesto según la reivindicación 10, en el que el resto de ciclodextrina es una resto de  $\beta$ -ciclodextrina.

FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3:** Estabilidad del anillo de lactona de CPT, 11 y 12 en PBS (pH 7,4)

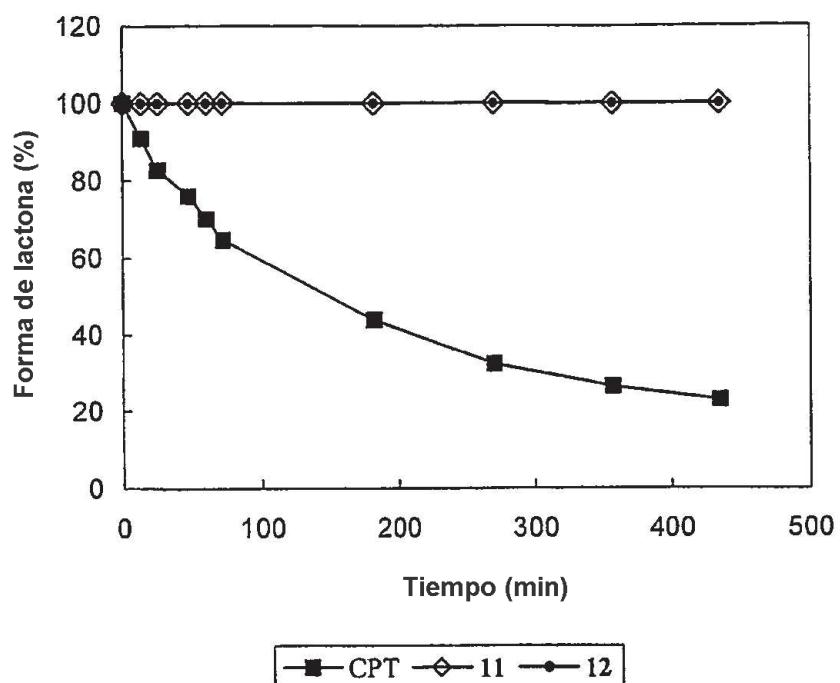
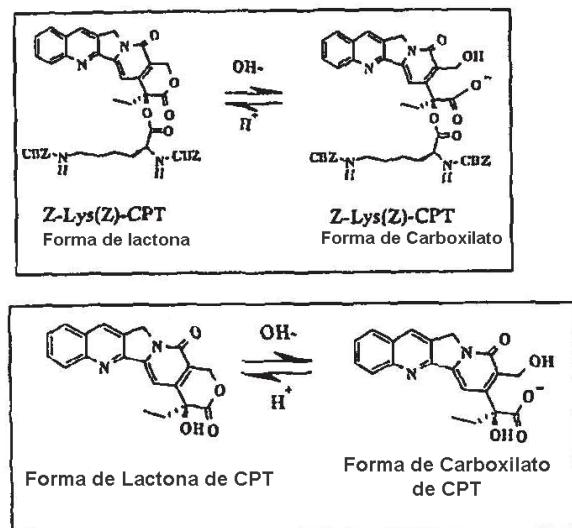
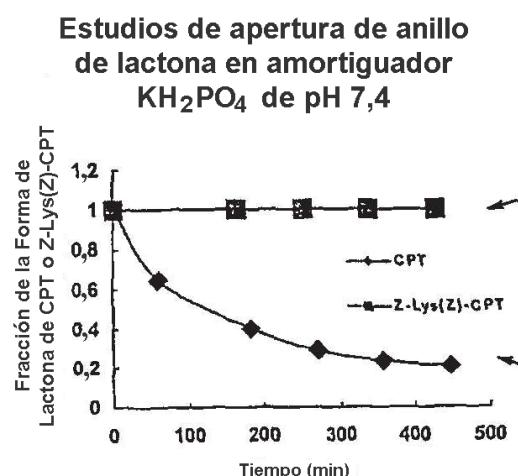
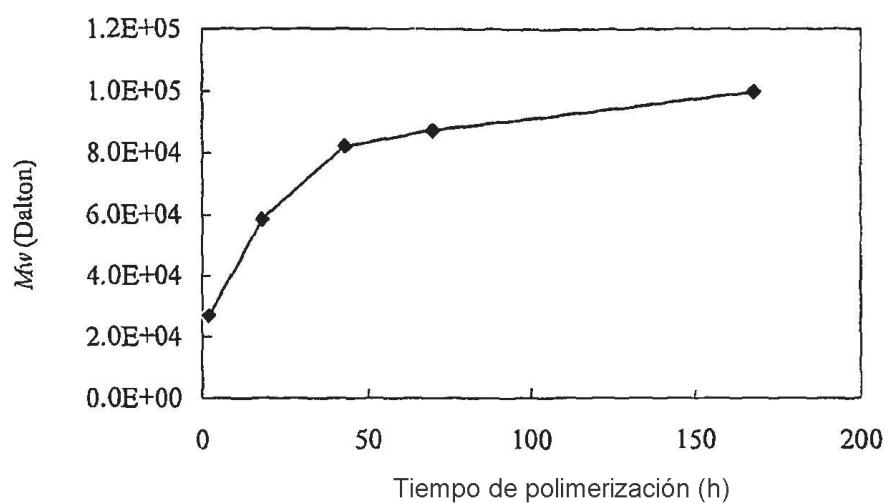
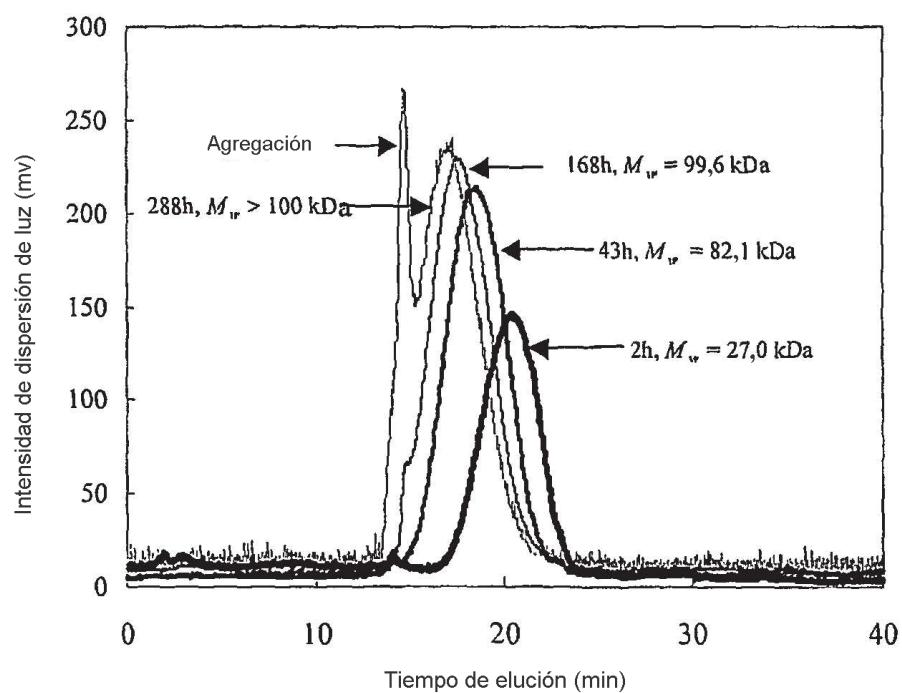
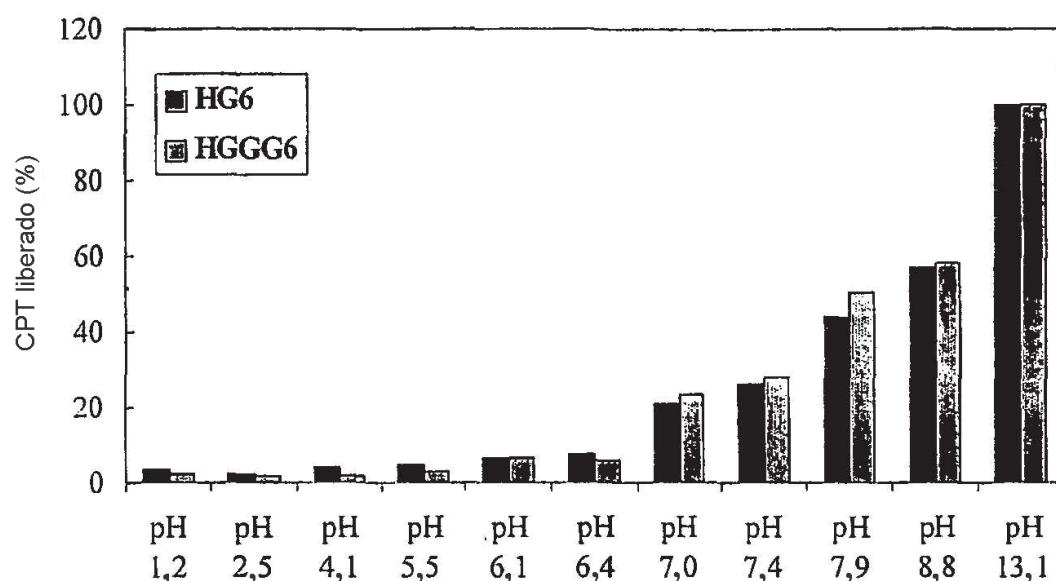


