(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 361 919**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05777645 .2**
(96) Fecha de presentación : **06.09.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1796644**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

(54) Título: **Suministro de fármaco a partir de agentes embólicos.**

(30) Prioridad: **07.09.2004 EP 04255411**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

(73) Titular/es: **Biocompatibles UK Limited**
Chapman House, Farnham Business Park
Weydon Lane
Farnham, Surrey GU9 8QL, GB

(72) Inventor/es: **Lewis, Andrew, Lennard;**
Stratford, Peter, William;
González-Fajardo, María V. y
Tang, Yiqing

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

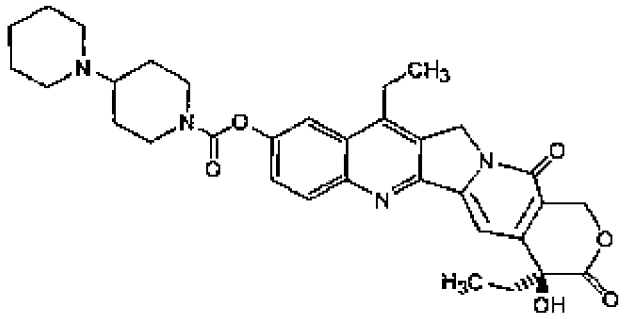
Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

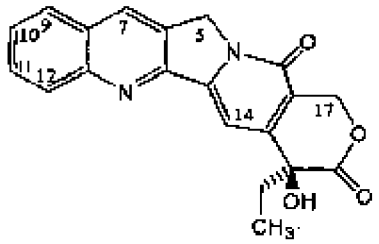
Suministro de fármaco a partir de agentes embólicos.

El alcance de esta invención es la preparación y el uso de microesferas para embolización, donde las microesferas comprenden un polímero insoluble en agua y una cantidad terapéutica de una camptotecina, preferiblemente irinotecan hidrocloruro, para la quimioembolización de un tumor.

La camptotecina (CPT) y sus análogos son una nueva clase de agentes anticáncer que han sido identificados en los últimos años. La camptotecina existe en dos formas dependiendo del pH: una forma de lactona activa a pH inferior a 5 y una forma de carboxilato inactivo a pH básico o a pH neutro fisiológico. El anillo A de camptotecina es el anillo del lado izquierdo en la porción del núcleo de las siguientes estructuras.



Irinotecan



Camptotecina

El irinotecan es una versión modificada de la camptotecina que ha sido desarrollada para mejorar la solubilidad y la especificidad del fármaco. Está descrito en el documento US 4.604.463. Las camptotecinas interactúan específicamente con la enzima topoisomerasa I que relaja la tensión torsional del ADN induciendo rupturas reversibles en los filamentos simples. El irinotecan y su metabolito activo SN-38 se unen al complejo de topoisomerasa I-ADN y evitan la religación de estas rupturas de los filamentos simples. Las investigaciones actuales dan a entender que la citotoxicidad del irinotecan es debida al daño producido en el doble filamento del ADN durante la síntesis del ADN cuando las enzimas de replicación interactúan con el complejo ternario formado por la topoisomerasa I, el ADN, y el irinotecan o el SN-38. Las células de mamíferos no pueden reparar de modo eficiente estas rupturas de la doble cadena.

El irinotecan en la forma de su sal de adición de ácido, por ejemplo, hidrocloruro, sirve como un precursor algo soluble en agua del metabolito lipófilo SN-38. El SN-38 se forma a partir de irinotecan por la escisión mediada por la carboxilesterasa del enlace de carbamato entre el resto de camptotecina y la cadena lateral de dipiperidino. El SN-38 es aproximadamente 1000 veces más potente que el irinotecan como inhibidor de la topoisomerasa I purificada a partir de líneas celulares tumorales de humanos y roedores. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* demuestran que la potencia del SN-38 con respecto al irinotecan varía de 2 a 2000 veces. Sin embargo, los valores del área bajo la curva de la concentración en plasma frente al tiempo (AUC) para el SN-38 son del 2% al 8% de los correspondientes a irinotecan ya que el SN-38 se une en un 95% a las proteínas plasmáticas en comparación con la unión que corresponde al irinotecan de aproximadamente el 50% de unión a las proteínas plasmáticas.

La inyección de irinotecan puede inducir tanto la forma temprana como la forma tardía de diarrea que parece que están mediadas por diferentes mecanismos. La diarrea temprana (que aparece durante la perfusión de irinotecan o muy poco después de la misma) es de naturaleza colinérgica. Usualmente es pasajera y sólo raras veces es grave. Puede ir acompañada por síntomas de rinitis, aumento de la salivación, miosis, lagrimeo, diaforesis, rubefacción, e hiperperistaltismo intestinal que puede causar espasmos abdominales.

Es uno de los fármacos de elección para el tratamiento del cáncer colorrectal y la metástasis del hígado (CRM). El fármaco se administra intravenosamente, usualmente en combinación con otros agentes terapéuticos. Otros investigadores han usado micropartículas como un medio de administración del fármaco intravenosamente; en estos casos es necesario que las micropartículas sean suficientemente pequeñas para evitar el bloqueo de los vasos sanguíneos (Evaluation of camptothecin microspheres in cancer therapy. Tong, Wenkai. Avail. UMI, Order No. DA3061801. (2002), 214 pp. De: Diss. Abstr. Int., B 2003, 63(8), 3730; Injectable pharmaceutical composition comprising microparticles or microdroplets of camptothecin. Sands, Howard; Mishra, Awadhesh. (Supergen, Inc., USA; Rtp Pharma, Inc.). PCT Int. Appl. (2002), 103 pp.).

Las microesferas de poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) han sido consideradas buenos vehículos de administración para la CPT debido al microambiente ácido formado por la degradación de la PLGA (Evaluation of PLGA Microspheres as Delivery System for Antitumor Agent-Camptothecin. Tong, Wenkai; Wang, Lejun; D'Souza, Martin J. Drug

Development and Industrial Pharmacy (2003), 29(7), 745-756) y Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin, Ertl, B., *et al.*, J. Contr. Rel. 1999, 61, 305-317. La camptotecina o sus derivados están incluidos en polímeros para dar microesferas anticáncer de liberación controlada con un diámetro medio de 2-70 μm. (Controlled-release microspheres containing antitumor agents. Machida, Masaaki; Onishi, Hiroshi; Morikawa, Akinobu; Machida, Ryoji; Kurita, Akinari. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2002), 7 pp.). Las partículas de este tamaño se utilizan generalmente para administración intravenosa, pero se pueden utilizar también como implantes o se pueden inyectar directamente en el sitio del tumor, por ejemplo, durante las operaciones quirúrgicas. (Camptothecin Delivery Methods Hatefi, A. *et al.*, Pharm. Res. 2002, 19(10) 1389-1399).

Otros autores han investigado el efecto de la interacción de polímero-fármaco sobre la morfología de superficie de las microesferas de polímero y sobre las propiedades de liberación *in vitro*. Se prepararon las microesferas de polilactida que incluyen hidrocloruro de irinotecan (CPT) mediante el método de evaporación del disolvente del sistema de emulsión O/O con el fin de controlar la concentración de fármacos en organismos vivos. El diámetro medio de las microesferas de polilactida se mantuvo a aproximadamente 50 μm aunque variaba el contenido de CPT (Surface morphology change of polylactide microspheres enclosing Irinotecan hydrochloride and its effect on release properties. Yoshizawa, Hidekazu; Nishino, Satoru; Natsugoe, Shoji; Aiko, Takashi; Kitamura, Yoshiro. Journal of Chemical Engineering of Japan (2003), 36(10), 1206-1211.).

Otro estudio de administración de un derivado de camptotecina (10-hidroxi-camptotecina) a partir de la poli(lactida-co-glicolida) degradable utiliza una emulsión de solución de cloruro de metileno-polímero en agua. Se añade el fármaco a la emulsión como una solución en DMF. Las microesferas tienen un tamaño medio de partícula en el intervalo de 27-82 μm. Lo que se pretende es que las microesferas circulen y liberen el fármaco a lo largo de un período de semanas. Aunque hay una sugerencia de que las camptotecinas encapsuladas podrían ser útiles para embolizar los tumores hepáticos, no hay ninguna indicación de cómo se puede conseguir esto. (Stabilization of 10-hydroxycamptothecin in Poly(lactide-co-glycolide)microsphere delivery vehicles Shenderova, A. *et al.*, Pharm. Res. 1997,14(10) 1406-1414).

Se han utilizado microesferas biodegradables para administrar el fármaco directamente al tumor por inyección directa en la masa tumoral (Use of biodegradable microspheres for the delivery of an anticancer agent in the treatment of glioblastoma. Faisant, Nathalie; Benoit, Jean-Pierre; Meinei, Philippe. WO-A-0069413). Las microesferas se forman de poliglicolida y tienen un diámetro medio de 48 μm.

Se ha demostrado que la incorporación del fármaco a las microesferas prolonga el tiempo de vida del fármaco en la circulación (Pharmacokinetics of prolonged-release CPT-11-loaded microspheres in rats. Machida, Y.; Onishi, H.; Kurita, A.; Hata, H.; Morikawa, A.; Machida, Y. Journal of Controlled Release (2000), 66(2-3), 159-175). Las microesferas que contienen CPT-11 compuestas de copolímeros de poli(ácido DL-láctico) o poli(ácido DL-láctico-co-ácido glicólico) se prepararon por un método de evaporación aceite-en-agua. Se examinaron el tamaño y la forma de las microesferas, y se analizaron las velocidades de liberación del fármaco a partir de los perfiles de liberación *in vitro*. Se inyectó la solución acuosa de CPT-11 i.v. o i.p. a 10 mg/kg, y se administraron las microesferas i.p. a 50 mg equivalentes de CPT-11/kg en ratas. Las microesferas tenían un diámetro medio de alrededor de 10 μm y su forma era esférica.

Otros autores han intentado dirigir las microesferas mediante el uso de campos magnéticos externos (*In vivo* evaluation of camptothecin microspheres for targeted drug delivery. Sonavaria, Vandana J.; Jambhekar, Sunil; Maher, Timothy. Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials (1994), 21ST 194-5). Las microesferas de albúmina magnéticamente sensibles que contienen camptotecina pueden ser dirigidas de manera fiable al sitio deseado en un modelo de rata. En adición, las microesferas dirigidas permanecieron localizadas durante muchas horas después de la separación del campo magnético lo que da a entender que las microesferas fueron sumergidas dentro de las células, y el fármaco liberado en el sitio. Presumiblemente las microesferas son muy pequeñas, probablemente de aproximadamente 1 μm.

Un método para el tratamiento paliativo de la metástasis colorrectal del hígado es por quimioembolización. En un procedimiento, se introduce un compuesto farmacéutico activo directamente en la arteria que alimenta el tumor mediante un catéter, seguido por la introducción del agente embólico para parar o para reducir el flujo en el segmento afectado, reduciendo por lo tanto el periodo de reposo del fármaco. No se ha adoptado ningún método de referencia y los compuestos terapéuticos usados son variados e incluyen, pero sin limitarse a ellos, 5-FU, mitomicina C o mezclas de cisplatino, adriamicina y mitomicina (CAM) entre otros. Inusualmente, aunque el irinotecan es un tratamiento sistémico de elección, no ha sido adoptado para la quimioembolización generalizada. Solamente un estudio reciente en ratas ha combinado específicamente irinotecan y embolización por un método en el que una solución de fármaco y una suspensión de microesferas embólicas de almidón se introdujeron en la arteria hepática. (Chemoembolization of rat liver metastasis with irinotecan and quantification of tumour cell reduction. Saenger Jan; Leible Maike; Seelig Matthias H; Berger Martin R. Journal of cancer research and clinical oncology (Germany) Apr 2004, 130 (4) p203-10). El método usado no implica la asociación del fármaco con el polímero del material embólico y por lo tanto no incluye ningún control de liberación del fármaco. Las microesferas de almidón solamente reducen el flujo a través de los vasos y se degradan dentro de un periodo de tiempo inferior a aproximadamente una hora.

W U, S. J., An Experimental study of the basic properties of drug microsphere and target treatment of rats with liver tumour, Zhonghua-Waike Za Zhi Apr 1990 28(4) 241-243, describe la embolización de la arteria hepática con

microesferas de camptotecina-albúmina. Los tumores se necrosaron y el daño de los tejidos causado por el tumor se anuló con las microesferas.

