



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 918**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04783400 .7**
96 Fecha de presentación : **04.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1667726**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54 Título: **Conjugados de poliactal-fármaco como sistema de liberación.**

30 Prioridad: **05.09.2003 US 500571 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2011

73 Titular/es: **The General Hospital Corporation**
55 Fruit Street
Boston, Massachusetts 02114, US

72 Inventor/es: **Papisov, Mikhail, I. y**
Yurkovetskiy, Alexander

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 918 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de poliacetal-fármaco como sistema de liberación

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

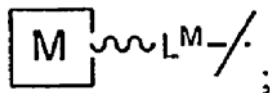
- 5 En forma tradicional, los agentes farmacéuticos principalmente han consistido en moléculas pequeñas que se dispensa en forma oral (como pastillas sólidas y líquidos) o como inyectables. Durante las últimas tres décadas, las formulaciones (es decir, composiciones que controlan la vía y/o tasa de administración del fármaco y permiten la administración del agente terapéutico en el sitio donde se necesita) se han vuelto cada vez más comunes y complejas. No obstante, muchas preguntas y desafíos respecto del desarrollo de nuevos tratamientos así como los mecanismos con los cuales administrarlos aún se deben tratar.
- 10 Si bien los esfuerzos de investigación considerables realizados en esta área han llevado a avances significativos, se han desarrollado métodos/sistemas de administración de fármacos durante años y que se usan en la actualidad, todavía exhiben problemas específicos que requieren mejora. Por ejemplo, muchos fármacos exhiben potencias y efectos terapéuticos limitados o reducidos de otro modo porque en general están sujetos a la degradación parcial antes de llegar a un blanco deseado en el cuerpo o se acumulan en tejidos diferentes del blanco o ambos.
- 15 Un objetivo en el campo de los sistemas de administración de fármacos, en consecuencia, es administrar medicaciones intactas a áreas específicamente dirigidas del cuerpo a través de un sistema que puede estabilizar el fármaco y controlar la transferencia in vivo de los agentes terapéuticos por medio de mecanismos fisiológicos o químicos o ambos. Durante la última década, se ha mostrado que materiales tales como microesferas poliméricas, micelas poliméricas, polímeros solubles y materiales tipo hidrogel son efectivos para aumentar la estabilidad del fármaco in vitro e in vivo, dinámica de liberación, especificidad de direccionamiento, reducción de la toxicidad del fármaco sistémico y en consecuencia han mostrado gran potencial para usar en aplicaciones biomédicas, en particular como componentes de varias formulaciones y dispositivos de administración del fármaco.
- 20 En consecuencia existe una necesidad en el campo biomédico de conjugados poliméricos hidrófilos, biocompatibles, biodegradable y de baja toxicidad que comprenden modificadores farmacéuticamente útiles, que superan o minimizan los problemas mencionados antes. Tales conjugados poliméricos se pueden usar en varias aplicaciones, que incluyen formulaciones farmacéuticas terapéuticas y diagnósticas, vectores del gen, dispositivos médicos, implantes y otros agentes terapéuticos, diagnósticos y profilácticos.
- 25 El diseño e ingeniería de los polímeros biomédicos (por ejemplo, polímeros para usar condiciones fisiológicas) en general están sujetos a requerimientos específicos y estrictos. En particular, tales materiales poliméricos deben ser compatibles con el medio biológico en que se usarán, lo que a menudo significa que ellos muestran ciertas características de hidrofiliidad. En varias aplicaciones, ellos también deben mostrar biodegradabilidad adecuada (es decir, ellos se degradan a especies de peso molecular bajo. Los fragmentos poliméricos a su vez se metabolizan en el cuerpo o se excretan,).
- 30 La biodegradabilidad se logra normalmente por la síntesis o uso de polímeros que tienen uniones hidrolíticamente inestables en el esqueleto. Los componentes del esqueleto químico más común con esta característica son los ésteres y las amidas. Más recientemente, se han desarrollado nuevos polímeros con anhídrido, ortoéster, poliacetal, policetal y otros componentes de esqueleto biodegradable. La hidrólisis de la estructura del esqueleto es el mecanismo prevalente para la degradación de tales polímeros. Otros tipos de polímeros, tales como poliéteres, pueden degradarse a través de la oxidación intra- o extracelular. Los polímeros biodegradables pueden ser naturales o sintéticos. Los polímeros sintéticos más comúnmente usados en aplicaciones médicas e investigación biomédica incluyen polietilenglicol (modificador de farmacocinética y respuesta inmune), alcohol polivinílico (portador del fármaco) y poli(hidroxipropilmetacrilamida) (portador del fármaco). Además, los polímeros naturales también se usan aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, dextrano, hidroxietilalmidón, albúmina, poliaminoácidos y proteínas parcialmente hidrolizadas se usan en aplicaciones que varían de expansores de plasma, a agentes radiofarmacéuticos para nutrición parenteral. En general, los polímeros sintéticos pueden ofrecer mayores ventajas que los materiales naturales ya que ellos se pueden adaptar para dar una amplia variedad de propiedades y uniformidad lote a lote más predecible que los materiales provenientes de la mayor parte de las fuentes naturales. Los métodos de preparación de varios materiales poliméricos son bien conocidos en la técnica. En muchas aplicaciones biomédicas, las moléculas poliméricas se deben asociar químicamente con la sustancia farmacológica u otros modificadores o entre sí (por ejemplo, para formar un gel). Varias propiedades del producto final dependen del carácter de asociación, por ejemplo, perfil de liberación del fármaco, inmunotoxicidad, inmunogenicidad y farmacocinética. En consecuencia existe una necesidad de métodos de asociación del polímero con las sustancias farmacológicas y otros modificadores farmacéuticamente útiles que pueden ser compatibles con el uso biomédico de los asociados (conjugados, geles). Tales métodos deben permitir adicionalmente, cuando sea necesario, la liberación del fármaco en condiciones fisiológicas con una velocidad óptima y en una forma o formas químicas óptimamente adecuadas para la aplicación deseada. Endo et al., Cancer Research 48, (12), 1988, 3330-3335 describe la producción de los conjugados de metotrexato-1gG y los estudios realizados en este. WO03/059988 describe los polímeros policetal biodegradables, métodos para su formación y uso y modificación química para incorporar grupos hidrófilos y/o farmacéuticamente útiles. WO 01/10468 describe la producción y el uso de
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

complejos fármaco–portador en que al menos una cadena de nucleótidos y un fármaco se asocian en forma reversible para formar un complejo de fármaco–portador. EP 1055685 describe polímeros ramificados no antigénicos, conjugados preparados con los polímeros y moléculas biológicamente activas y métodos de uso de los conjugados.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

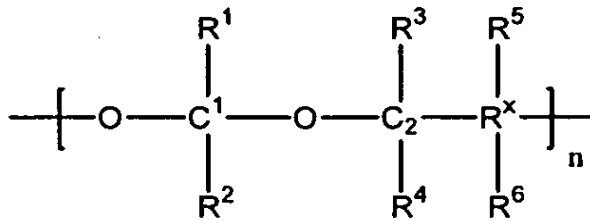
5 La presente invención revela un conjugado de polímero de acuerdo con las reivindicaciones que es biodegradable, biocompatible y exhibe baja toxicidad y/o bioadhesividad in vivo y contiene uno o varios modificadores unidos de forma covalente al polímero por medio de ligaciones que contiene succinamida opcionalmente sustituida. La invención es tal como se define en las reivindicaciones anejas.

10 En un aspecto, la invención comprende un conjugado que comprende un portador sustituido con una o varias apariciones de un resto que tiene la estructura:



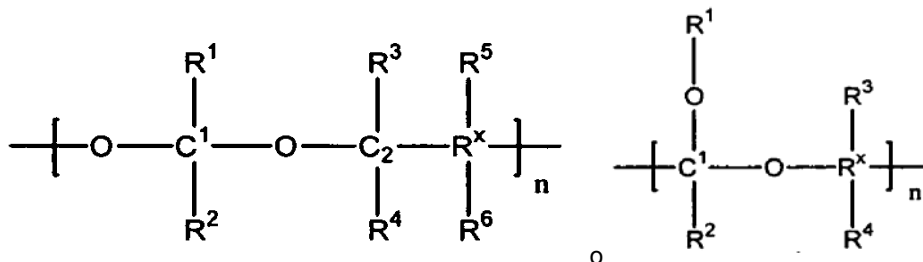
en donde el portador comprende

(a) un poliacetal biocompatible biodegradable, en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición de poliacetal tienen la siguiente estructura química:



15 en donde para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, uno de R¹ y R² es hidrógeno y el otro es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero, cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster; o

25 (b) un policetal biocompatible biodegradable, en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición del policetal tienen la siguiente estructura química:



30 en donde cada aparición de R¹ y R² es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁ u OC₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster;

35 en donde cada aparición de M es, de modo independiente, un modificador que es una pequeña molécula que tiene un peso molecular ≤ 1,5 kDa y en donde el modificador comprende una funcionalidad amina o está químicamente

modificado de modo que comprende un grupo funcional apropiado para el enlace covalente con un ácido succínico opcionalmente sustituido a través de la formación de un enlace de amida;

~ denota la unión directa o indirecta de M con el ligador L^M; y

5 cada aparición de L^M es, de modo independiente, un ligador que contiene succinamida opcionalmente sustituida, en donde el modificador M está directa o indirectamente unido con el ligador de succinamida a través de un enlace amida y el portador está ligado directa o indirectamente a cada aparición del ligador de succinamida a través de un enlace de éster.

En otro aspecto, la invención provee composiciones que comprenden los conjugados, métodos para su preparación y sus métodos de uso en el tratamiento de diversos trastornos, que incluyen cáncer.

10 DEFINICIONES

Ciertos compuestos de la presente invención y definiciones de grupos funcionales específicos también se describen con mayor detalle en la presente. A los fines de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., portada interna y los grupos funcionales específicos se definen en general tal como se describe en la presente. Además, se describen principios generales de la química orgánica, así como restos funcionales específicos y reactividad, en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999.

Por otra parte, un experto en la técnica apreciará que los métodos de síntesis, tal como se describe en la presente, utilizan una variedad de grupos protectores.

20 "Grupo protector": tal como se usa en la presente, la expresión grupo protector significa que un resto funcional particular, por ejemplo, O, S o N, está bloqueado temporalmente de modo que se puede llevar a cabo una reacción selectivamente en otro sitio reactivo en un compuesto multifuncional. En formas de realización preferidas, un grupo protector reacciona selectivamente con buen rendimiento para dar un sustrato protegido que es estable a las reacciones proyectadas; el grupo protector se debe eliminar selectivamente con buen rendimiento por medio de reactivos fácilmente asequibles, con preferencia, reactivos no tóxicos que no atacan los otros grupos funcionales; el grupo protector forma un derivado fácilmente separable (con mayor preferencia, sin la generación de nuevos centros estereogénicos); y el grupo protector tiene un mínimo de funcionalidad adicional para evitar otros sitios de reacción. Tal como se detalla en la presente, se pueden utilizar grupos protectores de oxígeno, azufre, nitrógeno y carbono. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, se pueden utilizar determinados grupos protectores de oxígeno de ejemplo. Estos grupos protectores de oxígeno incluyen éteres metílicos, éteres metílicos sustituidos (por ejemplo, MOM (éter metoximetílico), MTM (éter metiltiometílico), BOM (éter benciloximetílico), PMBM (éter p-metoxibenciloximetílico), para mencionar algunos), éteres etílicos sustituidos, éteres bencilicos sustituidos, éteres silílicos (por ejemplo, TMS (éter trimetilsilílico), TES (éter trietilsilílico), TIPS (éter triisopropilsilílico), TBDMS (éter t-butildimetilsilílico), éter tribencilsilílico, TBDPS (éter t-butildifenilsilílico), para mencionar algunos), ésteres (por ejemplo, formiato, acetato, benzoato (Bz), trifluoroacetato, dicloroacetato, para mencionar algunos), carbonatos, acetales y cetales cíclicos. En determinadas otras formas de realización de ejemplo, se utilizan grupos protectores de nitrógeno. Los grupos protectores de nitrógeno, así como los métodos de protección y desprotección se conocen en la técnica. Se puede hallar una guía en "Protective Groups in Organic Synthesis" Third Ed. Greene, T.W. y Wuts, P.G., Eds., John Wiley & Sons, New York: 1999. En determinadas formas de realización de ejemplo, RN1 y RN2 son cada uno hidrógeno. Los grupos protectores de nitrógeno incluyen carbamatos (que incluyen metil-, etil- y etilcarbamatos sustituidos (por ejemplo, Troc), para mencionar algunos) amidas, derivados imida cíclicos, N-alquilo y N-arilaminas, derivados de imina y derivados de enamina, para mencionar algunos. Los grupos protectores de ejemplo se detallan en la presente. Además, se describe una variedad de grupos protectores en "Protective Groups in Organic Synthesis", Third Ed. Greene, T.W. y Wuts, P.G., Eds., John Wiley & Sons, New York: 1999.

45 "Biocompatible": El término "biocompatible", tal como se usa en la presente, pretende describir compuestos que ejercen efectos de respuesta al huésped o destructivos mínimos mientras que está en contacto con líquidos corporales o células vivas o tejidos. Así, un grupo biocompatible, tal como se usa en la presente, se refiere a un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo o heteroarilo, que entra dentro de la definición de la expresión biocompatible, tal como se definen con anterioridad y en la presente. El término "biocompatibilidad" tal como se usa en la presente también implica mínimas interacciones con proteínas de reconocimiento, por ejemplo, anticuerpos naturales, proteínas celulares, células y otros componentes de sistemas biológicos, a menos que se deseen específicamente tales interacciones. De esta manera, se considera que las sustancias y grupos funcionales que específicamente causan los efectos anteriores, por ejemplo, fármacos y profármacos son biocompatibles. Con preferencia (a excepción de los compuestos pretendidos como ciclotóxicos, tales como, por ejemplo, agentes antineoplásicos), los compuestos son "biocompatibles" si su adición a células normales in vitro, en concentraciones similares a las concentraciones in vivo sistémicas pretendidas, da como resultado menos o igual al 1% de muerte celular durante el tiempo equivalente a la vida media del compuesto in vivo (por ejemplo, el período de tiempo requerido para el 50% del compuesto administrado in vivo por eliminar/clarificar) y su administración in vivo induce una inflamación mínima y médicamente aceptable, reacción a cuerpos extraños, inmunotoxicidad, toxicidad química

u otros efectos secundarios. En la oración anterior, la expresión “células normales” se refiere a células que no pretenden ser destruidos o afectados significativamente de otro modo por el compuesto en ensayo.

5 “**Biodegradable**”: Tal como se usa en la presente, polímeros “biodegradables” son polímeros que son susceptibles al procesamiento biológico in vivo. Tal como se usa en la presente, los compuestos “biodegradables” son aquellos que, cuando son absorbidos por células, pueden ser fracturados por la maquinaria lisosomal u otra maquinaria química o por hidrólisis en componentes que las células pueden volver a usar o disponer sin un efecto tóxico significativo sobre las células. Los fragmentos de degradación no inducen, con preferencia, o inducen poca sobrecarga orgánica o celular o procesos patológicos causados por tal sobrecarga u otros efectos adversos in vivo. Los ejemplos de procesos de biodegradación incluyen hidrólisis enzimática y no enzimática, oxidación y reducción. 10 Las condiciones apropiadas para la hidrólisis no enzimática de las estructuras poliméricas de diversos conjugados, por ejemplo, incluyen la exposición de los conjugados biodegradables al agua a una temperatura y un pH del compartimiento intracelular lisosomal. La biodegradación de algunas estructuras de los conjugados, por ejemplo, conjugados de poliactal o policetal de la presente invención, también se puede mejorar extracelularmente, por ejemplo, en regiones de bajo pH del cuerpo del animal, por ejemplo, una superficie inflamada, cerca de macrófagos 15 activados u otras células que liberan los factores de degradación. En determinadas formas de realización preferidas, el tamaño efectivo de la molécula polimérica a pH $-7,5$ no cambia de modo detectable durante 1 a 7 días y queda dentro del 50% de tamaño del polímero original durante al menos algunas semanas. Por otro lado, a pH ~ 5 , el polímero se degrada, con preferencia, de modo detectable durante 1 a 5 días y se transforma por completo en fragmentos de bajo peso molecular dentro de un marco de dos semanas o varios meses. La integridad del polímero en estas pruebas se puede medir, por ejemplo, por HPLC de exclusión de tamaño. A pesar de que puede preferirse una degradación más rápida en algunos casos, en general puede desearse más que el polímero se degrade en células con la velocidad que no exceda la velocidad de metabolización o excreción de fragmentos poliméricos por las células. En formas de realización preferidas, los polímeros y los subproductos de biodegradación polimérica son biocompatibles.

25 “**Hidrofílico**”: El término “hidrofílico”, como se refiere a sustituyentes en las unidades monoméricas poliméricas, no difiere esencialmente del significado común de este término en la técnica y denota restos químicos que contienen átomos ionizables, polares o polarizables o que, de otro modo, puede ser solvatado por moléculas de agua. De esta manera, un grupo hidrofílico, tal como se usa en la presente, se refiere a un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo o heteroarilo, que entra dentro de la definición de la expresión hidrofílico, tal como se definió con anterioridad. Los ejemplos de restos orgánicos hidrofílicos particulares que son apropiados incluyen grupos alifáticos o heteroalifáticos que comprenden una cadena de átomos en un rango de entre aproximadamente uno y doce átomos, hidroxilo, hidroxialquilo, amina, carboxilo, amida, éster carboxílico, tioéster, aldehído, nitrilo, isonitrilo, nitroso, hidroxilamina, mercaptoalquilo, heterociclo, carbamatos, ácidos carboxílicos y sus sales, ácidos sulfónicos y sus sales, ésteres de ácido sulfónico, ácidos fosfóricos y sus sales, ésteres de fosfato, éteres de poliglicol, poliaminas, policarboxilatos, poliésteres y politioésteres. En formas de realización preferidas de la presente invención, al menos una de las unidades monoméricas poliméricas incluyen un grupo carboxilo (COOH), un grupo aldehído (CHO), un metilol (CH₂OH) o un glicol (por ejemplo, CHOCH₂OH o CH-(CH₂OH)₂).

40 “**Hidrofílico**”: El término “hidrofílico”, cuando se refiere a los polímeros de la invención, no difiere en general del uso de este término en la técnica y denota polímeros que comprenden grupos funcionales hidrofílicos tal como se definió con anterioridad. En una forma de realización preferida, el polímero hidrofílico es un polímero hidrosoluble. La hidrofiliidad del polímero se puede medir directamente por determinación de energía de hidratación o por investigación entre dos fases líquidas o por cromatografía en fases sólidas con una hidrofobicidad conocida, como, por ejemplo, C₄ o C₁₈.

45 “**Biomoléculas**”: El término “biomoléculas”, tal como se usa en la presente, se refiere a moléculas (por ejemplo, proteínas, aminoácidos, péptidos, polinucleótidos, nucleótidos, carbohidratos; azúcares, lípidos, nucleoproteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, esteroides, etc.) que pertenecen a clases de compuestos químicos, ya sea naturales o creados de forma artificial (por ejemplo, por medio de métodos sintéticos o recombinantes), que se hallan comúnmente en células y tejidos. Los tipos de biomoléculas de ejemplo incluyen enzimas, receptores, neurotransmisores, hormonas, citoquinas, modificadores de la respuesta celular como factores del crecimiento y factores quimiotácticos, anticuerpos, vacunas, haptenos, toxinas, interferones, ribozimas, agentes antisentido, plásmidos, ADN y ARN.

“**Portador**”: El término portador, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier molécula pequeña o grande, biomolécula, partícula, gel u otro objeto o material que está o se puede unir covalentemente con unas o varias moléculas de fármaco con un ligador de succinamida.

55 “**Condiciones fisiológicas**”: La frase “condiciones fisiológicas”, tal como se usa en la presente, se refiere al rango de condiciones químicas (por ejemplo, pH, fuerza iónica) y bioquímicas (por ejemplo, concentraciones enzimáticas) se probablemente se pueden encontrar en los fluidos extracelular de tejidos vivos. Para la mayoría de los tejidos normales, el pH fisiológico va de aproximadamente 7,0 a 7,4. El plasma sanguíneo circulante y el líquido intersticial normal representan ejemplos típicos de condiciones fisiológicas normales.

“**Polisacárido**”, “**carbohidrato**” u “**oligosacárido**”: Los términos “polisacárido”, “carbohidrato” u “oligosacárido” son conocidos en la técnica y se refieren, en general, a sustancias que tienen la fórmula química $(CH_2O)_n$, donde en general $n > 2$ y sus derivados. Los carbohidratos son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas o cambio a tales sustancias en transformaciones químicas simples, tales como hidrólisis, oxidación o reducción. Típicamente, los carbohidratos están presentes en forma de acetales o cetales cíclicos (tales como glucosa o fructosa). Estas unidades cíclicas (monosacáridos) se pueden conectar entre sí para formar moléculas con pocas (oligosacáridos) o varias (polisacáridos) unidades de monosacáridos. A menudo, los carbohidratos con un número bien definido, tipos y posicionamiento de unidades de monosacáridos se denominan oligosacáridos, mientras que los carbohidratos que consisten en mezclas de moléculas de cantidades y/o posicionamiento de unidades de monosacárido variables se denominan polisacáridos. Los términos “polisacárido”, “carbohidrato” y “oligosacárido” se usan en la presente de modo indistinto. Un polisacárido puede incluir azúcares naturales (por ejemplo, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, ribosa y xilosa) y/o derivados de azúcares naturales (por ejemplo, 2'-fluororibosa, 2'-desoxirribosa y hexosa).

“**Molécula pequeña**”: Tal como se usa en la presente, la expresión “molécula pequeña” se refiere a moléculas, ya sea naturales o creadas artificialmente (por ejemplo, por síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo. Las moléculas pequeñas preferidas son biológicamente activas porque producen un efecto local o sistémico en animales, con preferencia, mamíferos, con mayor preferencia, seres humanos. Típicamente, las moléculas pequeñas tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1500 Da (1500 g/mol). En determinadas formas de realización preferidas, la molécula pequeña es un fármaco y la molécula pequeña se menciona como “molécula de fármaco” o “fármaco”. Con preferencia, a pesar de no ser necesario, el fármaco es uno que ya se ha definido como seguro y efectivo para ser usado por una agencia gubernamental o ente apropiado. Por ejemplo, los fármacos para uso humano enumerados por la FDA según 21 C.F.R. §§ 330.5, 331 a 361 y 440 a 460; los fármacos para uso veterinario enumerados por la FDA según 21 C.F.R. §§ 500 a 589, son considerados todos apropiados para usar con los presentes polímeros hidrofílicos.

Las clases de moléculas de fármacos que se pueden usar en la práctica de la presente invención incluyen sustancias anticáncer, radionúclidos, vitaminas, sustancias anti-SIDA, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores de enzima, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, anti-histaminas, lubricantes, tranquilizantes, anti-convulsivos, relajantes musculares y sustancias anti-Parkinson, antiespasmódicos y contractores musculares que incluyen bloqueadores del canal, mióticos y anticolinérgicos, compuestos anti-glaucoma, compuestos anti-parásito y/o anti-protozoarios, moduladores de interacciones de la matriz celular-extracelular que incluyen inhibidores del crecimiento celular y moléculas anti-adhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de ADN, ARN o síntesis de proteína, anti-hipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides, factores anti-angiogénicos, factores anti-secretorios, agentes anticoagulantes y/o antitrombóticos, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, anti-depresores, sustancias anti-psicóticas, anti-eméticos, agentes de imagen. Muchas moléculas grandes son también fármacos.

Un listado, aunque no exhaustivo, más completo de clases y fármacos específicos adecuadas para uso en la presente invención se puede hallar en “Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications” por Axel Kleemann y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999 y el “Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals”, Edited by Susan Budavari et al., CRC Press, 1996.

“**Grupo o entidad farmacéuticamente útil**”: Tal como se usa en la presente, la expresión grupo o entidad farmacéuticamente útil se refiere a un compuesto o fragmento de este o un resto químico que, cuando se asocia con los conjugados de la presente invención, pueden ejercer alguna función o actividad biológica o diagnóstica cuando se administra a un sujeto o aumentar las propiedades terapéuticas, diagnósticas o preventivas de los conjugados en aplicaciones biomédicas o mejorar la seguridad, atear la biodegradación o excreción o es detectable. Los ejemplos de grupos o entidades farmacéuticamente útiles adecuados incluyen modificadores de hidrofiliidad/hidrofobicidad, modificadores farmacocinéticos, modificadores biológicamente activos, modificadores detectables. “**Modificador**”: Tal como se usa en la presente, la expresión modificador se refiere a un resto orgánico, inorgánico o bioorgánico que se incorpora de modo covalente en un portador. Los modificadores pueden ser moléculas pequeñas y pueden pertenecer a cualquier clase química o farmacéutica, por ejemplo, nucleótidos, agentes quimioterapéuticos, agentes antibacterianos, agentes antivirales, inmunomoduladores, hormonas o análogos, enzimas, inhibidores, alcaloides y un radionúclido terapéutico (por ejemplo, emisor alfa, beta o positrones). En ciertas formas de realización, los agentes quimioterapéuticos incluyen, inhibidores de topoisomerasa I y II, agentes alquilantes, antraciclinas, doxorubicina, cisplatino, carboplatino, vincristina, mitomicina, taxol, camptotecina, oligonucleótidos antisentido, ribozimas y dactinomycinas. En ciertas formas de realización, los modificadores de acuerdo con la invención incluyen, biomoléculas, moléculas pequeñas, agentes terapéuticos, grupos o entidades farmacéuticamente útiles, macromoléculas, marcas diagnósticas, agentes quelantes, restos hidrófilos, dispersantes, agentes modificadores de carga, agentes modificadores de viscosidad, tensioactivos, agentes de coagulación y floculantes, para mencionar algunos. Un modificador puede tener una o varias funciones farmacéuticas, por ejemplo, actividad biológica y modificación de la farmacocinética. Los modificadores de farmacocinética pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos, antígenos, ligandos del receptor, grupos hidrófilo, hidrófobo o cargados. Los modificadores biológicamente activos incluyen, por ejemplo, fármacos y profármacos terapéuticos, antígenos, inmunomoduladores. Los modificadores detectables incluyen marcas diagnósticas, tales como sustancias radiactivas, fluorescentes, paramagnéticas, superparamagnética, ferromagnética, modulador de rayos X, opaco rayos X, reflectivos por ultrasonido y otras

sustancias detectables por uno de métodos clínicos o laboratorio disponibles, por ejemplo, centellografía, espectroscopia RMN, MRI, tomografía de rayo X, sonotomografía, fotoimagen, radioinmunoensayo. Los vectores del gen viral y no viral se consideran modificadores.

5 **“Macromolécula”**: Tal como se usa en la presente, la expresión macromolécula se refiere a moléculas, sea natural o creado artificialmente (por ejemplo, por medio de la síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente alta, en general por encima de 1500 g/mol.

10 **“Marca diagnóstica”**: Tal como se usa en la presente, la expresión marca diagnóstica se refiere a un átomo, grupo de átomos, resto o grupo funcional, un nanocristal u otro elemento diferenciado de una composición de materia, que se puede detectar in vivo o ex vivo usando métodos analíticos en la técnica. Cuando se asocian con un conjugado
15 de la presente invención, tales marcas diagnósticas permiten el control del conjugado in vivo. En forma alternativa o adicional, las construcciones y composiciones que incluyen marcas diagnósticas se pueden usar para controlar funciones o estructuras biológicas. Los ejemplos de marcas diagnósticas incluyen marcas que se pueden usar en procedimientos diagnósticos médicos, tales como, isótopos radiactivos (radionúclidos) para centellografía gamma y tomografía de emisión de positrones (PET), agentes de contraste para imagen de resonancia magnética (MRI) (por
20 ejemplo, átomos paramagnéticos y nanocristales superparamagnéticos), agentes de contraste para tomografía computada y otros métodos de imagen basado en rayos X, agentes para métodos diagnósticos basados en ultrasonido (sonografía), agentes para activación neutrónica (por ejemplo, boro, gadolinio), fluoróforos para varios procedimientos ópticos, y, en general los restos que pueden emitir, reflejar, absorber, dispersar o afectar de otro modo los campos u ondas electromagnéticas (por ejemplo, rayos gamma, rayos X, ondas de radio, microondas, luz),
25 partículas (por ejemplo, partículas alfa, electrones, positrones, neutrones, protones) u otras formas de radiación, por ejemplo, ultrasonido.

“Cantidad eficiente de un agente oxidante específico de glicol”: se refiere a la escisión oxidativa de los polisacáridos mencionados en la presente invención, la frase cantidad eficiente de un agente oxidante específico del glicol significa una cantidad del agente oxidante específico del glicol que provee la apertura oxidativa de
30 esencialmente todos los anillos de carbohidrato de un polisacárido.

“Grupo hidrófilo protegido” y “resto orgánico protegido”, estos términos como se usan en la presente, significan un grupo químico que no interferirá en una reacción química a la que está sujeta el portador o conjugado del portador. Los ejemplos de grupos hidrófilos protegidos incluyen ésteres carboxílicos, grupos alcoxi, tioésteres, tioéteres, grupos vinilo, grupos haloalquilo, Fmoc-alcoholes, etc.

30 **“Alifático”**: En general, la expresión alifático, tal como se usa en la presente, incluye hidrocarburos alifáticos tanto saturados como insaturados, de cadena lineal (es decir, no ramificado) o ramificada, que están opcionalmente sustituido con uno o varios grupos funcionales. Tal como apreciará un experto en la técnica, “alifático” incluye en la presente restos de alquilo, alquenilo, alquinilo. De esta manera, tal como se usa en la presente, la expresión “alquilo”
35 incluye grupos alquilo lineales y ramificados. Una convención análoga se aplica a otros términos genéricos tales como “alquenilo” y “alquinilo”. Por otra parte, tal como se usa en la presente, los términos “alquilo”, “alquenilo”, “alquinilo” comprenden grupos tanto sustituidos como no sustituidos. En ciertas formas de realización, tal como se usa en la presente, “alquilo inferior” se usa para indicar aquellos grupos alquilo (sustituidos, no sustituidos, ramificados o no ramificados) con aproximadamente 1–6 átomos de carbono.

40 **“Alquenilo”**: la expresión alquenilo denota un grupo monovalente derivado de un grupo hidrocarbonado que tiene al menos un enlace doble carbono-carbono por eliminación de un átomo de hidrógeno simple, estos grupos alquenilo están opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales. Los sustituyentes incluyen cualquiera de los sustituyentes mencionados más abajo, es decir, los sustituyentes mencionados más abajo resultan en la formación de un compuesto estable. Los grupos alquenilo incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, 1–metil–2–buten–1–ilo.

45 **“Alquinilo”**: la expresión alquinilo tal como se usa en la presente se refiere a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo que tiene al menos un enlace triple de carbono-carbono por eliminación de un átomo de hidrógeno simple, estos grupos alquenilo están opcionalmente sustituidos. Los sustituyentes incluyen cualquiera de los sustituyentes mencionados más abajo, es decir, los sustituyentes mencionados más abajo que resultan en la formación de un compuesto estable. Los grupos alquinilo representativos incluyen etinilo, 2–propinilo (propargilo), 1–propinilo.
50

En ciertas formas de realización, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen aproximadamente 1–20 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización determinadas, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen aproximadamente 1–10 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen aproximadamente 1–8 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen aproximadamente 1–6 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen aproximadamente 1–4 átomos de carbono. Los grupos alifáticos ilustrativos incluyen así, por ejemplo, metilo, etilo, n–propilo, isopropilo, alilo, n–butilo, sec–butilo, isobutilo, terc–butilo, n–pentilo, sec–pentilo, isopentilo,
55

terc-pentilo, n-hexilo, sec-hexilo, restos que nuevamente pueden llevar uno o varios sustituyentes. Los grupos alquenoilo incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo. Los grupos alquinoilo representativos incluyen etinilo, 2-propinilo (propargilo), 1-propinilo.