FIG. 4

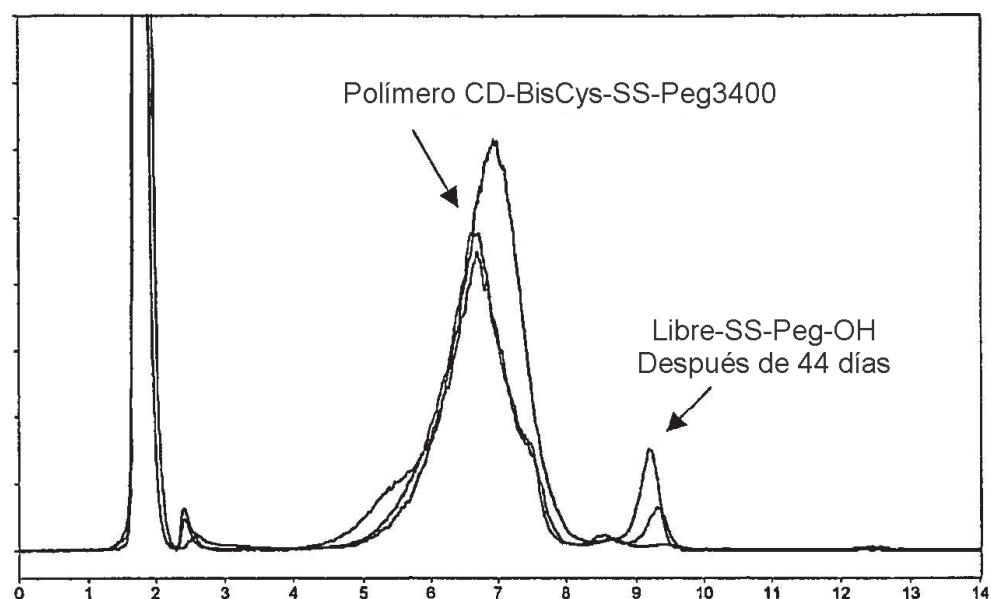


**FIG. 5a:** Control de polimerización por ajuste del tiempo de polimerización.**FIG. 5b:** Control de polimerización por ajuste del tiempo de polimerización.