Ha habido un estudio clínico sobre la embolización de la arteria ilíaca interna con microesferas super-selectivas de camptotecina para el carcinoma de vejiga (Xu A; Wang X; Yu M. Department of Urology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China. Zhonghua yi xue za zhi (China) May 2000, 80 (5) p358-9). La naturaleza de la microesfera no fue especificada. El tamaño era aproximadamente 200 μm de diámetro. Los autores evaluaron la eficacia de la embolización de la arteria ilíaca interna con microesferas de camptotecina para el carcinoma de vejiga. Dieciocho pacientes con carcinoma de vejiga inoperable y avanzado fueron tratados con embolización super-selectiva de la arteria ilíaca interna con microesferas de camptotecina. El tamaño del tumor se redujo significativamente, y las células tumorales se dañaron a diferentes grados en 17 pacientes. No se encontraron efectos adversos. Los autores sacaron la conclusión de que la embolización de la arteria ilíaca interna con microesferas de camptotecina es una terapia segura y eficaz para el carcinoma de vejiga inoperable y avanzado.

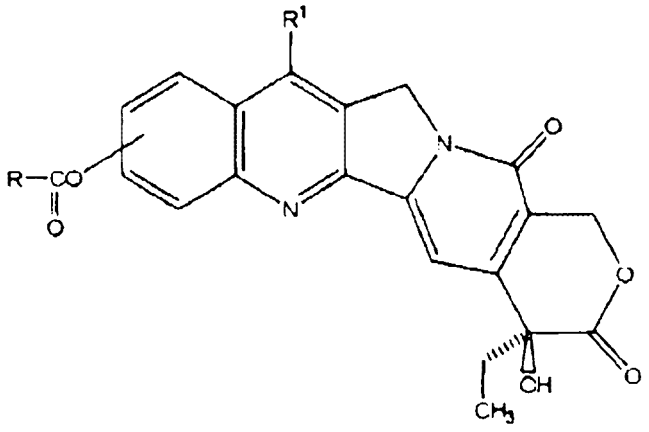
Nuestra publicación inicial WO200407149 describe microesferas, que tienen un tamaño de 40-500 micrómetros, que comprenden un polímero insoluble en agua, hinchable en agua, con una carga aniónica a pH 7, por ejemplo un macrómero de PVA que tiene más de un grupo colgante insaturado etilénicamente, y un compuesto de antraciclina que tiene un grupo amino que se asocia con los grupos aniónicos de la matriz polimérica. Para uso en el tratamiento de un tumor por emboloterapia.

Según la presente invención se proporciona un nuevo uso de microesferas que comprenden un polímero hinchable en agua, insoluble en agua, que está cargado aniónicamente a pH 7 y que tiene un contenido en agua en equilibrio cuando se hincha en agua a 37ºC, medido por análisis gravimétrico, en el intervalo de 40 a 99% y, asociado electrostáticamente con el polímero en forma liberable, un compuesto de camptotecina cargado catiónicamente, en la fabricación de una composición para uso en un método de tratamiento en el cual la composición se introduce en un vaso sanguíneo y las microesferas forman un émbolo en el vaso sanguíneo, en el cual las microesferas tienen tamaños, cuando están equilibradas en agua a 37ºC, en el intervalo de 100 a 1500 μm, en cuyo método el compuesto de camptotecina se libera del émbolo.

El método de tratamiento se destina generalmente a la terapia de un tumor sólido. En la invención las microesferas tienen diámetros cuando están equilibradas con agua a temperatura ambiente de más de 100 μm. Por lo tanto preferiblemente, sustancialmente ninguna de las microesferas tiene tamaños inferiores a 100 μm. Los tamaños pueden ser de hasta 200 μm, preferiblemente de hasta 1500 μm. El diámetro se determina preferiblemente mediante la medida del tamaño de la microesfera antes de cargarla con el compuesto de camptotecina. Aunque preferiblemente las microesferas son sustancialmente esféricas, pueden ser esferoidales o incluso de formas menos regulares. En la siguiente descripción se hace referencia a microesferas y partículas de modo intercambiable. El diámetro de una partícula no esférica es su diámetro más grande.

El compuesto de camptotecina es preferiblemente al menos ligeramente soluble en agua, por ejemplo soluble a una concentración de al menos 0,001 g/l en agua a temperatura ambiente, preferiblemente más de 0,002 g/l y más preferiblemente más de 0,01 g/l. Es preferible que el compuesto de camptotecina esté cargado catiónicamente a pH 7. El grupo catiónico puede ser un grupo de amina primaria, pero preferiblemente es un grupo de amina secundaria, terciaria o cuaternaria.

Una familia de compuestos adecuados tiene la fórmula general I



I

en la que R^1 es H, alquilo (C_{1-6}) inferior, opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amina, alcoxi, halógeno, acilo o aciloxi o halógeno; y

R es cloro o NR^2R^3 donde R^2 y R^3 son iguales o diferentes y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-4} sustituido o sin sustituir o un grupo carbocíclico o heterocíclico sustituido o sin sustituir, o R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido que puede estar interrumpido por -O-, -S- o $>NR^4$ en el que R^4 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-4} sustituido o sin sustituir o un grupo fenilo sustituido o sin sustituir;

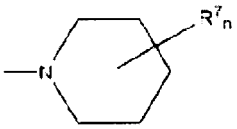
y donde la agrupación -O-CO-R está unida a un átomo de carbono localizado en cualquiera de las posiciones 9, 10 u 11 del anillo A del compuesto de camptotecina, incluyendo las sales del mismo.

Es preferible que la agrupación -O-CO-R esté unida en la posición 10.

R^1 es preferiblemente alquilo C_{1-4}, lo más preferiblemente etilo.

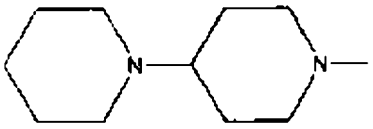
Un átomo de halógeno R es, por ejemplo, F, Cl, Br o I, preferiblemente F o Cl.

R^1 a R^4 pueden ser metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y t-butilo, preferiblemente metilo.

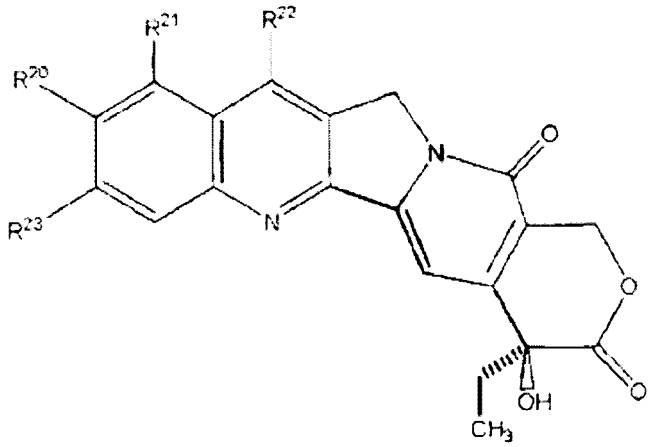
Los sustituyentes en R y R^1 se seleccionan preferiblemente de átomos de halógeno, hidroxi, alcoxi C_{1-4}, fenoxi, $COOR^6$, SO_3R^6 y $PO_3(R^6)_2$, arilo,  , NR^8R^9 y $CONR^8R^9$, $QAOR^5$, $QANR^8R^9$ y $QAQR^5$ en los que R^5 es alquilo C_{1-4} o arilo; R^6 es hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-4}; R^7 es hidrógeno, halógeno o alquilo C_{1-4}; R^8 y R^9 son iguales o diferentes y cada uno es H, o alquilo C_{1-4} o R^8 y R^9 juntos representan alcanodiilo C_{3-6};

Q es OCO, o -COO- y A es alcanodiilo C_{2-4}.

Preferiblemente R es NR^3R^3 donde R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo de 5 o 6 miembros, preferiblemente un anillo saturado, con sustituyentes opcionales. Un sustituyente es preferiblemente $-NR^8R^9$. En dicho sustituyente, R^8 y R^9 preferiblemente juntos son alcanodiilo C_{4-5}. Tales grupos son básicos y tienden a estar cargados catiónicamente a pH 7. Lo más preferiblemente R es



Otra familia de compuestos adecuados tiene la fórmula general II



II

en la que R^{20} y R^{23} son cada uno hidroxi o hidrógeno o juntos son CH_2OCH_2;

uno de R^{21} y R^{22} es H y el otro es $CH_2NR^{24}R^{25}$ donde R^{23} y R^{24} son iguales o diferentes y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-4} sustituido o sin sustituir o un grupo carbocíclico o heterocíclico sustituido

o sin sustituir, o R^{23} y R^{24} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido que puede estar interrumpido por -O-, -S- o $>NR^4$ en el que R^4 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-4} sustituido o sin sustituir o un grupo fenilo sustituido o sin sustituir; incluyendo las sales y derivados cuaternarios de los mismos. Un ejemplo de un compuesto adecuado de esta reivindicación es topotecan, en el que R^{20} es hidroxilo, R^{22} y R^{23} son hidrógeno, R^{21} es $CH_2NR^{24}R^{25}$ y R^{24} y R^{25} son ambos metilo.

El polímero es un material insoluble en agua. Aunque puede ser biodegradable, de manera que el fármaco pueda ser liberado sustancialmente por la erosión de la matriz del polímero para liberar el fármaco desde la superficie, preferiblemente el polímero es sustancialmente bioestable (esto es, no biodegradable).

El polímero es hinchable en agua. El polímero hinchable en agua útil en la invención tiene preferiblemente un contenido en agua en equilibrio, cuando se hincha en agua a 37ºC, medido por análisis gravimétrico, en el intervalo de 40 a 99% en peso, preferiblemente de 75 a 95%.

En la realización preferida de la invención, la composición que se administra a un paciente que necesite terapia de embolización, está en la forma de una suspensión de partículas de un polímero hinchado en agua, insoluble en agua, en un vehículo líquido. Preferiblemente las partículas se clasifican en intervalos de tamaño calibrados para una embolización precisa de los vasos sanguíneos. Las partículas cuando se equilibran en agua a 37ºC, preferiblemente tienen tamaños en el intervalo de 100 a 1500 μm, más preferiblemente en el intervalo de 100 a 1200 μm. Los intervalos calibrados pueden comprender partículas que tienen diámetros con una amplitud de banda de aproximadamente 100 a 300 μm. Los intervalos de tamaño pueden ser por ejemplo 100 a 300 μm, 300 a 500 μm, 500 a 700 μm, 700 a 900 μm y 900 a 1200 μm. Preferiblemente las partículas son sustancialmente de forma esférica. Tales partículas se denominan en esta memoria microesferas.

Generalmente el polímero está reticulado covalentemente, aunque puede ser apropiado que el polímero esté reticulado iónicamente, al menos en parte. Aunque puede ser adecuado usar polímeros que se derivan de fuentes naturales, tales como albúmina, alginato, gelatina, almidón, chitosán o colágeno, todos los cuales han sido utilizados como agentes embólicos, preferiblemente el polímero está sustancialmente libre de polímeros o derivados presentes en la naturaleza. Se forma preferiblemente por la polimerización de monómeros etilénicamente insaturados en presencia de monómeros reticulantes di-funcionales o con más funciones. Los monómeros etilénicamente insaturados pueden incluir un monómero iónico (incluyendo los zwitteriónicos).

Se pueden utilizar copolímeros de metacrilato de hidroxietilo, ácido acrílico y monómero reticulante, tal como dimetacrilato de etilenglicol o metilen-bisacrilamida, como se utilizan para las lentes de contacto basadas en etafilcon A. Se pueden utilizar también copolímeros de N-acriloil-2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol y N,N-bisacrilamida.

Otros polímeros son polímeros estirénicos reticulantes por ejemplo, con sustituyentes iónicos, del tipo usado como medio de separación o como medio de intercambio iónico.

Otro tipo de polímero que se puede utilizar para formar la matriz hinchable en agua, insoluble en agua, es el poli (alcohol vinílico) reticulado utilizando agentes reticulantes tipo aldehído tal como el glutaraldehído. Para tales productos, el poli(alcohol vinílico) (PVA) se puede volver iónico proporcionándole grupos iónicos colgantes haciendo reaccionar un compuesto que contiene un grupo iónico funcional con los grupos hidroxilo. Ejemplos de grupos funcionales adecuados para la reacción con los grupos hidroxilo son los agentes acilantes, tales como ácidos carboxílicos o derivados de los mismos, u otros grupos ácidos que pueden formar ésteres.

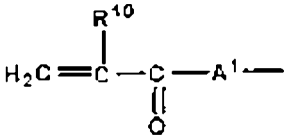
La invención es de particular valor cuando la matriz del polímero se forma a partir de un macrómero de poli(alcohol vinílico), que tiene más de un grupo colgante etilénicamente insaturado por molécula, mediante la polimerización radical de los grupos etilénicos. Preferiblemente el macrómero de PVA se copolimeriza con monómeros etilénicamente insaturados que incluyen por ejemplo un monómero no iónico y/o iónico, incluyendo un monómero aniónico.