5 **“Alicíclico”**: tal como se usa en la presente, la expresión alicíclico se refiere a compuestos que combinan las propiedades de compuestos alifáticos y cíclicos e incluyen hidrocarburos alifáticos cíclicos o policíclicos y compuestos cicloalquilo en puente que están opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales. Tal como apreciará un experto en la técnica, “alicíclico” incluye en la presente restos cicloalquilo, cicloalquenoilo y cicloalquinoilo, que están opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales. Los grupos alicíclicos ilustrativos incluyen así, por ejemplo, ciclopropilo, $-\text{CH}_2$ -ciclopropilo, ciclobutilo, $-\text{CH}_2$ -ciclobutilo, ciclopentilo, $-\text{CH}_2$ -ciclopentilo-n, ciclohexilo, $-\text{CH}_2$ -ciclohexilo, ciclohexeniletilo, ciclohexaniletilo, norborbilo, restos que nuevamente pueden llevar uno o varios sustituyentes.

10 **“Cicloalquilo”**: tal como se usa en la presente, la expresión cicloalquilo se refiere específicamente a grupos que tienen 3 a 7, con preferencia, 3 a 10 átomos de carbono. Los cicloalquilo apropiados incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo que, como en el caso de los restos alifáticos, heteroalifáticos o heterocíclicos, pueden estar opcionalmente sustituidos. Una convención análoga se aplica a otros términos genéricos como “cicloalquenoilo”, “cicloalquinoilo”.

15 **“Heteroalifático”**: tal como se usa en la presente, la expresión heteroalifático se refiere a restos alifáticos en donde uno o varios átomos de carbono en la cadena principal fueron sustituidos con un heteroátomo. De esta manera, un grupo heteroalifático se refiere a una cadena alifática que contiene uno o varios átomos de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio, por ejemplo, en lugar de átomos de carbono. Los restos heteroalifáticos pueden ser ramificados o lineales, no ramificados. En ciertas formas de realización, los restos heteroalifáticos están sustituidos por reemplazo independiente de uno o varios átomos de hidrógeno con uno o varios restos que incluyen alifático; heteroalifático; alicíclico; heteroalicíclico; aromático, heteroaromático; arilo; heteroarilo; alquilarilo; alquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; $-\text{NO}_2$; $-\text{CN}$; $-\text{CF}_3$; $-\text{CH}_2\text{CF}_3$; $-\text{CHC}_{12}$; $-\text{CH}_2\text{OH}$; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; $-\text{CH}_2\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$; o $-\text{GR}^{\text{G}1}$ en donde G es $-\text{O}$ -, $-\text{S}$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}$ -, $-\text{C}(=\text{O})$ -, $-\text{S}(=\text{O})$ -, $-\text{SO}_2$ -, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}$ -, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}$ -, $-\text{OC}(=\text{O})$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})$ -, $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}$ -, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})\text{O}$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}$ -, $-\text{C}(=\text{S})$ -, $-\text{C}(=\text{S})\text{S}$ -, $-\text{SC}(=\text{S})$ -, $-\text{SC}(=\text{S})\text{S}$ -, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})$ -, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})\text{O}$ -, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})\text{NR}^{\text{G}3}$ -, $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{G}2})$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}3})$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{SO}_2$ -, $\text{NR}^{\text{G}2}\text{SO}_2\text{NR}^{\text{G}3}$ -o $-\text{SO}_2\text{NR}^{\text{G}2}$ -, en donde cada aparición de $\text{R}^{\text{G}1}$, $\text{R}^{\text{G}2}$ y $\text{R}^{\text{G}3}$ incluye de modo independiente hidrógeno, halógeno o un resto opcionalmente sustituido de alifático, heteroalifático, alicíclico, heteroalicíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo. Los ejemplos adicionales de sustituyentes de aplicación general se ilustran por medio de las formas de realización específicas mostradas en los ejemplos que se describen en la presente.

20 **“Heteroalicíclico”, “heterocicloalquilo” o “heterocíclico”**: el término heteroalicíclico, heterocicloalquilo o heterocíclico, tal como se usa en la presente, se refiere a compuestos que combinan las propiedades de heteroalifático y cíclico compuestos e incluyen heterociclos mono- o policíclicos saturados e insaturados tales como morfolino, pirrolidinilo, furanilo, tiofuranilo, pirrolilo, etc., que están opcionalmente sustituidos con uno o varios grupos funcionales, tal como se define en la presente. En ciertas formas de realización, la expresión “heterocíclico” se refiere a un anillo no aromático de 5, 6, 7 u 8 miembros o un grupo policíclico, que incluye un grupo bi- o tricíclico que comprende anillos fusionados de seis miembros que tienen entre uno y tres heteroátomos seleccionados, de modo independiente, de oxígeno, azufre y nitrógeno, en donde (i) cada anillo de 5 miembros tiene 0 a 2 enlaces dobles y cada anillo de 6 miembros tiene 0 a 2 enlaces dobles, (ii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, (iii) el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado y (iv) cualquiera de los anteriores anillos heterocíclicos pueden estar fusionados en un anillo arilo o heteroarilo. En ciertas formas de realización, “heteroalicíclico”, “heterocicloalquilo” o “heterocíclico” se refiere a un sistema de anillos parcialmente insaturados o completamente saturados de 3 a 10 miembros, que incluye anillos simples de 3 a 8 átomos de tamaño y sistemas de anillos bi- y tricíclicos que pueden incluir grupos heterocíclicos aromáticos anillo de seis miembros o grupos heterocíclicos aromáticos fusionados con un anillo no aromático. Los heterociclos representativos incluyen pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo y tetrahidrofurilo. En ciertas formas de realización, se utiliza un grupo “heterocicloalquilo o heterociclo sustituido” y tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo heterocicloalquilo o heterociclo, tal como se definió con anterioridad, sustituido con el reemplazo independiente de uno, dos o tres de los átomos de hidrógeno con alifático; heteroalifático; alicíclico; heteroalicíclico; aromático, heteroaromático; arilo; heteroarilo; alquilarilo; alquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; $-\text{NO}_2$; $-\text{CN}$; $-\text{CF}_3$; $-\text{CH}_2\text{CF}_3$; $-\text{CHC}_{12}$; $-\text{CH}_2\text{OH}$; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; $-\text{CH}_2\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$; o $-\text{GR}^{\text{G}1}$ en donde G es $-\text{O}$ -, $-\text{S}$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}$ -, $-\text{C}(=\text{O})$ -, $-\text{S}(=\text{O})$ -, $-\text{SO}_2$ -, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}$ -, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}$ -, $-\text{OC}(=\text{O})$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})$ -, $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}$ -, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})\text{O}$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}$ -, $-\text{C}(=\text{S})$ -, $-\text{C}(=\text{S})\text{S}$ -, $-\text{SC}(=\text{S})$ -, $-\text{SC}(=\text{S})\text{S}$ -, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})$ -, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})\text{O}$ -, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})\text{NR}^{\text{G}3}$ -, $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{G}2})$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}3})$ -, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{SO}_2$ -, $\text{NR}^{\text{G}2}\text{SO}_2\text{NR}^{\text{G}3}$ -o $-\text{SO}_2\text{NR}^{\text{G}2}$ -, en donde cada aparición de $\text{R}^{\text{G}1}$, $\text{R}^{\text{G}2}$ y $\text{R}^{\text{G}3}$ incluye de modo independiente hidrógeno, halógeno o un resto opcionalmente sustituido de alifático, heteroalifático, alicíclico, heteroalicíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo. Los ejemplos adicionales o en general sustituyentes aplicables se ilustran por medio de formas de realización específicas mostradas en los ejemplos que se describen en la presente.

Además, se apreciará que cualquiera de los restos alicíclicos o heteroalicíclicos descritos con anterioridad y en la presente puede comprender un resto arilo o heteroarilo fusionado. Los ejemplos adicionales de sustituyentes aplicables en general se ilustran por medio de formas de realización específicas mostradas en los ejemplos que se describen en la presente.

5 **“Resto aromático”**: tal como se usa en la presente, la expresión resto aromático se refiere a restos hidrocarbonados mono- o policíclicos estables insaturados sustituidos o no sustituidos que tienen, con preferencia, 3–14 átomos de carbono, que comprende al menos un anillo que satisface la regla de Huckel en cuanto a aromaticidad. Los ejemplos de restos aromáticos incluyen fenilo, indanilo, indenilo, naftilo, fenantrilo y antracilo.

10 **“Resto heteroaromático”**: tal como se usa en la presente, la expresión resto heteroaromático se refiere a restos monoheterocíclicos o poliheterocíclicos estables sustituidos o no sustituidos insaturados que tienen con preferencia, 3–14 átomos de carbono, que comprenden al menos un anillo que satisface la regla de Huckel en cuanto a la aromaticidad. Los ejemplos de restos heteroaromáticos incluyen piridilo, quinolinilo, dihidroquinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, dihidroquinazolilo y tetrahidroquinazolilo.

15 También se apreciará que los restos aromáticos y heteroaromáticos, tal como se define en la presente, se pueden unir por medio de un resto alifático (por ejemplo, alquilo) o heteroalifático (por ejemplo, heteroalquilo) y, así, también incluyen restos tales como restos –(alifático)aromático, –(heteroalifático)aromático, –(alifático)heteroaromático, –(heteroalifático)heteroaromático, –(alquil)aromático, –(heteroalquil)aromático, –(alquil)heteroaromático y –(heteroalquil)heteroaromático. De esta manera, tal como se usa en la presente, las frases “restos aromáticos o heteroaromáticos” y “aromático, heteroaromático, –(alquil)aromático, –(heteroalquil)aromático, –(heteroalquil)heteroaromático y –(heteroalquil)heteroaromático” son indistintas. Los sustituyentes incluyen cualquiera de los sustituyentes previamente mencionados, es decir, los sustituyentes mencionados para restos alifáticos o para otros restos tal como se describen en la presente, que da como resultado la formación de un compuesto estable.

20 **“Arilo”**: tal como se usa en la presente, la expresión arilo se refiere a restos aromáticos, tal como se describió con anterioridad, que excluyen aquellos unidos por medio de un resto alifático (por ejemplo, alquilo) o heteroalifático (por ejemplo, heteroalquilo). En ciertas formas de realización de la presente invención, “arilo” se refiere a un sistema de anillo carbocíclicos mono- o bicíclicos que tiene uno o dos anillos que satisfacen la regla de Huckel en cuanto a la aromaticidad, que incluyen fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo.

25 **“Heteroarilo”**: tal como se usa en la presente, la expresión heteroarilo se refiere a restos heteroaromáticos, tal como se describió con anterioridad, excluyendo aquellos unidos por medio de un resto alifático (por ejemplo, alquilo) o heteroalifático (por ejemplo, heteroalquilo). En ciertas formas de realización de la presente invención, la expresión “heteroarilo”, tal como se usa en la presente, se refiere a un radical cíclico insaturado que tiene de cinco a aproximadamente diez átomos del anillo de los cuales un átomo del anillo está seleccionado de S, O y N; cero, uno o dos átomos del anillo son heteroátomos adicionales seleccionados, de modo independiente, de S, O y N; y los demás átomos del anillo son carbono, estando unido el radical con el resto de la molécula a través de cualquiera de los átomos del anillo tales como, por ejemplo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo.

30 Los sustituyentes de los restos arilo y heteroarilo incluyen cualquiera de los sustituyentes previamente mencionados, es decir, los sustituyentes mencionados para restos alifáticos o para otros restos tal como se describen en la presente, dando como resultado la formación de un compuesto estable. Por ejemplo, los grupos arilo y heteroarilo (que incluyen grupos arilo bicíclicos) pueden no estar sustituidos o pueden estar sustituidos, en donde la sustitución incluye el reemplazo de uno, dos o tres de los átomos de hidrógeno independientemente con uno o varios de los siguientes restos que incluyen: alifático; heteroalifático; alicíclico; heteroalicíclico; aromático, heteroaromático; arilo; heteroarilo; alquilarilo; alquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; –NO₂; –CN; –CF₃; –CH₂CF₃; –CHCl₂; –CH₂OH; –CH₂CH₂OH; –CH₂SO₂CH₃; o –GR^{G1}, en donde G es –O–, –S–, NR^{G2}–, –C(=O)–, –S(=O)–, –SO₂–, –C(=O)O–, –C(=O)NR^{G2}–, –OC(=O)–, –NR^{G2}C(=O)–, –OC(=O)O–, –OC(=O)NR^{G2}–, –NR^{G2}C(=O)O–, –NR^{G2}C(=O)NR^{G2}–, –C(=S)–, –C(=S)S–, –SC(=S)–, –SC(=S)S–, –C(=NR^{G2})–, –C(=NR^{G2})O–, –C(=NR^{G2})NR^{G3}–, –OC(=NR^{G2})–, –NR^{G2}C(=NR^{G3})–, –NR^{G2}SO₂–, –NR^{G2}SO₂NR^{G3}– o –SO₂NR^{G2}–, en donde cada aparición de R^{G1}, R^{G2} y R^{G3} incluye, de modo independiente, hidrógeno, halógeno o un resto opcionalmente sustituido de alifático, heteroalifático, alicíclico, heteroalicíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo. Los ejemplos adicionales de sustituyentes aplicables en general se ilustran por medio de las formas de realización específicas mostradas en los ejemplos que se describen en la presente.

35 **“Alcoxi”** (o **“alquiloxi”**): tal como se usa en la presente, la expresión alcoxi (o alquiloxi) se refiere a un grupo alquilo, tal como se describió previamente, unido al resto molecular principal a través de un átomo de oxígeno (“alcoxi”). En ciertas formas de realización, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–20 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización determinadas, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–10 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–8 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–6 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–4 átomos de carbono

alifáticos. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, terc-butoxi, neopentoxi y n-hexoxi.

5 “**Amina**”: la expresión amina se refiere a un grupo que tiene la estructura $-N(R)_2$, en donde cada aparición de R es, de modo independiente, hidrógeno o un resto de alifático, heteroalifático, aromático o heteroaromático o los grupos R, tomados juntos, pueden formar un resto de heterocíclico. En ciertas instancias, un grupo amina se puede cargar (protonizar) o cuaternizar, por ejemplo, $-HN^+(R)^2$ o $-N^+(R)^3$.

10 “**Alquilamino**”: tal como se usa en la presente, la expresión alquilamino se refiere a un grupo que tiene la estructura $-NHR'$, en donde R' es alquilo, tal como se define en la presente. El término “aminoalquilo” se refiere a un grupo que tiene la estructura NH_2R' , en donde R' es alquilo, tal como se define en la presente. En ciertas formas de realización, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–20 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización determinadas, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–10 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, los grupos alquilo, alqueno y alquino empleados en la invención contienen aproximadamente 1–8 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–6 átomos de carbono alifáticos. En otras formas de realización más, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1–4 átomos de carbono alifáticos. Los ejemplos de alquilamino incluyen metilamino, etilamino, iso-propilamino.

15 “**Ácido carboxílico**”: el término ácido carboxílico tal como se usa en la presente se refiere a un compuesto que comprende un grupo de la fórmula $-CO_2H$.

20 “**Halo, haluro y halógeno**”: los términos halo, haluro y halógeno tal como se usa en la presente se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

“**Metilol**”: el término metilol tal como se usa en la presente se refiere a un grupo alcohol de la estructura $-CH_2OH$.

“**Hidroalquilo**”: Tal como se usa en la presente, la expresión hidroalquilo se refiere a un grupo alquil, tal como se definió con anterioridad, que lleva al menos un grupo OH.

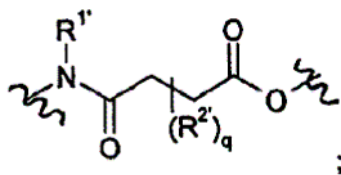
25 “**Mercaptoalquilo**”: el término mercaptoalquilo tal como se usa en la presente se refiere a un grupo alquilo, tal como se definió con anterioridad, que lleva al menos un grupo SH.

“**Acilo**”: el término acilo, tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo que comprende un grupo carbonilo de la fórmula $C=O$. Los ejemplos de grupos acilo incluyen haluros de acilo, anhídridos, tioésteres, amidas y ésteres carboxílicos.

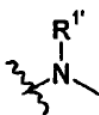
30 “**Hidrocarburo**”: el término hidrocarburo, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier grupo químico que comprende hidrógeno y carbono. El hidrocarburo puede estar sustituido o no sustituido. El hidrocarburo puede estar insaturado, saturado, ramificado, no ramificado, cíclico, policíclico o heterocíclico. Los hidrocarburos ilustrativos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, ciclopropilo, alilo, vinilo, n-butilo, terc-butilo, etinilo, ciclohexilo, metoxi, dietilamino. Como sabrá un experto en la técnica, todas las valencias se deben satisfacer haciendo todo tipo de sustituciones.

35 “**Sustituido**”: los términos sustituido, ya sea precedido por la expresión “opcionalmente” o no y sustituyente, tal como se usa en la presente, se refiere al reemplazo de radicales de hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado. Cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede estar sustituida con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cualquier posición. Tal como se usa en la presente, se contempla que la expresión “sustituido” incluye 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 heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en la presente que satisfacen las valencias de los heteroátomos. Los ejemplos de sustituyentes incluyen alifático; heteroalifático; alicíclico; heteroalíclico; aromático, heteroaromático; arilo; heteroarilo; alquilarilo; alquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; $-NO_2$; $-CN$; $-CF_3$; $-CH_2CF_3$; $-CHCl_2$; $-CH_2OH$; $-CH_2CH_2OH$; $-CH_2NH_2$; $-CH_2SO_2CH_3$; o $-GR^{G1}$, en donde G es $-O-$, $-S-$, $-NR^{G2}$, $-C(=O)-$, $-S(=O)-$, $-SO_2-$, $-C(=O)O-$, $-C(=O)NR^{G2}$, $-OC(=O)-$, $-NR^{G2}C(=O)-$, $-OC(=O)O-$, $-OC(=O)NR^{G2}$, $-NR^{G2}C(=O)O-$, $-NR^{G2}C(=O)NR^{G2}$, $-C(=S)-$, $-C(=S)S-$, $-SC(=S)-$, $-SC(=S)S-$, $-C(=NR^{G2})-$, $-C(=NR^{G2})O-$, $-C(=NR^{G2})NR^{G3}$, $-OC(=NR^{G2})-$, $-NR^{G2}C(=NR^{G3})-$, $-NR^{G2}SO_2-$, $-NR^{G2}SO_2NR^{G3}$ o $-SO_2NR^{G2}$, en donde cada aparición de R^{G1} , R^{G2} y R^{G3} incluye, de modo independiente, hidrógeno, halógeno o un resto opcionalmente sustituido de alifático, heteroalifático, alicíclico, heteroalíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo. Los ejemplos adicionales de los sustituyentes aplicables en general se ilustran por medio de las formas de realización específicas mostradas en los ejemplos que se describen en la presente.

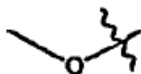
55 “**Ligador de succinamida**” o “**succinamida**”: a menos que se especifique otra cosa, tal como se usa en la presente, la expresión ligador de succinamida o succinamida designa un ligador que tiene la estructura:



5 en donde q es un número entero de 0–4; R^1 es hidrógeno o un grupo protector de nitrógeno; y cada aparición de R^2 es, de modo independiente, hidrógeno, halógeno, $-\text{CN}$, NO_2 , un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, aromático, heteroaromático o $-\text{GR}^{\text{G}1}$, en donde G es $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{S})\text{S}-$, $-\text{SC}(=\text{S})-$, $-\text{SC}(=\text{S})\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})-$, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})\text{NR}^{\text{G}3}-$, $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{G}2})-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}3})-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{SO}_2-$, $\text{NR}^{\text{G}2}\text{SO}_2\text{NR}^{\text{G}3}-$ o $-\text{SO}_2\text{NR}^{\text{G}2}-$, en donde cada aparición de $R^{\text{G}1}$, $R^{\text{G}2}$ y $R^{\text{G}3}$ es, de modo independiente, hidrógeno, halógeno o un resto opcionalmente sustituido de alifático, heteroalifático, alicíclico, heteroalíclico, aromático, heteroaromático, arilo o heteroarilo. En ciertas formas de realización,

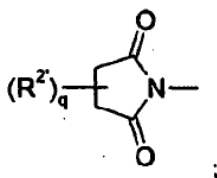


10 designa el sitio de unión de un modificador M , que está directa o indirectamente unido con el resto de succinimida a través de un enlace de amida. En ciertas formas de realización,



15 designa el sitio de unión de un portador que está ligado directa o indirectamente al resto de succinamida a través de un enlace de éster.

"Succinimida": a menos que se especifique otra cosa, tal como se usa en la presente, la expresión succinimida designa un resto que tiene la estructura:



20 en donde q es un número entero de 0–4; y cada aparición de R^2 es, de modo independiente, hidrógeno, halógeno, $-\text{CN}$, NO_2 , un resto de alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, aromático, heteroaromático o $-\text{GR}^{\text{G}1}$, en donde G es $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{G}2}-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{S})\text{S}-$, $-\text{SC}(=\text{S})-$, $-\text{SC}(=\text{S})\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})-$, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}2})\text{NR}^{\text{G}3}-$, $\text{NR}^{\text{G}3}-$, $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{G}2})-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{C}(=\text{NR}^{\text{G}3})-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{SO}_2-$, $-\text{NR}^{\text{G}2}\text{SO}_2\text{NR}^{\text{G}3}-$ o $-\text{SO}_2\text{NR}^{\text{G}2}-$, en donde cada aparición de $R^{\text{G}1}$, $R^{\text{G}2}$ y $R^{\text{G}3}$ es, de modo independiente, hidrógeno, halógeno o un resto opcionalmente sustituido de alifático, heteroalifático, alicíclico, heteroalíclico, aromático, heteroaromático, arilo o heteroarilo.

Los siguientes son términos más generales usados a lo largo de la presente solicitud:

30 "**Animal**": Tal como se lo utiliza en la presente, el término "animal" se refiere a seres humanos así como también a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo, lo que incluye por ejemplo mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, gusanos y células simples. Se considera que los cultivos de células y las muestras del tejido vivo constituyen pluralidades de animales. Es preferible que el animal no humano sea un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un primate o un cerdo). Un animal puede ser un animal transgénico. El término "sujeto" abarca animales.

35 "**Asociado con**": Cuando dos entidades están "asociadas entre sí", como se describe en la presente, están ligados por una interacción covalente o no covalente, directa o indirecta. Es preferible que la asociación sea covalente. Las interacciones no covalentes deseables incluyen la ligación de hidrógeno, interacciones de Van der Waals,

interacciones hidrófobas, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, o combinaciones de los mismos, etc.

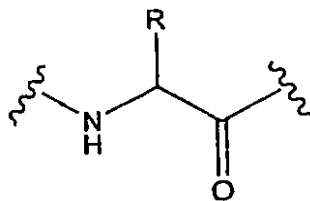
"**Cantidad eficiente**": En general, en la medida en que se refiere a un agente activo o a un dispositivo para entrega un fármaco, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad necesaria para suscitar la respuesta biológica deseada. Como comprenderá una persona con la pericia habitual en esta especialidad, la cantidad eficiente de un agente o dispositivo puede variar en función de factores tales como el punto final biológico deseado, el agente que debe entregarse, la composición de la matriz encapsuladora, el tejido apuntado, etc. Por ejemplo, la cantidad eficiente de micropartículas que contienen un antígeno a ser entregado para inmunizar un individuo, es la cantidad que tiene como resultado una inmunorrespuesta suficiente para impedir la infección con un organismo que tiene el antígeno administrado.

"**Directamente unido**": Tal como se lo utiliza en la presente, la expresión "directamente unido", en la medida en que se refiere a una fijación covalente de una entidad a otra (por ejemplo, un modificador unido a un ligador succinamida) significa que las dos entidades están conectadas entre sí mediante un enlace covalente. Por ejemplo, en el presente documento se describe un modificador unido a ligadores succinamida, por lo cual el punto de fijación del ligador succinamida es un enlace amida. Un modificador adecuado podría ser cualquier modificador que comprenda una funcionalidad amina (o forma protegida de la misma), que forma un enlace amida al reaccionar con el grupo ácido carboxílico de un ligador ácido succínico adecuado.

"**Indirectamente unido**": Tal como se lo utiliza en la presente, la expresión "indirectamente unido", en la medida en que se refiere a la fijación covalente de una entidad a otra (por ejemplo, un modificador unido a un ligador succinamida) significa que las dos entidades están conectadas entre sí por intermedio de una ligación de resto (a diferencia de un enlace covalente directo). Por ejemplo, en el presente documento se describen modificador unidos a ligadores succinamida, con lo cual el punto de fijación al ligador succinamida es un enlace amida. Un modificador podría ser cualquier modificador que comprenda una funcionalidad, que puede estar "encapuchada" con una resto químico que comprende un grupo amida, o forma protegida del mismo, de manera tal que el modificador amida-capuchonado podría ahora formar un enlace amida al reaccionar con el grupo ácido carboxílico de un ligador ácido succínico adecuado.

"**Residuo aminoacilo natural**": La expresión residuo amino acilo natural, tal como se la utiliza en la presente se refiere a uno cualquiera de los aminoácidos L comunes que se presentan naturalmente en las proteínas de presentación natural: glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), cisteína (Cis) y metionina (Met).

"**Residuo aminoacilo no natural**": La expresión residuo amino acilo no natural, tal como se la utiliza en la presente se refiere a cualquier aminoácido que no sea un aminoácido natural. Esto incluye, por ejemplo, los radicales α -, β -, ω -, D-, L- aminoacilo, y los compuestos de la fórmula general



en la que la cadena lateral R es diferente de las cadenas laterales de aminoácidos que se presentan en la naturaleza.

"**Aminoacilo**": En términos mas generales, la expresión amino acilo, tal como se la utiliza en la presente, abarca aminoácidos naturales y no naturales.

"**PHF**" se refiere a poli(1-hidroximetil-etil-hidroximetil-formal).

"**CPT**" se refiere a camptotecina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra un experimento de liberación de profármaco dado a título de ejemplo, a partir de PHF-CPT en plasma de rata a 37 °C. Inserto: linealización logarítmica de la cinética PHF-CPT. Valores medios tomados de dos experimentos independientes, para todos los puntos SD<10% de la media, p<0,05.

La Figura 2 ilustra un estudio de la dinámica de los tamaños de los tumores, dados a título de ejemplo, en ratones desnudos con xenoinjertos LS174t. Flechas: inyecciones de fármacos (qwx3). Obsérvese que aún la dosis conjugada más pequeña es más activa que el control Irinotecan. Estadísticas: n=10 por grupo, variaciones estándar dentro del 25% de la media, no mostrada por razones de claridad en la figura.

La Figura 3 ilustra dinámicas de volúmenes de tumores en los animales sobrevivientes con xenoinjertos LS174t, n =10 por grupo, dosis iguales (160 nm/kg de CPT) de Irinotecan y PHF-CPT.

La Figura 4 ilustra un estudio de supervivencia de animales dado a título de ejemplo correspondiente al estudio de la dinámica de los tamaños de los tumores de la Figura 3.

5 La Figura 5 ilustra un experimento de biocinética, dado a título de ejemplo, de conjugado de PHF-CPT (médula espinal PHF 111IN-DTPA etiquetado y CPT 3H etiquetado).

La Figura 6 ilustra un experimento de biodistribución dado a título de ejemplo del polímero portador (111In) y CPT (3H) 24 horas post administración IV de PHF-CPT doblemente etiquetado. Xenoinjerto: HT29, tumores de 0,1-0,15 ml; n=6 por grupo.

10 La Figura 7 ilustra un experimento de microdistribución dado a título de ejemplo de CPT en tejido de tumor a las 24 horas post administración de PHF-CPT. Imágenes de fluorescencia de CPT (izquierda) y contraste de fase (derecha) de la misma región. Rebanada sin teñir, no unido. Campo: 80 x 130Pm.

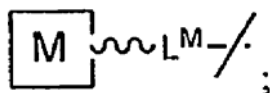
La Figura 8 ilustra una distribución operativa porcentual dada a título de ejemplo del tejido entre CPT y PHF=CPT. Xenoinjerto HT29 en ratones desnudos (n=6), administrado por IV a razón de 20 mg de CPT por kg, 48 horas después de la inyección, % de dosis por gramo de tejido. Nivel 26X de CPT En Tumor con dosis de Fleximer 5X en circulación con Fleximer-CPT.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE DETERMINADAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Seguidamente se describirán de manera más particular y se destacarán en las reivindicaciones determinadas formas de realización de la invención. Debe entenderse que las formas de realización particulares de la invención se muestran a título de ilustración y no tienen por objeto servir de limitaciones de la invención.

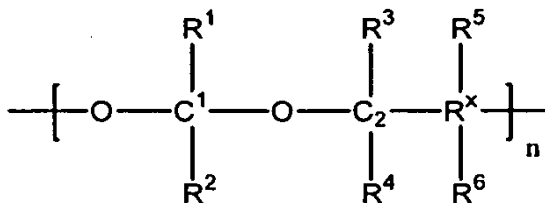
Al estar orientada a la necesidad de conjugados polímeros solubles completamente biodegradables no bioadhesivos para uso en aplicaciones biomédicas, en un aspecto, la presente invención provee novedosos conjugados portadores, en donde el portador ha sido modificado químicamente por fijación covalente de (bio)moléculas pequeñas/grandes o de otros restos (in)orgánicos (es decir, modificadores) por intermedio de enlaces que contienen monosuccinamidas opcionalmente sustituidas.

De esta manera, en ciertas formas de realización, la invención provee un conjugado que comprende un portador sustituido con una o varias apariciones de un resto que tiene la estructura:



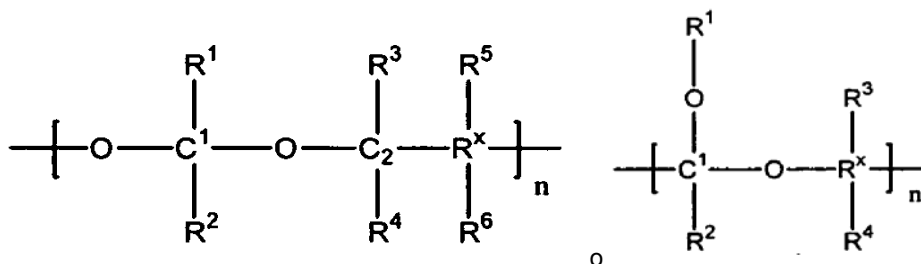
en donde el portador comprende

30 (a) un poliactal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición de poliactal tienen la siguiente estructura química:




en donde para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, uno de R¹ y R² es hidrógeno y el otro es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster; o

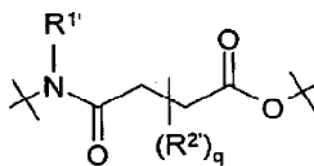
(b) un policetal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición del policetal tienen la siguiente estructura química:



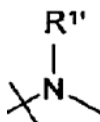
5 en donde cada aparición de R^1 y R^2 es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C_1 u OC_1 ; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C_2 ; n es un número entero; cada aparición de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster;

10 en donde cada aparición de M es, de modo independiente, un modificador que es una pequeña molécula que tiene un peso molecular $\leq 1,5$ kDa y en donde el modificador comprende una funcionalidad amina o está químicamente modificado de modo que comprende un grupo funcional apropiado para el enlace covalente con un ácido succínico opcionalmente sustituido a través de la formación de un enlace de amida;  denota una unión directa o indirecta de M con el ligador L^M ; y cada aparición de L^M es, de modo independiente, un ligador que contiene succinamida opcionalmente sustituida, en donde el modificador M está directa o indirectamente unido con el ligador de succinamida a través de un enlace amida y el portador está ligado directa o indirectamente a cada aparición del ligador de succinamida a través de un enlace de éster.