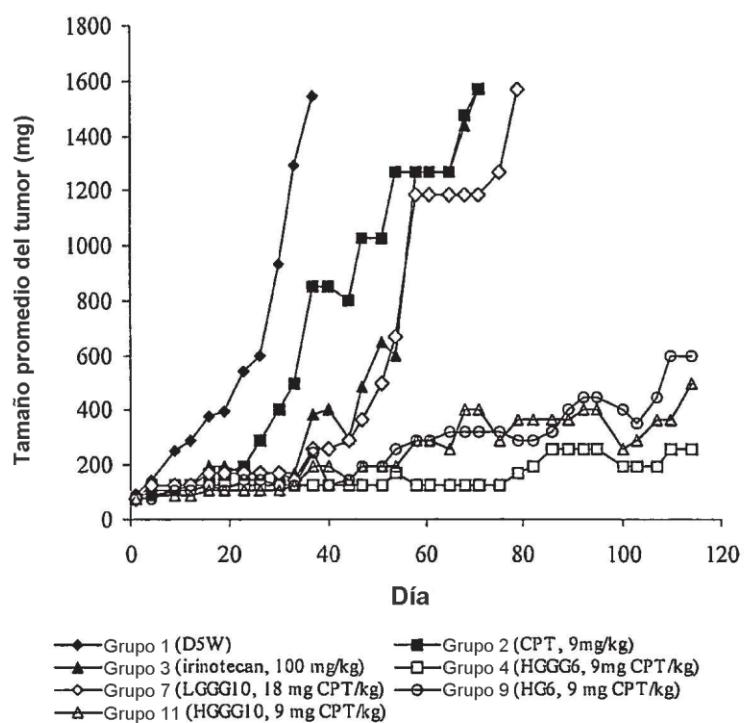
**FIG. 6:** Liberación de CPT desde HG6 y HGGG6 a 37°C tras 24 h en disoluciones amortiguadoras con pHs en el intervalo de 1,1 a 13,1