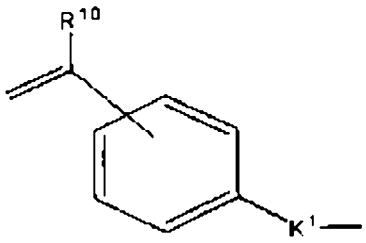
El macrómero de PVA se puede formar, por ejemplo, proporcionando un polímero de PVA, de un peso molecular adecuado tal como en el intervalo de 1000 a 500.000 D, preferiblemente de 10.000 a 100.000 D, con grupos vinílicos o acrílicos colgantes. Los grupos acrílicos colgantes se pueden proporcionar, por ejemplo, haciendo reaccionar ácido acrílico o metacrílico con PVA para formar uniones éster a través de alguno de los grupos hidroxilo. Otros métodos para unir los grupos vinílicos capaces de polimerización sobre el poli(alcohol vinílico) se describen, por ejemplo, en el documento US 4.978.713 y, preferiblemente, en los documentos US 5.508.317 y 5.583.163. Por lo tanto, el macrómero preferido comprende una cadena principal de poli(alcohol vinílico) a la que se une, mediante un enlace acetal cíclico, un resto (alquil)acrilaminoalquilo. El Ejemplo 1 describe la síntesis de un ejemplo de un macrómero de este tipo conocido por el nombre aprobado de nelfilcon B. Preferiblemente los macrómeros de PVA tienen aproximadamente 2 a 20 grupos etilénicos colgantes por molécula, por ejemplo 5 a 10.

Cuando los macrómeros de PVA se copolimerizan con monómeros etilénicamente insaturados, incluyendo un monómero iónico, el monómero iónico tiene preferiblemente la fórmula general II

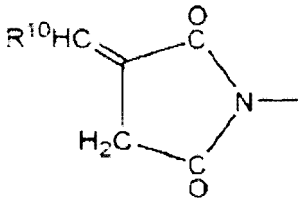
$$Y^1BQ^1 \qquad \text{II}$$

en la que Y^1 se selecciona de

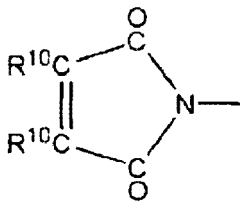




$CH_2=C(R^{10})-CH_2-O-$, $CH_2=C(R^{10})-CH_2OC(O)-$, $CH_2=C(R^{10})OC(O)-$, $CH_2=C(R^{10})-O-$, $CH_2=C(R^{10})CH_2OC(O)N(R^{11})-$, R^{12} $OOCCR^{10}=CR^{10}C(O)-O-$, $R^{10}CH=CHC(O)O-$, $R^{10}CH=C(COOR^{12})CH_2-C(O)-O-$,



y



donde:

R^{10} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

R^{11} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

R^{12} es hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-4} o BQ^1 donde B y Q^1 son como se definen más adelante;

A^1 es-O- o $-NR^{11}-$;

K^1 es un grupo $-(CH_2)_rOC(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)O-$, $-(CH_2)_rNR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)NR^{13}-$ (donde los grupos R^{13} son iguales o diferentes), $-(CH_2)_rO-$, $-(CH_2)_rSO_3-$, u opcionalmente en combinación con B, un enlace de valencia y r es de 1 a 12 y R^{13} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

B es una cadena lineal o ramificada de alcanodiilo, oxaalquileno, alcanodiiloxaalcanodiilo, o alcanodiiloligo(oxaalcanodiilo) que contiene opcionalmente uno o más átomos de flúor incluyendo cadenas perfluoradas o, si Q^1 o Y^1 contienen un átomo de carbono terminal unido a un enlace de valencia B; y

Q^1 es un grupo iónico.

Preferiblemente se incluye un compuesto que comprenda un grupo aniónico Q^1.

Un grupo aniónico Q^1 puede ser, por ejemplo, un grupo carboxilato, carbonato, sulfonato, sulfato, nitrato, fosfonato o fosfato. El monómero se puede polimerizar como el ácido libre o en forma de sal. Preferiblemente el pK_a del ácido conjugado es menor que 5.

Un grupo catiónico adecuado Q^1 es preferiblemente un grupo $N^+R^{14}{}_3$, $P^+R^{15}{}_3$ o $S^+R^{15}{}_2$ en los cuales los grupos R^{14} son iguales o diferentes y son cada uno hidrógeno, alquilo C_{1-4} o arilo (preferiblemente fenilo) o dos de los grupos R^{14} juntos con el heteroátomo al que están unidos forman un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene de 5 a 7 átomos, los grupos R^{15} son cada uno OR^{14} o R^{14}. Preferiblemente el grupo catiónico es permanentemente catiónico, esto es cada R^{14} es distinto de hidrógeno. Preferiblemente un grupo catiónico Q es $N^+R^{14}{}_3$ en el cual cada R^{14} es alquilo C_{1-4}, preferiblemente metilo.

Un grupo zwitteriónico Q^1 puede tener una carga global, por ejemplo al tener un centro divalente de carga aniónica y un centro monovalente de carga catiónica o vice-versa o al tener dos centros de carga catiónica y un centro de carga aniónica o vice-versa. Preferiblemente, sin embargo, el zwitterión no tiene ninguna carga global y lo más preferiblemente tiene un centro de carga catiónica monovalente y un centro de carga aniónica monovalente.

Ejemplos de grupos zwitteriónicos que se pueden usar como Q en la presente invención se describen en el documento WO-A-0029481.

Cuando el monómero etilénicamente insaturado incluye un monómero zwitteriónico, por ejemplo, éste puede aumentar la hidrofilicidad, lubricidad, biocompatibilidad y/o hemocompatibilidad de las partículas. Los monómeros zwitteriónicos están descritos en las publicaciones anteriores WO-A-9207885, WO-A-9416748, WO-A-9416749 y WO-A-9520407. Preferiblemente un monómero zwitteriónico es la sal interna de fosfato de 2-metacriloiloxi-2'-trimetilamonio-etilo (MPC).

En el monómero de la fórmula general I preferiblemente Y^1 es un grupo $CH_2=CR^{10}COA-$ en el que R^{10} es H o metilo, preferiblemente metilo, y en el que A^1 es preferiblemente NH. B es preferiblemente un grupo alcanodiilo de 1 a 12, preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono. Tales monómeros son monómeros acrílicos.

Se puede incluir en el monómero etilénicamente insaturado el monómero diluyente, por ejemplo un monómero no iónico. Dicho monómero puede ser útil para controlar el pK_a de los grupos ácidos, para controlar la hidrofilicidad o hidrofobicidad del producto, para proporcionar regiones hidrófobas en el polímero, o simplemente para actuar como diluyente inerte. Ejemplos de monómeros diluyentes no iónicos son, por ejemplo, acrilatos de alquilo (alk) y acrilamidas (alk), especialmente aquellos compuestos que tienen grupos alquilo con 1 a 12 átomos de carbono, acrilatos de alquilo (alk) y acrilamidas de alquilo (alk) hidroxi-sustituidos y di-hidroxi-sustituidos, vinil-lactamas, estireno y otros monómeros aromáticos.

En la matriz del polímero, el nivel de anión está preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 10 $meq.g^{-1}$, preferiblemente al menos 1,0 $meq.g^{-1}$. Los aniones preferidos se derivan de ácidos fuertes, tales como sulfatos, sulfonatos, fosfatos y fosfonatos.

Cuando el macrómero de PVA se copolimeriza con otros monómeros etilénicamente insaturados, la relación en peso del macrómero de PVA al otro monómero está preferiblemente en el intervalo de 50:1 a 1:5, más preferiblemente en el intervalo de 20:1 a 1:2. En el monómero etilénicamente insaturado el monómero aniónico está preferiblemente presente en una cantidad en el intervalo de 10 a 100% en moles, preferiblemente al menos 25% en moles.

El polímero reticulado se puede formar como tal en forma de partículas, por ejemplo mediante polimerización en gotitas de monómero en una fase dispersa en un vehículo inmiscible continuo. Se conocen ejemplos de polimerizaciones adecuadas agua-en-aceite para producir partículas que tienen el tamaño deseado, cuando se hinchan. Por ejemplo el documento US 4.224.427 describe procedimientos para formar perlas esféricas uniformes (microesferas) de hasta 5 mm de diámetro, dispersando monómeros solubles en agua en una fase de disolvente continuo, en presencia de agentes de suspensión. Pueden estar presentes estabilizantes y tensioactivos para proporcionar control sobre el tamaño de las partículas de la fase dispersa. Después de la polimerización, se recogen las microesferas reticuladas por medios conocidos, y se lavan y se esterilizan opcionalmente. Preferiblemente las partículas, por ejemplo microesferas, se hinchan en un líquido acuoso, y se clasifican según su tamaño.

El compuesto de camptotecina se asocia con el polímero preferiblemente de forma que permita la liberación controlada del agente durante un período de tiempo. Este período puede variar desde varios minutos a semanas, preferiblemente al menos hasta unos días, preferiblemente hasta 72 horas. El agente se une electrostáticamente al polímero. La presencia de grupos aniónicos en el polímero permite el control de la liberación de camptotecina activa cargada catiónicamente.

El compuesto farmacéutico activo se puede incorporar a la matriz del polímero por una variedad de técnicas. En un método, el compuesto activo se puede mezclar con el precursor del polímero, por ejemplo una mezcla de un monómero o un macrómero o una mezcla de un polímero reticulable y un reticulador, antes de la polimerización o reticulación. Alternativamente, el compuesto activo se puede cargar en el polímero después de que éste haya sido reticulado. Por ejemplo, el polímero desecado en partículas se puede hinchar en una solución de compuesto activo, preferiblemente en agua o en un alcohol tal como etanol, opcionalmente con la separación posterior del agente no absorbido y/o evaporación del disolvente. Una solución del compuesto activo, en un disolvente orgánico tal como un alcohol, o, más preferiblemente, en agua, se puede esparcir sobre un lecho de partículas en movimiento, con lo que el fármaco se absorbe en el cuerpo de las partículas con separación simultánea de disolvente. Lo más convenientemente, se ha encontrado que es posible simplemente poner en contacto las partículas hinchadas suspendidas en un vehículo líquido continuo, tal como agua, con una solución alcohólica acuosa de fármaco, durante un período de tiempo, con lo que el fármaco se absorbe en el cuerpo de las partículas. Las técnicas para fijar el fármaco en las partículas pueden aumentar los niveles de carga, por ejemplo, precipitación por subida del pH de la suspensión de carga hasta un valor en el que el compuesto activo está en una forma relativamente insoluble. Posteriormente se puede separar el vehículo de hinchamiento o, de forma conveniente, puede ser retenido con las partículas como parte del producto para uso posterior como un agente embólico o las partículas hinchadas se pueden usar en forma hinchada en la forma de una suspensión, esto es sin nada o con mucho líquido fuera de las partículas hinchadas. Alternativamente, se puede separar la suspensión de partículas de cualquier solución de carga del fármaco remanente y se pueden secar las partículas por cualquiera de las técnicas clásicas empleadas para secar los productos farmacéuticos básicos. Estas técnicas podrían incluir, pero sin limitarse a ellas, secado por aire a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas o a presión reducida o a vacío; liofilización clásica; liofilización a presión atmosférica; solución

con aumento de dispersión de fluidos supercríticos (SEDS). Alternativamente las microesferas cargadas con fármaco se pueden deshidratar utilizando un disolvente orgánico para reemplazar el agua en una serie de etapas, seguido por evaporación del disolvente orgánico más volátil. Se debe seleccionar un disolvente que no sea disolvente para el fármaco.

En resumen, un procedimiento típico de liofilización clásica se podría realizar como sigue: la muestra se divide en alícuotas en viales de vidrio parcialmente tapados, los cuales se ponen en una bandeja enfriada, de temperatura controlada dentro del liofilizador. Se reduce la temperatura de la bandeja y se congela la muestra a una temperatura definida, uniforme. Una vez completada la congelación, la presión en el secador se reduce hasta una presión definida para iniciar el secado primario. Durante el secado primario, se separa progresivamente el vapor de agua de la masa congelada por sublimación mientras que se controla la temperatura de la bandeja a una temperatura baja, constante. Se inicia el secado secundario aumentando la temperatura de la bandeja y reduciendo la presión de la cámara adicionalmente para que se pueda separar el agua absorbida en la masa semi-desecada hasta que el contenido de agua residual disminuya hasta el nivel deseado. Los viales se pueden sellar, *in situ*, bajo una atmósfera protectora si fuera necesario.