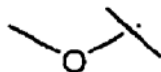
15 En ciertas formas de realización, cada aparición de L^M comprende, de modo independiente, un resto que tiene la estructura:



20 en donde



denota el sitio de unión con el modificador M ;



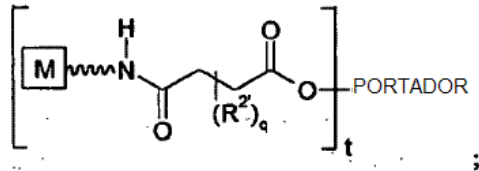
25 denota el sitio de unión con el portador; q es un número entero de 0-4; R^1 es hidrógeno o alquilo, alquenilo, $-C(=O)R^{1A}$, $-C(=O)OR^{1A}$, $-SR^{1A}$, SO_2R^{1A} ; en donde cada aparición de R^{1A} es, de modo independiente, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo, heteroalifático, heteroalícíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo; R^2 es, de modo independiente, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo, heteroarilo, $-C(=O)R^{2A}$ o $-ZR^{2A}$, en donde Z es $-O-$, $-S-$, $-NR^{2B}$, en donde cada aparición de R^{2A} y R^{2B} es, de modo independiente, hidrógeno o un resto de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo o heteroarilo.

En ciertas formas de realización, R^1 es hidrógeno.

35 En ciertas formas de realización, cada aparición de R^2 es hidrógeno. En ciertas formas de realización, una o varias apariciones de R^2 es alquilo C_{1-10} . En ciertas formas de realización, una o varias apariciones de R^2 es alquilo C_{1-6} . En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 es un grupo hidrofóbico. En determinada forma

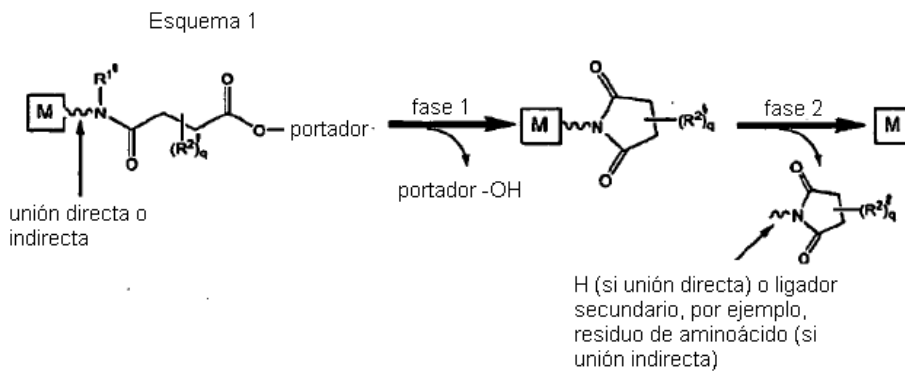
de realización, una o varias apariciones de R^2 es un grupo hidrofílico. En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 es un grupo aniónico. En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 es un grupo catiónico. En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 es un ligando de receptor.

5 En ciertas formas de realización, los conjugados de la presente invención tienen la estructura general:



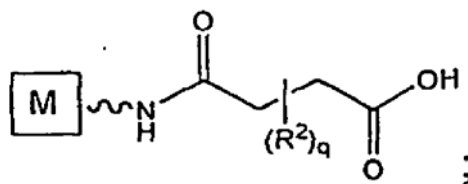
en donde R^2 y q son tal como se definieron con anterioridad, \sim denota unión directa o indirecta de M con el ligador de succinamida; y t es un número entero que designa la cantidad de restos de modificador conjugados con el portador.

10 Estos conjugados realizaron una liberación en fase dual de los restos de modificador (M), tal como se indica en el esquema 1 siguiente:



La liberación de fase dual procede con un clivaje de enlace de éster (con liberación de portador-OH) y simultánea formación de M -succinimida en el lado de la amida, seguido de posterior hidrólisis del resto de M -succinimida (con liberación de M). El proceso de liberación puede proceder con formación de subproductos en la fase 1 y/o la fase 2. Por ejemplo, un subproducto que se puede formar en la fase 1 incluye:

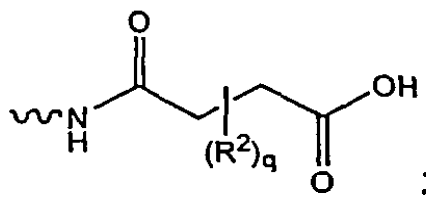
15



donde



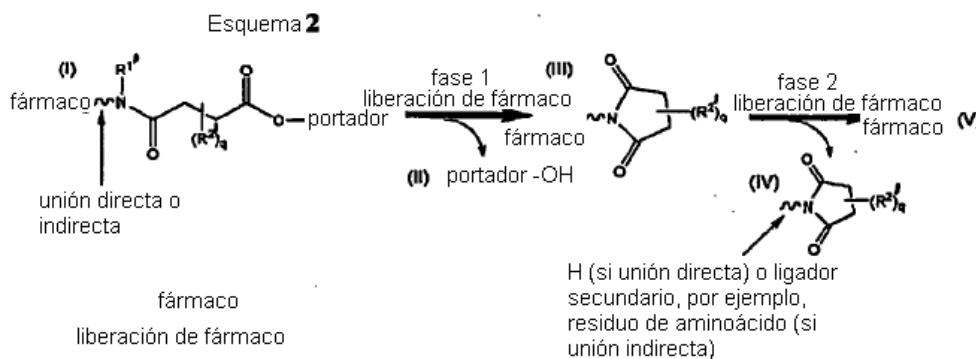
20 denota unión directa o indirecta de M . De modo similar, un subproducto que se puede formar en la fase 1 incluye:



donde  denota hidrógeno (si unión directa) o un ligador secundario (si unión indirecta).

En un aspecto, la invención comprende conjugados de fármaco–portador, en donde uno o varios restos de fármaco (por ejemplo, PM más pequeño o igual que aproximadamente 1,5 kDa) se unen covalentemente al portador a través de un ligador de succinamida opcionalmente sustituido, ya sea directa o indirectamente.

5 Tal como se trató con anterioridad, estos sistemas desarrollan una liberación en fase dual de restos de fármaco, tal como se indica en el siguiente esquema 2:



Tal como se trató con anterioridad, se pueden formar subproductos en el proceso.

10 Se han realizado intentos por emplear ligadores de succinamidoésteres con el grupo amida en el lado del portador,⁹ que no dio como resultado una liberación de fármaco en fase dual. En el sistema de la invención, el succinamidoéster se orienta de modo tal que el éster se forme en el lado del portador, mientras que el carboxilo opuesto forma un enlace amida con un modificador con contenido de amina (por ejemplo, fármaco o derivado de fármaco).

15 En ciertas formas de realización, el sistema de liberación de fármaco en fase dual, tal como se aplica a moléculas de fármaco (es decir, como modificadores) permite la manipulación de preparaciones macromoleculares solubles, potencialmente direccionables con nueva farmacocinética y reducida toxicidad. En ciertas formas de realización, el sistema de la invención incluye componer un conjugado hidrofílico de portador–fármaco que libere un profármaco lipofílico (por ejemplo, profármaco de CPT que tiene un anillo lactona estabilizado), que, a su vez, libera la sustancia farmacológica activa localmente (intra– y extracelularmente), sin necesidad de previa metabolización por el complejo hepático microsomal P450.

20 Las ventajas potenciales del sistema liberación en fase dual, cuando se aplica a fármacos incluyen: (1) la capacidad de preparar conjugados de fármaco–portador hidrosolubles que, por ejemplo, se pueden administrar por vía intravenosa. (2) activación del profármaco intermediario (III) “in situ” más que en el hígado, de modo que son posibles la administración local y el direccionamiento [el solicitante ejemplificó esta forma de realización con CPT como el fármaco. Distinto que con otros profármacos de CPT, por ejemplo, irinotecano, el profármaco de CPT intermediario está activado de hecho “in situ”]. (3) el método de la invención puede permitir la liberación de ciertos fármacos en forma estabilizada (en forma del intermediario de fármaco–succinimida) (como es el caso de CPT, que se libera en una forma lactona–estabilizada), que asegura la deposición del profármaco en tejidos y bajas velocidades de redistribución y transferencia a la orina.

30 Esta invención difiere de los sistemas de liberación de fármacos existentes en al menos las siguientes formas:

(1) En sistemas de liberación de fármaco conocidos en la técnica, el fármaco se pretende liberar en general en una etapa. Por el contrario, la presente invención incluye (i) liberación de una molécula succinimidada o de fármaco (profármaco) o una combinación de formas succinimidadas y succinamidadas; y (ii) liberación del fármaco de la molécula de fármaco succinimidada o succinamidada.

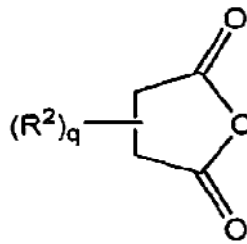
35 (2) En sistemas de liberación de pequeñas moléculas que contienen un grupo ligador de succinamido entre la molécula de fármaco y el portador conocido en la técnica, el fármaco está conectado con dicho ligador a través de un grupo éster. El fármaco se libera, en consecuencia, en una etapa, mientras que el ligador queda conectado con el portador.

40 También se ha de entender que debe brindar una consideración al tamaño (peso molecular) de los modificadores que se pueden usar en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, tal como se describe con mayor detalle en el Ejemplo 11, la reacción de ciclación–eliminación que resulta en la liberación de profármaco succinimidado implica el plegamiento del succinamidoéster en una estructura de intermediario cíclico (ver, por ejemplo, los esquemas 1 y 2), con posterior ataque nucleofílico intramolecular sobre el carbono del éster. Sin desear estar ligado por cualquier

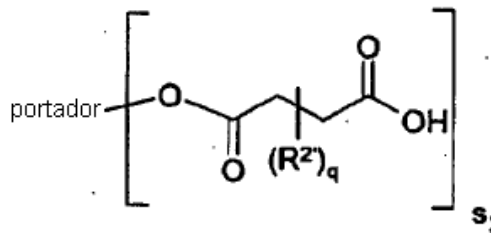
5 teoría particular, el impedimento estérico de un modificador a granel (por ejemplo, proteína) puede prevenir tal plegamiento y, por ende, interferir significativamente con la liberación del fármaco, haciendo que los modificadores no sean apropiados para la liberación del fármaco en fase dual. La presente invención describe una clase de modificadores que son apropiados para la liberación de fármaco en fase dual como modificadores con PM inferior a 1,5 kDa. La invención puede utilizar derivados de ácido succínico no sustituidos o sustituidos y se puede usar en combinación con una variedad de sustancias farmacológicas que incluyen agentes antineoplásicos, antiinfecciosos y anestésicos.

Portadores

10 Un portador apropiado puede comprender una o varias funcionalidades que pueden reaccionar, en condiciones apropiadas, con un anhídrido succínico opcionalmente sustituido que tiene la estructura:

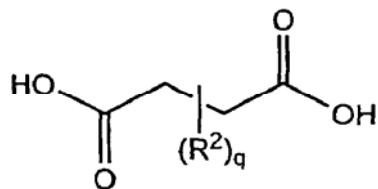


para formar un portador succinilado que tiene la estructura:

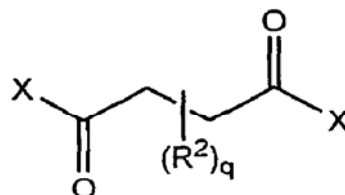


15 o una de sus sales; en donde s es un número entero que designa la cantidad de sitios de succinilación en el portador, q es un número entero de 0-4; y cada aparición de R² es, de modo independiente, hidrógeno, halógeno, -CN, NO₂, un resto de alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, aromático, heteroaromático o -GR^{G1}, en donde G es -O-, -S-, -NR^{G2}-, -C(=O)-, -S(=O)-, -SO₂-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^{G2}-, -OC(=O)-, -NR^{G2}C(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)NR^{G2}-, -NR^{G2}C(=O)O-, -NR^{G2}C(=O)NR^{G2}-, -C(=S)-, -C(=S)S-, -SC(=S)-, -SC(=S)S-, -C(=NR^{G2})-, -C(=NR^{G2})O-, -C(=NR^{G2})NR^{G3}-, -OC(=NR^{G2})-, -NR^{G2}C(=NR^{G3})-, -NR^{G2}SO₂-, -NR^{G2}SO₂NR^{G3}- o -SO₂NR^{G2}-, en donde cada aparición de R^{G1}, R^{G2} y R^{G3} es, de modo independiente, hidrógeno, halógeno o un derivado opcionalmente sustituido de alifático, heteroalifático, alicíclico, heteroalíclico, aromático, heteroaromático, arilo o heteroarilo.

25 En otras formas de realización determinadas, un portador apropiado puede comprender una o varias funcionalidades que pueden reaccionar, en condiciones apropiadas, con un anhídrido succínico opcionalmente sustituido (como antes), ácido succínico,

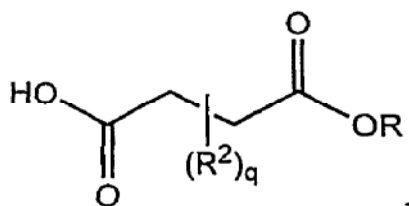


dihaloanhídrido de succinilo,



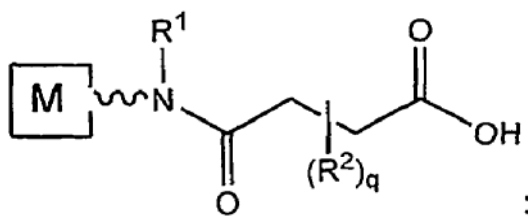
X = haluro


éster succínico

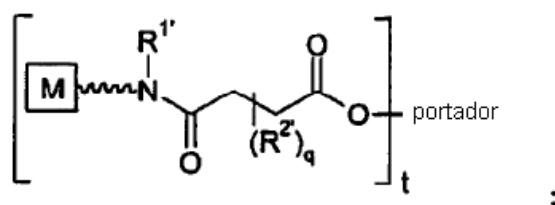


o cualquier otro reactivo para succinilación.

- 5 En otras formas de realización determinadas, un portador apropiado puede comprender una o varias funcionalidades que pueden reaccionar, en condiciones apropiadas, con un ácido succínico opcionalmente sustituido que tiene la estructura:



- 10 en donde q y R² son tal como se definieron con anterioridad; M es un modificador;  denota unión directa o indirecta de M con el resto de succinilo; y R¹ es hidrógeno, -C(=O)R^{1A}, -C(=O)OR^{1A}, -SR^{1A}, SO₂R^{1A} o un resto de alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, aromático, heteroaromático, en donde cada aparición de R^{1A} es, de modo independiente, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo, heteroalifático, heteroalíclico, aromático, heteroaromático, arilo o heteroarilo; para formar un conjugado que tiene la estructura:
- 15



en donde t es un número entero que designa la cantidad de restos de modificador conjugados con el portador.

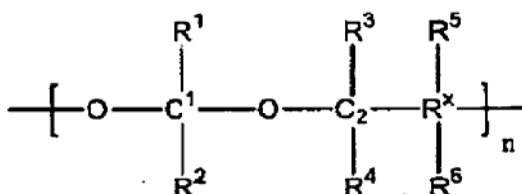
- 20 En ciertas formas de realización, cuando el portador es un polímero, aproximadamente 2 a aproximadamente 25% de monómeros comprende un modificador M, con mayor preferencia, aproximadamente 5 a aproximadamente 20%, con mayor preferencia, aproximadamente 5 a aproximadamente 18%, con mayor preferencia, aproximadamente 5 a aproximadamente 15%, con mayor preferencia, aproximadamente 6 a aproximadamente 15%, con mayor preferencia, aproximadamente 6 a aproximadamente 14%, con mayor preferencia, aproximadamente 7 a aproximadamente 13%, con mayor preferencia, aproximadamente 7 a aproximadamente 12%, con mayor preferencia, aproximadamente 8 a aproximadamente 12%, con mayor preferencia, aproximadamente 9 a aproximadamente 12%, con mayor preferencia, aproximadamente 10 a aproximadamente 12%, con mayor preferencia, aproximadamente 9 a aproximadamente 11%, con máxima preferencia, aproximadamente 10 a aproximadamente 11%.

- 30 Los conjugados de la invención pueden encontrar un uso en aplicaciones biomédicas, tales como ingeniería de genes de entrega de fármacos y de tejidos. El portador es biocompatible y biodegradable. En determinadas formas de realización, el portador es una macromolécula, polímero soluble, nanopartícula, gel, liposoma, micela, sutura o implante. La expresión "polímero soluble" comprende polímeros biodegradables biocompatibles tales como un polial (por ejemplo, poliacetal o policetal hidrofílico). El portador puede ser hidrófilo.

Los portadores utilizados en la presente invención son poliacetales o policetales biodegradables biocompatibles que comprenden al menos un enlace hidrolizable en cada unidad monómero posicionado dentro de la cadena principal. Esto asegura que el proceso de degradación (por intermedio de hidrólisis/desdoblamiento de las unidades monoméricas) resultará en la fragmentación del polímero conjugado en los componentes monoméricos (es decir, degradación) y confiere a los conjugados polímeros de la invención sus propiedades biodegradables. Las propiedades (por ejemplo, solubilidad, bioadhesividad y carácter hidrófilo de los conjugados de polímeros biodegradables biocompatibles pueden modificarse mediante subsiguiente sustitución de grupos hidrófilos o hidrófobos adicionales. Ejemplos de polímeros biodegradables biocompatibles pueden hallarse entre otros en las patentes US 5.811.510, 5.863.990 y 5.958.398; solicitud de patente provisional US 60/348.333; solicitud de patente de utilidad US 10/501.565; patentes europeas Nros.: 0820473 y 03707375.6; y solicitudes de patente internacionales PCT/US03/01017 y PCT/US03/22584. En los documentos mencionados arriba pueden encontrarse una guía acerca del significado, preparación y aplicaciones de este tipo de polímeros.

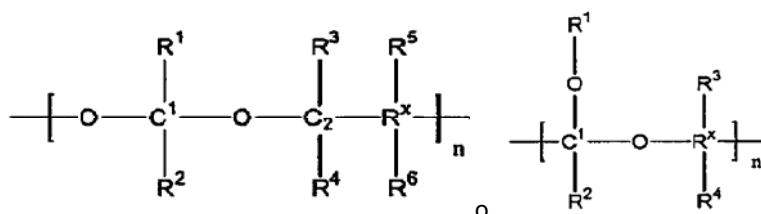
Como se describe en los ejemplos, hemos preparado con éxito conjugados biodegradables biocompatibles que son hidrófilos, hidrolizables y que comprenden moléculas de fármaco (por ejemplo, camptotecina (es decir, CPT)) unidos de forma covalente al polímero portador por intermedio de enlaces que contienen monosuccinamida. De esta manera, en determinadas formas de realización dadas a título de ejemplo, los portadores adecuados para implementar la presente invención son poliacetales o policetales que tienen al menos un átomo de oxígeno acetal/cetal en cada unidad monómera posicionada dentro de la cadena principal. Como se expuso en lo que precede, esto asegura que el proceso de degradación (por intermedio de hidrólisis/ desdoblamiento de los grupos acetal/cetal del polímero) tendrá como resultado la fragmentación del conjugado poliactal o policetal en componentes de bajo peso molecular (es decir, una degradación). De esta manera, un aspecto novedoso de la presente invención presente es el que se refiere a la estructura y propiedades de conjugados que comprenden uno o varios modificadores covalentemente unidos – por intermedio de enlaces que contiene succinamida, a un portador hidrófilo que tiene grupos acetal/cetal en la cadena principal.

En determinadas otras formas de realización de ejemplo, el portador comprende un poliactal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición de poliactal tienen la siguiente estructura química:



en donde para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, uno de R¹ y R² es hidrógeno y el otro es un grupo biocompatible e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster. En ciertas formas de realización, el grupo funcional es un resto hidroxilo.

En otras formas de realización de ejemplo, el portador comprende un policetal biocompatible biodegradable, en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición del policetal tienen la siguiente estructura química:

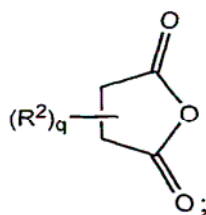


en donde cada aparición de R¹ y R² es un grupo biocompatible e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁ u OC₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster. En ciertas formas de realización, el grupo funcional es un resto de hidroxilo.

5 Los ejemplos de restos orgánicos apropiados son grupos alifáticos que tienen una cadena de átomos en un intervalo de entre aproximadamente 1 y 12 átomos, hidroxilo, hidroxialquilo, amina, carboxilo, amida, éster carboxílico, tioéster, aldehído, nitrilo, isonitrilo, nitroso, hidroxilamina, mercaptoalquilo, heterociclo, carbamatos, ácidos carboxílicos y sus sales, ácidos sulfónicos y sus sales, ésteres de ácido sulfónico, ácidos fosfóricos y sus sales, ésteres de fosfato, éteres de poliglicol, poliaminas, policarboxilatos, poliésteres, polioésteres, grupos de utilidad farmacéutica, una sustancia biológicamente activa o un rótulo diagnóstico.

En ciertas formas de realización, en los poliacetales y policetales descritos directamente con anterioridad, para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 comprende un grupo funcional que aumenta la hidrofiliidad del polímero o se adapta para una unión covalente con el ligador de succinamida.

10 En ciertas formas de realización, en los poliacetales y policetales descritos directamente con anterioridad, para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 comprende un grupo carbonilo adaptado para la unión covalente con el ligador L^M . En determinadas formas de realización de ejemplo, los poliacetales y policetales descritos directamente con anterioridad, en donde al menos uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 comprenden un grupo hidroxilo, se conjugan con uno o varios restos que tienen la estructura:



15 en donde q y R^2 son como se definen en general con anterioridad y en clases y subclases de la presente.

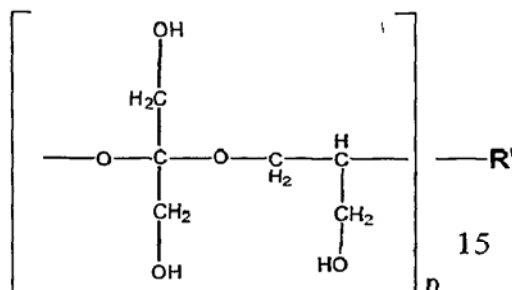
En otra forma de realización más, al menos uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 contiene un resto quiral.

20 En ciertas formas de realización, los portadores biocompatibles biodegradables de la invención pueden tener enlaces cruzados. La guía para ligadores cruzados y metodología de ligación cruzada en conexión con poliales en general se puede hallar, por ejemplo, en la solicitud provisional US N.º: 60/348.333; solicitud de utilidad US N.º: 10/501.565 y la solicitud internacional N.º: PCT/US03/01017.

25 En determinadas formas de realización de ejemplo, el portador es un poliactal biocompatible biodegradable o un policetal que está entrecruzado con epibromhidrina o epiclorhidrina. En ciertas formas de realización, la epibromhidrina o epiclorhidrina está presente en una cantidad en el intervalo de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20% en peso de los poliacetales o policetales biocompatibles biodegradables entrecruzados.

En una forma de realización, los poliacetales o policetales biocompatibles biodegradables apropiados para poner en práctica la presente invención tienen un peso molecular de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1500 kDa. En una forma de realización preferida de la presente invención, los poliacetales o policetales biocompatibles biodegradables tienen un peso molecular de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1000 kDa.

30 En ciertas formas de realización, los portadores poliméricos se modifican (es decir, se conjugan con uno o varios modificadores) en uno o ambos términos. Por ejemplo, cuando el portador es un policetal, el portador puede tener la estructura:

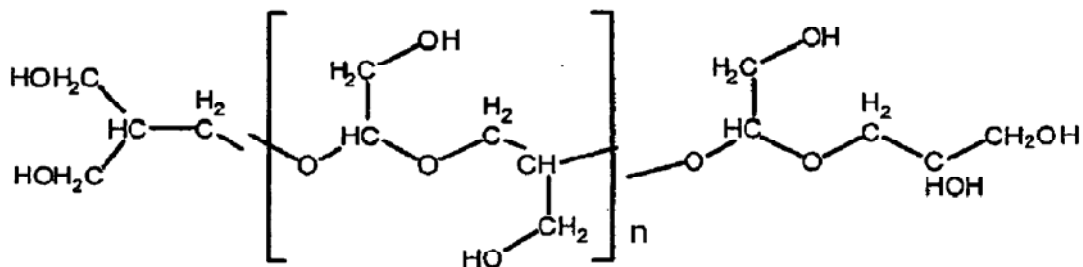


35 en donde n es un número entero y R' puede ser un modificador. Por ejemplo, R' puede comprender un éster de N-hidroxisuccinimida o un resto de maleimida para conjugar con proteínas u otras biomoléculas; R'' y R''' pueden comprender un fosfolípido y un resto específico blanco tales como anticuerpo, respectivamente, para la modificación de liposomas.

En otras formas de realización determinadas, los portadores se pueden sustituir en una posición terminal y una o varias posiciones no terminales o tanto en una posición terminal como una o varias posiciones no terminales.

En ciertas formas de realización, el portador es una macromolécula lineal, una macromolécula ramificada, una macromolécula globular, un copolímero de injerto, un copolímero de peine, una nanopartícula o un portador a base de lípidos. En determinadas formas de realización de ejemplo, el portador a base de lípidos es un liposoma.

En ciertas formas de realización, el portador es PHF, una estructura que se muestra a continuación:

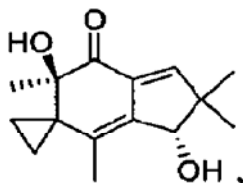


5

Modificadores

Los modificadores de acuerdo con la invención incluyen pequeñas moléculas que tienen un peso molecular $\leq 1,5$ kDa. En determinadas formas de realización, el modificador es un resto quimioterapéutico. En determinadas formas de realización, el modificador es camptotecina (CPT), que está opcionalmente enlazada de manera covalente a un ligador secundario. En determinadas formas de realización, el modificador es taxol, que está enlazado opcionalmente de manera covalente a un ligador secundario. En determinadas formas de realización, el modificador es iludina, que tiene la siguiente estructura:

10



opcionalmente covalentemente ligado a un ligador secundario.

15

Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen fármacos tales como vitaminas, sustancias anti-SIDA, sustancias anticáncer, radionúclidos, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores de enzimas, neurotoxinas, opioides, agentes hipnóticos, antihistaminas, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, miorelajantes y sustancias antiparkinson, antiespasmódicos y agentes para la contracción de los músculos que incluyen bloqueadores de canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, agentes antiparasitarios y compuestos antiprotozoarios, moduladores de las interacciones de matriz entre células y entorno extracelular que incluyen inhibidores del crecimiento de las células, y moléculas antiadhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de ADN, ARN o de la síntesis de las proteínas, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides, factores antiangiogénicos, factores antisecretorios, anticoagulantes y/o agentes antitrombóticos, anestésicos locales, agentes oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos y de imagen.

20

25

En determinadas formas de realización, el modificador puede estar químicamente modificado de manera de comprender un grupo funcional (es decir, un grupo amina) apropiado para el enlace covalente con un ácido succínico opcionalmente sustituido a través de la formación de un enlace de amida; estando dicho ácido succínico conjugado al portador por medio de la formación de un enlace éster.

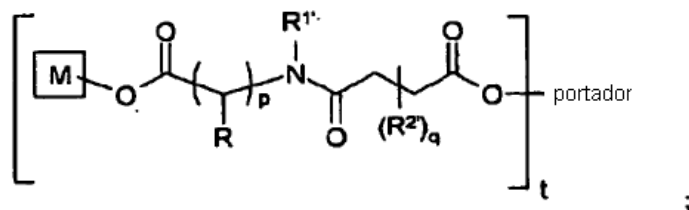
30

Conjugados

Los conjugados de la invención comprenden una o varias apariciones de M, donde M es un modificador, en donde una o varias apariciones de M pueden ser iguales o diferentes. En ciertas formas de realización, una o varias apariciones de M son un resto biocompatible. En ciertas formas de realización, una o varias apariciones de M son un resto hidrofílico. En ciertas formas de realización, una o varias apariciones de M son una molécula de fármaco. En ciertas formas de realización, una o varias apariciones de M son un resto quimioterapéutico. En ciertas formas de realización, una o varias apariciones de M son un resto de camptotecina.

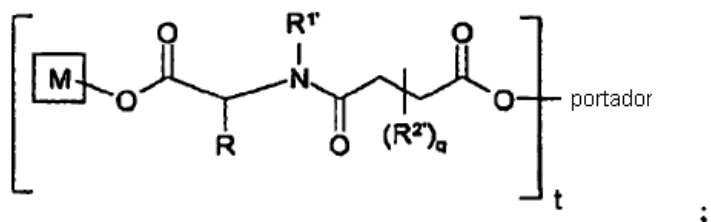
35

En otra forma de realización determinada, una o varias apariciones de M se unen con el ligador de succinamida ya sea directamente o a través de un segundo ligador. El ligador secundario puede ser un residuo de aminoacilo, de modo tal que el conjugado tiene la siguiente estructura general:



en donde p es un número entero de 1–12; t es un número entero que designa la cantidad de restos de modificador conjugados con el portador; y cada aparición de R es, de modo independiente, hidrógeno, halógeno, –CN, NO₂, un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, aromático, heteroaromático o –GR^{G1}, en donde G es –O–, –S–, –NR^{G2}–, –C(=O)–, –S(=O)–, –SO₂–, –C(=O)O–, –C(=O)NR^{G2}–, –OC(=O)–, –NR^{G2}C(=O)–, –OC(=O)O–, –OC(=O)NR^{G2}–, –NR^{G2}C(=O)O–, –NR^{G2}C(=O)NR^{G2}–, –C(=S)–, –C(=S)S–, –SC(=S)–, –SC(=S)S–, –C(=NR^{G2})–, –C(=NR^{G2})O–, –C(=NR^{G2})NR^{G3}–, –OC(=NR^{G2})–, –NR^{G2}C(=NR^{G3})–, –NR^{G2}SO₂–, –NR^{G2}SO₂NR^{G3}– o –SO₂NR^{G2}–, en donde cada aparición de R^{G1}, R^{G2} y R^{G3} es, de modo independiente, hidrógeno, halógeno o un resto opcionalmente sustituido de alifático, heteroalifático, alicíclico, heteroalifático, aromático, heteroaromático, arilo o heteroarilo.

En ciertas formas de realización, el ligador secundario es un residuo de α-aminoacilo y el conjugado tiene la siguiente estructura general:



en donde t es un número entero que designa la cantidad de restos de modificador conjugados con el portador; y R designa una cadena lateral de aminoácidos natural o no natural.

Como se trató más en general con anterioridad, en ciertas formas de realización, cuando el portador es un polímero, aproximadamente 2 a aproximadamente 25% de monómeros comprende un modificador M, con mayor preferencia, aproximadamente 5 a aproximadamente 20%, con mayor preferencia, aproximadamente 5 a aproximadamente 18%, con mayor preferencia, aproximadamente 5 a aproximadamente 15%, con mayor preferencia, aproximadamente 6 a aproximadamente 15%, con mayor preferencia, aproximadamente 6 a aproximadamente 14%, con mayor preferencia, aproximadamente 7 a aproximadamente 13%, con mayor preferencia, aproximadamente 7 a aproximadamente 12%, con mayor preferencia, aproximadamente 8 a aproximadamente 12%, con mayor preferencia, aproximadamente 9 a aproximadamente 12%, con mayor preferencia, aproximadamente 10 a aproximadamente 12%, con mayor preferencia, aproximadamente 9 a aproximadamente 11 %, con máxima preferencia, aproximadamente 10 a aproximadamente 11%.