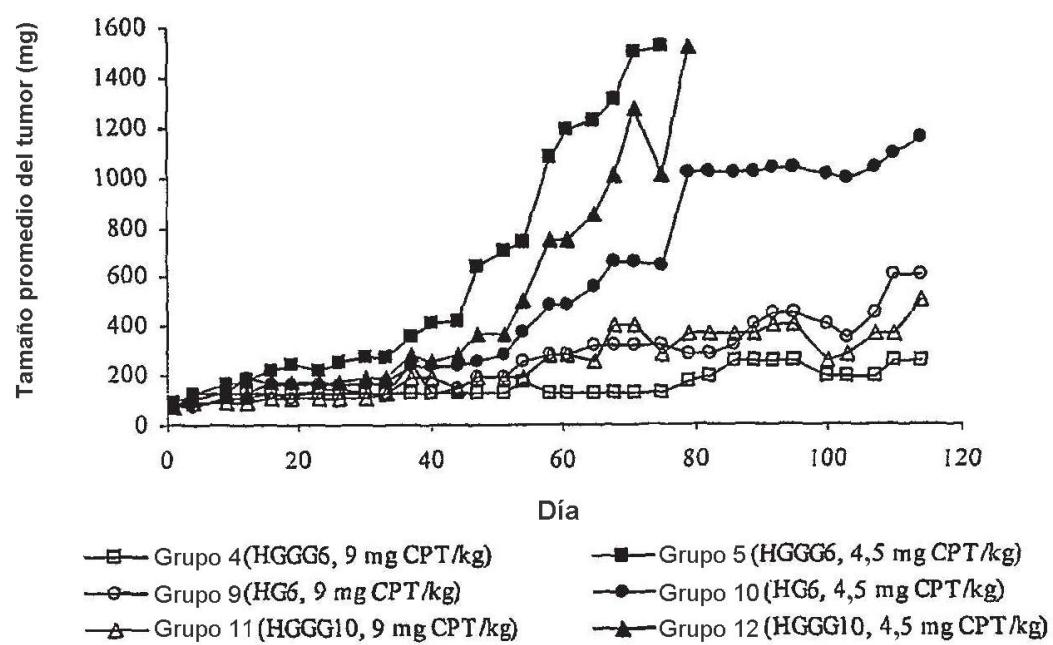


**FIG. 7:** Análisis HPLC de la degradación de Polímero CD-BisCys-SS-Peg3400

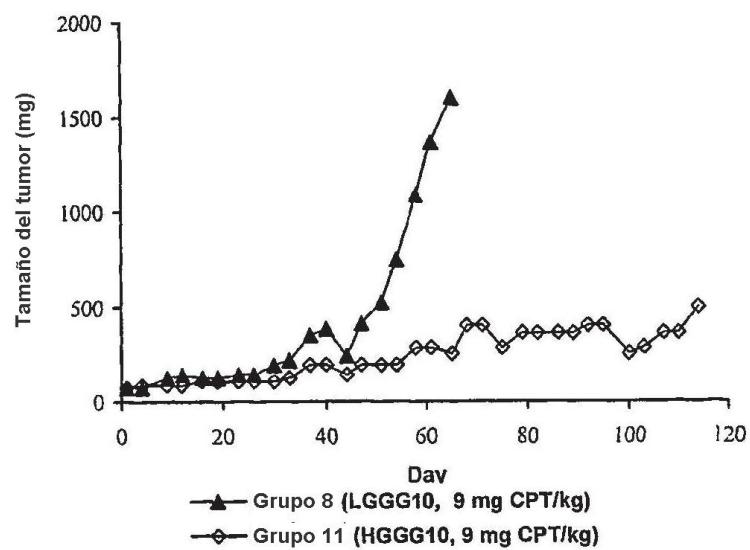


**FIG. 8:** La curva de crecimiento tumoral como una función del tiempo para el D5W, CPT, irinotecan, LGGG10 a su mayor dosis no tóxica ensayada (18 mg CPT/kg), y los otros tres conjugados con polímero de elevado peso molecular (HGGG6, HG6, HGGG10) y sus MTDs

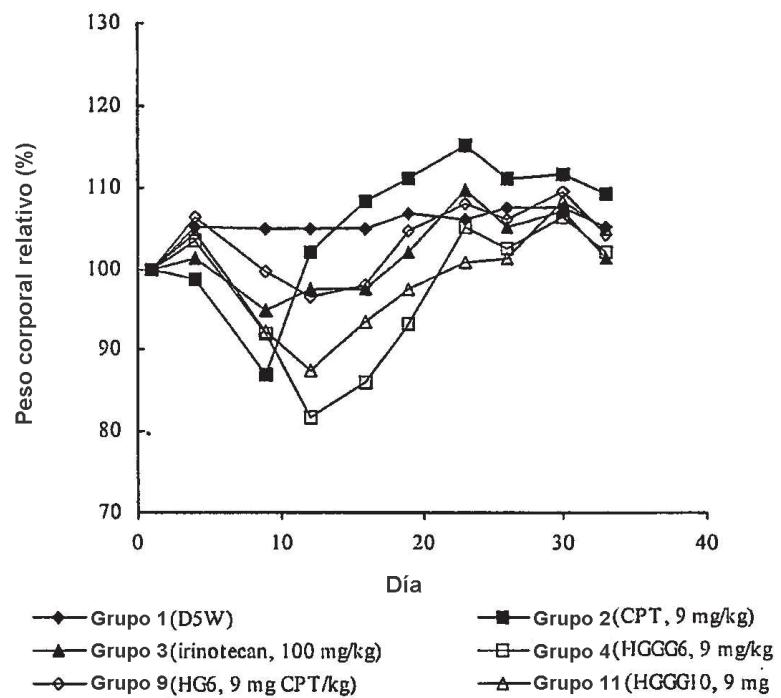


**FIG. 9.** Las curvas de crecimiento tumoral promedio para HGGG6, HG6 y HGGG10

**FIG. 10:** Las curvas de crecimiento tumoral promedio para LGGG10 y HGGG10 cada uno a una dosis de 9 mg CPT/kg



**FIG. 11:** Pérdidas de peso corporal promedio (MBW) como una función del tiempo representado para D5W, CPT, irinotecan y los tres conjugados que contienen polímero de elevado peso molecular y sus MTDs



**FIG. 12.** La correlación de la concentración de CPT (ng/mg de tejido) con el tamaño del tumor (en mg)