La liofilización a presión atmosférica se consigue mediante la circulación rápida de aire muy seco sobre un producto congelado. En comparación con el procedimiento clásico de liofilización, la liofilización sin vacío tiene muchas ventajas. El gas seco circulante proporciona una mejor transferencia de calor y masa desde la muestra congelada, del mismo modo que la colada se seca más rápidamente en un día ventoso. La mayor parte del trabajo en esta área se refiere a la producción de alimentos, y se ha observado que hay un aumento de la retención de compuestos aromáticos volátiles, pero los beneficios potenciales de esto para el secado de productos biológicos está todavía por determinar. Es de particular interés el hecho de que usando procedimientos de secado por pulverización a presión atmosférica, en lugar de una torta, se obtiene un polvo fino fluido. Se pueden obtener partículas que tienen diámetros del orden de submicras, esto es diez veces más pequeñas que las que se pueden obtener generalmente por molienda. La naturaleza de partículas, con su mayor área superficial da como resultado un producto fácilmente rehidratable, y aunque actualmente no es posible el control perfecto sobre el tamaño de partícula requerido para aplicaciones de inhalación y transdérmicas, sin embargo hay potencial en esta área.

Aunque la composición se puede preparar a partir del polímero y el compuesto de camptotecina inmediatamente antes de la administración, se prefiere que la composición sea preformada. Las partículas de polímero-camptotecina desecadas se pueden hidratar inmediatamente antes de su uso. Alternativamente la composición que se suministra puede estar totalmente preparada y preferiblemente comprende partículas de polímero con compuesto de camptotecina absorbido o con compuesto de camptotecina absorbido y agua embebida por ejemplo, solución salina fisiológica y líquido fuera de las partículas, por ejemplo solución salina.

El nivel de compuesto de camptotecina en la composición que se administra está preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 500 mg por ml de composición, preferiblemente 10 a 100 mg por ml. Preferiblemente el método de quimioembolización se repite de una a cinco veces y para cada dosis la cantidad de compuesto de camptotecina administrada está en el intervalo de 0,1 a 100 mg por ml, preferiblemente 10 a 100 mg por ml. La cantidad de composición administrada en una embolización normal está en el intervalo 1 a 6 ml. La cantidad total de compuesto de camptotecina administrada por dosis está preferiblemente en el intervalo 10 a 1000 mg, más preferiblemente 50 a 250 mg. Basándose en los datos de liberación que se muestran en los ejemplos que siguen, se cree en esta invención que esto dará concentraciones terapéuticamente eficaces en los vasos sanguíneos en un tumor y que se producirán niveles significativos de liberación intracelular con lo que se alcanzará un efecto terapéutico. Se deben evitar los efectos secundarios adversos de la administración sistémica de camptotecina.

Las composiciones embólicas se pueden mezclar de una manera normal para la embolización del tumor. Por lo tanto la composición se puede administrar inmediatamente antes de la administración por el radiólogo interviniente, con agentes de diagnóstico por la imagen tales como agentes radiopacos. Adicionalmente o alternativamente las partículas pueden ser precargadas con material radiopaco en adición al compuesto de camptotecina. Por lo tanto el polímero y el compuesto farmacéutico activo, proporcionados como una mezcla preformada, se pueden premezclar con un agente de diagnóstico por la imagen radiopaco en una jeringa utilizada como el reservorio para el dispositivo de administración. La composición se puede administrar, por ejemplo, a partir de un dispositivo de microcatéter en la arteria apropiada. La selección del intervalo de tamaño de partícula adecuado, dependiente del sitio eventual de embolización, se puede hacer del modo normal por el radiólogo interviniente.

Se espera que la invención sea beneficiosa en el tratamiento de tumores primarios y secundarios que son hipervasculares, y por tanto embolizables, tales como el cáncer de hígado primario (carcinoma hepatocelular, HCC), metástasis en el hígado (colorrectal, de mama, endocrino), y tumores renales, de huesos, de mama, de vejiga, de próstata, de colon y de pulmón.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos. Algunos de los resultados se muestran en las figuras adjuntas, descritas en más detalle en los ejemplos, pero que se describen brevemente como sigue:

La Figura 1 presenta la carga de irinotecan de varias perlas diferentes como se describe en el ejemplo 1;

La Figura 2 presenta la elución a partir de las perlas cargadas en el ejemplo 1, en silano tamponado con fosfato (PBS);

La Figura 3 presenta los perfiles de elución para el irinotecan a partir de las perlas cargadas en el ejemplo 1 en agua;

La Figura 4 presenta la capacidad de carga descrita en el ejemplo 2;

La Figura 5 presenta el cambio de tamaño de las perlas descrito en el ejemplo 3;

La Figura 6 presenta el efecto del tamaño de las perlas y el contenido de grupo iónico en la carga de fármaco como se describe en el ejemplo 4;

La Figura 7 presenta la elución de irinotecan a partir de las esferas de gel como se describe en el ejemplo 6;

La Figura 8 presenta los resultados del ejemplo 7;

La Figura 9 presenta los resultados de quimioluminiscencia del Ejemplo 9;

La Figura 10 presenta el número de células tumorales en el hígado después de los ensayos del Ejemplo 9;

La Figura 11 presenta fotografías de los hígados de las ratas control y de las ratas de ensayo después de los ensayos del Ejemplo 9.

Ejemplo de referencia

Método general para la preparación de microesferas

Síntesis del macrómero nelfilcon B

La primera fase de la síntesis de microesferas incluye la preparación de nelfilcon B - un macrómero polimerizable a partir del polímero de PVA soluble en agua utilizado ampliamente. Se añade Mowiol 8-88, poli(alcohol vinílico) (PVA) polvo (88% de hidrolizado, 12% de contenido de acetato, peso molecular medio de aproximadamente 67.000 D) (150 g) (Clariant, Charlotte, N.C. USA) a un vaso de reacción de vidrio de 2 L. Con agitación suave, se añaden 1000 ml de agua y se aumenta la agitación a 400 rpm. Para asegurar la disolución completa del PVA, se sube la temperatura hasta 99 ± 9ºC durante 2-3 horas. Enfriando a temperatura ambiente se mezcla N-acriloilaminoacetaldehído (NAAADA) (Ciba Vision, Germany) (2,49 g o 0,104 mmol/g de PVA) en la solución de PVA seguido por la adición de ácido clorhídrico concentrado (100 ml) que cataliza la adición del NAAADA al PVA por transesterificación. La reacción tiene lugar a temperatura ambiente durante 6-7 horas, después se para por neutralización a pH 7,4 utilizando solución 2,5 M de hidróxido de sodio. El cloruro de sodio resultante más cualquier NAAADA sin reaccionar se separan por diafiltración (etapa 2).

Diafiltración del macrómero

La diafiltración (filtración de flujo tangencial) se realiza circulando de modo continuo una solución de alimentación a ser purificada (en este caso solución de nelfilcon B) a través de la superficie de una membrana que permite la permeación del material no deseado (NaCl, NAAADA) que va al material de desecho mientras que tiene un tamaño de poro suficientemente pequeño para evitar el paso del material retenido que permanece en circulación.

La diafiltración de nelfilcon B se realiza utilizando un mini soporte de acero inoxidable Pellicon 2 que tiene apiladas membranas de celulosa de 0,1 m^2 que tienen un tamaño de poro con un peso molecular de corte de 3000 (Millipore Corporation, Bedford, Mass. USA). El Mowiol 8-88 tiene un peso molecular medio de 67000 y por tanto tiene una capacidad limitada para permear a través de las membranas.

El matraz que contiene el macrómero está provisto de una barra de agitación magnética y se coloca en una placa de agitación. La solución se alimenta al conjunto de diafiltración mediante una bomba peristáltica Masterflex LS provista de una cabeza de bomba Easy Load II y utilizando tubería LS24 clase VI. Se circula el nelfilcon sobre las membranas a aproximadamente 3,4 x 10^5 kPa (50 psi) para acelerar la permeación. Cuando la solución ha sido concentrada hasta aproximadamente 1000 ml se mantiene constante el volumen mediante la adición de agua a la misma velocidad con la que se recoge el filtrado en el material de desecho hasta que se hayan añadido 6000 ml extra. Una vez alcanzada, se concentra la solución hasta 20-23% de sólidos con una viscosidad de 1700-3400 mPa.s a 25ºC. El nelfilcon se caracteriza por GFC, NMR y por la viscosidad.

Síntesis de las microesferas

Las esferas se sintetizan por un método de polimerización en suspensión en el que una fase acuosa (nelfilcon B) se añade a una fase orgánica (acetato de butilo) y donde las fases son inmiscibles. Empleando un mezclado rápido se puede dispersar la fase acuosa para formar gotitas, cuyo tamaño y estabilidad se pueden controlar por factores

tales como velocidades de agitación, viscosidad, relación de fase acuosa/fase orgánica y el uso de estabilizantes y tensioactivos que influyen en la energía interfacial entre las fases. Se fabrican dos series de microesferas, una serie con AMPS bajo y una serie con AMPS alto, cuya formulación se muestra a continuación.

A	AMPS alto:
Fase acuosa:	aproximadamente 21% p/p de solución de nelfilcon B (400 ± 50 g aprox)
	aproximadamente 50% p/p de 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato (AMPS) sal de Na (140 ±10 g)
	agua purificada (137 ± 30 g)
	persulfato de potasio (5,22 ± 0,1 g)
	tetrametiletilendiamina TMEDA (6,4 ± 0,1 ml)
Fase orgánica:	acetato de n-butilo (2,7 ± 0,3 L)
	10% p/p de acetato-butirato de celulosa (CAB) en acetato de etilo (46 ± 0,5 g)
	agua purificada (19,0 ± 0,5 ml)
B	AMPS bajo:
Fase acuosa:	aproximadamente 21% p/p de solución de nelfilcon B (900 ± 100 g aprox)
	aproximadamente 50% p/p de 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato (AMPS) sal de Na (30,6 ± 6 g)
	agua purificada (426 ± 80 g)
	persulfato de potasio (20,88 ± 0,2 g)
	TMEDA (25,6 ± 0,5 ml)
Fase orgánica:	acetato de n-butilo (2,2 ± 0,3 L)
	10% p/p de acetato-butirato de celulosa (CAB) en acetato de etilo (92 ± 1,0 g)
	agua purificada (16,7 ± 0,5 ml).

Se calienta un recipiente de reacción de 4000 ml con camisa, utilizando un baño controlado por ordenador (Julabo PN 9-300-650) con sensores de retroalimentación que hacen un seguimiento continuo de la temperatura de reacción.

Se añade el acetato de butilo al reactor a 25ºC seguido por la solución de CAB y agua. Se purga el sistema con nitrógeno durante 15 minutos antes de añadir el macrómero de PVA. Se inicia la reticulación de la solución de PVA dispersada mediante la adición de TMEDA y subiendo la temperatura a 55ºC durante tres horas bajo nitrógeno. La reticulación tiene lugar mediante una polimerización iniciada por redox con lo que los grupos amino de la TMEDA reaccionan con el grupo peróxido del persulfato de potasio para generar especies radicales. Estos radicales inician entonces la polimerización y reticulación de los dobles enlaces sobre el PVA y el AMPS transformando las gotitas de PVA-AMPS dispersadas en microesferas de polímero insolubles. Después de enfriar a 25ºC se transfiere el producto a un reactor filtro para purificación donde el acetato de butilo se separa por filtración seguida por:

- Lavado con 2 × 300 ml de acetato de etilo para eliminar el acetato de butilo y el CAB
- Equilibrar en acetato de etilo durante 30 min y después filtrar
- Lavar con 2 × 300 ml de acetato de etilo con filtración a vacío
- Equilibrar en acetona durante 30 min y filtrar para eliminar el acetato de etilo, el CAB y el agua
- Lavar con 2 × 300 ml de acetona con filtración a vacío
- Equilibrar en acetona durante la noche
- Lavar con 2 × 300 ml de acetona a vacío
- Secar a vacío, 2 horas, 55ºC, para eliminar los disolventes residuales.

Coloración

Esta etapa es opcional. Generalmente es innecesaria cuando se carga el fármaco con un compuesto activo coloreado (ya que este proporciona el color) pero se menciona aquí que hay ventajas reflejadas en el Ejemplo 8 que sigue. Cuando se hidrata la microesfera contiene aproximadamente 90% (p/p) de agua y puede ser difícil de visualizar. Para ayudar a la visualización en un marco clínico, se colorean de azul las esferas utilizando el colorante azul # 4 reactivo (RB4). El RB4 es un colorante de clorotriazina soluble en agua que en condiciones alcalinas reaccionará con los grupos hidroxilo colgantes sobre la cadena principal de PVA generando un enlace éter covalente. La reacción se lleva a cabo a pH 12 (NaOH) con lo que el HCl generado será neutralizado dando como resultado NaCl.

Antes de la coloración, las esferas se rehidratan completamente y se dividen en alícuotas de 35 g (tratadas individualmente). Se prepara la solución colorante disolviendo 0,8 g de RB4 en solución 2,5 M de NaOH (25 ml) y agua (15 ml) añadiéndola después a las esferas en 2 L de solución salina a 80 $g.L^{-1}$. Después de mezclar durante 20 min se recoge el producto sobre un tamiz de 32 μm y se lava para eliminar el grueso del colorante sin reaccionar.