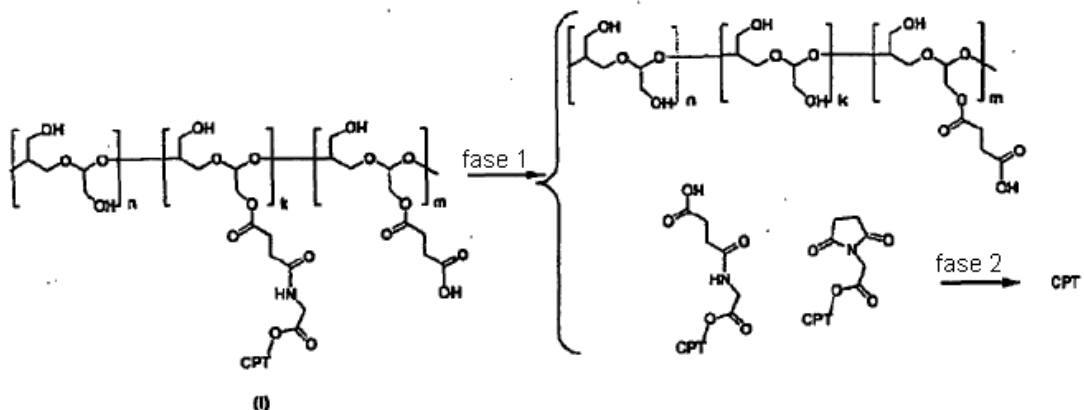
En ciertas formas de realización, M es CPT. En ciertas formas de realización, M es CPT y el ligador secundario es un residuo de aminoacilo. En ciertas formas de realización, M es CPT y el ligador secundario es un residuo de glicina.

En otras formas de realización, en los conjugados de la invención, una o varias apariciones de M comprenden un modificador biológicamente activo.

En determinada forma de realización, el modificador es un resto quimioterapéutico. En ciertas formas de realización, el modificador es camptotecina (CPT). De esta manera, en un aspecto, la presente invención provee un conjugado de CPT–portador, en donde CPT y el portador están covalentemente unidos a través de un ligador que contiene succinamida, en donde CPT está directa o indirectamente unido con el resto de succinamida a través de un enlace amida y el portador está ligado directa o indirectamente al resto de succinamida a través de un enlace de éster. En ciertas formas de realización, CPT está indirectamente unido con el resto de succinamida por medio de un resto de aminoacilo. En ciertas formas de realización, CPT está indirectamente unido con el resto de succinamida por medio de un resto de glicina. El portador es un poliactal o policetal del tipo descrito en la presente.

En ciertas formas de realización, se provee un conjugado de PHF–CPT que tiene la estructura (I) mostrada en el esquema 3 siguiente:

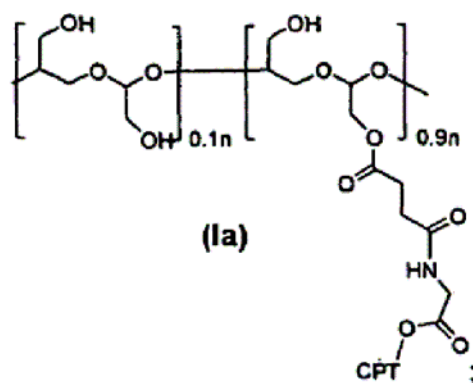
Esquema 3



en donde n, k y m son números enteros entre 10–300, 1–20 y 0–300, respectivamente.

Tal como se indicó con anterioridad, el conjugado (I) puede liberar posteriormente CPT en un proceso de dos fases.

En determinada forma de realización, se provee un conjugado de PHF–CPT que tiene la estructura:

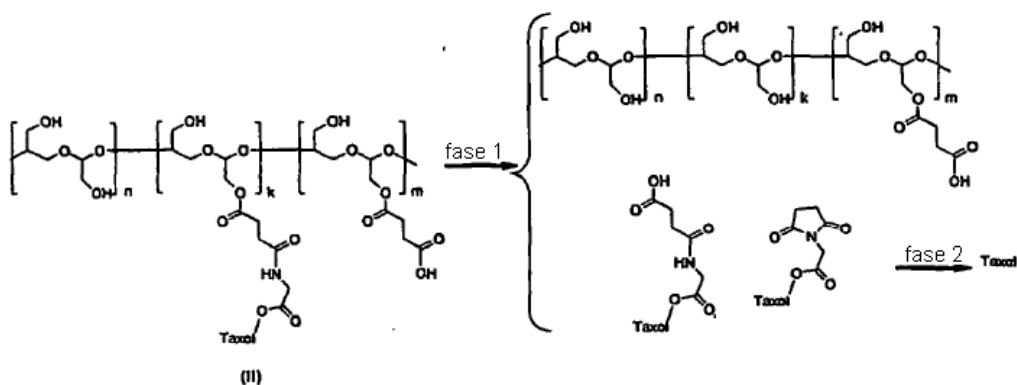


5

en donde n es un número entero entre 10–3000.

En ciertas formas de realización, se provee un conjugado de PHF–Taxol que tiene la estructura (II) mostrada en el siguiente esquema 4:

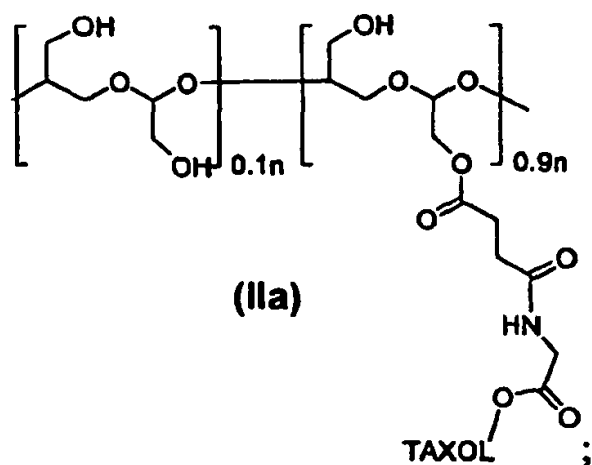
Esquema 4



10 en donde n, k y m son números enteros de entre 10–300, 1–20 y 0–300, respectivamente.

Tal como se indicó con anterioridad, el conjugado (II) puede liberar posteriormente taxol en un proceso de dos fases.

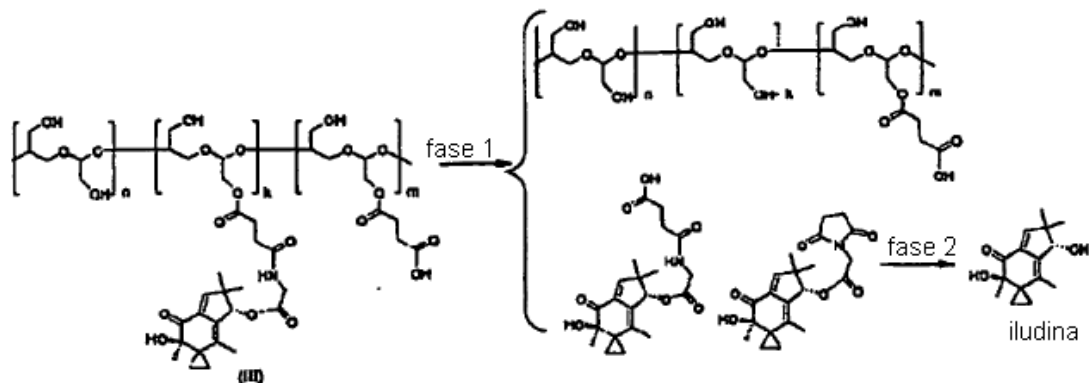
En determinada forma de realización, se provee un conjugado de PHF-Taxol que tiene la estructura:



en donde n es un número entero entre 10–3000.

5 En ciertas formas de realización, se provee un conjugado de PHF-iludina que tiene la estructura (III) mostrada en el siguiente esquema 5:

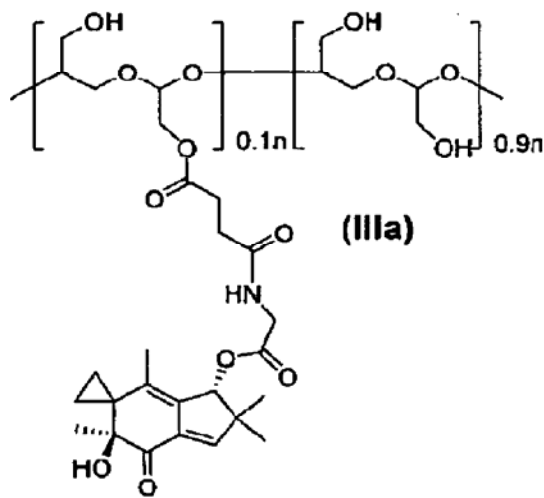
Esquema 5



en donde n, k y m son números enteros de entre 10–300, 1–20 y 0–300, respectivamente.

Tal como se indicó con anterioridad, el conjugado (III) puede liberar posteriormente iludina en un proceso de dos fases.

10 En ciertas formas de realización, se provee un conjugado de PHF-iludina que tiene la estructura:



en donde n es un número entero de entre 10–3000.

- Los conjugados biocompatibles de la invención pueden ser preparados para satisfacer los requerimientos de biodegradabilidad y carácter hidrófilo. Por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas, es posible lograr un equilibrio entre biodegradabilidad y estabilidad. Por ejemplo, es sabido que las macromoléculas con pesos moleculares más allá de un umbral determinado (en general, superior a 50–100 kDa, en función de la forma física de la molécula) no son excretados por los riñones, ya que las moléculas pequeñas pueden ser eliminados del cuerpo solamente a través de la incorporación por las células y degradación en compartimientos intracelulares, notablemente los lisosomas. Esta observación es un ejemplo de cómo es posible diseñar materiales funcionalmente estables y además biodegradables mediante la modulación de su estabilidad bajo condiciones fisiológicas generales ($\text{pH} = 7,5 \pm 0,5$) y con un pH lisosomal (pH aproximadamente igual a 5). Por ejemplo, es sabido que la hidrólisis de los grupos acetal y cetel es catalizada por ácidos, por lo que en términos generales los poliales serán menos estables en un entorno lisosomal ácido que, por ejemplo, en plasma de sangre. Es posible diseñar un test para comparar el perfil de degradación de los polímeros a por ejemplo, $\text{pH}=5$ y $\text{pH}=7,5$ a 37°C en un medio acuoso y de esta manera determinar el equilibrio previsto entre la estabilidad del polímero bajo un entorno fisiológico normal y en el compartimiento lisosomal “digestivo” después de la incorporación por las células. Es posible medir la integridad de los polímeros en los tests de este tipo, por ejemplo, mediante la HPLC de exclusión de tamaño. Una persona con pericia en la especialidad puede seleccionar otros métodos adecuados para estudiar diversos fragmentos de los conjugados degradados de esta invención.
- En muchos casos, será preferible que a $\text{pH} = 7,5$ el tamaño efectivo del polímero no cambie de manera detectable a lo largo de de 1 a 7 días y que permanezca dentro del 50% con respecto al tamaño original durante por lo menos varias semanas. Por otra parte, con un $\text{pH}=5$, el polímero debería preferentemente degradarse de manera detectable a lo largo de 1 a 5 días y haberse transformado por completo en fragmentos de bajo peso molecular dentro de un marco del tiempo de dos semanas a varios meses. Si bien en algunos casos puede ser preferible una degradación más rápida, por lo general será más deseable que el polímero se degrade en las células con una velocidad que no supere la velocidad de metabolización o excreción de los fragmentos de polímero por las células. Por lo tanto, en determinadas formas de realización, se prevé que los conjugados de la presente invención serán biodegradables, en particular al ser incorporadas en las células y relativamente “inertes” con respecto a los sistemas biológicos. Los productos de la degradación del portador carecen preferentemente de carga y no desplazan de manera significativa el pH del entorno. Se propone que la abundancia de grupos alcohol puede proveer un bajo coeficiente de reconocimiento de polímeros por los receptores de las células, particularmente de los fagocitos. Por lo general las estructuras poliméricas de la presente invención contienen poco o nada de determinantes antigénicos (característicos, por ejemplo, de algunos polisacáridos y polipéptidos) y por lo general no comprenden estructuras rígidas capas de entrar en interacciones de tipo “llave y traba” in vivo a menos que estas últimas sean deseables. De esta manera, se predice que los conjugados solubles, reticulados y sólidos de esta invención tendrán una baja toxicidad y bioadhesividad, lo que los hace adecuados para diversas aplicaciones biomédicas.

En determinadas formas de realización de la presente invención, los conjugados biodegradables biocompatibles pueden formar estructuras lineales o ramificadas. Por ejemplo, los conjugados biodegradables biocompatibles de poliacetal o policetal de la presente invención pueden ser quirales (ópticamente activos). Opcionalmente, los conjugados biodegradables biocompatibles de poliacetal o policetal de la presente invención puede ser racémicos.

En otra forma de realización más, los conjugados de la presente invención están asociados con una macromolécula o con una nanopartícula. Los ejemplos de macromoléculas adecuadas incluyen, enzimas, polipéptidos, polilisina, proteínas, lípidos, polielectrolitos, anticuerpos, ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico y lectinas. La macromolécula puede modificarse químicamente antes de asociársela con dicho conjugado biodegradable

biocompatible. Para los efectos de la presente invención, se considera que el ADN y ARN circular y linear (por ejemplo, plásmidos) y los asociados supramoleculares de los mismos, tales como las partículas virales, son macromoléculas. En determinadas formas de realización, los conjugados de la invención no están covalentemente unidos con macromoléculas.

5 En determinadas formas de realización, los conjugados de la invención son solubles en agua. En determinadas formas de realización, los conjugados de la invención no son solubles en agua. En determinadas formas de realización, el conjugado de acuerdo con la invención se halla en una forma sólida. En determinadas formas de realización, los conjugados de la invención son coloides. En determinadas formas de realización, los conjugados de la invención se hallan en forma de partículas. En determinadas formas de realización, los conjugados de la invención se hallan en forma de gel. En determinadas formas de realización, los conjugados de la invención se hallan en una forma de fibra. En determinadas formas de realización, los conjugados de la invención se hallan en una forma de película.

Aplicaciones

15 En un aspecto, un área de aplicación de la presente invención es el tratamiento/quimioterapia de cáncer. Sin embargo, los alcances de aplicación de la invención no se limitan a esta área. Otras aplicaciones serán fácilmente evidentes para el lector.

20 A pesar de las mejoras recientes significativas en las estadísticas relacionadas con el cáncer en los Estados Unidos, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte. La eficacia de la quimioterapia, que es la principal modalidad terapéutica, todavía está limitada por la toxicidad de los fármacos disponibles que impiden elevar la dosis a niveles que resulten en una remisión fiable. Un aspecto de la presente invención se refiere a la posibilidad de desarrollar preparaciones quimioterapéuticas nuevas, considerablemente más eficientes y menos tóxicas. El sistema de la invención también puede ser útil en la inflamación, control del dolor, y en términos generales, en todas las otras áreas en las cuales es beneficiosa una liberación prolongada o el apuntamiento de los fármacos.

25 Los sistemas de entrega de fármacos macromoleculares que han sido estudiados ampliamente durante las dos últimas décadas, han mejorado significativamente las propiedades farmacológicas de varias sustancias farmacológicas y han provisto nuevas herramientas para controlar la entrega del fármaco a las células cancerosas. Una gran mayoría de conjugados farmacológicos antineoplásicos de los cuales se ha informado hasta la presente (a) son inactivos hasta que la sustancia farmacológica haya sido liberada del portador macromolecular, y (b) la sustancia farmacológica se libera o al menos está destinada a ser liberada, en una etapa. En algunos casos, el conjugado (por ejemplo, de una proteína) puede ser activo sin liberación de fármaco desde el portador.

35 Los beneficios de la asociación del fármaco con las moléculas del portador se refieren en parte a los siguientes factores: (1) Solubilización de la sustancia farmacológica; (2) acceso restringido de la sustancia farmacológica al intersticio normal debido al gran tamaño hidrodinámico del conjugado, (3) entrega del conjugado a los tejidos tumorales por intermedio de una mayor permeabilidad y efecto de retención EPR, y (4) mantenimiento de los niveles prolongados del fármaco a lo largo de periodos que superan el ciclo de la célula cancerosa. En algunos conjugados (desarrollados más recientemente), se refuerza el carácter específico de la entrega del fármaco a las células cancerosas por intermedio de la incorporación de diversos restos de apuntamiento (por ejemplo, anticuerpos) y por intermedio de hidrólisis, asistida por enzima, de la ligación que conecta la molécula del fármaco al portador.

40 En varios estudios preclínicos, los conjugados de fármacos antineoplásicos han demostrado ser menos tóxicos que los respectivos fármacos libres. La actividad antineoplásica de los conjugados (por unidad de la sustancia farmacológica administrada) era usualmente inferior a la de los fármacos no modificados, si bien en algunos casos es similar o más elevada 26. Sin embargo, los conjugados son frecuentemente más efectivos a dosis equitóxicas, por lo que una pérdida parcial de la actividad antineoplásica está contrarrestada por la menor toxicidad y por mayores dosis máximas toleradas.

45 En un aspecto, el sistema dual de liberación del fármaco de la invención añade dos beneficios importantes: (1) un aspecto adicional de propiedades controladas del profármaco liberado (por ejemplo, carácter hidrófobo, afinidad con respecto a los componentes de la célula, transporte transmembrana, conservación de la actividad del fármaco, redistribución desde el sitio de liberación); y (2) una posibilidad adicional de regular ambas fases de la liberación del fármaco (por lo tanto, por ejemplo, optimizar los niveles activos del fármaco y la duración de la liberación en función del ciclo de las células cancerosas).

50 Como se mencionó en lo que precede, los portadores tales como los conjugados poliméricos solubles no bioadhesivos, completamente biodegradables, serían sumamente deseables para llevar la presente invención a la práctica.

Métodos sintéticos

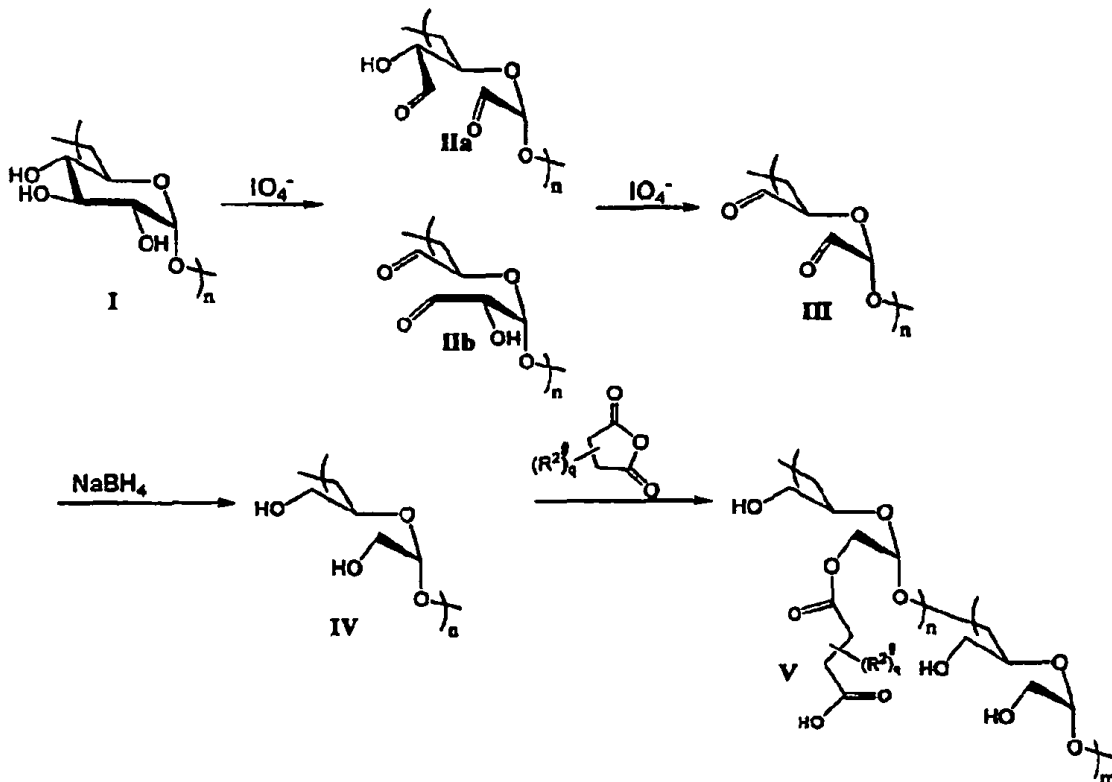
55 De acuerdo con la presente invención, pueden utilizarse cualesquier técnicas disponibles para preparar los conjugados o composiciones de acuerdo con la invención que los incluyen y los compuestos intermedios y

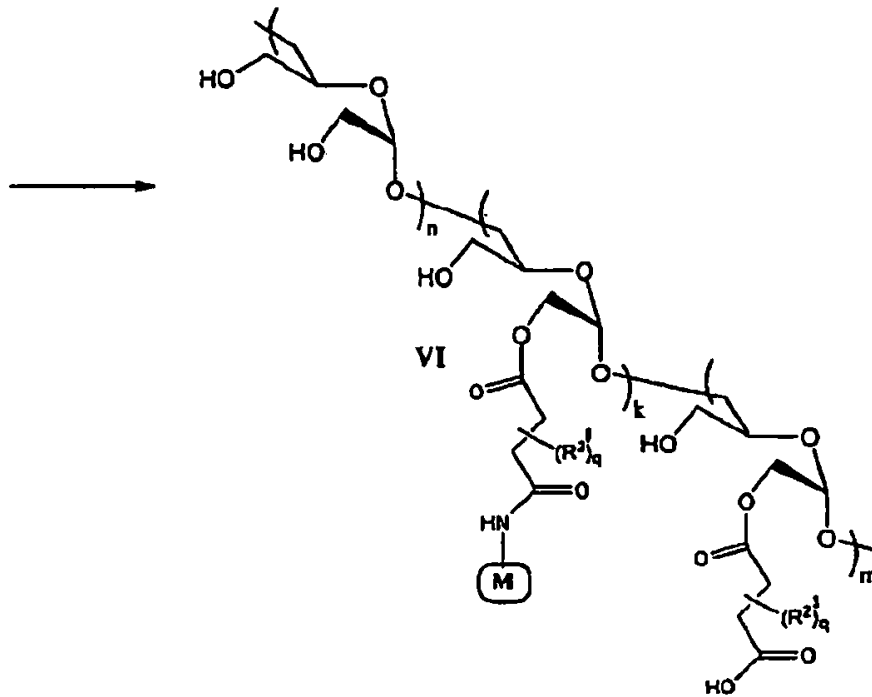
componentes (por ejemplo, los portadores y modificadores) útiles para prepararlos. Por ejemplo, puede utilizarse métodos semisintéticos y completamente sintéticos tales como los que se exponen en detalle en lo que sigue.

Portadores

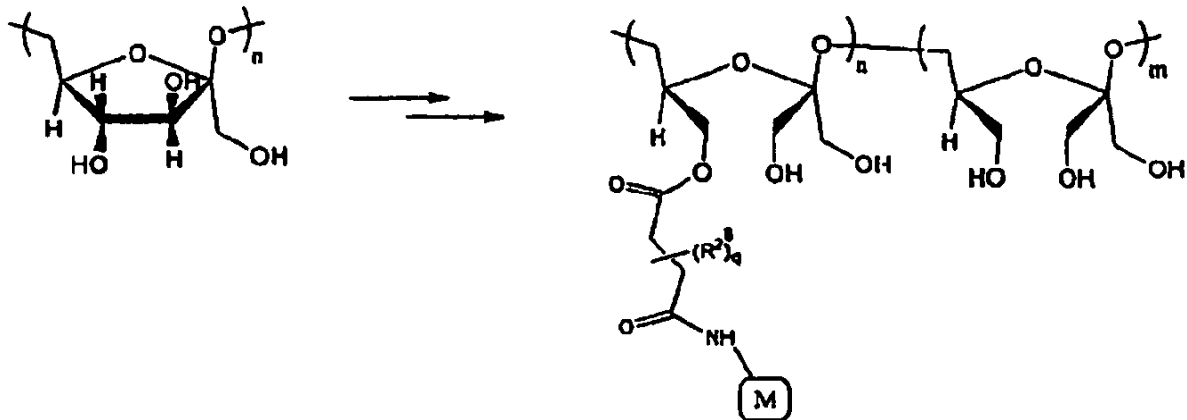
5 Los métodos para preparar portadores polímeros (por ejemplo, portadores polímeros biocompatibles, biodegradables) adecuados para su conjugación a modificadores, son conocidos en la especialidad. Por ejemplo, es posible encontrar una guía para la síntesis en las patentes US 5.811.510; 5.863.990 y 5.958.398; la solicitud de patente provisoria US 60/348.333; la solicitud de patente de utilidad US 10/501.565; las patentes europeas Nros.: 0820473 y 03707375,6; y las solicitudes de patentes internacionales PCT/US03/01017 y PCT/US03/22584. La persona con pericia en la especialidad sabrá cómo adoptar estos métodos para preparar portadores polímeros para su utilización en la práctica de la invención.

10 Por ejemplo, se pueden preparar poliacetales o policetales semisintéticos a partir de polialdosas y policetasas por medio de un clivaje lateral completo de anillos carbohidrato con peryodato en soluciones acuosas, con posterior conversión en restos hidrofílicos (por ejemplo, por medio de reducción del borhidruro) para conjugación de grupos hidroxilo con uno o varios modificadores, por medio de un ligador de succinamida. En una forma de realización ilustrativa, los anillos de carbohidrato de un polisacárido apropiado se pueden oxidar por medio de reactivos específicos de glicol, dando como resultado el clivaje de enlaces de carbono-carbono entre átomos de carbono que están conectados con un grupo hidroxilo. Un ejemplo de aplicación de esta metodología en dextrano B-512 se ilustra a continuación:

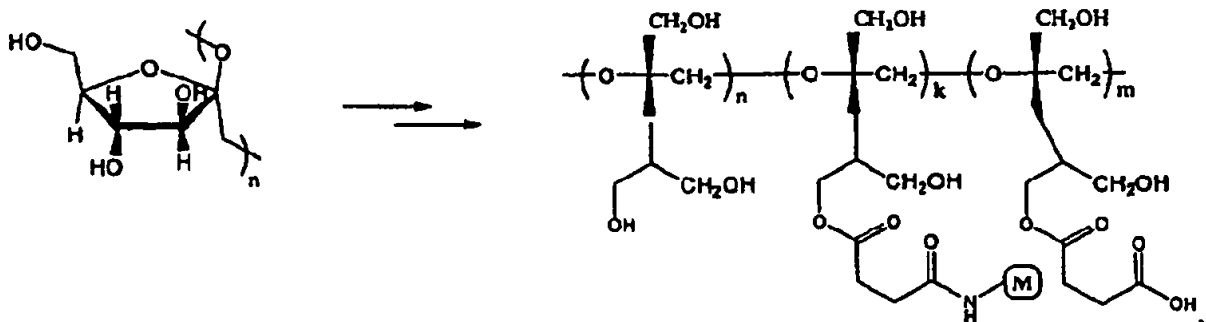




Se puede usar un enfoque similar con levano:



e inulina:



5

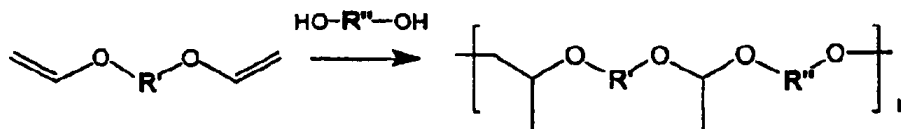
En una forma de realización, un método para formar los conjugados de poliactal o policetal biodegradables biocompatibles de la presente invención comprende un proceso en el que se combina un polisacárido apropiado con una cantidad eficaz de un agente de oxidación específico de glicol para formar un intermediario de aldehído. El intermediario de aldehído, que es un poliactal o policetal en sí, se puede reducir luego en el correspondiente poliol,

se puede succinular y acoplar con uno o varios modificadores apropiados para formar un poliacetal biocompatible biodegradable o policetal conjugado que comprende ligaciones que contienen succinamida.

En otra forma de realización preferida, se pueden preparar poliacetales o policetales biocompatibles biodegradables completamente sintéticos para usar en la presente invención haciendo reaccionar un iniciador apropiado con un compuesto precursor adecuado.

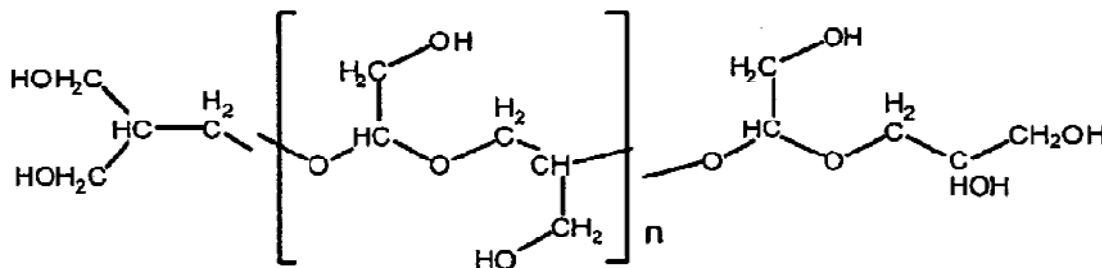
5

Por ejemplo, se pueden preparar poliacetales o policetales completamente sintéticos por condensación de éteres de vinilo con dioles sustituidos protegidos. Se pueden usar otros métodos, tales como polimerización de abertura de ciclos, en donde la eficacia del método dependerá del grado de sustitución y la densidad de los grupos protectores.



10 Un experto en la técnica apreciará que los sistemas de disolventes, catalizadores y otros factores se pueden optimizar para obtener productos de alto peso molecular.

En ciertas formas de realización, el portador es PHF que tiene la estructura:



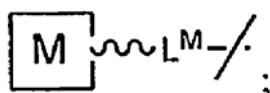
Modificadores

15 Los modificadores de acuerdo con la invención incluyen moléculas pequeñas que tienen un peso molecular $\leq 1,5$ kDa.

Tal como se trató con anterioridad, los modificadores de utilidad en la práctica de la invención se pueden modificar químicamente, de modo que comprendan independientemente un grupo funcional apropiado para el enlace covalente con un ácido succínico opcionalmente sustituido a través de la formación de un enlace de amida; dicho ácido succínico está conjugado con el portador a través de la formación de un enlace de éster.

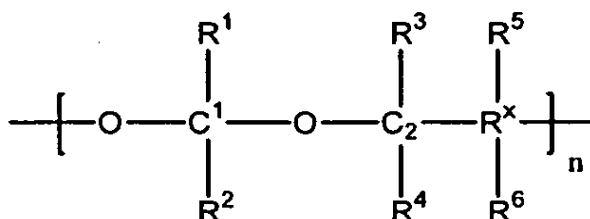
20 **Conjugados**

En otro aspecto, la invención provee un método para preparar un conjugado que comprende un portador sustituido con una o varias apariciones de un resto que tiene la estructura:



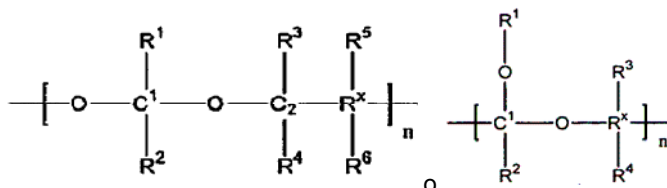
en donde el portador comprende

25 (a) un poliacetal biocompatible biodegradable, en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición de poliacetal tienen la siguiente estructura química:



en donde para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, uno de R¹ y R² es hidrógeno y el otro es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero, cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster; o

(b) un policetal biocompatible biodegradable. en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición del policetal tienen la siguiente estructura química:



en donde cada aparición de R¹ y R² es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁ u OC₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster;

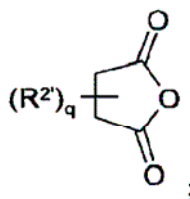
en donde cada aparición de M es, de modo independiente, un modificador que es una pequeña molécula que tiene un peso molecular ≤ 1,5 kDa y en donde el modificador comprende una funcionalidad amina o está químicamente modificado de modo que comprende un grupo funcional apropiado para el enlace covalente con un ácido succínico opcionalmente sustituido a través de la formación de un enlace de amida;

~ denota unión directa o indirecta de M con el ligador L^M; y cada aparición de L^M es, de modo independiente, un ligador que contiene succinamida opcionalmente sustituida, en donde el modificador M está directa o indirectamente unido con el ligador de succinamida a través de un enlace amida y el portador está ligado directa o indirectamente a cada aparición del ligador de succinamida a través de un enlace de éster; en donde dicho método comprende las etapas de:

proporcionar un portador,

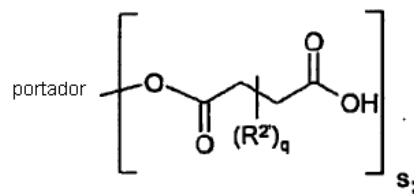
proporcionar uno o varios modificadores;

hacer reaccionar el portador con un anhídrido succínico opcionalmente sustituido que tiene la estructura:



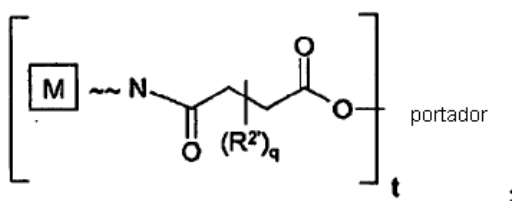
en donde q es un número entero de 0-4; y cada aparición de R^{2'} es, de modo independiente, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo, heteroalifático, heteroalícíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, -C(=O)R^{2A} o -ZR^{2A}, en donde Z es -O-, -S-, -NR^{2B}, en donde cada aparición de R^{2A} y R^{2B} es, de modo independiente, hidrógeno o un resto alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo o heteroarilo;

en condiciones apropiadas para formar un portador succinilado que tiene la estructura:



o su sal; en donde s denota la cantidad de restos de succinilo en el portador;

5 y hacer reaccionar el portador succinilado con uno o varios restos de modificador (M), en donde al menos un resto de modificador forman un enlace de amida, ya sea directa o indirectamente a través de un ligador secundario, con un resto de succinilo presente en el portador; generando así el conjugado que tiene la estructura:



10 en donde R^2 y q son tal como se definieron con anterioridad; \sim denota unión directa o indirecta de M con el ligador de succinamida; y t es un número entero que designa la cantidad de restos de modificador conjugados con el portador que modo que $t \leq s$.

En ciertas formas de realización, cada aparición de R^2 es hidrógeno. En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 es un resto alquilo C_{1-10} . En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 son alquilo C_{1-6} . En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 son un grupo hidrofóbico. En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 son un grupo hidrofílico. En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 son un grupo aniónico. En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 son un grupo catiónico. En determinada forma de realización, una o varias apariciones de R^2 son un ligando de receptor.

En determinadas formas de realización de ejemplo, en la etapa de acoplamiento del portador succinilado, un subgrupo de los sitios de ácido succinámico en el portador queda sin reaccionar.

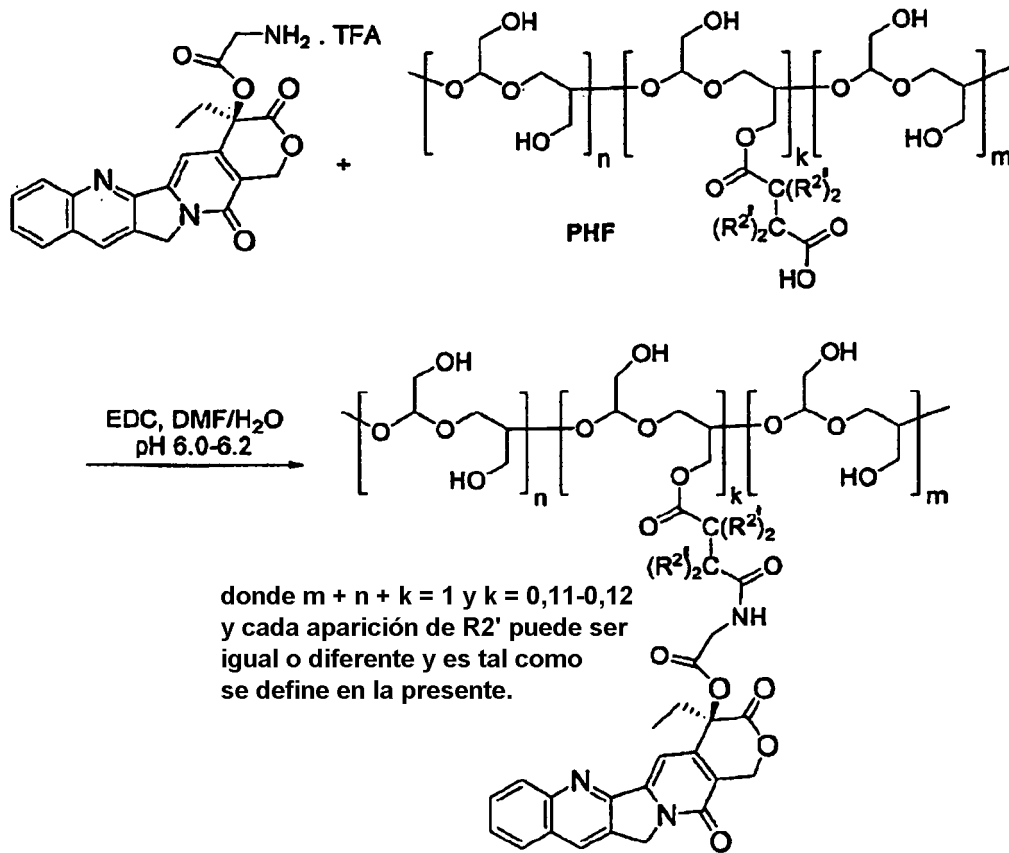
20 En ciertas formas de realización, el grado de succinilación en el portador se modula variando la relación de cantidad de anhídrido succínico vs. cantidad de portador en la etapa de reacción del portador con el anhídrido succínico opcionalmente sustituido. De esta manera, la succinilación se puede controlar seleccionando la relación apropiada de anhídrido succínico / portador.

25 En ciertas formas de realización, el grado de incorporación del modificador en el conjugado se modula variando la relación de cantidad de modificador vs. la cantidad de portador succinilado en la etapa de reacción del portador succinilado con uno o varios restos de modificador. De esta manera, los contenidos de modificador en el conjugado se pueden controlar seleccionando la relación apropiada de modificador/portador succinilado. En ciertas formas de realización, el grado de incorporación de modificador en el conjugado se determina por el grado de succinilación del portador.

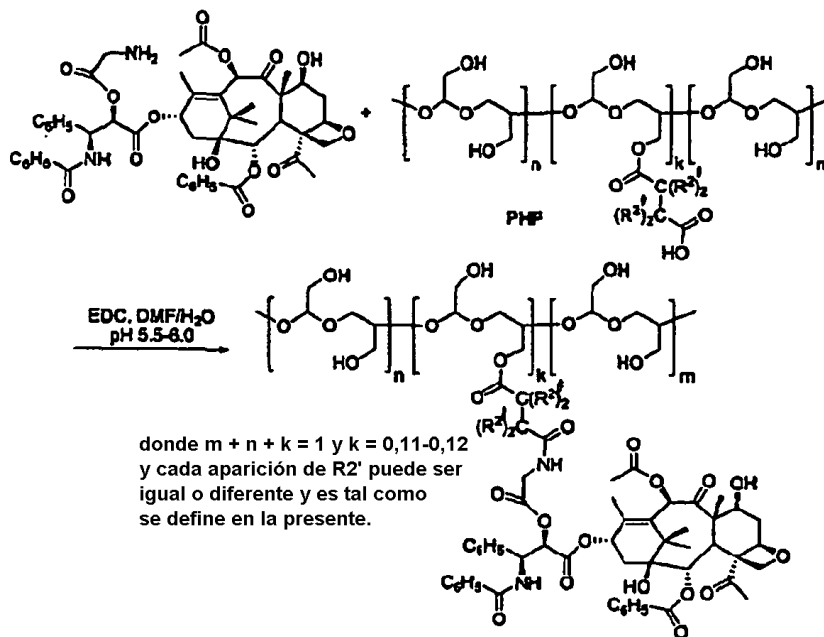
30 En ciertas formas de realización, una variedad de modificadores se puede mezclar junto con el portador succinilado y la mezcla de reacción se incuba en condiciones apropiadas hasta lograr el grado de conversión deseable. Este método de puede usar por medio de mezcla de los modificadores y el portador en diferentes relaciones para producir, en una etapa, bibliotecas de conjugados con diversa composición y contenido de modificador.

35 En determinada forma de realización, el modificador es un resto quimioterapéutico. En ciertas formas de realización, el modificador es camptotecina (CPT), taxol o iludina. De esta manera, en un aspecto, la presente invención provee un método para preparar un conjugado de CPT–portador, taxol–portador o iludina–portador, en donde CPT, taxol o iludina y el portador se unen covalentemente a través de un ligador que contiene succinamida, en donde CPT, taxol o iludina está directa o indirectamente unido con el resto de succinamida a través de un enlace amida y el portador está ligado directa o indirectamente al resto de succinamida a través de un enlace de éster. En ciertas formas de realización, CPT, taxol o iludina se une indirectamente al resto de succinamida por medio de un resto de aminoácido. En ciertas formas de realización, el portador es un poliacetal o policetal, tales como los descritos en la presente. En

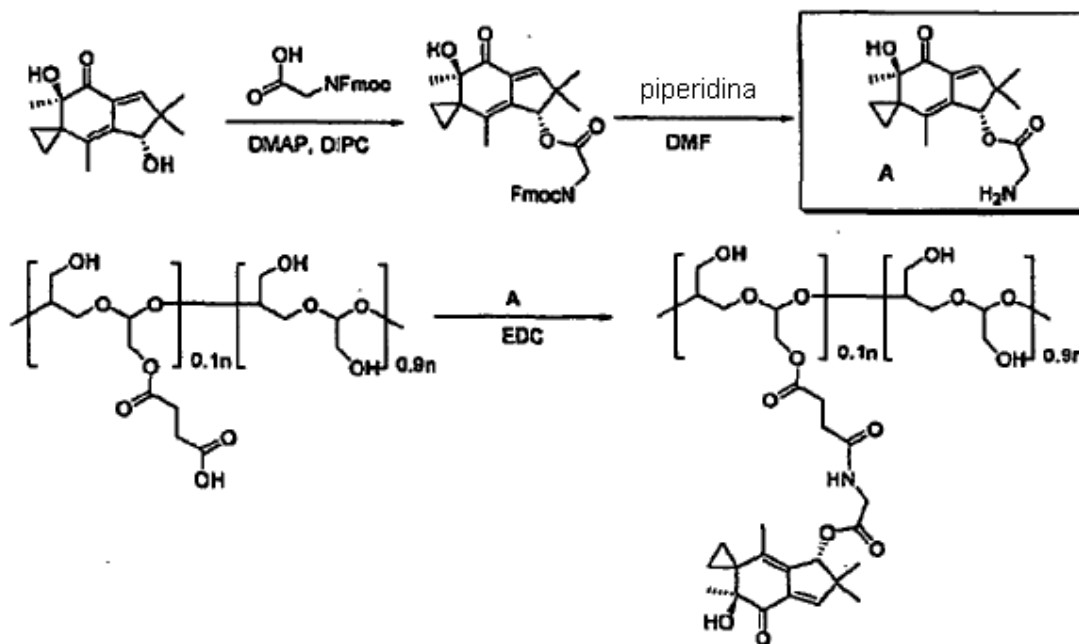
determinadas formas de realización de ejemplo, el poliacetal o policetal es PHF. En ciertas formas de realización, un conjugado de PHF-CPT de acuerdo con la presente invención se puede preparar de la siguiente manera:



5 En ciertas formas de realización, un conjugado de PHF-Taxol de acuerdo con la presente invención se puede preparar de la siguiente manera:



En ciertas formas de realización, un conjugado de PHF-iludina de acuerdo con la presente invención se puede preparar de la siguiente manera:



Composiciones

En determinadas formas de realización, se provee una composición que comprende cualesquiera uno o varios de los conjugados expuestos de la presente y un portador o diluyente farmacéuticamente adecuado. En determinadas formas de realización, la composición comprende un conjugado CPT portador. En determinadas formas de realización, el CPT está indirectamente unido al resto succinamida por intermedio de un resto amino acilo. En determinadas formas de realización, el CPT está indirectamente unido al resto succinamida por intermedio de un resto glicina. En determinadas formas de realización, el portador es un poliactal o policetal, tales como los descritos en la presente. En determinadas formas de realización dadas como ejemplo, el poliactal o policetal es PHF. En determinadas formas de realización, la composición comprende un conjugado PHF-CPT que tiene la fórmula (I) o (Ia).

En determinadas formas de realización, la composición comprende un conjugado taxol-portador. En determinadas formas de realización, el taxol está indirectamente unido al resto succinamida por intermedio de un resto amino acilo. En determinadas formas de realización, el taxol está indirectamente unido al resto succinamida por intermedio de un resto glicina. En determinadas formas de realización, el portador es un poliactal o policetal, tales como los descritos en la presente. En determinadas formas de realización de ejemplo, el poliactal o policetal es PHF. En determinadas formas de realización, la composición comprende un conjugado PHF-taxol que tiene la fórmula (II) o (IIa).

En determinadas formas de realización, la composición comprende un conjugado iludina-portador. En determinadas formas de realización, la iludina está indirectamente unida al resto succinamida por intermedio de un resto amino acilo. En determinadas formas de realización, la iludina está indirectamente unida al resto succinamida por intermedio de un resto glicina. En determinadas formas de realización, el portador es un poliactal o policetal, tales como los descritos en la presente. En determinadas formas de realización dadas como ejemplo, el poliactal o policetal es PHF. En determinadas formas de realización, la composición comprende un conjugado PHF-iludina que tiene la fórmula (III) o (IIIa).

En determinadas formas de realización, la invención provee una composición en la forma de un gel del conjugado de acuerdo con la invención biodegradable biocompatible y un compuesto biológicamente activo dispuesto dentro del gel. Como alternativa o a título adicional, es posible disponer una etiqueta de diagnóstico dentro del gel o incorporado en la matriz del gel.

En otra forma de realización, la invención provee una composición en la forma de una solución del conjugado poliactal o policetal biodegradable biocompatible y una entidad farmacéuticamente útil, una prodroga o una macromolécula disuelta dentro de la solución. Como alternativa o adicionalmente, es posible disolver un fármaco o una macromolécula dentro de la solución. Como alternativa o adicionalmente es posible disolver una etiqueta de diagnóstico dentro de la solución.

En determinadas formas de realización, se provee una composición que comprende un conjugado biodegradable biocompatible de la invención asociado con una cantidad eficiente de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico está incorporado y se libera desde dicha matriz de conjugado biodegradable biocompatible por

degradación de la matriz de polímero o difusión del agente desde la matriz a lo largo de un intervalo de tiempo. En determinadas formas de realización, el conjugado está asociado de manera no covalente con una cantidad eficiente de un agente terapéutico. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en vitaminas, sustancias antiSIDA, sustancias anticáncer, radionúclidos, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores de enzima, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistaminas, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, miorelajantes y sustancias antiparkinson, antiespasmódicos y agentes para contraer los músculos que incluyen bloqueadores de canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparásito y/o antiprotozoarios, moduladores de interacciones entre células y matriz extracelulares que incluyen inhibidores del crecimiento de las células y moléculas antiadhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de ADN, ARN o de la síntesis de las proteínas, antihipertensivos analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides, factores antiangiogénicos, factores antisecretorios, anticoagulantes y/o agentes antitrombóticos, anestésicos locales, agentes oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos, agentes de imagen y combinación de ellos.

En variaciones de esta formas de realización, puede ser deseable incluir otros compuestos farmacéuticamente activos, tales como antiinflamatorios o esteroides que se utilizan para reducir la hinchazón, antibióticos, antivirales o anticuerpos. Otros compuestos que pueden incluirse son agentes de conservación, antioxidantes y rellenos (cargas inertes), recubrimientos o agentes de abultamiento que también pueden utilizarse para alterar la estabilidad de la matriz de polímero y/o las velocidades de liberación del fármaco.

Aditivos utilizados para alterar las propiedades de las composiciones de los conjugados:

En una forma de realización preferida, solamente se incorpora el conjugado en el dispositivo o constructo de entrega, si bien es posible incluir otros materiales biocompatibles, con preferencia, biodegradables o metabolizables, para procesamiento, conservación y otras finalidades, tales como tampones y rellenos.

Los tampones, ácidos y bases se utilizan para ajustar el pH de la composición. También es posible incluir agentes para incrementar la distancia de difusión de los agentes liberados desde el polímero implantado.

Los rellenos son materiales solubles en agua o no solubles en agua incorporados en la formulación para añadir volumen. Los tipos de relleno incluyen NaCl, manitol, azúcares, polímeros sintéticos, almidones modificados y celulosas. La cantidad de relleno en la formulación estará típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 90% en peso.

Métodos de uso

La presente invención comprende conjugados de polímero destinado a ser utilizados en aplicaciones biomédicas, primariamente (pero a título exclusivo) en los campos de la farmacología, bioingeniería, curación de heridas y dermatología/cosméticos. En particular, las aplicaciones médicas para los conjugados de la invención incluyen productos farmacéuticos terapéuticos inyectables, productos farmacéuticos de diagnóstico inyectables, geles, implantes quirúrgicos, sistemas para la liberación controlada de fármacos, aplicaciones para el cierre de heridas (suturas, broches), dispositivos de fijación ortopédicos (espigas, varillas, tornillos, tacks, ligamentos), aplicaciones cardiovascular (stents, injertos) y como fármacos de circulación prolongada y apuntados. Los conjugados de la presente invención también pueden ser empleados como componentes de biomateriales, fármacos, portadores de fármacos, formulaciones farmacéuticas, dispositivos médicos, implantes y puede asociarse con moléculas pequeñas, entidades farmacéuticamente útiles, fármacos, macromoléculas y piquetes de diagnóstico.

Usos posibles en los métodos de tratamiento

Los conjugados de la invención pueden utilizarse en métodos para tratar animales (con preferencia, mamíferos, más preferentemente, seres humanos). Los conjugados de la presente invención pueden utilizarse en un método para tratar animales que comprende administrar al animal un conjugado biodegradable biocompatible de la invención. Por ejemplo, es posible administrar los conjugados de acuerdo con la invención en la forma de polímeros lineales solubles, copolímeros, conjugados, coloides, partículas, geles, ítems sólidos, fibras, películas, etc. Los conjugados biodegradables biocompatibles de esta invención pueden utilizarse como portadores de fármacos y como componentes de portadores de fármacos, en sistemas de liberación prolongada de fármacos, preparaciones para procedimientos quirúrgicos poco invasivos, etc. Las formulaciones farmacéuticas puede ser inyectables, implantables, etc.

Los conjugados de la invención pueden utilizarse en un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficiente de al menos un conjugado de la invención; en donde dicho conjugado libera uno o varios modificadores en un proceso de fase dual; en donde dicho(s) modificador(es) es (son) uno o más agentes terapéuticos adecuados para el tratamiento de la enfermedad o trastorno.

Los conjugados de la invención pueden utilizarse en un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficiente de al menos un conjugado de la invención; en donde dicho conjugado está asociado con un agente terapéutico, con lo cual:

el conjugado libera uno o varios modificadores en un proceso de fase dual; en donde dicho(s) modificador(es) es (son) uno o más agentes terapéuticos adecuados para el tratamiento de la enfermedad o trastorno y en donde el agente terapéutico se incorpora en y se libera desde la matriz de policetal biodegradable biocompatible por degradación de la matriz de polímero o por difusión del agente desde la matriz a lo largo de un intervalo de tiempo.

El modificador puede ser entregado localmente por implantación de dicho conjugado en el sitio de entrega deseado.

Uno cualquiera o más de los métodos descritos en lo que precede pueden además incluir la administración de al menos un compuesto adicional biológicamente activo.

El compuesto biológicamente activo puede ser seleccionado del grupo que consiste en vitaminas, sustancias anti-SIDA, sustancias anticáncer, radionúclidos, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores de enzimas, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistaminas, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, miorelajantes y sustancias antiparkinson, antiespasmódicos y agentes para contraer los músculos, que incluyen bloqueadores de canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparásitos y/o antiprotozoarios, moduladores de interacciones entre células y matrices extracelular que incluyen inhibidores del crecimiento de las células y moléculas anti-adhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de ADN, ARN o de la síntesis de las proteínas, antihipertensores, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides, factores antiangiogénicos, factores antisecretorios, agentes anticoagulantes y/o antitrombóticos, anestésicos locales, agentes oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos y sustancias antipsicóticas, antieméticos, agentes de imagen y combinaciones de ellos.

El conjugado puede además comprender, o estar asociado con, una etiqueta de diagnóstico. La etiqueta de diagnóstico puede seleccionarse del grupo consistente en: isótopos radiofarmacéuticos o radioactivos para centellografía de rayos gamma y PET, agente de contraste para MRI (Magnetic Resonance Imaging), agente de contraste para tomografía computada, agente de contraste para el método de formación de imágenes por rayos X, agente para el método de diagnóstico por ultrasonido, agente para la activación de neutrones, restos que pueden reflejar, dispersar o afectar los rayos X, ultrasonidos, ondas de radio y microondas y fluoróforos. Además, es posible monitorear el conjugado in vivo.

El conjugado de la invención puede utilizarse en un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende preparar una formulación acuosa de por lo menos un conjugado de la invención e inyectar parenteralmente dicha formulación en el sujeto. En determinadas formas de realización dadas como ejemplo, el conjugado comprende un modificador biológicamente activo. En determinadas formas de realización dadas como ejemplo, el conjugado comprende un modificador detectable.

El conjugado de la invención puede utilizarse en un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende preparar un implante que comprende al menos un conjugado de la invención e implantar dicho implante en el sujeto. En determinadas formas de realización dadas como ejemplo, el implante es una matriz de gel biodegradable.

Los conjugados biodegradables biocompatibles de la invención pueden utilizarse como un empaque para una herida quirúrgica desde la cual se ha removido un tumor o crecimiento. El empaque de conjugado biodegradable biocompatible reemplazará el sitio del tumor durante la recuperación y se degradará y disipará a medida que la herida sane.

En determinadas formas de realización, el conjugado está asociado con una etiqueta de diagnóstico para el monitoreo in vivo.

Los conjugados descritos en lo que precede pueden ser utilizados para el tratamiento terapéutico, preventivo y analítico (diagnóstico) de animales. Los conjugados están destinados en términos generales para la administración parenteral, pero en algunos casos se los puede administrar por otras vías.

En una forma de realización, los conjugados solubles o coloidales se administran por vía intravenosa. En otra forma de realización, los conjugados solubles o coloidales se administran por intermedio de inyecciones locales (por ejemplo, subcutáneas, intramusculares). En otra forma de realización, los conjugados sólidos (por ejemplo, partículas, implantes, sistemas para la entrega de fármacos) se administran por intermedio de implantación o inyección.

Los conjugados que comprenden una sustancia biológicamente activa (por ejemplo, un fármaco o un vector gen) pueden administrarse para tratar una enfermedad que responda a dicha sustancia.

Los conjugados que comprenden una etiqueta detectable pueden administrarse para estudiar los patrones y el aspecto dinámico de la distribución de etiquetas en el cuerpo de los animales.

Los conjugados que comprenden un antígeno o un componente generador de antígeno (por ejemplo, un plásmido) pueden administrarse para desarrollar una inmunidad frente a dicho antígeno.

Aplicaciones para los métodos de entrega de fármacos

Ejemplos de aplicaciones de métodos para la entrega de fármacos aplicables a la presente invención pueden encontrarse entre otros en la solicitud de patente provisoria US 60/348.333; en la solicitud de patente de utilidad US 10/501.565; en la patente europea N.º: 03707375.6; y en la solicitud de patente internacional PCT/US03/01017. Los mismos incluyen conjugados de polial-molécula pequeña-fármaco, portadores modificados por proteína, polial cationizado, liposomas modificados por polial, nano y micropartículas modificados por polial.

En otra forma de realización, los conjugados biodegradables biocompatibles de la presente invención pueden ser supervisados in vivo mediante procedimientos de diagnóstico adecuados. Tales procedimientos de diagnóstico incluyen la formación de imágenes por resonancia nuclear magnética (NMR, nuclear magnetic resonance imaging), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI, magnetic resonance imaging), ultrasonido, rayos X, centellografía, tomografía de emisión de positrones (PET, positron emission tomography), etc. El procedimiento de diagnóstico puede detectar, por ejemplo la disposición del conjugado (por ejemplo, distribución, localización, densidad, etc.) o la liberación de fármacos, profármacos, compuestos biológicamente activos o etiquetas de diagnóstico desde el conjugado biodegradable biocompatible a lo largo de un intervalo de tiempo. El grado de aptitud del método depende ampliamente de la forma del conjugado administrado y de la presencia de etiquetas detectables. Por ejemplo, el tamaño y la forma de los implantes del conjugado pueden determinarse de manera no invasiva mediante formación de imágenes por NMR, ultrasonido, tomografía o tomografía de rayos X ("computada"). La distribución de una preparación de conjugado soluble que comprende un radiotrazador emisor de rayos gamma o de positrones, puede llevarse a cabo mediante centellografía gama o PET, respectivamente. La microdistribución de la preparación del conjugado que comprende una etiqueta fluorescente puede investigarse mediante formación de foto imágenes.

A los fines de la presente invención se da por entendido que la transferencia y disposición de los conjugados in vivo pueden regularse mediante la modificación de grupos incorporados en la estructura del conjugado, tales como modificadores hidrófobos e hidrófilos, codificadores de carga, ligandos de receptor, anticuerpos, etc. Dicha modificación, en combinación con la incorporación de etiquetas de diagnóstico puede utilizarse para desarrollar nuevos agentes de diagnóstico útiles. Estas últimas pueden diseñarse sobre la base racional (por ejemplo, conjugados de moléculas grandes o pequeñas que ligan componentes de tejido conocidos, tales como receptor de célula, antígenos de superficie, etc.), así como a través de la detección sistemática de bibliotecas de moléculas conjugadas modificadas con una variedad de restos con actividades de ligazón desconocidas o poco conocidas, tales como péptidos sintéticos y oligonucleótidos, moléculas orgánicas y metalorgánicas pequeñas, etc.

Componente de interfaz

En una forma de realización de la presente invención, el conjugado biodegradable biocompatible puede utilizarse como un componente de interfaz. La expresión "componente de interfaz", tal como se usa en la presente, significa un componente, tal como un revestimiento o capa sobre un objeto, que altera el carácter de la interacción del objeto con el entorno biológico, por ejemplo, a efectos de suprimir reacciones de cuerpos extraños, disminuir la respuesta inflamatoria, suprimir la formación de coágulos, etc. Debe entenderse que el objeto puede ser microscópico o macroscópico. Los ejemplos de objetos microscópicos incluyen macromoléculas, coloides, vesículas, liposomas, emulsiones, burbujas de gas, nanocristales, etc. Los ejemplos de objetos macroscópicos incluyen superficies, tales como superficies de equipamiento quirúrgico, tubos de ensayo, tubos de perfusión, ítems que entran en contacto con tejidos biológicos, etc. Se cree que los componentes de interfaz pueden, por ejemplo, proveer al objeto una protección contra las interacciones directas con células y opsoninas y por lo tanto disminuir las interacciones del objeto con el sistema biológico.

Es posible modificar las superficies mediante el conjugado biodegradable biocompatible de la presente invención, por ejemplo mediante la conjugación de grupos funcionales de la medula espinal del polímero conjugado con grupos funcionales presentes sobre la superficie a ser modificada. Por ejemplo, los grupos aldehído de precursores biodegradable biocompatible poliactal o policetal pueden hacerse reaccionar con grupos amino presentes sobre la superficie en la presencia de cianoborohidruro de manera de formar ligaciones amina. En otra forma de realización, es posible sintetizar un conjugado poliactal o policetal biocompatible biodegradable de la invención que incluye un grupo terminal adecuado tal como un poliactal o policetal que tiene un grupo terminal aldehído. Es posible conectar un polímero a una superficie mediante la reacción del grupo terminal.

En otra forma de realización más, es posible ligar un polisacárido adecuado con una superficie para lo cual se hace reaccionar un extremo reductor o no reductor del polisacárido mediante subsiguiente secuencia de oxidación/reducción y ulterior conversión del resto del polisacárido de manera de producir un conjugado poliactal o policetal.

Debe entenderse que los conjugados biodegradables biocompatibles de esta invención puede ser conjugados con macromoléculas, tales como enzimas, polipéptidos, proteínas, etc., mediante los métodos descritos en la presente para conjugar los conjugados biodegradables biocompatibles con grupos funcionales presentes sobre una superficie.

Los conjugados biodegradables biocompatibles de la invención también pueden ser conjugados con un compuesto que pueda unirse físicamente a una superficie por intermedio de, por ejemplo, interacciones hidrófobas, de van der Waals y electrostáticas. Por ejemplo, los precursores poliactal o policetal biodegradables biocompatibles pueden ser conjugados con lípidos, polielectrolitos, proteínas, anticuerpos, lectinas, etc.

5 En otras formas de realización de la presente invención, es posible producir preparaciones biomédicas de los conjugados biodegradables biocompatibles de poliactal o policetal de la invención, de diversas formas. Se cree que los componentes de interfaz pueden prolongar la circulación de portadores de fármaco macromoleculares y coloidales. Por ello, las moléculas pequeñas, los compuestos biológicamente activos, las etiquetas de diagnóstico, etc., que se incorporan en tales portadores pueden pasar a través del cuerpo sin estimular una respuesta
10 inmunogénica ni interacciones significativas por los receptores de las células y las proteínas de reconocimiento (opsoninas). Por lo tanto, es posible modificar más aún un conjugado de la presente invención con un componente interfaz (por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol o un polial hidrófilo) de manera tal que la médula espinal portadora del fármaco del conjugado quede rodeada por un "cepillo" formado por las cadenas de dicho componente de interfaz. Este último puede modificarse adicionalmente para permitir que conjugado apunte a un determinado
15 marcador molecular, célula o tejido in vivo.

La invención se describirá ahora específicamente por medio de los siguientes ejemplos. Todas las partes y porcentajes son en peso, a menos que se establezca otra cosa.

EJEMPLIFICACIÓN

20 El especialista estableció una literatura bien establecida de química de polímeros para aprovechar, en combinación con la información contenida en la presente, la guía a las estrategias de síntesis, grupos protectores y otros materiales y métodos útiles para la síntesis de los conjugados de esta invención.

Las diversas referencias citadas en la presente proporcionan una información de fondo valiosa para preparar polímeros similares a los compuestos de la invención descritos en la presente o intermediarios relevantes, así como información de la formulación, los usos y la administración de los conjugados de la invención que pueden ser de
25 interés. Se puede hallar guía adicional, entre otros, en (i) Papisov M.I. Acyclic polyacetals from polysaccharides. ACS Symposium Series 786 (2001), 301–314; (ii) Cabodi S., Nenci A., Ong L., Papisov M., Dotto G–P. Targeted drug delivery to breast cancer cells. Proceedings, Dept of Defense Breast Cancer Research Program Meeting, Atlanta, GA, 2000; v.1 p. 307; (iii) M. I. Papisov, M. Yin, A. Yurkovetskiy, A. Hiller, S. Choi, A. J. Fischman. Fully biodegradable hydrophilic polyals (polyacetals and polyketals). 29th Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive
30 Materials, 2002, Seúl, Corea. Controlled Release Society, Deerfield, IL, 2002; documento N.º 465; (iv) A. Yurkovetskiy, S. Choi, A. Hiller, M. Yin, A. J. Fischman, M. I. Papisov. Biodegradable polyal carriers for protein modification. 29th Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials, 2002, Seúl, Corea. Controlled Release Society, Deerfield, IL, 2002; documento N.º 357; (v) M. Papisov, A. Yurkovetskiy, M. Yin, A. Hiller, A. J. Fischman. Fully biodegradable hydrophilic polyacetals for macromolecular radiopharmaceuticals. 49–th Annual Meeting of The
35 Society of Nuclear Medicine, Los Ángeles, CA, 2002. J. Nuc. Med. 2002, 43:5 (suplemento) p. 377P; (vi) A. V. Yurkovetskiy, A. Hiller, M. Yin, S. Sayed, A. J. Fischman, M. I. Papisov. Biodegradable polyals for protein modification. Controlled Release Society's Winter Symposium, Salt Lake City, Utah, 2003; (vii) Papisov, A. Yurkovetskiy, M. Yin, P. Leone, Alan J. Fischman, Alexander Hiller, and Sakina Sayed. Hydrophilic Polyals: Biomimetic Biodegradable Stealth Materials for Pharmacology and Bioengineering. Proceedings of 226th Natl.
40 Meeting of American Chemical Society, New York, NY, 2003; (viii) A. V. Yurkovetskiy, A. Hiller, S. Sayed, M. Yin, X. M. Lu, A. J. Fischman y M. I. Papisov. Synthesis of a macromolecular camptothecin conjugate with dual phase drug release. Molecular Pharmacology, 2004, en prensa.