Extracción

Se utiliza un procedimiento de extracción extensa para eliminar cualquier RB4 no unido o no adsorbido específicamente. El protocolo seguido es como se indica:

- Equilibrar en 2 L de agua durante 5 min. Recoger sobre un tamiz y lavar. Repetir 5 veces
- Equilibrar en 2 L de solución de hidrogenofosfato de disodio 80 mM en solución salina al 0,29% (p/p). Calentar a ebullición durante 30 min. Enfriar, recoger sobre un tamiz y lavar con 1 L de solución salina. Repetir dos veces más.
- Recoger, lavar sobre un tamiz el equilibrado en 2 L de agua durante 10 min.
- Recoger y deshidratar en 1 L de acetona durante 30 min.
- Reunir todas las alícuotas y equilibrar durante la noche en 2 L de acetona.

Tamizado

Las microesferas fabricadas varían en tamaño de 100 a 1200 micras y deben sufrir un fraccionamiento a través de un procedimiento de tamizado utilizando un intervalo de tamaños de malla para obtener las distribuciones nominales listadas a continuación.

1. 100-300 μm
2. 300-500 μm
3. 500-700 μm
4. 700-900 μm
5. 900- 1200 μm.

Antes del tamizado, las esferas se secan a vacío para eliminar cualquier disolvente y después se equilibran a 60ºC en agua para ser rehidratadas completamente. Se tamizan las esferas utilizando una unidad de tamiz vorti de acero inoxidable de 316 L (MM Industries, Salem Ohio) con bandejas de tamizado de acero inoxidable de 38 cm (15 pulgadas) con tamaños de malla que varían de 32 a 1000 μm. Se hace recircular solución salina filtrada a través de la unidad para ayudar al fraccionamiento. Se desechan las esferas recogidas en el tamiz de 32 micras.

Ejemplo 1

Carga & elución del irinotecan de las perlas de embolización

Se analizaron los siguientes productos de microesferas (“Perlas”):

1. Microesferas de AMPS alto (“Gelesfera GS”) (preparadas como en el Ejemplo 1), fracción de tamaño de partícula de 100 a 300 μm, 500-700 μm y 900-1200 μm, contenido de agua en equilibrio 94%. (Invención).
2. Contour SE, un producto embólico comercialmente disponible que comprende microesferas de poli(alcohol vinílico) no iónico, fracción de tamaño de partícula de 500-700 μm, contenido de agua en equilibrio 40%. (referencia).

3. Microesferas de AMPS bajo ("BeadBlock - BB") preparadas como en el Ejemplo 1) intervalo de tamaño de partícula de 100 a 300 μm, contenido de agua en equilibrio 90%. (Invención).

4. Embosfera - un agente embólico comercialmente disponible que comprende partículas de copolímero N-acriloil-2-amino-2-hidroxi-metil-propano-1,3-diol-co-N,N-bisacrilamida) reticulado con gelatina y glutaraldehído que tiene un tamaño de partícula que varía de 100-300 y de 500 a 700 μm. Este polímero a pH neutro tiene una carga positiva neta a partir del contenido en gelatina. (FR-A-7723223). El contenido de agua en equilibrio es 91%. (Referencia).

5. Amberlita ira400 (resina tipo gel fuertemente básica, funcionalidad de amonio cuaternario, tamaño medio = 510 μm, contenido en agua = 52,44%). (Referencia).

6. Amberlyst 36 (húmeda), muy fuertemente ácida, funcionalidad de ácido sulfónico, forma de hidrógeno, tamaño medio = 667 μm, contenido en agua = 57,25). (Invención).

7. Ultra-drivalon 250-4000 μm (partículas de PVA). (Referencia).

Se utilizó el hidrocloruro de irinotecan trihidrato (Campto, de Aventis), a una concentración de 20 mg/ml. Otros ingredientes dentro de esta formulación incluyen sorbitol y ácido láctico. La concentración del compuesto de camptotecina se determinó utilizando espectroscopía UV a 369 nm.

Se mezcló 1 ml de cada suspensión de perlas con 1 ml de solución de irinotecan (20 mg/ml) en una cantidad calculada, mezclando por rotación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se midió la concentración de la solución remanente con UV a 369 nm para determinar la concentración de irinotecan. Se calculó la cantidad de fármaco cargada en las perlas por el método de depleción. La Figura 1 presenta las características de carga de las microesferas en estudio. Claramente las perlas con componentes iónicos son capaces de cargar cantidades apreciables del fármaco (Gelesferas y Amberlyst particularmente). La carga es particularmente rápida para las Gelesferas (5-10 minutos) mientras que la Amberlyst requiere ~60 minutos.

Estas perlas cargan activamente la concentración total de 20 mg del fármaco de la solución. Los otros agentes embólicos son solamente capaces de cargar 5-7 mg de la solución, lo que es esencialmente un efecto de reparto en equilibrio, indicando que no hay ninguna interacción específica entre la perla y el fármaco.

Se eluyó el irinotecan a partir de 1 ml de perlas cargadas como se ha descrito antes en 200 ml de tampón PBS, a temperatura ambiente durante 2 horas. Los resultados (Figura 2) muestran casi la misma velocidad de elución para todas las perlas, con una elución de más del 90% del total eluido en los 10 primeros minutos, y completa en 2 horas, con la excepción de Amberlyst 36 húmeda, que presenta un perfil de elución más lento, con el 40% eluido en las 2 primeras horas. Esto se atribuye al alto nivel del componente de ácido sulfónico fuertemente ácido.

La Figura 3 presenta sin embargo la comparación de los perfiles de elución de diferentes perlas cargadas de irinotecan en agua. Se eluyó 1 ml de perlas cargadas en 100 ml de agua (grado HPLC) durante 30 minutos. Las perlas Contour SE y Embosferas muestran el 100% de elución en los 10 primeros minutos mientras que las perlas Gelesferas muestran una elución de menos del 1% de la carga total. Esto indicó que la elución es dirigida por un mecanismo de intercambio iónico y sugiere que será posible formular las esferas de la invención en una forma hidratada dentro de agua pura sin temor de pérdida del fármaco por elución en el medio durante el tiempo de almacenaje. Esta característica no sería posible con los agentes embólicos microesféricos comerciales actuales.

Ejemplo 2

Investigación de la capacidad de carga de las Gelesferas

El contenido de carga del irinotecan y la eficacia de carga se determinó usando Gelesferas, 500-700 μm. Se mezcló una suspensión de perlas con la solución de irinotecan (20 mg/ml) en cantidad calculada, mezclando por rotación durante al menos 4 horas. Se midió la solución con UV a 369 nm para determinar la concentración de irinotecan y la carga de fármaco en las perlas (por el método de depleción). La línea recta de la Figura 4 muestra que el contenido de irinotecan en las perlas aumentó linealmente con la cantidad designada de carga a concentración baja (inferior a 50 mg/ml). Por encima de esta concentración, disminuyó notablemente la eficacia de carga, indicando saturación de las perlas.

Ejemplo 3

Cambio de tamaño con carga de irinotecan

Se midió el cambio de tamaño de las Gelesferas con carga de irinotecan mediante el uso de Image-ProPlus 4.5 con microscopía óptica de vídeo. La condición de carga es el tamaño de las Gelesferas, 500-700 μm; la concentración de irinotecan en la solución de carga es 20 mg/ml (Campto) a temperatura ambiente manteniendo en un mezclador de rotación durante la noche. La Figura 5 muestra que hay una disminución en el tamaño de la perla con el aumento de la concentración de fármaco asociado dentro de las perlas. Esto se asocia con el desplazamiento de agua desde la estructura de hidrogel por el fármaco que interactúa con los grupos iónicos.

Ejemplo 4

Efecto del tamaño de las perlas y contenido de grupo iónico sobre la carga de fármaco

Una comparación de la velocidad de carga de irinotecan en las Gelesferas con AMPS alto de diferentes tamaños y las BeadBlock con AMPS bajo. Las condiciones de carga fueron, 1 ml de cada suspensión de perlas (Gelesferas y BeadBlock de 100-300 μm) se mezcló con 2,5 ml de solución de irinotecan (20 mg/ml); 1 ml de solución de perlas (Gelesferas de 300-500 μm) se mezcló con 1 ml de solución de irinotecan (20 mg/ml). Las mezclas se mezclaron por rotación y la concentración de la solución se midió con UV a 369 nm. La Figura 6 presenta Gelesferas de diferentes tamaños cargadas a velocidades similares, muy rápidas; las esferas con AMPS bajo cargan menos fármaco debido a una concentración más baja del componente iónico de las microesferas.

Ejemplo 5

Liofilización de las Gelesferas cargadas con irinotecan

Se mezcló 1 ml de perlas de Gelesferas con solución Campto (20 mg/ml) y se mezclaron por rotación durante 3 horas. La solución remanente se separó utilizando una pipeta para dejar una suspensión de perlas que fue liofilizada hasta un producto seco. Se alcanzaron diferentes niveles de carga variando la cantidad de solución de fármaco.

Ejemplo 6

Elución de irinotecan a partir de las Gelesferas liofilizadas

Se eluyó el irinotecan a partir de las Gelesferas liofilizadas con diferentes cargas de camptotecina preparadas como en el Ejemplo 5 en tampón PBS. Los resultados se muestran en la Figura 7. La velocidad de elución se redujo después de la liofilización en comparación con las muestras no liofilizadas. También la carga de fármaco más alta demostró una elución más lenta en comparación con la carga más baja.

Ejemplo 7

Comparación de la elución de hidrocloruro de irinotecan formulado y no formulado

Se mezcló 1 ml de suspensión de perlas con la formulación Campto y se mezclaron por rotación durante 3-4 horas. En un estudio separado de carga se cargó 1 ml de perlas con fármaco neto de hidrocloruro de irinotecan sólido mezclando la suspensión de perlas con el fármaco en polvo y 2 ml de agua, y se mezclaron por rotación durante 3-4 horas en cuyo tiempo el fármaco se disolvió lentamente y se alojó activamente en las perlas. Se eluyó el irinotecan de las diferentes Gelesferas de 900-1200 μm en 200 ml de tampón PBS. Las curvas de elución mostradas en la Figura 8 no presentan diferencias significativas entre las perlas cargadas con la formulación o las cargadas usando el fármaco neto.

Ejemplo 8

Indicación de carga del fármaco

Las microesferas Gelesferas se tiñen de azul usando el colorante azul 4 reactivo con el fin de que se puedan visualizar fácilmente por los radiólogos intervinientes durante el uso. Las microesferas tienen una coloración azul que se ve que aumenta a color turquesa después de la carga del irinotecan en las perlas. Esta se puede usar como un indicador visual para diferenciar entre las perlas cargadas y las no cargadas. El cambio de color es aún más marcado en las perlas cargadas con irinotecan liofilizadas.

Ejemplo 9

Sumario de un estudio piloto preclínico de Gelesferas cargadas con irinotecan y cargadas con doxorubicina en el modelo de metástasis de hígado en rata CC531-lacZ

El propósito de este estudio piloto fue evaluar la efectividad del fármaco eluyendo las perlas para quimioembolización en un modelo de metástasis en hígado de rata, utilizando perlas cargadas con irinotecan o perlas cargadas con doxorubicina. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la viabilidad, determinar la reducción de la carga tumoral en las ratas tratadas con quimioembolización, y determinar la dosis de fármaco a utilizar en el estudio principal.

Se eligió para este estudio el modelo de rata como un modelo adecuado para quimioembolización porque se había demostrado previamente utilizando este modelo, que había una actividad significativa de irinotecan en términos de remisión completa en el 44% de las ratas y de reducción de la carga media de células tumorales en un 66%. (Saenger *et al., op. cit.*). En este modelo se trasplantan las células CC531-lacZ mediante inyección en la vena portal de ratas macho WAG/Rij y se realiza la detección de las células tumorales por su actividad de β-galactosidasa. Esto permite la determinación del número de células utilizando un ensayo de quimioluminescencia.

Debido al pequeño tamaño de los vasos sanguíneos en las ratas y con el fin de ser consistentes con estudios anteriores, se utilizarán también las microesferas con un tamaño de 75 μm ± 25 μm. Las microesferas se prepararán específicamente para el estudio por el método detallado previamente en el ejemplo 1 (Amps alto) y se teñirán y esterilizarán por procedimientos normales.

Se mezcla el fármaco con las microesferas inmediatamente antes de la embolización.

Se deja que el fármaco y las microesferas se carguen durante 30 a 60 minutos y se agitan cada 5 a 10 minutos para cargar. Alternativamente se ponen en un mezclador rotatorio para ayudar a la carga.