Más aún, el profesional se dirige a la orientación específica y los ejemplos provistos en este documento relacionados con varios ejemplos de conjugados y los intermediarios de estos.

45 Los conjugados de esta invención y su preparación se pueden considerar adicionalmente por los ejemplos que ilustran algunos de los procesos por los cuales se preparan o usan estos compuestos.

De acuerdo con la presente invención, se puede usar cualquier técnica disponible para elaborar o preparar los conjugados de la invención o composiciones que los incluyen. Por ejemplo, se puede usar una variedad de métodos de síntesis en fase de solución tales como los descritos de detalle a continuación. En forma alternativa o adicional,
50 los conjugados de la invención se pueden preparar usando alguna de una variedad de técnicas combinatorias, métodos de síntesis paralela y/o síntesis de fase sólida conocidas por la técnica.

Se apreciará que como se describe a continuación, que se puede sintetizar una variedad de conjugados de invención de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Los materiales iniciales y reactivos usados en la preparación de estos compuestos están disponibles en proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical
55 Company (Milwaukee, WI), Bachem (Torrance, CA), Sigma (St. Louis, MO) o se preparan por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica siguiendo los procedimientos descritos en tales referencias como Fieser and Fieser 1991, "Reagents for Organic Synthesis", vols 1–17, John Wiley and Sons, New York, NY, 1991; Rodd 1989 "Chemistry of Carbon Compounds", vols. 1–5 and supps, Elsevier Science Publishers, 1989; "Organic

Reactions", vols 1–40, John Wiley and Sons, New York, NY, 1991; March 2001, "Advanced Organic Chemistry", 5th ed. John Wiley and Sons, New York, NY; Larock 1990, "Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations", 2nd ed. VCH Publishers; y otras referencias más específicamente dirigidos a la química de polímeros. Los métodos que se describen a continuación son solo ilustrativos de algunos métodos por los cuales se pueden sintetizar los conjugados de esta invención y se pueden realizar varias modificaciones a estos métodos y serán sugeridas a los expertos en la técnica con respecto a la descripción.

Los materiales iniciales, intermediarios y conjugados de esta invención se pueden aislar y purificar usando técnicas convencionales, que incluyen filtración, destilación, cristalización, cromatografía. Estos se pueden caracterizar usando métodos convencionales, que incluyen constantes físicas y datos de espectros.

10 Materiales

Borhidruro de sodio, cianoborhidruro de sodio, metaperyodato de sodio, clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil-3-etilcarbodiimida (EDC), ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y anhídrido succínico eran de Aldrich, St Louis, MO. InCl₃ [In-111] fue de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA). Piridina anhidra, alcohol etílico y otros solventes se obtuvieron en Sigma-Aldrich y usaron en purificación adicional.

15 La camptotecina se obtuvo de Hande Tech development Co. (Houston, TX). Se obtuvieron dextrano B-512 (Mn 73,000 Da, 188,000 Da) y N-BOC-glicina de Sigma Chemical Company (St Louis, MO). Anhídrido succínico (SA), borohidruro de sodio, metaperyodato de sodio, clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil-3-etilcarbodiimida (EDC), diisopropilcarbodiimida (DIPC), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio se adquirieron en Aldrich (St Louis, MO). Otros agentes químicos, de calidad reactivo o superior, se obtuvieron en Acros Organics o Fisher Scientific y se usan como se recibieron. Piridina anhidra, alcohol metílico, alcohol etílico, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, cloruro de metileno, éter dietílico y otros solventes se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se usaron sin purificación posterior. Se usó agua desionizada (resistencia > 18 MΩ) para todos los procedimientos sintéticos y analíticos.

Equipo y métodos

25 Se realizaron cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en medio acuoso y cromatografía en fase inversa (RP) mediante un sistema de HPLC Varian-Prostar equipado con un detector de índice de refracción modelo BIO-RAD 1755 y detector UV LDC/Milton Roi SpectroMonitor 3000. Se usaron columnas HPSEC Biosil SEC-125 y Biosil SEC-400 (BIO-RAD) y Superose-6 de baja presión (Pharmacia) para la cromatografía de exclusión por tamaño. Se realizó la calibración de la columna SEC basado en estándares de dextrano y proteína de peso molecular amplio. A menos que se indique de otro modo, la elución se realizó isocráticamente con 0,9% de NaCl regulado con fosfato 50 mM, pH=7,0.

Se usó una columna Altima C18 (Alltech, 250 mm x 4,6 mm, microesfera 5 μm) para la determinación cromatográfica RP de derivados de CPT de peso molecular bajo y productos de degradación de los conjugados polímero-CPT.

35 Se llevó a cabo el aislamiento y la purificación preparativa de polímeros y conjugados poliméricos en una columna G-25 gel Spectra-Chrom (60 cm x ID 10 cm) equipada con un sistema de administración líquido Milton-Roy, bomba peristáltica MasterFlex CL, detector Knauer-2401 RI, colector de fracciones Foxi JR y sistema de adquisición de datos Varian-Prostar. Alternativamente, se usó un sistema de diálisis de flujo Quix-Stend (A/G Technology, Needham, MA) equipado con un cartucho de fibra hueca UFP-10-C-4MA (límite 10 kDa) en los procedimientos de volumen alto. Se llevó a cabo la dispersión de luz de correlación fotónica mediante un analizador Brookhaven ZetaPlus.

Se realizaron RMN protónica y de ¹³C en espectrómetros de RMN Varian Mercuri-300, Bruker DPX-300 y Bruker Aspect 3000 usando pico de disolvente como estándar de referencia.

45 Un espectrofotómetro UV-visible Cari 300Bio equipado con bloque Peltier multicelda termostatzado y el lector de placa de 96 pocillos Molecular Devices Co se usaron para las mediciones espectroscópicas y los estudios de cinética enzimática.

Se usó un sistema LC/MSD serie Agilent 1100 para la caracterización de MS de los productos de hidrólisis de PHF-CPT.

Se obtuvieron ratones nu/nu machos, 18–24 g (8–10 semanas) de Charles River Laboratories, MA.

El cultivo de células HT-29 de adenocarcinoma colorrectal humano fue de ATCC (ATCC HTB-38).

50 Se realizó el estudio de fotoimagen por medio del microscopio Nikon Eclipse TE300 con sistema óptico contraste de fase de distancia de trabajo largo, montaje de imagen de epifluorescencia, cámara CCD y estación de trabajo de imagen basado en MacOS.

Las mediciones de radiactividad se realizaron por medio del contador gamma Wallac Wizard 1480 (Perkin Elmer). Se realizó la centellografía gamma usando la cámara gamma Ohio Nuclear con colimador de energía media.

Conjugados de PHF-CPT

Como se describió antes, la biodegradación de agentes terapéuticos macromoleculares es un problema importante pero estudiado incompletamente, incluso para los polímeros más ampliamente usados. Por ejemplo, hay un riesgo potencial de que el uso clínico extendido de los conjugados que contienen fragmentos poliméricos no o biodegradables lentos puede llevar a la vacuolización de células a largo plazo (ver, por ejemplo, Bendele A. Seeli J. Richei C. Sennello G. Shopp G. (1998) Comunicación breve: renal tubular vacuolation in animals treated with polietilene-glicol-conjugados proteins. *Toxicological Sciences*. 42, 152-7) y overload, development of lisosomal disease syndrome (ver, por ejemplo, Christensen, M., Johansen, P., Hau C., (1978) Storage of polivinilpirrolidone (PVP) in tissue following long-term treatment with a PVP-containing Vasopressin preparation. *Acta Med Scand*, 204, 295-298), y a dosis mayores, a otras alteraciones metabólicas patológicas (ver, por ejemplo, Miyasaki K. (1975) Experimental Polymer Storage Disease in Rabbits. *Virchows Arch. A. Pat. Anat. And Histol.*, 365, 351-365). El desarrollo de polímeros biodegradables esencialmente completo, con preferencia, degradación con formación de productos fácilmente eliminables o metabolizables de baja toxicidad, parece ser la solución radical posible predominante del problema de la deposición intracelular de largo plazo. Una combinación de un material macromolecular y un reactivo de reticulación que permite la suficiente estabilidad del conjugado en el ambiente extracelular normal y, por otra parte, la tasa de desintegración del conjugado aceptable después de la endocitosis, debe ser más beneficiosa.

Los poliales completamente degradables esencialmente hidrófilas, por ejemplo, poli[1-hidroxi metil etil en hidroximetil-formal] (PHF), se han desarrollado e informado como miméticos acíclicos de los polisacáridos (ver, por ejemplo, (1) Papisov MI, Garrido L, Poss K, Wright C, Weissleder R, Brady TJ. (1996) A long-circulating polymer with hydrolyzable main chain. 23rd International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Kyoto, Japan, 1996; Controlled Release Society, Deerfield, IL,; 107-108; and (2) Papisov M.I. (1998) Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes. *dv. Drug Delivety Rev.*, 32, 119-138). Se mostró que estos materiales, que se pueden preparar sintéticamente y por escisión lateral de algunos polisacáridos, son esencialmente (i) no biorreactivos, (ii) no tóxicos y (iii) totalmente degradables, y, en consecuencia, demostraron tener potencial en varias aplicaciones farmacéuticas (ver, por ejemplo, (1) Papisov MI, Babich JW, Dotto P, Barzana M, Hillier S, Graham-Coco W, Fischman AJ. (1998) Model cooperative (multivalent) vectors for drug targeting. 25th Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials, 1998, Las Vegas, Nevada, USA; Controlled Release Society, Deerfield, IL, 170-171; y (2) Papisov MI. (2001) Acyclic polyacetals from polysaccharides. (Biopolymers from polysaccharides and agroproteins), ACS Symposium Series 786, pp. 301-314). Los poliales contienen grupos acetal o cetal sensibles al pH dentro de la cadena principal, que provee la combinación deseada de la estabilidad del polímero en medio neutro y alcalino y desestabilización en ambiente ácido.

En ciertas formas de realización, la presente invención también se expande el alcance de las potenciales aplicaciones para poliales hidrófilos y demuestra adecuación de estos materiales para la preparación de conjugados portador-fármaco esencialmente degradables total en sistemas de liberación del fármaco en fase dual. En determinadas formas de realización del ejemplo, se usa un polial hidrófilo (PHF) para obtener y caracterizar los conjugados de PHF-CPT.

Camptotecina¹ (CPT) es un agente antineoplásico potente con actividad inhibidora de topoisomerasa I. La aplicación terapéutica del CPT no modificado está impedida por muy baja solubilidad en el medio acuoso, alta toxicidad e inactivación rápida a través de la hidrólisis del anillo de lactonas in vivo. La hidrólisis de la lactona, que es reversible en medio ácido, produce un carboxilato soluble en agua². Este último se elimina por los riñones y causa cistitis hemorrágica, una reacción adversa grave a la administración de CPT. La acilación del hidroxilo del anillo de lactona (020) aumenta significativamente la estabilidad.

La hidrofiliación de la molécula de CPT produce formas hidrosolubles, por ejemplo, Irinotecano (CPT-11). Este último es el profármaco soluble más ampliamente usado, que (así como otros profármacos de CPT) requieren activación endoplásmica, principalmente en el hígado, para la conversión en la forma activa (SN38⁵). Tales profármacos, activaron el tejido canceroso externo, no son factibles para direccionamiento al tumor así como a las células cancerosas.

Las formas macromoleculares y liposómicas de CPT han mostrado mejor eficacia, en comparación con los análogos de peso molecular bajo.^{6,7} Sin embargo, aun se informó toxicidad en vejiga.⁸ El sistema de liberación del fármaco en fase dual descrito en este documento estaba destinado a manipular genéticamente preparaciones macromoleculares soluble, potencialmente dirigibles con nueva farmacocinética y toxicidad reducida.

La estrategia de fase dual involucra el ensamblaje de un conjugado hidrófilo que libera un profármaco de CPT estabilizado lipófilo, que a su vez, libera la sustancia farmacológica activa en forma local (intra- y extracelular), sin la necesidad de metabolización previa por el complejo microsomal hepático P450.

El sistema de liberación modelo desarrollado en este trabajo se basa en una reacción conocida, la ciclación hidrolítica de los succinamidoésteres. La reacción produce una escisión del enlace éster y la formación simultánea de succinimida en el sitio amida. Se han realizado intentos para emplear ligadores de succinamidoéster con el grupo amida en la parte del portador,⁹ que no produce la liberación del fármaco de fase dual. En nuestro sistema, el

succinamidoéster está orientado de modo que el éster se forma en la parte del polímero, mientras que el carboxilo opuesto forma un enlace amida con un fármaco q o derivado de fármaco que contiene amina (en este documento, CPT-(O₂O)-glicinato).

5 La hidrólisis del ligador succinamidoéster produce la escisión del fármaco del polímero en la forma de un succinimidoglicil-CPT cíclico (Esquema 2). La reacción se cataliza con una base y en medio acuoso se llega a la terminación en condiciones moderadas. La segunda etapa es la hidrólisis del enlace éster de glicilo in vivo, que produce la liberación del fármaco activo.

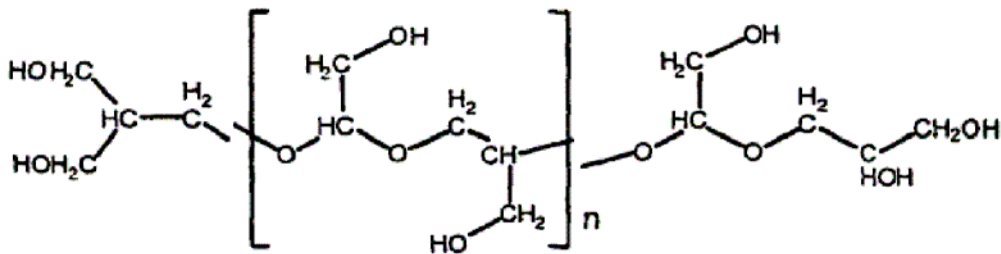
10 Las ventajas potenciales de este sistema de liberación del fármaco en fase dual, aplicado a CPT, incluyen: (1) el conjugado es hidrosoluble y se puede administrar por vía intravenosa. (2) A diferencia de otros profármacos de CPT, por ejemplo, Irinotecano, el profármaco intermediario se activa "en el sitio" más que en el hígado, de modo que son posibles la administración y direccionamiento local. (3) CPT se libera en una forma estabilizada con lactona, lipófila, que asegura la deposición del profármaco en los tejidos y bajas tasas de redistribución y transferencia de carboxilato a la orina.

15 En este documento, un modelo de conjugado de CPT macromolecular completamente biodegradable con liberación de fase dual de un ligador de succinamidoéster no sustituido se sintetizó y caracterizó in vitro. También se presentan los resultados iniciales de los estudios de caracterización in vivo en curso.

20 El conjugado se ensambló mediante poli(1-hidroximetil-etilen hidroxil-metil formal) (PHF) como un esqueleto. PHF es un polímero "oculto" biodegradable, altamente hidrófilo desarrollado en nuestro laboratorio.^{10,11} La biodegradabilidad del PHF reduce los riesgos potenciales asociados con la administración de dosis grandes de polímeros no degradables, lo que hace al modelo del conjugado de PHF viable para el desarrollo clínico.

Ejemplo 1. PHF

25 PHF es un poliacetal acíclico semisintético preparado por la escisión lateral exhaustivo del Dextrano B-512. La escisión del peryodato completo de la secuencia (1→6)-poliglicósido de Dextrano B-512 produce poli(1-carboniletieno carbonil formal) (PCF). La reducción del borohidruro de grupos aldehído laterales de PCF da poli(1-hidroximetil-etilen hidroxil-metil formal) (PHF), un copolímero (copoliacetal) de glicerol y glicol aldehído (Ver estructura más abajo). La escisión incompleta en la etapa de oxidación produce la presencia de grupos glicol vecinos en lugar de algunos grupos metilol, que es en algunos casos es deseable. Un grado aun menor de escisión produce la presencia de grupos glicol y algunos anillos de carbohidrato en la cadena del polímero.



30 Propiedades del PHF incluyen los siguientes:

PHF es un polímero hidrosoluble altamente hidrófilo estable en condiciones fisiológicas, pero sometido a hidrólisis catalizada por protones a Ph lisosómico.

35 El polímero no mostró toxicidad en los ratones a dosis hasta 4 g/kg IV e IP (dosis mayores no estudiadas). Después de la administración IV, el PHF de peso molecular bajo (<50 kDa) está casi completamente eliminado por riñones sin acumulación significativa en ningunos tejidos.

El PHF de peso molecular alto y derivados (macromoléculas modificadas por PHF y portadores del fármaco modelo) que no se elimina por riñón circulan con vidas medias de hasta 10-25 horas (roedores), con una distribución final casi uniforme (acumulación por g de tejido en RES solo dos veces superior que en otros órganos). El último sugiere la carencia de reconocimiento por fagocitos, otras células y proteínas de reconocimiento (propiedades "ocultas"²⁷).

40 Se preparó PHF, en escala multigramo, en una variedad de pesos moleculares. La estructura química de PHF permite una amplia variedad de modificaciones y derivatizaciones, por medio de grupos OH laterales así como por medio de al menos un grupo glicol vecino terminal.²⁸ Varios derivados de PHF se sintetizaron y caracterizaron como preparaciones biomédicas modelo (conjugados de proteína y molécula pequeña, geles, portadores de fármaco de circulación larga, etc.).^{28,29,30,31,32,33,34}

45 Debido a las propiedades "ocultas", el perfil de biodegradabilidad y la flexibilidad tecnológica, PHF es un material altamente prometedor para varias aplicaciones farmacéuticas y de bioingeniería. En particular, la biodegradabilidad y

multifuncionalidad del PHF elimina varias limitaciones en el tamaño y la estructura de conjugados de molécula pequeña, lo que permite, por ejemplo, administración de dosis alta de lo conjugados de peso molecular alto (>50 kDa) sin el riesgo de deposiciones de polímero de largo plazo en las células.

5 Se evaluaron varias preparaciones de PHF modelo clínicamente relevantes desarrolladas en nuestro laboratorio en MGH en estudios colaborativos con la industria farmacéutica. Varios aspectos de la tecnología del poliactal se codesarrollaron con o autorizados por MGH a Novartis, Amgen y Nanopharma. La orientación adicional para la preparación del material poliméricos de PHF se puede hallar, entre otros, en PCT/US03/22584.

10 El polímero se preparó usando una modificación acelerada de una técnica previamente descrita¹² que permite la formación de PHF con 5% de unidades 2,3-dihidroxiethylformal que se originan de C2-C3 del dextrano. La preparación de dextrano B-512, de 73 kDa (15,15 g, 93,4 mmol por glicopiranosido), se disolvió en 300 ml de agua desionizada a 0-5°C y se trató con 47,95 g (224,2 mmol) de metaperiodato de sodio en un reactor protegido de luz durante 3 horas. El yodato de sodio cristalino se extrajo de la mezcla de reacción por filtración (filtro de vidrio de 1 µ). El pH del filtrado se ajustó a 8,0 con Na OH 5 N y la solución resultante se trató inmediatamente con borohidruro de sodio (7,07 g, 187 mmol, disuelto en 70 ml de agua desionizada) durante 2 horas. El pH luego se ajustó a 6,5 con HCl 1 N. El producto se desalinizó en Sefadex G25 y se liofilizó; rendimiento: 80%. Los resultados del análisis SEC fueron Mn=60 kDa e índice de polidispersión (Mw/Mn) de 2,0. Se halló que el espectro RMN protónico en DMF-d₆:D₂O (95:5 v/v) concuerda con la estructura esperada del PHF (C1-H a δ4,62 t, J=5,2 Hz) con aproximadamente 5% de grupos laterales diol vecinos que se originan de C2-C3 (δ4,49 d, J=5,2 Hz).

Ejemplo 2. Sal trifluoroacetato CPT-20-(O)-glicinato (CPT-Gli.TFA)

20 CPT-Gli.TFA, se preparó en dos etapas de acuerdo con el procedimiento informado por Greenwald^{12,14} y modificado por Minko^{1e}. En breves palabras, CPT se trató con BOC-glicina y DIPC en cloruro de metileno en presencia de DMAP. El grupo N-BOC se extrajo con ácido trifluoroacético y el CPT-Gli.TFA resultante se cristalinizó en éter dietílico. Pureza: > 97% (HPLC, RMN).

Ejemplo 3. PHF-Succinato (PHF-SA).

25 Se disolvieron PHF (10,00 g, 75,6 mmol), anhídrido succínico (0,76 g, 7,6 mmol) y DMAP (1,2 mg, 0,01 mmol) en 5 ml de piridina anhidra. Después de 18 horas de agitación a 40°C, la piridina se extrajo al vacío, el residuo se suspendió en agua desionizada y el pH se ajustó a 7,0 con NaOH 1 N. El PHF succinilado se desalinizó en Sefadex G-25 y se liofilizó con 86% de rendimiento. El contenido de ácido succínico, determinado por titulación potenciométrica, fue 10,3% (mol/monómero). El espectro ¹H RMN del polímero (D₂O) contenía señales características para los protones de metileno del éster de ácido succínico a δ 2,66 y δ 2,57 (tripletes anchos) además de los protones del metileno y metino (δ 3,3-3,8) y acetal (δ 4,4-4,7) del esqueleto de PHF.

Ejemplo 4. Conjugado de camptotecina-PHF conjugado (PHF-CPT).

35 La conjugación de CPT-Gli.TFA con PHF-SA se realizó por medio de (i) amidación mediada por EDC del polímero-succinato con sal de trifluoroacetato de CPT-20-O-glicinato en medio acuoso o (ii) acoplamiento mediado por DIPC en condiciones no acuosas (DMF). Se halló que el primer método (que se describe a continuación) es más eficiente, basado en una velocidad de reacción superior, producto limpiador y simplicidad de purificación.

Antes de la síntesis preparativa, se prepararon conjugados con varios contenidos de CPT (aproximadamente 5% a 15% p/p) en menor escala para la solubilidad del ensayo en medio acuoso, que mostró que los conjugados con el contenido de CPT hasta 10% p/p eran fácilmente solubles.

40 Síntesis preparativa. Se disolvió PHF-SA (15,0 g, 10,7 mmol SA) en 150 ml de agua desionizada y mezcló con 30 ml de DMF, se enfrió a -2°C y se combinó con solución de CPT-Gli.TFA (2,0 g/3,85 mmol en 20 ml de mezcla 3:1 acetonitrilo/agua). Bajo agitación intensa, se añadió EDC (2,0 g) a la mezcla de reacción. El pH se ajustó a 5,9-6,0. Después de 30 minutos de agitación, la temperatura de la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y la agitación continuó durante otras 3 horas. La conversión de CPT en este punto fue 93%, sobre la base del HPLC RP (UV a 360 nm). El pH se ajustó a 5,5 para evitar la liberación del CPT del conjugado y la mezcla de reacción se conservó toda la noche a 8°C. La mezcla luego se diluyó con DMF y agua a 600 ml (contenido de DMF 10% v/v) y el conjugado se desalinizó en Sefadex G-25, se liofilizó y se conservó a -20 C°. El producto se obtuvo como un sólido blanuzco a amarillo pálido con contenido de CPT de 7,48% p/p (determinado espectrofotométricamente a 360 nm). Rendimiento basada en CPT: 80%.

50 El espectro RMN protónico de PHF-CPT (DMSO-d₆/D₂O) contenía las señales características para el esqueleto de PHF modificado por ácido succínico: δ 3,3-3,8 (metileno y metino), δ 4,4-4,7 (acetal), δ 2,4-2,6 (-CH₂-, succinato); y las señales correspondientes a las estructuras de CPT laterales: δ 0,95 (t), δ 2,21 (d), δ 5,26(m), δ 5,46(s), δ 7,20(s), δ 7,70(t), δ 7,88(t), δ 8,09(d), δ 8,18(d), δ 8,45(s).

La mezcla de reacción y las composiciones del producto liofilizado se muestran en la Tabla 1.

55

Tabla 1 Composición del conjugado de PHF–CPT (por CPT, mol %).

N.º	Derivados de CPT	Mezcla de reacción	Productos aislado
1	PHF–CPT	92,8	96,15
2	CPT–Glicinato	1,9	0,32
3	CPT	2,3	0,34
4	CPT–CA (carboxilato)	0,3	0,44
5	CPT–Gly–SA	< 0,05	0,53
6	CPT–Gly–SI	< 0,05	0,66
7	Otros MW bajo	2,7	1,59

El PHF–CPT sintetizado fue soluble en medio acuoso. HPSEC mostró Mn de \approx 65 kDa esencialmente sin agregación (dispersión luz con correlación fotónica). Las viscosidades de hasta 20% de soluciones fueron viables para la inyección a través de una aguja de calibre alto usado en los estudios en roedores; la mayor parte de inyecciones se realizaron a 6% p/p ($\eta=4,05$ cps).

Ejemplo 5. Camptotecina–20–(N–succinimidoglicinato) (CPT–SI).

CPT–SI es el profármaco lipófilo aislado de los productos de la hidrólisis de PHF–CPT (ver más adelante). CPT–SI se sintetizó como compuesto control.

PHF–CPT (500 mg) se disolvió en 10 ml de fosfato 0,1 M pH 7,6 y se incubó durante 24 horas a 37°C. La suspensión resultante se diluyó a 150 ml y se extrajo con cloruro de metileno (3x150 ml). Las fases de cloruro de metileno se combinaron, lavaron con HCl 0,01 N y secaron en sulfato de magnesio. El disolvente se extrajo al vacío. El residuo amarillo claro se redisolvió en cloruro de metileno, se filtró y seco al vacío para producir 38 mg de un producto que contiene, de acuerdo con RP HPLC, > 93% de CPT–SI. Se halló que la solubilidad del CPT–SI en agua es menor que la de CPT no modificado, <1,0 Mg/ml, vs. 2,5 μ g/ml respectivamente.

^1H RMN (300 MHz, EDCl^3): δ 1,01(t, 3H, J=7,4 Hz, C19), δ 2,05–2,32 (m, 2H, C18), δ 2,66 (s, 4H, succinimida), δ 4,32–4,51(AB, 2H, 17,2 Hz, C– α Gli), δ 5,32 (s, 2H, C–5), δ 5,29–5,65 (AB, 2H, 17,3Hz, C–17), δ 7,20 (s, 1H, C–14), δ 7,60 (t, 1H, J=7,5 Hz, C–11), δ 7,76 (t, 1H, J=7,7 Hz), δ 7,86 (d, 1H, J=8,3, C–12), δ 8,20 (d, 1H, J=8,3, C–9), δ 8,32(s, 1H, C–7)

^{13}C RMN: 7,23, 28,36, 29,89, 32,04, 39,53, 50,17, 67,31, 77,45, 96,29, 120,54, 128,23, 128,33, 128,64, 130,00, 130,80, 131,35, 145,14, 146,70, 149,08, 152,46, 157,48, 166,27, 166,78, 175,95.

MS: m/z 488,2 (M+H)

Ejemplo 6. Camptotecin–20–(N–succinamidoglicinato) (CPT–SA, control).

Se disolvieron CPT–Gli.TFA (50 mg, 0,096 mmol) y anhídrido succínico (18 mg, 0,190 mmol) en 2 ml de piridina anhidra. Después de una agitación de 18 horas a temperatura ambiente, la piridina se extrajo al vacío. El residuo sólido se suspendió en agua desionizada y se extrajo con cloruro de metileno, se lavó con HCl 0,01N y se secó en sulfato de magnesio. La extracción de disolvente al vacío produjo un sólido amarillo claro (41,4 mg, 85% de rendimiento) que contiene > 90% de CPT–SA (HPLC con detección a 360 nm). LC–MS: m/z 506,2 (M+H). El producto se usó como estándar de HPLC para la determinación de la composición del producto de hidrólisis de PHF–CPT.

Ejemplo 7. Preparación de portadores poliactal succinilados

Los portadores poliactal modificados con un grupo succinilo sustituido se prepararon de acuerdo con un procedimiento análogo al que se describió anteriormente para PHF–SA. En breves palabras, el tratamiento de PHF anhidro de Mn 60 kDa (10,0 g) en 100 ml de piridina seca con cantidad calculada de derivado de anhídrido succínico (ver Tabla 2) y DMAP (relación de anhídrido:DMAP=1:0,1 mol) durante 18 horas a 40°C proporcionó la conversión cuantitativa del derivado de ácido succínico en el correspondiente PHF–succinato con grado de sustitución de unidades estructurales de PHF de aproximadamente 10% (mol). Después de la evacuación de piridina al vacío, los PHF–succinatos se disolvieron en agua DI y se purificaron de impurezas de peso molecular bajo por filtración en gel en columna Sefadex G–25 equilibrada con agua DI. El producto final se recuperó de la solución acuosa por liofilización como una espuma con un rendimiento promedio de 85–90%. Los PHF–succinatos son polímeros hidrófilos fácilmente solubles en agua y disolventes orgánicos polares (piridina, DMF, DMSO). El rendimiento, composición y contenido de succinato del polímero se informan en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición y propiedades de los portadores de PHF succinilados

Poliacetal modificado	Derivado de ácido succínico	Sustitución de polímero (calculado) % mol	contenido de succinato* mol/g de polímero	Rendimiento de polímero, %
PHF-SA	Anhídrido succínico	10	$7,0 \times 10^{-4}$	86
PHF-MSA	Anhídrido metilsuccínico	10	$6,9 \times 10^{-4}$	88
PHF-DMSA	Anhídrido 1,1-dimetilsuccínico	10	$6,8 \times 10^{-4}$	85
PHF-NSA	Anhídrido (2-Nonen-1-il) succínico	15	$8,9 \times 10^{-4}$	89
PHF-DSA	Anhídrido (2-Dodecen-1-il) succínico	15	$8,6 \times 10^{-4}$	91

*) Titulación potenciométrica

Ejemplo 8. PHF-CPT (PHF-NSA-CPT) ligado a ácido (2-nonen-1-il)- succínico

Se disolvió PHF-(2-nonenilsuccinato) (PHF-NSA) (2,5 g, 2,23 mmol NSA) en 50 ml de agua desionizada y se mezcló con 20 ml de DMF, se enfrió a 0°C y se combinó con solución de CPT-Gli.TFA (454 mg/0,848 mmol) en 15 ml de mezcla 4:1 acetonitrilo/agua). Bajo agitación intensa, se añadió EDC (500 mg) a la mezcla de reacción. El pH se ajustó a 5,9-6,0. Después de 30 minutos de agitación, la temperatura de la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente; la agitación continuó durante otras 3 horas. La conversión CPT-Gli.TFA después de 3 horas controlada por HPLC (UV a 360 nm) fue >92%. La mezcla de reacción luego se diluyó con mezcla 1:9 v/v de DMF/agua a 150 ml y el pH de la solución resultante se ajustó a 5,5. El conjugado obtenido se desalinizó en Sefadex G-25 y se liofilizó. El producto se obtuvo como sólido blancuzco a amarillo pálido soluble en agua y disolventes orgánicos polares (piridina, DMF, DMSO). El contenido del conjugado CPT determinado espectrofotométricamente a 360 nm fue 13,0% p/p. Rendimiento basado en CPT: >95%. El contenido del grupo carboxilo residual en el conjugado fue $4,1 \times 10^{-4}$ mol/g.

El espectro RMN protónico de PHF-NSA-CPT (DMSO-d₆/D₂O) contenía las señales características para el esqueleto de PHF modificado con ácido nonenoilsuccínico: δ 3,3-3,8 (metileno y metino, PHF), δ 4,4-4,7 (acetal), δ 2,6-2,7 (-CH₂-, succinato), δ 0,96(t) (-CH₃, nonenilo), δ 1-25-1-35 (-CH₂-, nonenilo) δ 5,65 y δ 5,75. (-CH=, nonenilo); y las señales correspondientes a las estructuras laterales de CPT: δ 0,95 (t), δ 2,22 (d), δ 5,26(m), δ 5,46(s), δ 7,20(s), δ 7,71(t), δ 7,89(t), δ 8,10(d), δ 8,18(d), δ 8,45(s).

Ejemplo 9. PHF-CPT ligado a ácido metilsuccínico (PHY-MSA-CPT)

Se disolvió PHF-(metilsuccinato) (PHF-MSA) (2,5 g, 1,72 mmol MSA) en 50 ml de agua desionizada y mezcló con 20 ml de DMF, se enfrió a 0°C y se combinó con solución de CPT-Gli.TFA (450 mg/0,840 mmol) en 15 ml de mezcla 4:1 de acetonitrilo/agua). Bajo agitación intensa, se añadió EDC (500 mg) a la mezcla de reacción. El pH se ajustó a 5,9-6,0. Después de 30 minutos de agitación, la temperatura de la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente; la agitación continuó durante otras 3 horas. La conversión de CPT-Gli.TFA después de 3 horas controlada por HPLC (UV a 360 nm) fue >90%. La mezcla de reacción luego se diluyó con una mezcla 1:9 v/v de DMF/agua a 150 ml y el pH de la solución resultante se ajustó a 5,5. El conjugado obtenido se desalinizó en Sefadex G-25 y se liofilizó. El producto se obtuvo como un sólido blancuzco a amarillo soluble en agua, solución salina y disolventes orgánicos polares (DMF, DMSO), pH intrínseco 5,7. El contenido de conjugado de CPT determinado espectrofotométricamente a 360 nm fue 7,65% p/p. El rendimiento basado en CPT: 71%. El contenido de grupo carboxilo residual en el conjugado fue $3,0 \times 10^{-4}$ mol/g.

El espectro RMN protónico de PHF-MSA-CPT (DMSO-d₆/D₂O) contenía las señales características para el esqueleto de PHF modificado con ácido metilsuccínico y las estructuras laterales de CPT.

Ejemplo 10. PHF-CPT ligado a ácido 1,1-dimetilsuccínico (PHF-MESA-CPT)

Se disolvió PHF-(1,1-dimetilsuccinato) (PHF-DMSA) (2,5 g, 1,70 mmol de DMSA) en 50 ml de agua desionizada y se mezcló con 20 ml de DMF, se enfrió a 0°C y se combinó con solución de CPT-Gli.TFA (450 mg/0,840 mmol) en 15 ml de una mezcla 4:1 de acetonitrilo/agua). Bajo agitación intensa, se añadió EDC (500 mg) a la mezcla de reacción. El pH se ajustó a 5,9-6,0. Después de 30 minutos de agitación, la temperatura de te mezcla de reacción se

llevó a temperatura ambiente; la agitación continuó durante otras 3 horas. La conversión de CPT–Gli.TFA después de 3 horas controlada por (UV a 360 nm) fue >90%. La mezcla de reacción luego se diluyó con una mezcla 1:9 v/v de DMF/agua a 150 ml y el pH de la solución resultante se ajustó a 5,5. El conjugado obtenido se desalinizó en Sefadex G–25 y se liofilizó. El producto se obtuvo como un sólido blancuzco a amarillo soluble en agua, solución salina y disolventes orgánicos polares (DMF, DMSO), pH intrínseco 5,7. El contenido de conjugado de CPT determinado espectrofotométricamente a 360 nm fue 6,9% p/p. El rendimiento basado en CPT: aproximadamente 65%. El contenido de grupo carboxilo residual en el conjugado fue $2,9 \times 10^{-4}$ mol/g.

El espectro RMN protónico de PHF–NSA–CPT (DMSO–d₆/D₂O) contenía las señales características para el esqueleto de PHF modificado con ácido dimetilsuccínico y las estructuras laterales de CPT.

10 Ejemplo 11. Hidrólisis de PHF–CPT

La estabilidad hidrolítica del conjugado PHF–CPT se analizó en agua DI y solución salina isotónica a temperatura ambiente y pH=5,7, en solución salina 0,9% regulada con fosfato 0,05 M (pH 7,4) y en plasma de rata recién preparado a 37°C. La hidrólisis de PHF–CPT y la acumulación de los derivados de CPT se controlaron por RP HPLC mediante un gradiente de 20 minutos de 10–70% de acetonitrilo/agua (ambos disolventes con 0,1% de TFA). Los resultados se reprodujeron en dos experimentos independientes.

La segunda etapa de la hidrólisis de CPT–SI se investigó de modo análogo.

La reacción de ciclación–eliminación (Esquema 2) involucra el plegado del succinamidoéster en una estructura cíclica intermedia, con posterior ataque nucleófilo intramolecular en el carbono del éster. De esta manera, la reacción debe ser sensible para la presencia de (1) sustituyentes voluminosos y (2) sustituyentes que alteran la densidad de carga en los carbonos carboxílicos del ligador. La segunda fase también se afecta con los sustituyentes en el anillo succinimida del profármaco. En consecuencia, la sustitución en el ligador de succinato puede ser una herramienta poderosa para la regulación del perfil de liberación del fármaco. Por otra parte, la sustitución en el ligador de succinato puede abrir el camino a la regulación de las propiedades del profármaco (hidrofobicidad, transferencia de transmembrana, afinidad a los receptores celulares, etc.), que también pueden mejorar la farmacocinética.

Otros análogos sustituidos de PHF–CPT se sintetizan mediante los succinatos de metilo, 2,2–dimetilo y 2–nonen–2–ilo como se describen en los Ejemplos 7–10. Mediante los procedimientos análogos a los que se describieron antes, se investigó la liberación de CPT de estos conjugados en solución salina regulada por fosfato como se describió antes. Los conjugados también se analizaron para determinar citotoxicidad en el cultivo de células HT29.

Las soluciones PHF–CPT (pH intrínseco=5,5–5,7 con capacidad buffer fisiológicamente despreciable) no mostraron descomposición significativa después de una semana de conservación a 8°C o 24 horas a temperatura ambiente. A pH neutro y ligeramente básico (7,0–7,4) y condiciones moderadas (8–37°C), el conjugado experimentó hidrólisis lenta que produce principalmente CPT–20–O–(N–succinimidoglicinato) (CPT–SI). Por ejemplo, la hidrólisis del conjugado PHF–CPT (2 mg/ml en solución salina 0,9% regulada con fosfato 0,05 M, pH 7,4 durante 24 horas) produjo la liberación cuantitativa de CPT del PHF–CPT, con lactona CPT–SI (87%), carboxilato de CPT (8%) y lactona CPT–SA (5%) como los únicos productos detectables. De forma sorprendente, CPT liberado del profármaco en estas condiciones estuvo en la forma de carboxilato pero no de lactona, lo que sugiere que el anillo de lactona, que fue estable en CPT–SI y CPT–SA, se hidrolizó durante la segunda etapa de la liberación de CPT.

Una tendencia similar pero de composición de productos hidrolíticos ligeramente diferente se observó en plasma de rata recién preparado, como se muestra en la Figura 1. Esto sugiere la presencia de mecanismos de liberación de CPT adicionales, posiblemente mediados por las interacciones con las proteínas plasmáticas. Se halló que la escisión de CPT (todas las formas) de PHF–CPT es monoexponencial, con tiempo de liberación medio de $2,2 \pm 0,1$ horas.

El tiempo medio de la posterior hidrólisis de CPT–SI fue durante 20 horas, de acuerdo con las condiciones (la dependencia del pH exacto y la sensibilidad de la enzima, si hubiera, se determinarán en los estudios en curso).

Los tres análogos sintetizados de PHF–CPT también se investigaron para determinar las primeras tasas de liberación de fase. Como se espera, los grupos nonenilo voluminosos (que impiden estéricamente el plegado del ligador, que es necesario para la ciclación hidrolítica) disminuyó la tasa de liberación, mientras que los grupos metilo, que estabilizan las estructuras cíclicas, la aumentó (Tabla 3; cada resultado se basó en dos experimentos independientes, n=4–6 puntos de datos cada uno; para todos los números de SD<10% de la media, p<0,05).

50 **Tabla 3.** Velocidades de liberación comparativas de conjugados de CPT-PHF modificados en PBS a Ph 7,4/37°C

Compuesto	Ligador	Tiempo de liberación medio de CPT, horas
PHF–CPT	Gly–succinato	2.1

Compuesto	Ligador	Tiempo de liberación medio de CPT, horas
PHF-MSA-CPT	Gly-(metil succinato)	1.4
PHF-DMSA-CPT	Gly-(2,2-dimetil succinato)	0.6
PHF-NSA-CPT	Gly-(2-nonen-2-il succinato)	16.0

Ejemplo 12. Conjugado PHF-SAG-Taxol

El conjugado de Taxol soluble en agua con PHF utilizando ligadura de succinamidoglicina de liberación de fase dual, conjugado de PHFsuccinamidoglicina-Taxol (PHF-SAG-Taxol), se ha preparado a partir de Taxol-2'(O)-glicinato y PHF succinilado.

- 5 El Taxol-2'(O)-glicina-NH₂ se obtuvo en dos etapas por medio de la acilación de Taxol con HO-Gli-(Z) (DIPC, DMAP, CH₂Cl₂) seguido por la desprotección del grupo amino (H₂, Pd/C, MeOH) con 60% de rendimiento total [Z=Cbz]. Taxol-2'(O)-Gli-NH₂ se conjugó con PHF-succinato (10% mol de ácido succínico, MW 65 kDa) por medio del acoplamiento mediado por EDC en 50% de DMF acuoso. La síntesis de PHF-SAG-Taxol conjugado se llevó a cabo en una escala de 2 gramos, a temperatura ambiente, pH 5,5-6,0. Se detectó una conversión cuantitativa (>98%) de Taxol-glicinato a PHF-SAG-Taxol dentro de las 3 horas. El PHF-SAG-Taxol se purificó de las impurezas de bajo peso molecular por filtración en gel en una columna G25 Sefadex equilibrada con agua DI y se recuperó por liofilización. Siguiendo el procedimiento anterior, se prepararon conjugados con carga de Taxol que varía de 6% a 13% (peso). Todos los productos fueron fácilmente solubles en agua desionizada y solución salina. La estabilidad de los conjugados de PHF-Taxol en medio acuoso se controló por HPLC. Las soluciones acuosas de PHF-SAG-Taxol fueron estables en condiciones ambientales en un intervalo de pH de 4,5 a 5,5. En condiciones fisiológicas (PBS, pH 7,4, 37°C) el fármaco se liberó del conjugado con una vida media de 1,5±0,2 horas, lo que produce una mezcla de Taxol-2'(O)-(succinimidoglicina) y Taxol en una relación de 1,5: 1,0. En estas condiciones, éster de Taxol-2'(O)-(succinimidoglicina) se hidrolizó a Taxol con vida media de aproximadamente 3 horas. La actividad antitumoral de la preparación PHF-SAG-Taxol con contenido de Taxol de 13% se analizó in vitro con las células de carcinoma colorrectal humano HT-29. Las formulaciones de PHF-Taxol conjugado y Taxol no modificado han mostrado eficacia inhibitoria del crecimiento celular estadísticamente idéntica (ED50 15 nM).

Ejemplo 13. Glicil-iludina

- 25 Se disolvió iludina M, 50 mg (0,2 mmol), en 2 mL de THF anhidro y se enfrió a 0°C. Luego, se añadieron 65 mg (0,22 mmol) de Fmoc-glicina, 30 mg (0,22 mmol) de diisopropilcarbodiimida y 1 mg de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 2 horas, luego durante la noche a temperatura ambiente. La Fmocglicil-iludina resultante se purificó por cromatografía en columna (sílice, cloroformo con 1% de etanol) y se secó al vacío. Rendimiento: 73 mg (70%).

- 30 Se disolvió Fmoc-glicil-iludina (30 mg) en 5 mL de 20% de piperidina en DMF. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se extrajo al vacío y la glicil-iludina resultante se purificó por cromatografía en columna (sílice, cloroformo con 3% de etanol y 1% de trietilamina). Rendimiento: 10 mg (57%).

Ejemplo 14. PHF-iludina M

- 35 PHF anhidro, Mn 73 kDa (2,0 g), preparado como se describió en el Ejemplo 1, se disolvió en 50 ml de piridina seca. Luego, se añadieron 0,15 g de anhídrido succínico y 18 mg de DMAP. La mezcla de reacción se incubó durante 18 horas a 40°C. La reacción produjo una acilación cuantitativa de PHF con formación de PHF-succinato que tenía 10% de sus unidades monoméricas succiniladas. Después de la extracción de piridina al vacío, el PHF-succinato se disolvió en agua desionizada y se purificó por filtración en gel en una columna Sefadex G-25 equilibrada con agua desionizada. El producto final se recuperó de la solución acuosa por liofilización. Rendimiento: casi 100%.

- 40 Se disolvió PHF-succinato (100 mg) en 2 ml de agua desionizada y se mezcló con 0,5 ml de DMF. La glicil-iludina, 10 mg, se disolvió en 0,5 mL de acetonitrilo. Las soluciones se enfriaron a 0°C y se mezclaron. Bajo agitación intensa, se añadió EDC (1-etil-3-(3-dietilaminopropil)carbodiimida; 20 mg) a la mezcla de reacción. El pH se ajustó a 5,9-6,0. Después de 30 minutos, la temperatura de la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente; la agitación continuó durante otras 3 horas. La asociación de glicil-iludina con PHF-succinato se controló por HPLC por exclusión de tamaño (detección: UV a 318 nm). Después de completar la reacción, se añadieron 15 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 5,5 y la mezcla de reacción se desalinizó inmediatamente en Sefadex G-25. El producto, PHF-iludina, se liofilizó. Rendimiento: casi 100%. Las propiedades del polímero se informan en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades de conjugados de PHF-iludina M

Número muestra	de % de carga de fármaco en peso	Peso molecular	Solubilidad razonable ²
----------------	----------------------------------	----------------	------------------------------------

muestra	en peso		
1	1.5%	78.000	4 mg/mL
2	3%	78.000	7,5mg/mL
3	4%	78.000	10mg/mL

1. La carga del fármaco se determinó por espectrómetro UV a 318 nm.

2 La solubilidad razonable se determinó por la disolución de 250 mg de conjugados en 1 mL de agua. La viscosidad de la solución resultante no fue demasiado alta para realizar la inyección IV.

Ejemplo 15. Marcación

5 Se usó un conjugado marcado dual (CPT marcado con ^3H y esqueleto marcado con ^{111}In) para el control independiente paralelo de los componentes del conjugado.

Un conjugado PHF-CPT marcado [^3H] con 0,210 mCi/g de actividad y 7,0% p/p de contenido de CPT se preparó usando [5- $^3\text{H}(\text{N})$]-camptotecina (Moravek Biochemicals, Inc.) como se describió para PHF-CPT. El esqueleto del polímero del conjugado se modificó con DTPA y se marcó con ^{111}In por tranquelación del citrato de indio a pH 5,5. La modificación del PHF-CPT con DTPA se realizó en dos etapas. (1) Dioles vecinos presentes en la estructura de PHF (ver Ejemplo 1) se oxidaron con metaperyodato de sodio en una relación de diol:periyodato 1:1, pH 5,7, durante 2 horas a temperatura ambiente. Los grupos aldehídos laterales resultantes se aminaron en forma no reductora con amida n DTPA de 1-amino-2-hidroxi-3-(aminooxi)-propano. Esta última "aminooxi-DTPA", que forma enlaces oxima con los aldehídos en condiciones moderadas, se preparó en nuestro laboratorio (síntesis descrita en otra parte). En nuestra opinión, las oximas, que son significativamente más estables en condiciones fisiológicas que las hidrazidas¹⁵ y en general menos tóxicas, son más adecuadas para la modificación de carbonilo en los conjugados modulares.

Las purzas radioquímicas de todos los derivados marcados fueron >98% (HPLC).

Ejemplo 16. Biocinética

20 La biocinética y las biodistribuciones de los conjugados PHF-CPT se estudiaron en ratas normales y en ratones desnudos con xenoinjertos HT29 y A2780 mediante los conjugados que contienen conjugados de CPT marcados con marca doble. Todos los estudios de animales se realizaron de acuerdo con protocolos aprobados institucionalmente.

Ratones macho desnudos/nu, con peso promedio de 28-32 g (Charles River Labs, Boston, MA), que portan xenoinjertos tumorales de 150-200 μl (n=6 por grupo) se inyectaron iv con el PHF-CPT marcado con marca doble en 0,9% de solución salina a razón de 20 mg/kg sobre la base de CPT. Las actividades inyectadas fueron 1,25 μCi /animal para ^3H y 5 μCi /animal para ^{111}In .

Las ratas macho exogámicas adultas de 240 g (Charles River Laboratories, Boston, MA), n=6 por grupo se inyectaron iv con 800 μl de PHF-CPT marcado en 0,9% de solución salina a razón de 20 mg/kg por CPT. La actividad inyectada por animal fue 1,25 μCi y 24 μCi para ^3H y ^{111}In respectivamente.

Se tomaron muestras de sangre en los puntos de tiempo 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 8 y 24 horas. A 24 horas, los animales se sacrificaron; se recolectaron tumores y muestras de los órganos principales para el recuento. Las actividades totales de ^3H y ^{111}In en los tejidos se midieron por centelleo (beta) y recuento gamma respectivamente y se expresaron como % de dosis inyectada/g de tejido para caracterizar las distribuciones de ^3H -CPT (total de todas las formas) y ^{111}In -PHF.

Se halló que la vida media del polímero portador en la rata fue 14,2 \pm 1,7 horas, mientras que la vida media de la sustancia farmacológica fue 2,1 \pm 0,2 horas, que corresponde bien a la tasa de liberación de la primera fase determinada in vitro (Figura 5).

40 Tanto ^3H -CPT como ^{111}In -PHF mostraron acumulación sustancial en el tejido tumoral. A 24 horas, la captación de CPT en el tumor fue 2,22% y 2,52% dosis/g para A2780 y HT29, respectivamente, que es aproximadamente 75 veces mayor que para CPT (p<0,05) y muy similar a PEG-CPT.¹⁴ Las relaciones promedio de tumor a músculo fueron 2,4 y 1,5, respectivamente (p<0,2 para la diferencia entre dos xenoinjertos diferentes).

45 La acumulación en otros tejidos (Figura 6) también fue similar a la de PEG-CPT. Sin embargo, se detectaron niveles de fármaco 2-3 veces superiores en los tejidos del sistema retículoendotelial (RES). Si bien no está ligado por la teoría, esto último puede deberse a la mayor captación del RES del CPT-SI, luego PEG-CPT o deberse a la farmacocinética dependiente del volumen de sangre.

La fotografía (microscopía de fluorescencia) de la fluorescencia de CPT en tejido tumoral no fijado no teñido 24 horas pos-administración mostró distribución de CPT relativamente homogénea con acumulación del fármaco elevada en algunas áreas adyacentes a los lechos vasculares (Figura 7). La distribución intracelular difusa de la fluorescencia de CPT indicó predominantemente localización del fármaco citoplásmica (no vesicular).

5 **Ejemplo 17. Actividad antiproliferativa**

Se investigó citotoxicidad de los derivados de CPT en el cultivo de células HT29. Las células se cultivaron en medio McCoy 5a con 1,5 mM de L-glutamina suplementado con 10% de FBS. Las células (en crecimiento exponencial) se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (≈ 10000 células/pocillo), se cultivaron durante 24 horas y luego se trataron con compuestos de ensayo en varias diluciones. Se evaluó la inhibición del crecimiento 72 horas pos-tratamiento (ensayo MTT). Se halló que ID50 del PHF-CPT en el cultivo de células HT-29 fue 172 nM, que es 10 veces más alto que la ID50 de CPT (17 nM) y 5 veces más alto que la ID50 de CPT-SI (34 nM).

15 **Ejemplo 18. Actividad antineoplásica y toxicidad in vivo**

La toxicidad de CPT se evaluó en ratones exogámicos normales, así como en animales atímicos desnudos que portan xenoinjerto en el curso de los estudios de actividad antineoplásica.

15 La actividad antineoplásica del PHF-CPT se evaluó con un modelo de xenoinjerto HT-29 en ratones atímicos de acuerdo con protocolos aprobados institucionalmente. Camptotecina y CPT-SI (el producto de liberación de la primera fases) se usaron como controles.

El estudio se realizó mediante dosis aproximadamente equitoxicas de CPT y PHF-CPT. Las células se inyectaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo, 10^6 células por animal en 50 μ l. Cuando el volumen alcanzó 100–150 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales: PHF-CPT, camptotecina, CPT-SI y control no tratado (n=3 cada uno). Los animales de los primeros tres grupos recibieron la sustancia experimental respectiva por medio de la vena de la cola en cinco dosis cada tres días (5xq3D). Cada inyección contenía 22,5 mg de CPT eqv/kg de CPT y CPT-SI y 45 mg CPT eqv/kg para PHFCPT. Todas las formulaciones se prepararon inmediatamente antes de la administración. PHF-CPT se administró como una solución en 0,9% de solución salina. Se administraron CPT y CPT-SI como dispersiones en Tween 80/agua (9/1 v/v). Se controlaron peso del animal, tamaño del tumor, aspecto del animal, comportamiento y tasa de supervivencia durante cuatro semanas después de la administración. La pérdida de peso mayor de 20% y el crecimiento del tumor mayor 1500 mm^3 se contaron como letalidades (los animales se sacrificaron).

20 **Ejemplo 19. Actividad in vivo de PHF-CPT en el modelo de xenoinjerto LS174t**

30 Se administró PHF-CPT IV, 160 nm/kg por CPT, q7dx3 a ratones desnudos con xenoinjertos de tumor LS174t en crecimiento. Se administró irinotecano (un derivado de CPT de peso molecular bajo soluble, usado como control) IP, también a razón de 160 nm/kg, siguiendo el mismo esquema. Los resultados (Figuras 3 y 4) demostraron que, a las mismas dosis (por sustancia de fármaco), PHF-CPT suprimió el crecimiento tumoral más potentemente que Irinotecano (Figura 3). El grupo de animales tratado con PHFCPT tuvo mejor tasa de supervivencia que el grupo tratado con irinotecano (Figura 4).

Se halló que la dosis tolerada máxima (MTD) de PHF-CPT es >24 mg/kg, que es al menos dos veces mayor que la de CPT de peso molecular bajo e irinotecano (9–10 mg/kg para esquemas análogos).

40 **Ejemplo 20. Toxicidad antineoplásica de PHF-CPT**

La toxicidad antineoplásica de PHF-CPT se analizó en el modelo HT29 (tamaño del tumor 100–150 μ L), usando CPT y CPT-SI como controles. Este último se administró como emulsiones Cremophor®. Se halló que PHF-CPT administrado a razón de 45 mg/kg por CPT (5xq3d.) es más efectivo y menos tóxico que CPT no modificado a 22,5 mg/kg (mismo esquema). Se halló que el producto de liberación intermedio, CPT-SI, no tiene efecto significativo sobre la dinámica del tumor, determinada por el tiempo de crecimiento tumoral de 0,10–0,15 cm^3 a 1,5 cm^3 (27 días versus 24 para control no tratado y 40 días para CPT a 22,5 mg/kg 5xq4d).

45 **REFERENCIAS**

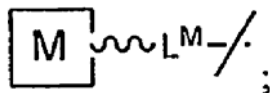
1. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of Camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from Camptotheca acuminata. J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 3888–3890
2. Fassberg J, Stella VJ. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. J Pharm Sci 1992, 81:676–684
3. Cao Z, Harris N, Kozielski A, Vardeman D, Stehlin JS, Giovanella B. Alkyl esters of camptothecin and 9-nitrocampothecin: synthesis, in vitro pharmacokinetics, toxicity, and antitumor activity. Journal of Medicinal Chemistry 1998, 41:31–37

4. Zhao H, Lee C, Sai P, Choe YH, Boro M, Pendri A, Guan S, Greenwald RB. 20-O-acylcamptothecin derivatives: evidence for lactone stabilization. *Journal of Organic Chemistry* 2000, 65:4601–4606
5. Kaneda N, Nagata H, Furuta T, Yokokura T. Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer Research* 1990, 50:1715–1720
- 5 6. Duncan R, Gac-Breton S, Keane R, Musila R, Sat YN, Satchi R, Searle F. Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. *Journal of Controlled Release* 2001, 74: 135–146
7. Burke TG, Bom D. Camptothecin design and delivery approaches for elevating anti-topoisomerase I activities in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000, 922:36–45
- 10 8. Schoemaker NE, van Kesteren C, Rosing H, Jansen S, Swart M, Lieverst J, Fraier D, Breda M, Pellizzoni C, Spinelli R, Grazia Porro M, Beijnen JH, Schellens JH, ten Bokkel Huinink WW. A phase I and pharmacokinetic study of MAG-CPT, a water-soluble polymer conjugate of camptothecin. *British Journal of Cancer* 2002, 87:608–614
9. Tadayoni BM, Friden PM, Walus LR, Musso GF. Synthesis, in vitro kinetics, and in vivo studies on protein conjugates of AZT: evaluation as a transport system to increase brain delivery. *Bioconjugate Chemistry* 1993, 4: 139–145
- 15 10. Papisov MI. Acyclic polyacetals from polysaccharides. *ACS Symp. Series* 2001, 786:301–314.
11. Papisov MI. Biodegradable polyacetal polymers and methods of their formation and use. *Patente US N.º 5.811.510, 09/22/1998*
12. Greenwald RB, Pendri A, Conover CD, Lee C, Choe YH, Gilbert C, Martinez A, Xia J, Wu D, Hsue M. Camptothecin-20-PEG ester transport forms: the effect of spacer groups on antineoplastic activity. *Bioorg Med Chem* 1998, 6:551–562
- 20 13. Minko T, Paranjpe PV, Qui B, Laloo A, Won R, Stein S, Sinko PJ. Enhancing the anticancer efficacy of camptothecin using biotinylated poly(ethyleneglycol) conjugates in sensitive and multidrug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002, 50:143–150.
- 25 14. C. Conover, R. Greenwald, A. Pendri, C. Gilbert, K. Shum. Camptothecin delivery systems: enhanced efficacy and tumor accumulation of camptothecin following its conjugation to polyethylene glycol via a glycine linker. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998, 42: 407–414
15. Webb, R.R., II, and Kancko, E. Synthesis of 1-(aminoxy)-4-[(3-nitro-2-pyridyl)dithio]butane hydrochloride and of 1-(aminoxy)-4-[(3-nitro-2-pyridyl)dithio]but-2-ene. Novel heterofunctional cross-linking reagents, *Bioconjugate Chem.* 1990, 1: 96–99.
- 30 16. Maeda H, Seymour LW, Miyamoto Y. Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo. *Bioconj. Chem.* 1992, 3:351–362
17. Papisov MI. Modeling in vivo transfer of long-circulating polymers (two classes of long circulating polymers and factors affecting their transfer in vivo). *Adv. Drug Delivery Rev., Special issue on long circulating drugs and drug carriers*, 1995, 16:127–137.
- 35 18. Maeda H, Seymour LW, Miyamoto Y. Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo. *Bioconj. Chem.* 1992, 3:351–362.
19. Greenwald RB. PEG drugs: an overview. *Journal of Controlled Release* 2001, 74:159–71.
20. Conover CD, Greenwald RB, Pendri A, Gilbert CW, Shum KL. Camptothecin delivery systems: enhanced efficacy and tumor accumulation of camptothecin following its conjugation to polyethylene glycol via a glycine linker. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998,42:407–14.
- 40 21. Li C, Price JE, Milas L, Hunter NR, Ke S, Yu DF, Chamsangavej C, Wallace S. Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors. *Clin Cancer Res.* 1999, 5:891–7.
22. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res.* 1986 46:6387–92.
- 45 23. Rihova B, Kopeckova P, Strohalm J, Rossmann P, Vetvicka V, Kopecek J. Antibody-directed affinity therapy applied to the immune system: in vivo effectiveness and limited toxicity of daunomycin conjugated to HPMA copolymers and targeting antibody. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988, 46:100–14
24. Ulbrich K, Etrych T, Chytil P, Jelinkova M, Rihova B. HPMA copolymers with pH-controlled release of doxorubicin. In vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity. *J Control Release.* 2003, 87:33–47
- 50

25. Duncan R, Gac-Breton S, Keane R, Musila R, Sat YN, Satchi R, Searle F. Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. *J Control Release*. 2001, 74:135–46
26. Papisov MI, Garrido L, Poss K, Wright C, Weissleder R, Brady TJ. A long-circulating polymer with hidrolizable main chain. 23-rd International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Kyoto, Japan, 1996; Controlled Release Society, Deerfield, IL, 1996; 107–108
27. Papisov MI. Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes: molecular mechanics and chemistry of liposome interactions. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1998,32:119–138.
28. Papisov MI. Modeling in vivo transfer of long-circulating polymers (two classes of long circulating polymers and factors affecting their transfer in vivo). *Adv. Drug Delivery Rev.*, Special issue on long circulating drugs and drug carriers, 1995, 16:127–137
29. Papisov MI. Acyclic polyacetals from polysaccharides. *ACS Symposium Series 786* (2001), 301–314
30. A.Yurkovetskiy, S. Choi, A. Hiller, M. Yin, A.J. Fischman, M.I. Papisov. Biodegradable polyal carriers for protein modification. 29th Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials, 2002, Seoul, Korea. Controlled Release Society, Deerfield, IL, 2002; documento N.º 357.
31. Papisov MI, Babich JW, Dotto P, Barzana M, Hillier S, Graham-Coco W, Fischman AJ. (1998) Model cooperative (multivalent) vectors for drug targeting. 25th Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials, 1998, Las Vegas, Nevada, USA; Controlled Release Society, Deerfield, IL, 170–171
32. A. Yurkovetskiy, S. Choi, A. Hiller, M. Yin, C. McCusker, S. Syed, A. J. Fischman, M.I. Papisov. Biodegradable polyals for protein modification. *Bioconj. Chem.* 2003 (en revisión).
33. A.V. Yurkovetskiy, A. Hiller, M.Yin, S. Sayed, A.J.Fischman, M.I.Papisov. Biodegradable polyals for proteína modification. Controlled Release Society's Winter Symposium, Salt Lake City, Utah, 2003.
34. Papisov MI. Biodegradable polyacetal polymers and methods of their formation and use. Patente US N.º 5.811.510, 09/22/1998; Papisov MI. Biodegradable polyketals. Solicitud de patente US 60/348.33; 2002; Papisov M., Kinstler O, Ladd D. Protein conjugates with a water-soluble biocompatible polymer. Solicitud de patente US 60/397.509; 2002; Papisov M., Yurkovetsky A. Oxime Conjugates and Methods of Preparation Thereof", solicitud de patente US 60/397.283; 2002; Elmaleh D., Robson S., Papisov M. Conjugates comprising a biodegradable polymer and uses thereof. Solicitud de patente US, 2/20/2002.