Se inyectan las células tumorales en la vena portal del modelo de rata el día 0. Se realiza una relaparatomía el día 8 que permite un control visual de la presencia de células tumorales en el hígado. Los animales que resultaron ser positivos en cuanto a la presencia de un tumor recibieron el tratamiento de embolización a través de la arteria hepática el día 8. El día 21, se debe terminar el experimento. Se determina el peso del hígado de los animales y se congelan profundamente los hígados hasta el momento de determinar el número de células tumorales por luminometría.

Se utilizaron las siguientes dosis de irinotecan en el estudio piloto: 60 mg/kg, 30 mg/kg y 15 mg/kg. Los resultados se muestran en la Figura 9 que presenta la media y la mediana del número de células tumorales viables en el hígado para los grupos control (n=9), y para los grupos de 60 mg/kg y 15 mg/kg (n=3) de perlas cargadas con irinotecan.

Utilizando un ensayo de quimioluminescencia, se midió el número de células tumorales viables en el hígado en los animales control y en los animales de ensayo. La Figura 9 muestra que hay una reducción de más de dos veces en el número de células tumorales viables en las ratas que sufrieron quimioembolización a una dosis de irinotecan de 60 mg/kg. Aunque el grupo de 15 mg/kg parece que tiene un número más alto de células tumorales, se debe observar que en el grupo control hay muchas células tumorales que se han vuelto necróticas, mientras que en el grupo de 15 mg/kg la velocidad de crecimiento del tumor fue más lenta y como resultado la necrosis es inferior lo que lleva a un número más alto de células tumorales viables en este punto de tiempo.

Un experimento adicional con 30 mg/kg de irinotecan demostró la desaparición completa de las células tumorales en el hígado de la rata (Figura 10). La Figura 10 presenta la media y la mediana del número de células tumorales en el hígado para los grupos control y para los grupos de 30 mg/kg de irinotecan.

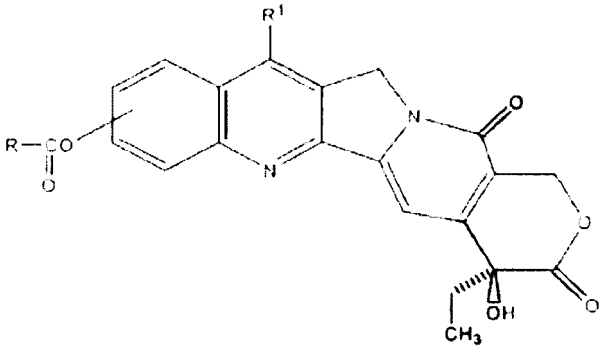
La Figura 11 presenta el aspecto del hígado en el momento del sacrificio. El hígado control (A) presenta el aspecto difuso del tumor por todo el hígado, así como un aumento del volumen del hígado. El hígado de los animales después de quimioembolización con 60 (B) o 30 (C) mg/kg de irinotecan demuestra que el hígado tiene un aspecto aparentemente sano sin ningún tumor detectable y sin aumento de volumen del hígado.

REIVINDICACIONES

1. El uso de microesferas que comprenden un polímero hinchable en agua, insoluble en agua, que está cargado aniónicamente a pH 7 y que tiene un contenido en agua en equilibrio cuando se hincha en agua a 37ºC, medido por análisis gravimétrico, en el intervalo de 40 a 99% y, asociado electrostáticamente con el polímero en forma liberable, un compuesto de camptotecina cargado catiónicamente, en la fabricación de una composición para uso en un método de tratamiento en el cual la composición se introduce en un vaso sanguíneo y las microesferas forman un émbolo en el vaso sanguíneo, en el cual las microesferas tienen tamaños, cuando están equilibradas en agua a 37ºC, en el intervalo de 100 a 1500 μm, en cuyo método el compuesto de camptotecina se libera del émbolo.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es para un tumor sólido.

3. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto de camptotecina tiene preferiblemente la fórmula general I



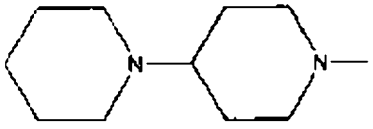
en la que R^1 es H, alquilo (C_{1-6}) inferior, opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amina, alcoxi, halógeno, acilo o aciloxi o halógeno; y

R es cloro o NR^2R^3 donde R^2 y R^3 son iguales o diferentes y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-4} sustituido o sin sustituir o un grupo carbocíclico o heterocíclico sustituido o sin sustituir, o R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido que puede estar interrumpido por -O-, -S- o $>NR^4$ en el que R^4 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-4} sustituido o sin sustituir o un grupo fenilo sustituido o sin sustituir;

y donde la agrupación -O-CO-R está unida a un átomo de carbono localizado en cualquiera de las posiciones 9, 10 u 11 del anillo A del compuesto de camptotecina, incluyendo las sales del mismo.

4. El uso según la reivindicación 3, en el que R es NR^2R^3 donde R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido.

5. El uso según la reivindicación 4, en el que R es



6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que RCOO está sustituido en la posición 10.

7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que R^1 es etilo.

8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las partículas tienen tamaños en el intervalo de 200 a 1200 μm.

9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero es poli(alcohol vinílico) reticulado.

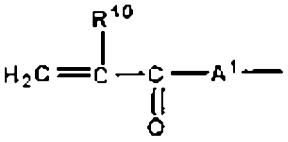
10. El uso según la reivindicación 9, en el que el polímero se forma a partir de un macrómero de poli(alcohol vinílico), que tiene más de un grupo colgante etilénicamente insaturado por molécula, mediante la polimerización radical de los grupos etilénicos.

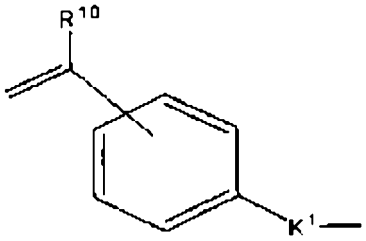
11. El uso según la reivindicación 10, en el que los macrómeros de PVA se copolimerizan con monómeros etilénicamente insaturados.

12. El uso según la reivindicación 11, en el que el monómero incluye un monómero iónico que tiene la fórmula general II

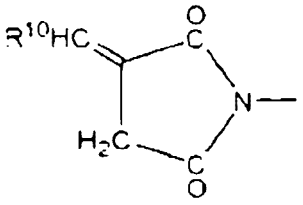
$$Y^1BQ^1 \qquad II$$

en la que Y^1 se selecciona de

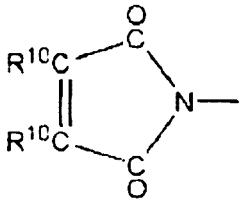




$CH_2=C(R^{10})-CH_2-O-$, $CH_2=C(R^{10})-CH_2OC(O)-$, $CH_2=C(R^{10})OC(O)-$, $CH_2=C(R^{10})-O-$, $CH_2=C(R^{10})CH_2OC(O)N(R^{11})-$, R^{12} $OOCCR^{10}=CR^{10}C(O)-O-$, $R^{10}CH=CHC(O)O-$, $R^{10}CH=C(COOR^{12})CH_2-C(O)-O-$,



y



donde:

R^{10} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

R^{11} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

R^{12} es hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-4} o BQ^1 donde B y Q^1 son como se definen más adelante;

A^1 es-O- o $-NR^{11}-$;

K^1 es un grupo $-(CH_2)_rOC(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)O-$, $-(CH_2)_rNR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)NR^{13}-$ (donde los grupos R^{13} son iguales o diferentes), $-(CH_2)_rO-$, $-(CH_2)_rSO_3-$, u opcionalmente en combinación con B, un enlace de valencia y r es de 1 a 12 y R^{13} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

B es una cadena lineal o ramificada de alcanodiilo, oxaalquileno, alcanodiiloxaalcanodiilo, o alcanodiiloligo(oxaalcanodiilo) que contiene opcionalmente uno o más átomos de flúor incluyendo cadenas perfluoradas o, si Q^1 oY^1 contienen un átomo de carbono terminal unido a un enlace de valencia B; y

Q^1 es un grupo aniónico.

13. El uso según la reivindicación 12, en el que Q^1 es un grupo carboxilato, carbonato, sulfonato, sulfato, nitrato, fosfonato o fosfato.

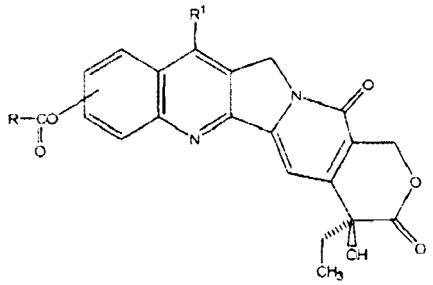
14. El uso según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que Y^1 es un grupo $CH_2=CR^{10}COA-$ en el que R^{10} es H o metilo y en el que A^1 es NH y B es un grupo alcanodiilo de 2 a 6 átomos de carbono.

15. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición que se administra comprende un agente de diagnóstico por la imagen.

16. El uso según la reivindicación 15, en el que el agente de diagnóstico por la imagen es un agente radiopaco.

17. Una composición que comprende microesferas para uso en un método de tratamiento de un tumor sólido en el que la composición se introduce en un vaso sanguíneo y las microesferas forman un émbolo en el vaso sanguíneo, en el que las microesferas comprenden un polímero hinchable en agua, insoluble en agua, que está cargado aniónicamente a pH 7 y que tiene un contenido en agua en equilibrio cuando se hincha en agua a 37ºC, medido por análisis gravimétrico, en el intervalo de 40 a 99% y, asociado electrostáticamente con el polímero en forma liberable, un compuesto de camptotecina cargado catiónicamente, en el cual las microesferas tienen diámetros cuando están equilibradas en agua a temperatura ambiente de más de 100 μm, y las microesferas tienen tamaños, cuando están equilibradas en agua a 37ºC, en el intervalo de 100 a 1500 μm.

18. Una composición según la reivindicación 17, en la que el compuesto de camptotecina tiene la fórmula general I



I

en la que

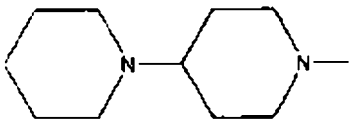
R^1 es H, alquilo (C_{1-6}) inferior, opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amina, alcoxi, halógeno, acilo o aciloxi o halógeno; y

R es cloro o NR^2R^3 donde R^2 y R^3 son iguales o diferentes y cada uno representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-4} sustituido o sin sustituir o un grupo carbocíclico o heterocíclico sustituido o sin sustituir, o R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido que puede estar interrumpido por -O-, -S- o $>NR^4$ en el que R^4 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-4} sustituido o sin sustituir o un grupo fenilo sustituido o sin sustituir;

y donde la agrupación -O-CO-R está unida a un átomo de carbono localizado en cualquiera de las posiciones 9, 10 u 11 del anillo A del compuesto de camptotecina, incluyendo las sales del mismo.

19. Una composición según la reivindicación 18, en la que R es NR^2R^3 donde R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido.

20. Una composición según la reivindicación 19, en la que R es



21. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en la que RCOO- está sustituido en la posición 10.

22. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en la que R^1 es etilo.

23. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en la que el polímero es poli(alcohol vinílico) reticulado.

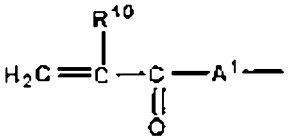
24. Una composición según la reivindicación 23, en la que el polímero se forma a partir de un macrómero de poli (alcohol vinílico), que tiene más de un grupo colgante etilénicamente insaturado por molécula, mediante la polimerización radical de los grupos etilénicos.

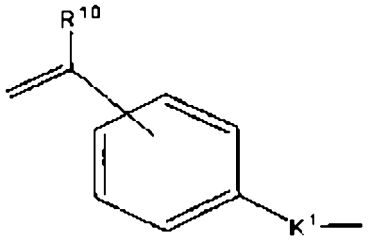
25. Una composición según la reivindicación 24, en la que el macrómero de poli(alcohol vinílico) se copolimeriza con un monómero etilénicamente insaturado.