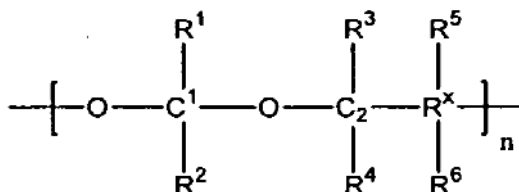
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un portador sustituido con una o varias apariciones de un resto que tiene la estructura:



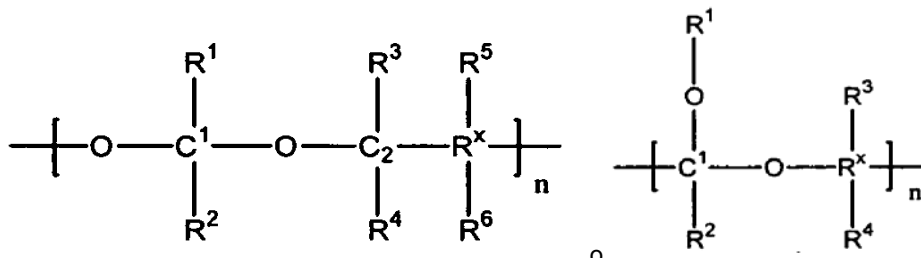
5 en donde el portador comprende

(a) un poliacetal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición de poliacetal tiene la siguiente estructura química:



10 en donde para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, uno de R¹ y R² es hidrógeno y el otro es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster; o

(b) un policetal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición del policetal tienen la siguiente estructura química:



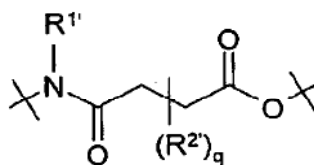
20 en donde cada aparición de R¹ y R² es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁ u OC₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalícíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster;

30 en donde cada aparición de M es, de modo independiente, un modificador que es una pequeña molécula que tiene un peso molecular ≤ 1,5 kDa y en donde el modificador comprende una funcionalidad amina o está químicamente modificado de modo que comprende un grupo funcional apropiado para el enlace covalente con un ácido succínico opcionalmente sustituido a través de la formación de un enlace de amida;

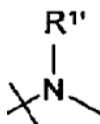
~ denota la unión directa o indirecta de M con el ligador L^M; y cada aparición de L^M es, de modo independiente, un ligador que contiene succinamida opcionalmente sustituida, en donde el modificador M está directa o indirectamente unido con el ligador de succinamida a través de un enlace amida y el portador está ligado directa o indirectamente a cada aparición del ligador de succinamida a través de un enlace de éster.

35 2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

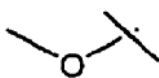
cada aparición de L^M comprende, de modo independiente, un resto que tiene la estructura:



en donde



denota el sitio de unión con el modificador M;



5

denota el sitio de unión con el portador, q es un número entero de 0-4; R^{1'} es hidrógeno o alquilo, alquenoilo, -C(=O)R^{1A}, -C(=O)OR^{1A}, -SR^{1A}, SO₂R^{1A}; en donde cada aparición de R^{1A} es, de modo independiente, hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, cicloalquinoilo, heteroalquilo, heteroalquenoilo, heteroalquinoilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenoilo, heterocicloalquinoilo, heteroalifático, heteroalíciclico, arilo o heteroarilo; y cada aparición de R^{2'} es, de modo independiente, hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, cicloalquinoilo, heteroalquilo, heteroalquenoilo, heteroalquinoilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenoilo, heterocicloalquinoilo, heteroalifático, heteroalíciclico, arilo, heteroarilo, -C(=O)R^{2A} o -ZR^{2A}, en donde Z es -O-, -S-, -NR^{2B}, en donde cada aparición de R^{2A} y R^{2B} es, de modo independiente, hidrógeno o un alquilo, alquenoilo, alquinoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, cicloalquinoilo, heteroalquilo, heteroalquenoilo, heteroalquinoilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenoilo, heterocicloalquinoilo, heteroalifático, heteroalíciclico, arilo o heteroarilo.

10

15

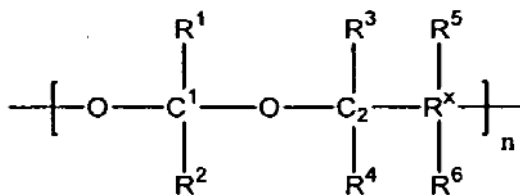
3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R¹ es hidrógeno.

4. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde cada aparición de R^{2'} es hidrógeno.

5. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el portador es una macromolécula, polímero soluble, nanopartícula, gel, liposoma, micela, sutura o implante.

20

6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el poliacetal tiene la estructura:

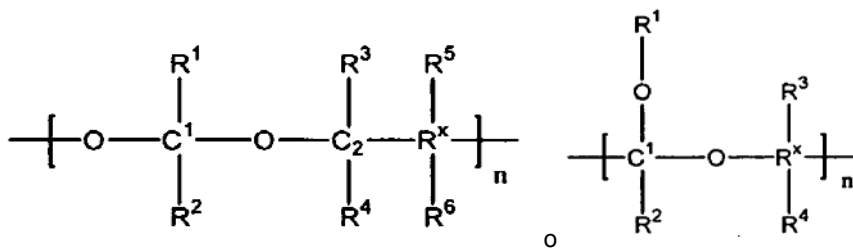


en donde para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, uno de R¹ y R² es hidrógeno y el otro es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíciclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero, cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíciclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster.

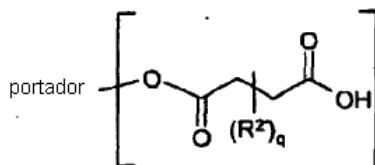
25

30

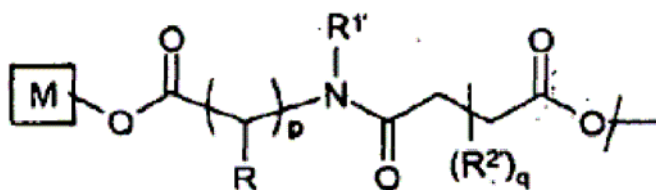
7. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el policetal tiene la estructura:



- 5 en donde cada aparición de R¹ y R² es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁ u OC₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster.
8. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el modificador es un resto quimioterapéutico.
9. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde al menos una aparición de M comprende camptotecina (CPT).
10. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde cada aparición de M comprende camptotecina (CPT).
- 15 11. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cada aparición de M es camptotecina (CPT) y M está unido indirectamente con L^M por medio de un resto de aminoácido.
12. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 11, en donde M está unido indirectamente con L^M por medio de un resto de glicina.
- 20 13. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster es un resto de hidroxilo.
14. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8 a 13, en donde el portador es PHF (poli(1-hidroximetiletilénhidroximetil-formal)).
15. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el portador es PHF y M es CPT y M está indirectamente unido con L^M por medio de un resto de glicina.
- 25 16. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 ó 6 a 15, en donde el conjugado comprende un subgrupo de sitios de ácido succinámico en el portador que queda sin reaccionar, donde estos sitios tienen la estructura:

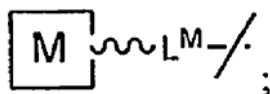


- 30 17. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el portador está sustituido con una o varias apariciones del resto:



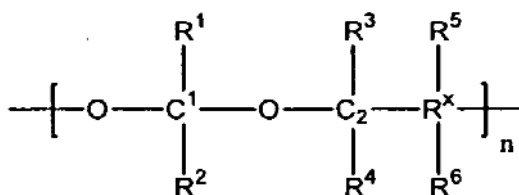
en donde p es 1, R y R¹ son cada uno hidrógeno y M es CPT.

18. Un método para preparar un conjugado que comprende un portador sustituido con una o varias apariciones de un resto que tiene la estructura:



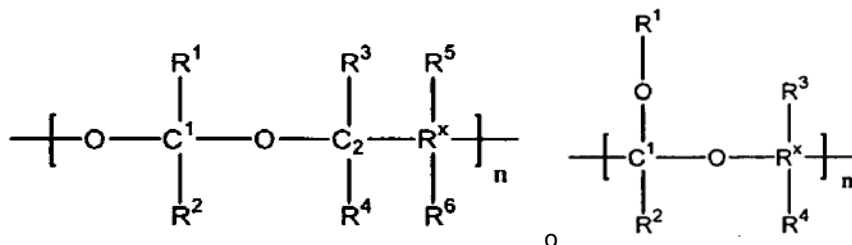
en donde el portador comprende

- 5 (a) un poliacetal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición de poliacetal tienen la siguiente estructura química:



10 en donde para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, uno de R¹ y R² es hidrógeno y el otro es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero, cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster; o

- 15 (b) un policetal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición del policetal tienen la siguiente estructura química:



20 en donde cada aparición de R¹ y R² es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁ u OC₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster;

25 en donde cada aparición de M es, de modo independiente, un modificador que es una pequeña molécula que tiene un peso molecular ≤1,5kDa y en donde el modificador comprende una funcionalidad amina o está químicamente modificado de modo que comprende un grupo funcional apropiado para el enlace covalente con un ácido succínico opcionalmente sustituido a través de la formación de un enlace de amida;

30 \sim denota la unión directa o indirecta de M con el ligador L^M; y

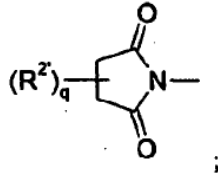
cada aparición de L^M es, de modo independiente, un ligador que contiene succinamida opcionalmente sustituida, en donde el modificador M está directa o indirectamente unido con el ligador de succinamida a través de un enlace amida y el portador está ligado directa o indirectamente a cada aparición del ligador de succinamida a través de un enlace de éster;

35 en donde dicho método comprende las etapas de:

proporcionar un portador;

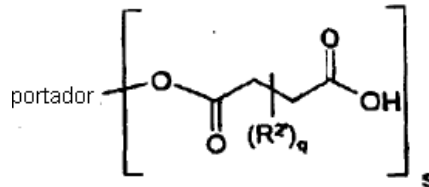
proporcionar uno o varios modificadores;

hacer reaccionar el portador con un anhídrido succínico opcionalmente sustituido que tiene la estructura:

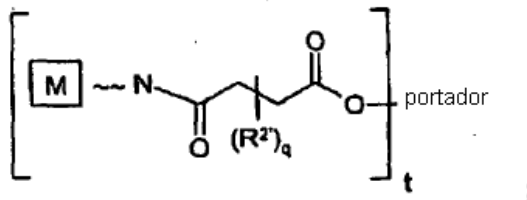


5 en donde q es un número entero de 0-4; y cada aparición de R^2 es, de modo independiente, hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo, heteroalifático, heteroalíclico, arilo, heteroarilo, $-C(=O)R^{2A}$ o $-ZR^{2A}$, en donde Z es $-O-$, $-S-$, $-NR^{2B}$, en donde cada aparición de R^{2A} y R^{2B} es, de modo independiente, hidrógeno o un resto de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo, heteroalifático, heteroalíclico, arilo o heteroarilo;

en condiciones apropiadas para formar un portador succinilado que tiene la estructura:



15 en donde s denota la cantidad de restos de succinilo en el portador y hacer reaccionar el portador succinilado con uno o varios restos de modificador (M), en donde al menos un resto de modificador forma un enlace de amida, ya sea directa o indirectamente a través de un ligador secundario, con un resto de succinilo presente en el portador; generando así el conjugado que tiene la estructura:



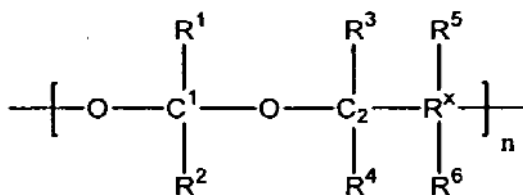
en donde R^2 y q are tal como se definió con anterioridad;

20 \sim denota la unión directa o indirecta de M con el ligador de succinamida; y t es un número entero que designa la cantidad de restos de modificador conjugados con el portador de modo que $t \leq s$.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde cada aparición de R^2 es hidrógeno.

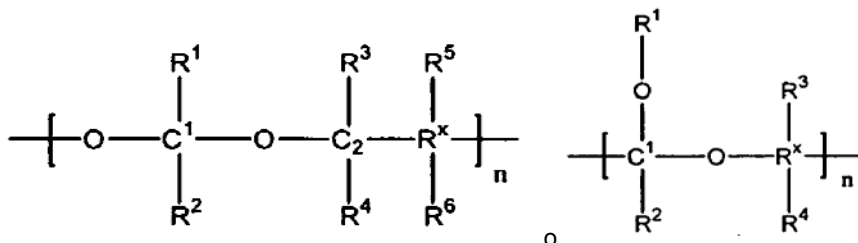
20. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde en la etapa de acoplamiento el portador succinilado, un subgrupo de los sitios de ácido succinámico en el portador queda sin reaccionar.

25 21. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el portador es un poliacetal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición de poliacetal tienen la siguiente estructura química:



en donde para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, uno de R¹ y R² es hidrógeno y el otro es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster.

- 5
22. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el portador es un policetal biocompatible biodegradable en donde al menos un subgrupo de las unidades estructurales de repetición del policetal tienen la siguiente estructura química:



en donde cada aparición de R¹ y R² es un grupo biocompatible seleccionado del grupo que consiste en alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclic, arilo y heteroarilo e incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₁ u OC₁; R^x incluye un átomo de carbono covalentemente unido a C₂; n es un número entero; cada aparición de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es un grupo biocompatible y está seleccionado, de modo independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo y heteroarilo; y para cada aparición de la estructura n entre paréntesis, al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ comprende un grupo funcional apropiado para acoplarse con una succinamida a través de un enlace de éster.

- 15
23. El método de acuerdo con la reivindicación 21 ó 22, en donde el grupo funcional es un resto de hidroxilo.
24. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el portador es PHF (poli(1-hidroxmetiletilenhidroximetil-formal)).
25. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde al menos una aparición de M comprende CPT.
- 25
26. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde cada aparición de M comprende CPT.
27. El método de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, en donde CPT está indirectamente unido con el ligador de succinamida a través de un resto de glicina.
28. Una composición que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30
29. La composición de acuerdo con la reivindicación 28, en donde en el conjugado al menos una aparición de M comprende CPT.
30. La composición de acuerdo con la reivindicación 28, en donde en el conjugado cada aparición de M comprende CPT.
31. La composición de acuerdo con la reivindicación 29 ó 30, en donde en el conjugado CPT está indirectamente unido con el ligador de succinamida por medio de un resto de glicina.
- 35
32. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto por implantación de un implante que comprende el conjugado en el sujeto.
33. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el implante es una matriz de gel biodegradable.

34. Un implante que comprende un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

35. El implante de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el implante es una matriz de gel biodegradable.

5 36. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el conjugado está destinado a administración con al menos un compuesto adicional biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en vitaminas, sustancias anti-SIDA, sustancias anticáncer, radionúclidos, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores de enzimas, neurotoxinas, opioides, agentes hipnóticos, antihistaminas, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, miorelajantes y sustancias antiparkinson, antiespasmódicos y agentes para la contracción de los músculos que incluyen bloqueadores de canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, agentes antiparasitarios y compuestos antiprotozoarios, moduladores de las interacciones de matriz entre células y entorno
10 extracelular que incluyen inhibidores del crecimiento de las células, y moléculas antiadhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de ADN, ARN o de la síntesis de las proteínas, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides, factores antiangiogénicos, factores antisecretorios, anticoagulantes y/o agentes antitrombóticos, anestésicos locales, agentes oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos y de imagen y combinaciones de ellos.

15

Figura 1

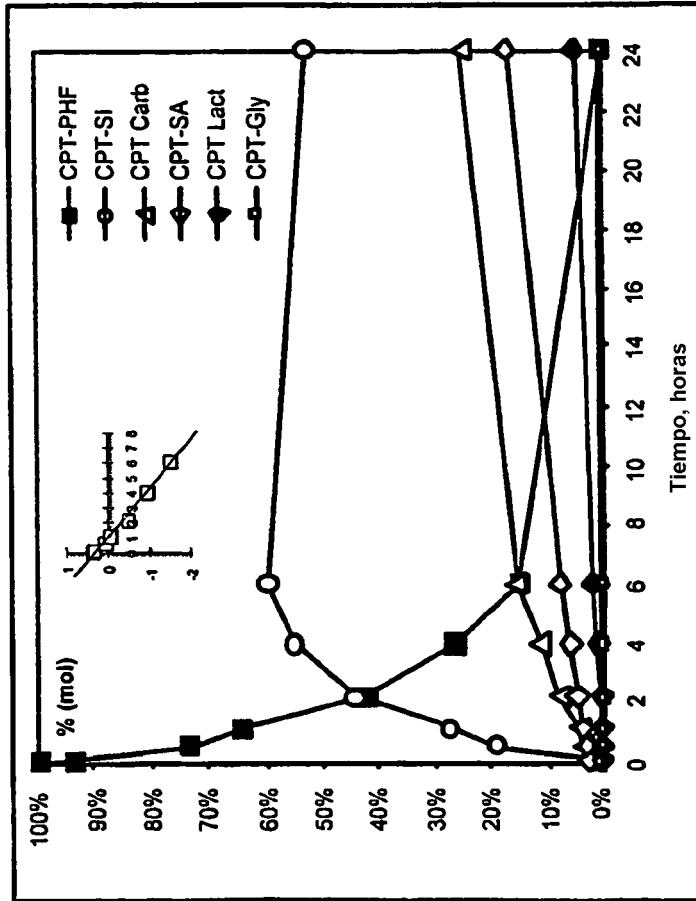


Figura 2

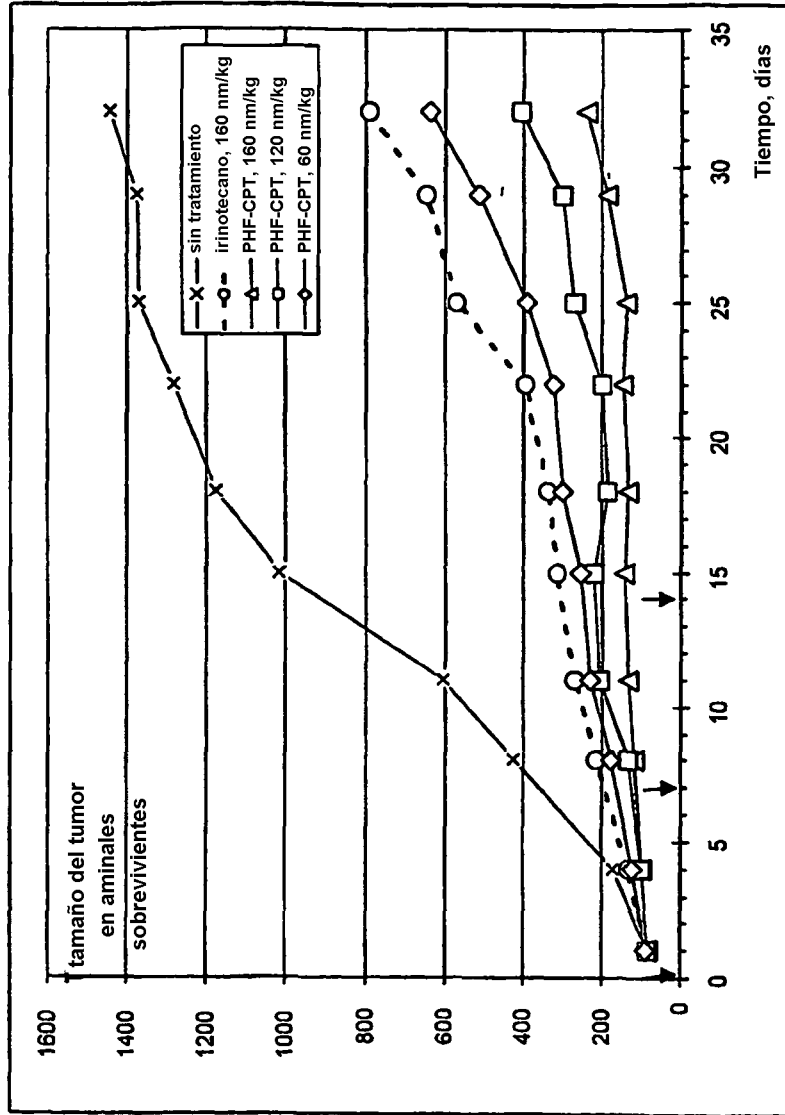


Figura 3

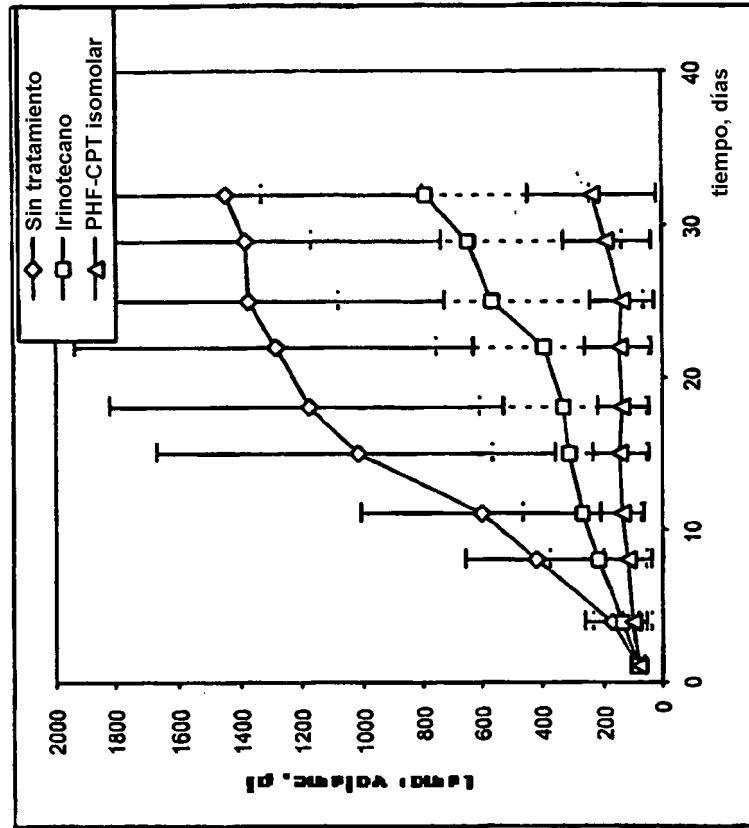


Figura 4

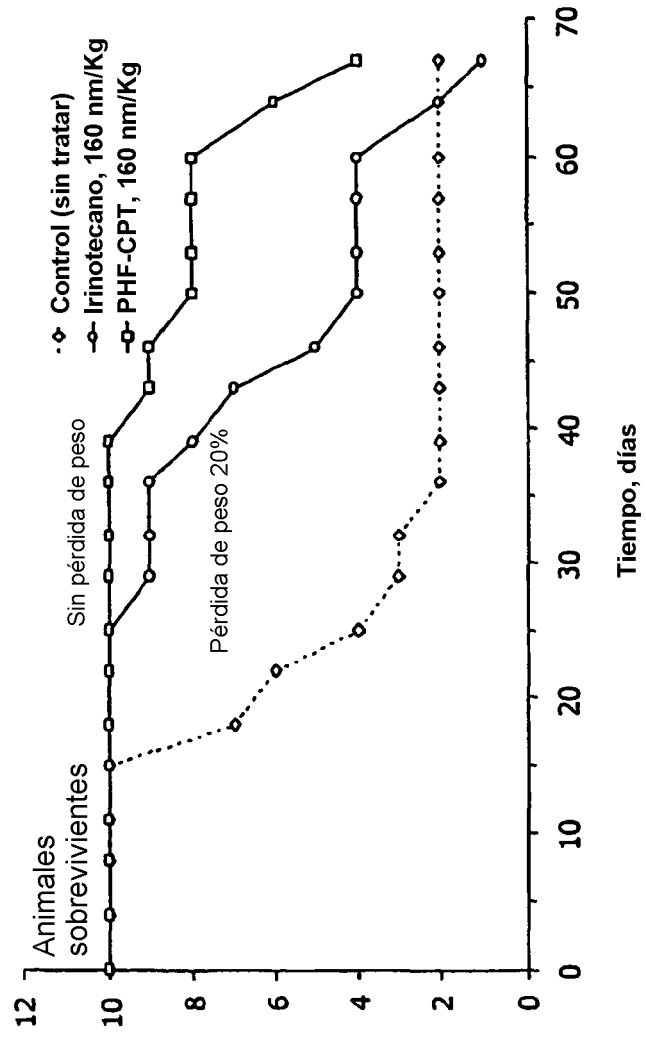


Figura 5

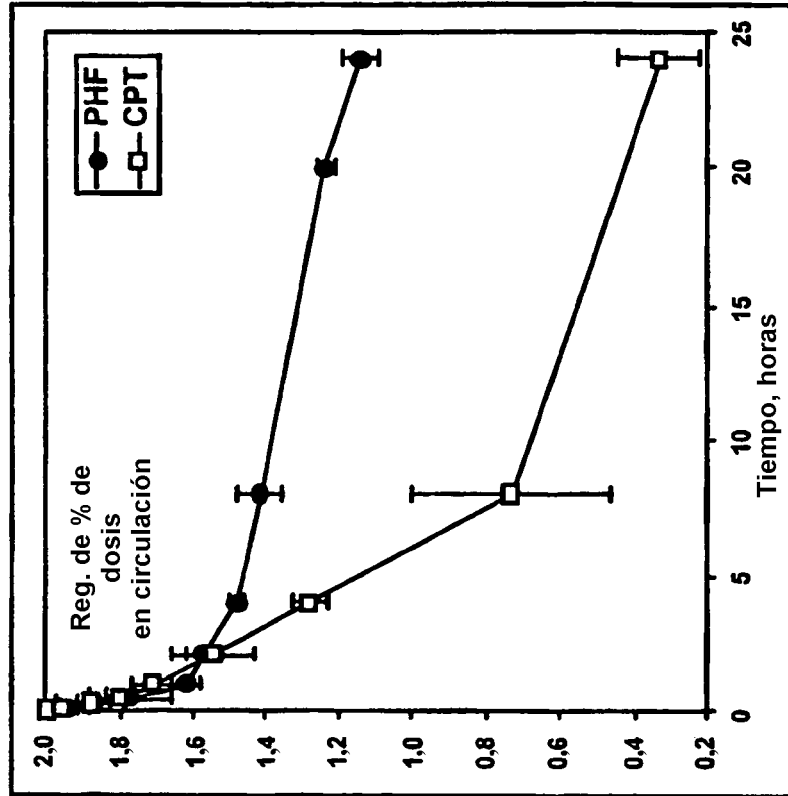


Figura 6

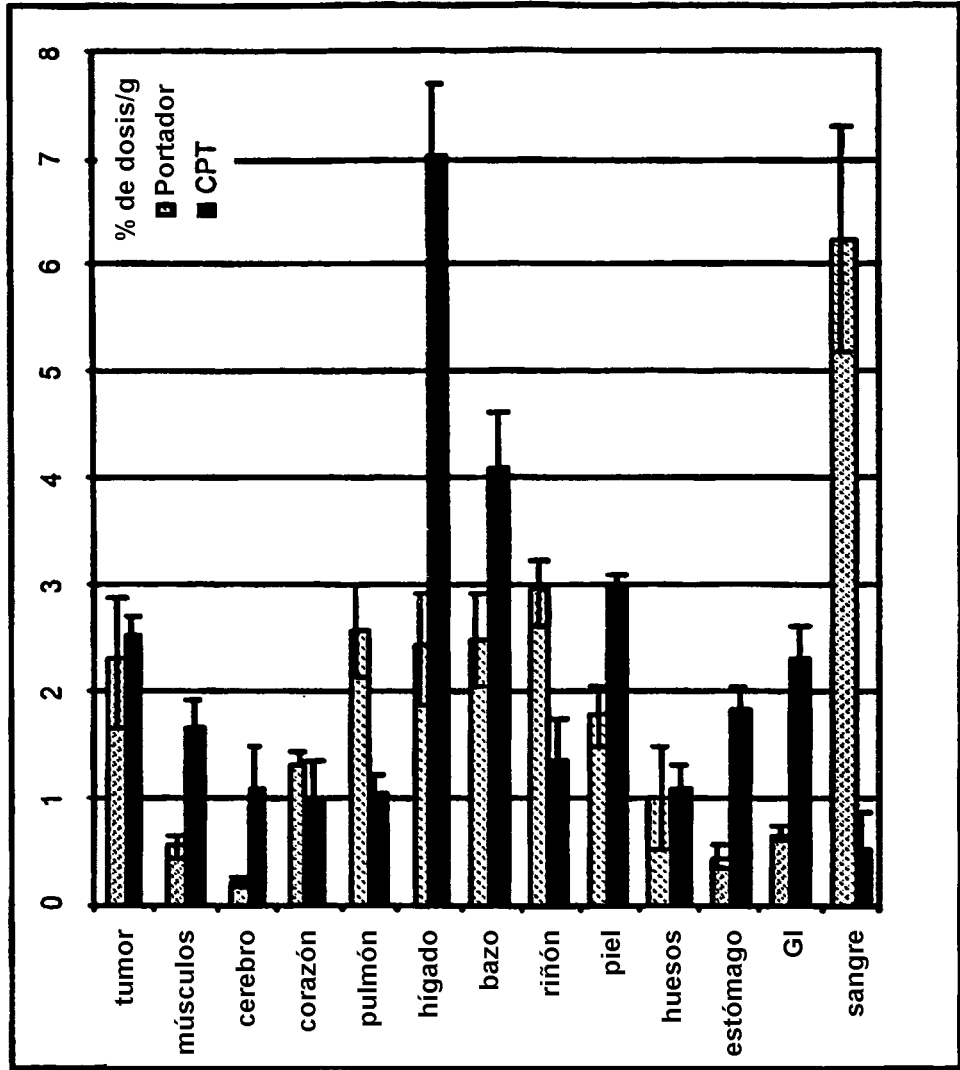


Figura 7

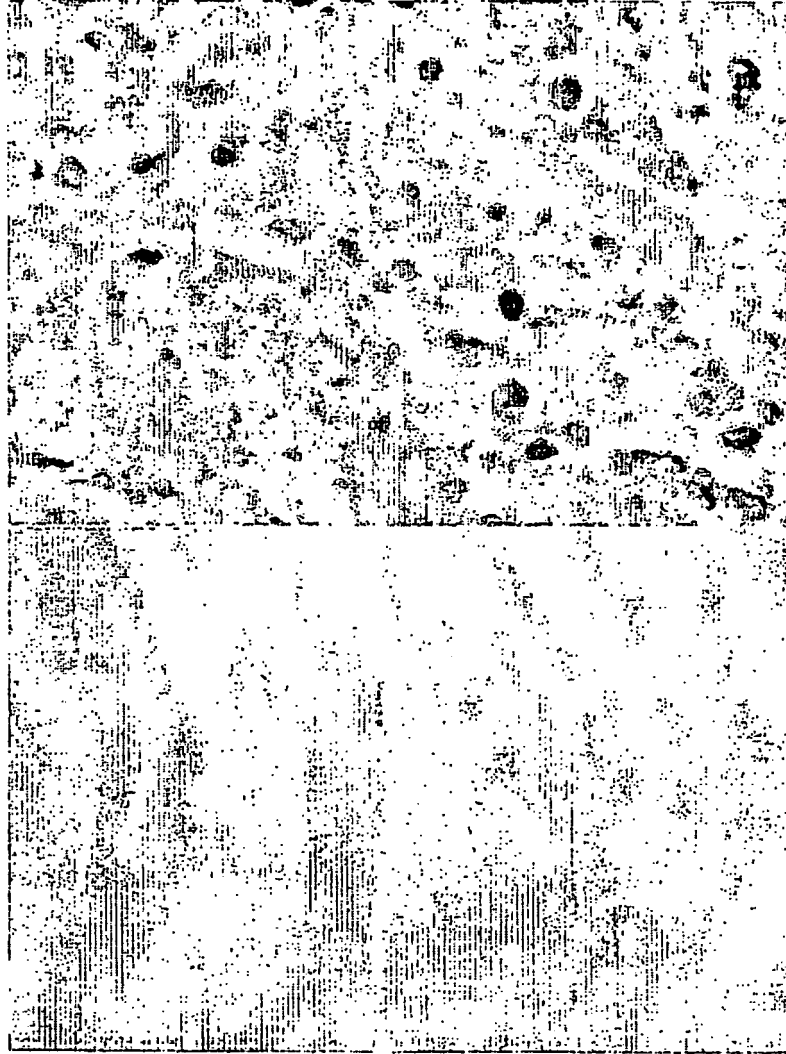


Figura 8