26. Una composición según la reivindicación 25, en la que el monómero incluye un monómero iónico que tiene la fórmula general II

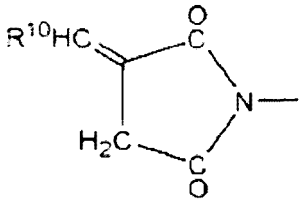
$$Y^1BQ^1 \qquad \text{II}$$

en la que Y^1 se selecciona de

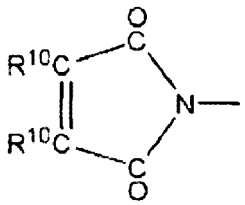




$CH_2=C(R^{10})-CH_2-O-$, $CH_2=C(R^{10})-CH_2OC(O)-$, $CH_2=C(R^{10})OC(O)-$, $CH_2=C(R^{10})-O-$, $CH_2=C(R^{10})CH_2OC(O)N(R^{11})-$, R^{12} $OOCCR^{10}=CR^{10}C(O)-O-$, $R^{10}CH=CHC(O)O-$, $R^{10}CH=C(COOR^{12})CH_2-C(O)-O-$,



y



donde:

R^{10} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

R^{11} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

R^{12} es hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-4} o BQ^1 donde B y Q^1 son como se definen más adelante;

A^1 es-O- o $-NR^{11}-$;

K^1 es un grupo $-(CH_2)_rOC(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)O-$, $-(CH_2)_rNR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)NR^{13}-$, $-(CH_2)_rNR^{13}C(O)NR^{13}-$ (donde los grupos R^{13} son iguales o diferentes), $-(CH_2)_rO-$, $-(CH_2)_rSO_3-$, u opcionalmente en combinación con B, un enlace de valencia y r es de 1 a 12 y R^{13} es hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_4;

B es una cadena lineal o ramificada de alcanodiilo, oxaalquileno, alcanodiiloxaalcanodiilo, o alcanodiiloligo(oxaalcanodiilo) que contiene opcionalmente uno o más átomos de flúor incluyendo cadenas perfluoradas o, si Q^1 oY^1 contienen un átomo de carbono terminal unido a un enlace de valencia B; y

Q^1 es un grupo aniónico.

27. Una composición según la reivindicación 26, en la que Q^1 es un grupo carboxilato, carbonato, sulfonato, sulfato, nitrato, fosfonato o fosfato.

28. Una composición según la reivindicación 26 o la reivindicación 27, en el que Y^1 es un grupo $CH_2=CR^{10}COA-$ en el que R^{10} es H o metilo, y en el que A^1 es NH y B es un grupo alcanodiilo de 2 a 6 átomos de carbono.

29. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, que comprende adicionalmente un agente de suspensión líquido.

30. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 29, que comprende un agente de diagnóstico por la imagen.

31. Una composición según la reivindicación 30, en la que el agente de diagnóstico por la imagen es un agente radiopaco.

32. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, que está en forma de partículas secas.

33. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 32, en la que los diámetros de las microesferas a 37ºC, están en el intervalo de 100 a 1200 μm.

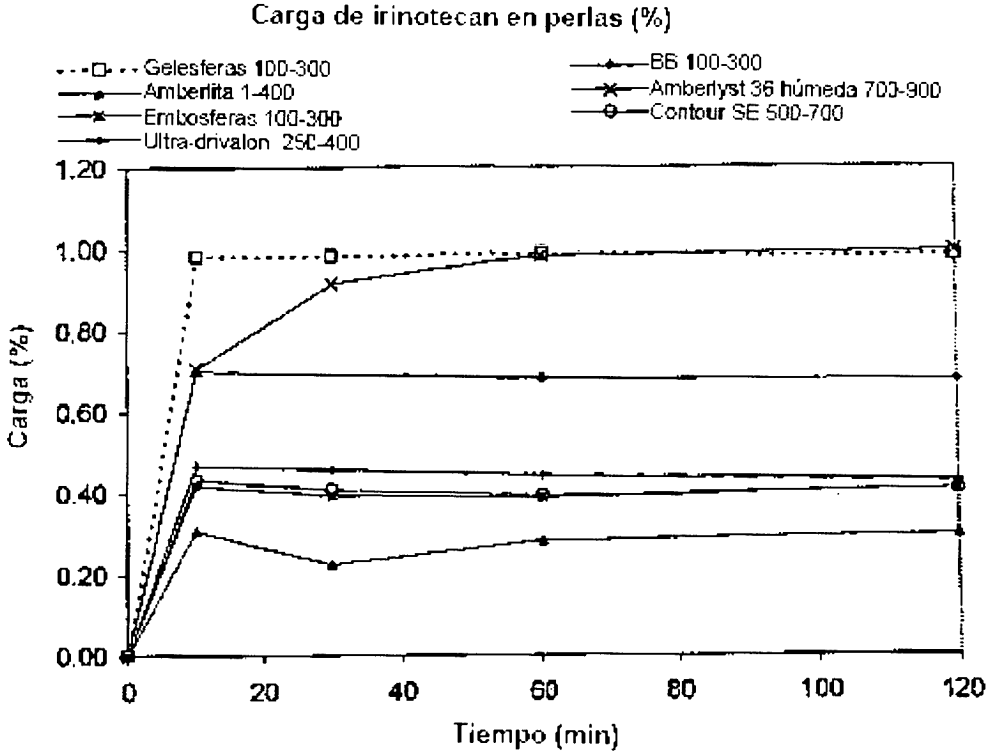


Figura 1

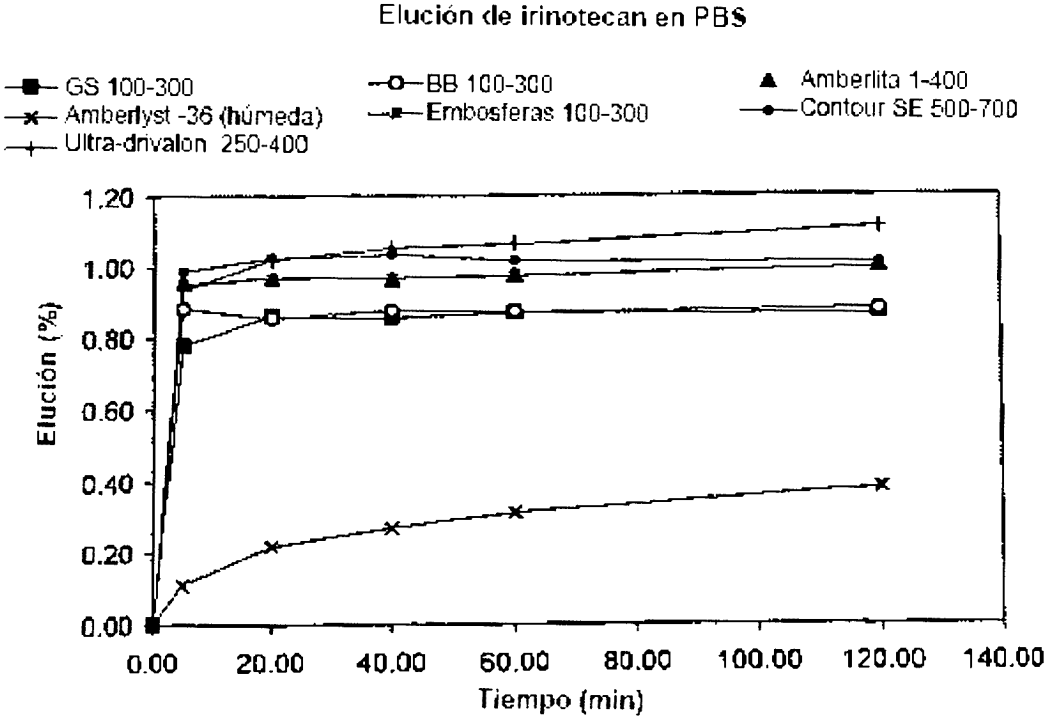


Figura 2

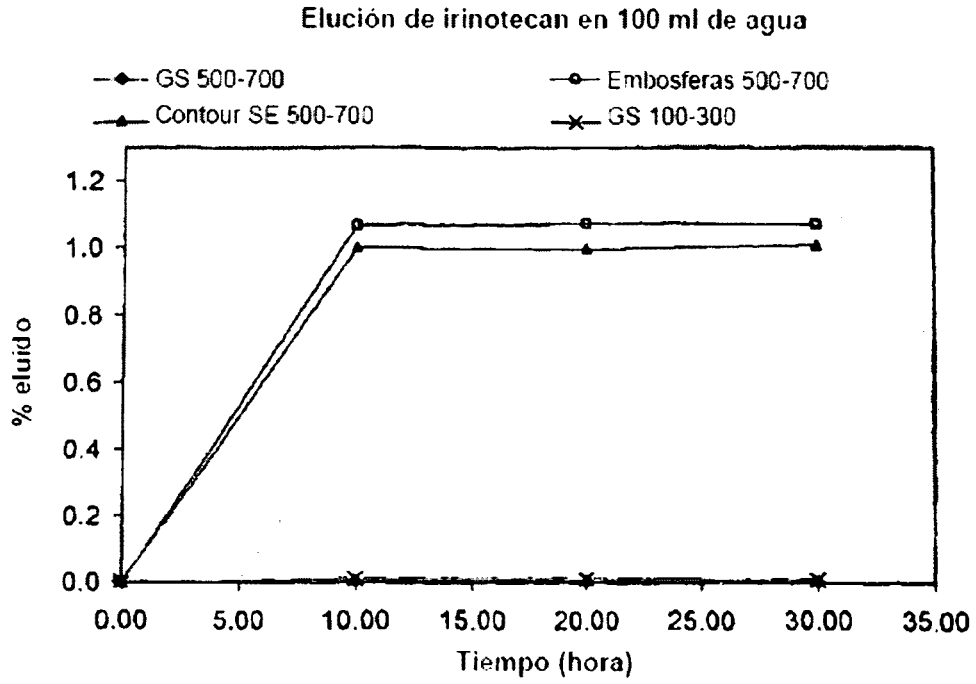


Figura 3

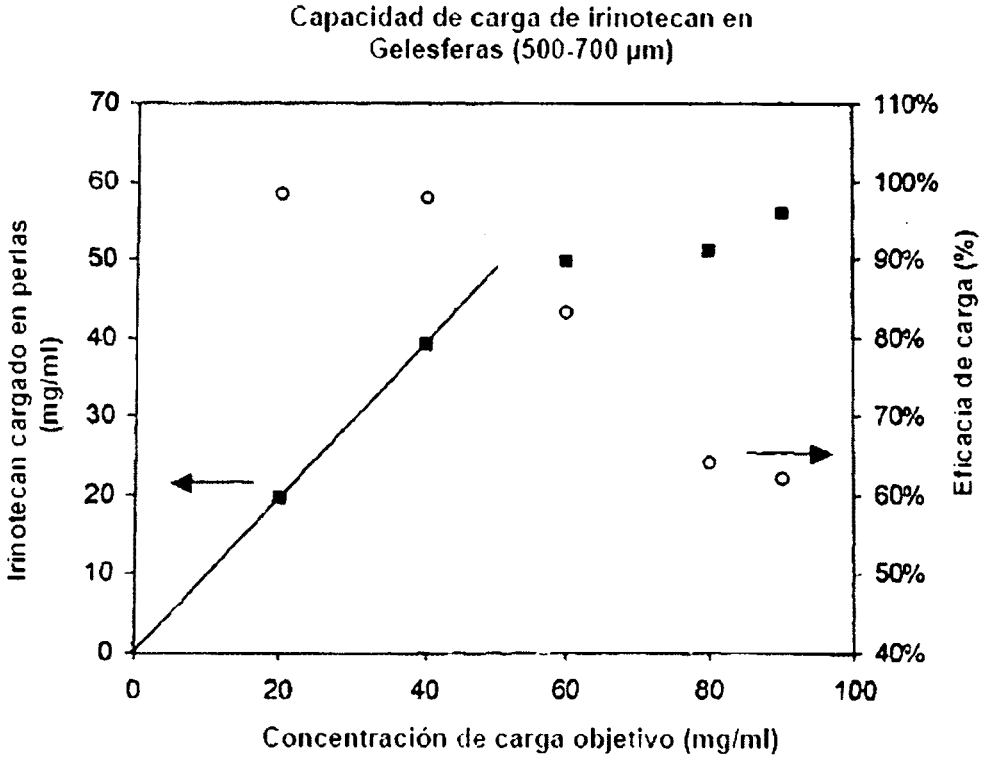


Figura 4

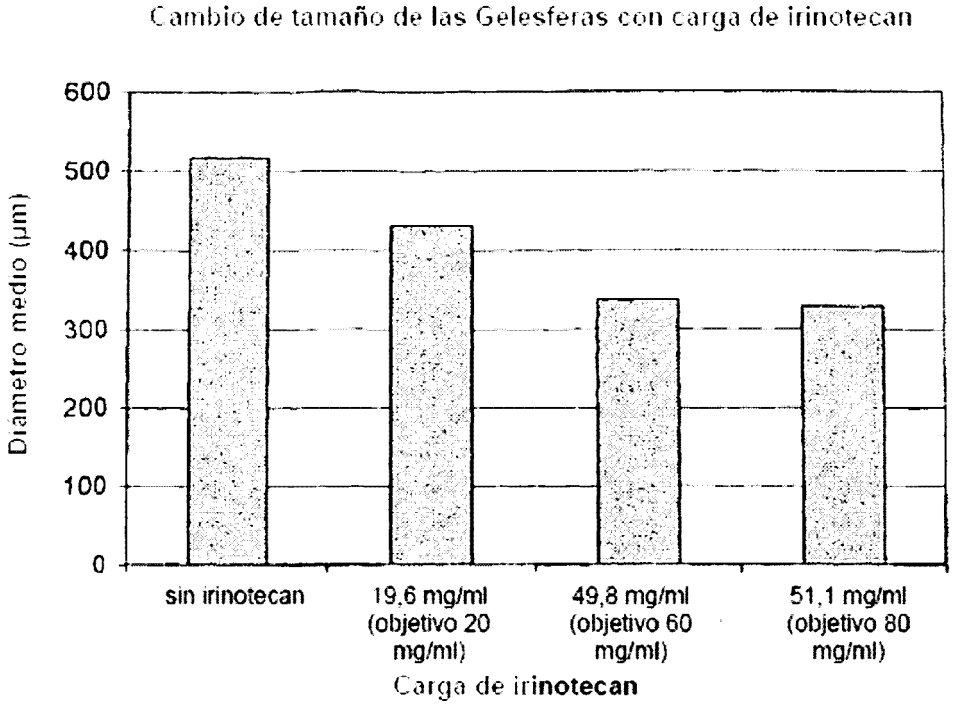


Figura 5

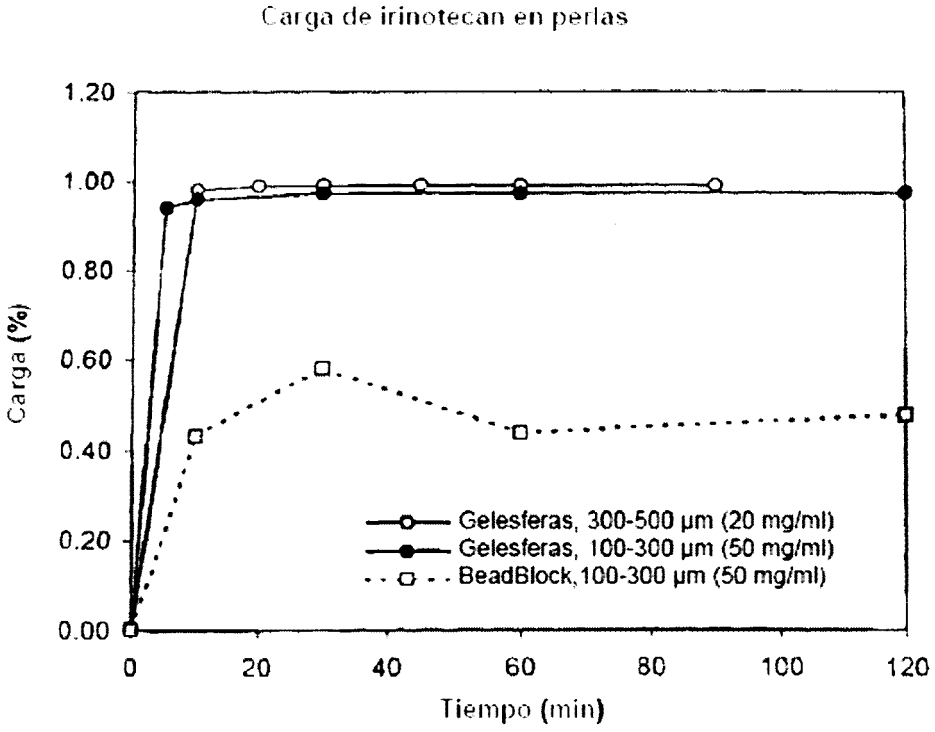


Figura 6

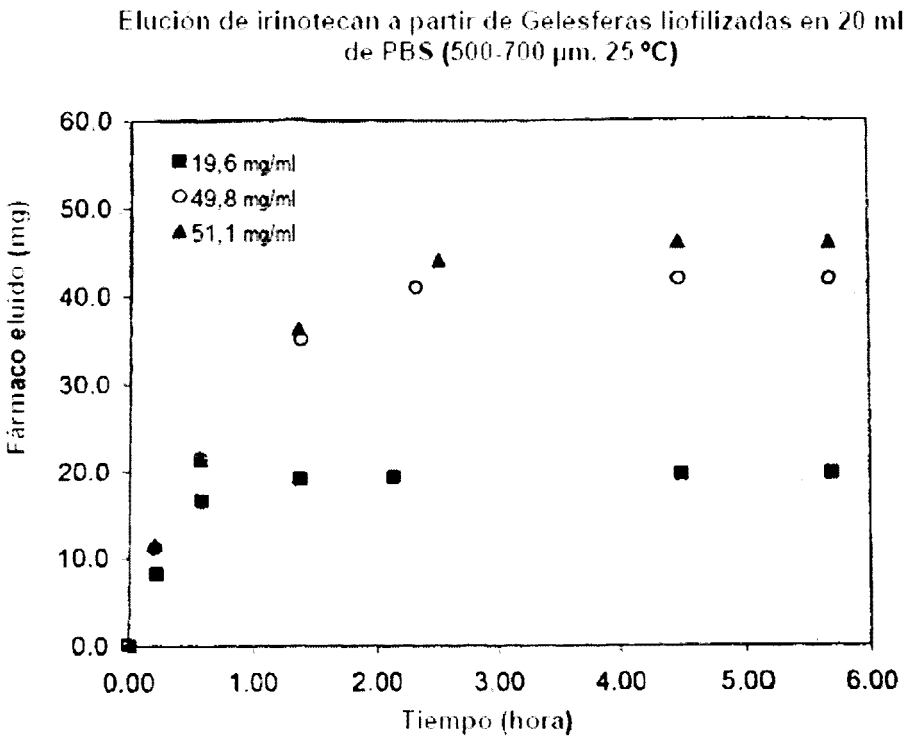


Figura 7

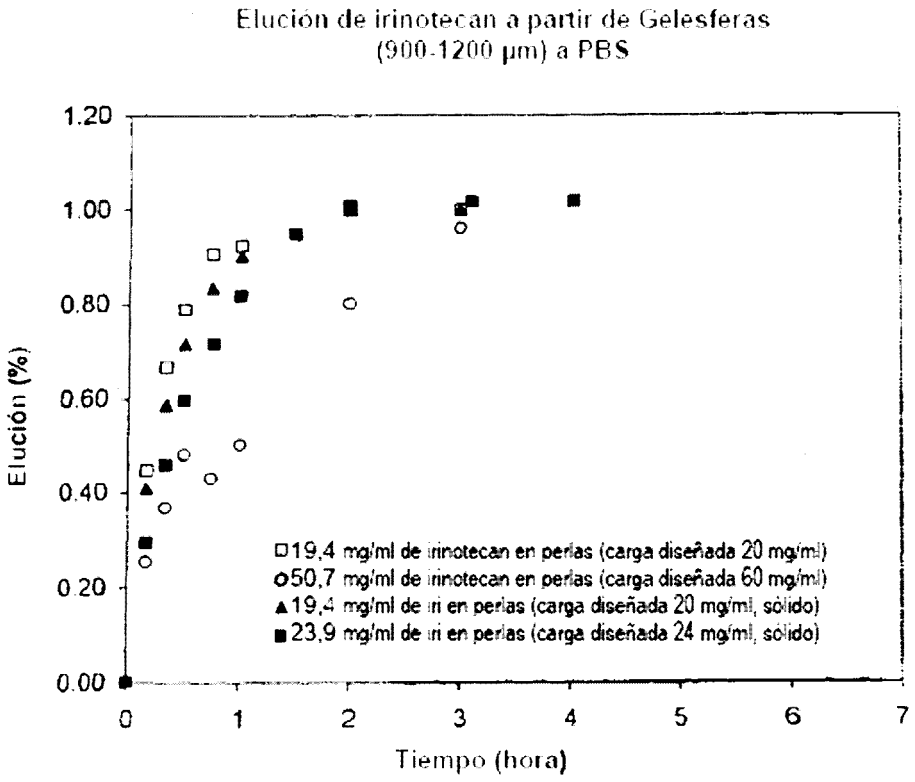


Figura 8

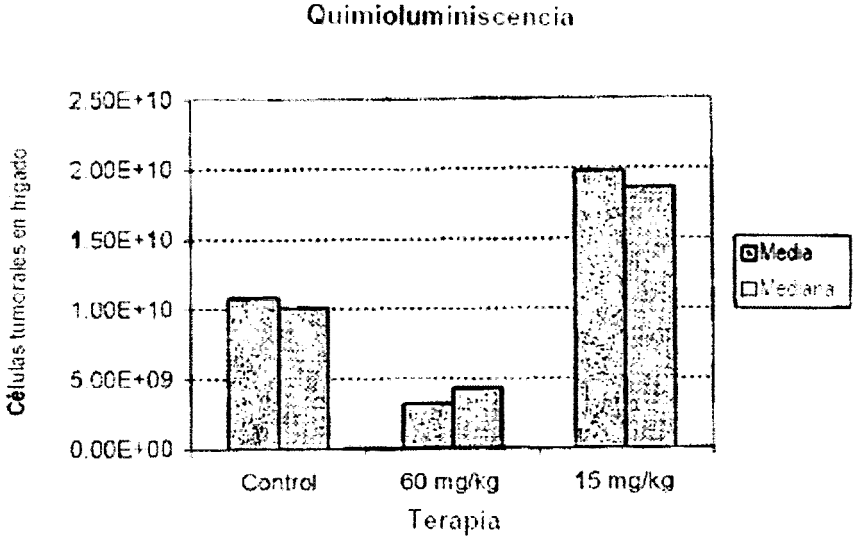


Figura **9**

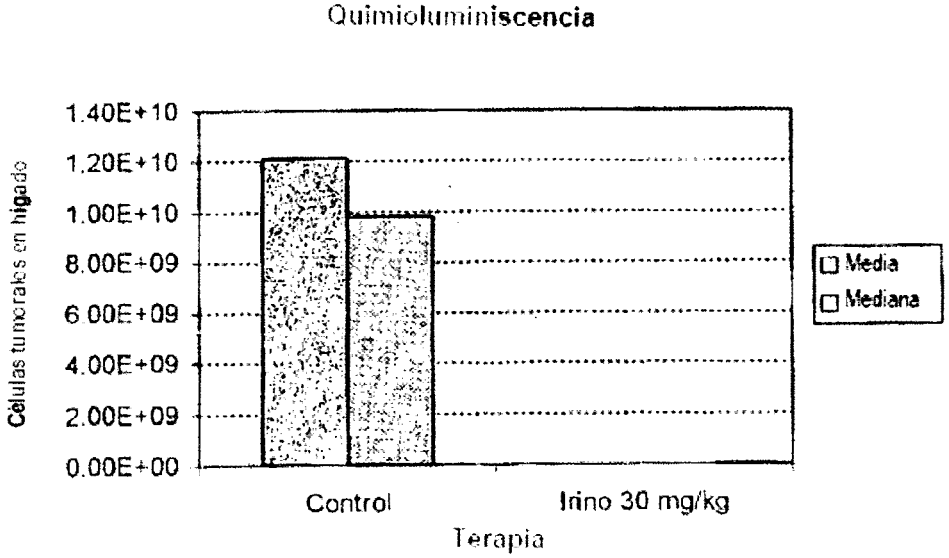


Figura 10

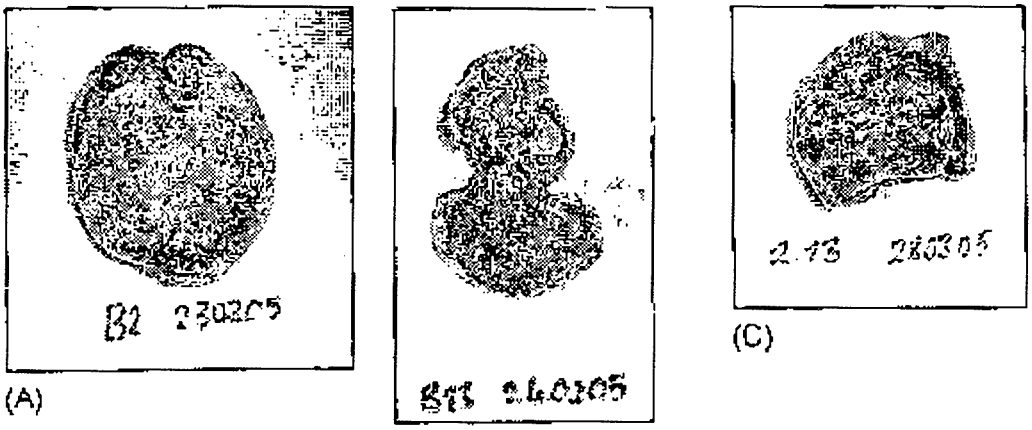


Figura 11