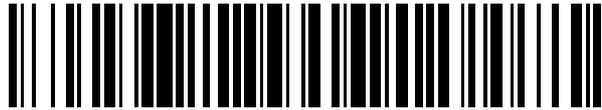


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 461**

51 Int. Cl.:

C08G 69/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2006 E 10004160 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **14.07.2010 EP 2206736**

54 Título: **Conjugados de aminoácidos-poliglutamato y métodos**

30 Prioridad:

05.12.2005 US 742291 P

10.01.2006 US 757917 P

10.04.2006 US 790735 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2013

73 Titular/es:

NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)

1-1-2, Shimohozumi Ibaraki

Osaka 567-8680, JP

72 Inventor/es:

YU, LEI;

ZHAO, GANG;

VAN, SANG;

DAS, SANJIB KUMAR;

FENG, ZHONGLING;

FU, XIAOLI y

WANG, XINGHE

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 461 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 aminoácido-poliglutamato y métodos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

- 5 [0001] En general, esta invención se refiere a polímeros solubles en agua biocompatibles con grupos funcionales colgantes y métodos para prepararlos, y en particular a conjugados de aminoácido-poliglutamato de utilidad en diversas aplicaciones de administración de fármacos, biomoléculas y agentes de imagen.

Descripción de la técnica anterior

- 10 [0002] Se han utilizado diversos sistemas para la administración de fármacos, biomoléculas, y agentes de formación de imágenes. Por ejemplo, dichos sistemas incluyen cápsulas, liposomas, micropartículas, nanopartículas, y polímeros.

- 15 [0003] Se han caracterizado y estudiado diversos sistemas biodegradables basados en poliésteres. El ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) son algunos de los biomateriales mejor caracterizados en cuanto al diseño y rendimiento en aplicaciones de administración de fármacos. Ver Uhrich, K.E.; Cannizzaro, S.M.; Langer, R.S. y Shakeshelf, K.M. "Polymeric Systems for Controlled Drug Release." Chem. Rev. 1999, 99, 3181-3198 y Panyam J, Labhasetwar V. "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue." Adv Drug Deliv Rev. 2003, 55, 329-47). Asimismo, 2-hidroxipropil metacrilato (HPMA) ha sido ampliamente utilizado para obtener un polímero en aplicaciones de administración de fármacos. También se han investigado sistemas biodegradables basados en poliortoésteres. Ver Heller, J.; Barr, J.; Ng, SY; Abdellauoi, KS y Gurny, R. "Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses." Adv. Drug Del. Rev. 2002, 54, 1015-1039. También se han investigado sistemas polianhídrido. Tales polianhídridos son normalmente biocompatibles y pueden degradarse in vivo a compuestos relativamente no tóxicos que se eliminan del cuerpo en forma de metabolitos. Kumar, N.; Langer, R.S. and Domb, A.J. "Polyanhydrides: an overview." Adv. Drug Del. Rev. 2002, 54, 889-91.

- 25 [0004] Los polímeros basados en aminoácidos también se han considerado como una fuente potencial de nuevos biomateriales. Los poli-amino ácidos que tienen buena biocompatibilidad han sido investigados en la liberación de compuestos de bajo peso molecular. Un número relativamente pequeño de ácidos y copolímeros poliglutámicos se han identificado como materiales candidatos para administración de fármacos. Ver Bourke, S.L. and Kohn, J. "Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethylene glycol)." Adv. Drug Del. Rev., 2003, 55, 447- 466.

- 35 [0005] Los fármacos anticancerosos hidrofóbicos y proteínas y polipéptidos terapéuticos administrados con frecuencia tienen mala bio-disponibilidad. Esta pobre biodisponibilidad puede ser debida a la incompatibilidad de soluciones bi-fásicas de fármacos hidrofóbicos y soluciones acuosas y/o la rápida eliminación de estas moléculas de la circulación sanguínea por degradación enzimática. Una técnica para incrementar la eficacia de agentes como proteínas y otras moléculas pequeñas administradas implica conjugar el agente administrado con un polímero, como una molécula de polietilenglicol ("PEG"), que puede proporcionar protección contra la degradación enzimática in vivo. Tal "PEGilación" a menudo mejora el tiempo de circulación y, por tanto, la bio-disponibilidad del agente administrado.

- 40 [0006] Sin embargo, PEG tiene deficiencias en ciertos aspectos. Por ejemplo, debido a que PEG es un polímero lineal, la protección estérica ofrecida por el PEG es limitada, en comparación con polímeros ramificados. Otro defecto de PEG es que es generalmente susceptible de derivatización en sus dos terminales. Esto limita el número de otras moléculas funcionales (por ejemplo, aquellas que son útiles para la liberación de proteínas o fármacos a tejidos específicos) que pueden ser conjugadas con PEG.

- 45 [0007] El ácido poliglutámico (PGA) es otro polímero de elección para solubilizar fármacos anticancerosos hidrofobos. Se ha informado de muchos fármacos anticancerosos conjugados con PGA. Ver Chun Li. "Poly(L-glutamic acid)-anticancer drug conjugates." Adv. Drug Del. Rev., 2002, 54, 695-713. Sin embargo, no hay ninguno aprobado actualmente por la FDA.

- 50 [0008] Paclitaxel, extraído de la corteza del árbol tejo del Pacífico (Wani et al. "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia." J Am Chem Soc. 1971, 93, 2325-7), es un medicamento aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer de ovario y cáncer de mama. Sin embargo, al igual que otros medicamentos anticancerosos, paclitaxel tiene pobre biodisponibilidad debido a su hidrofobicidad y a la insolubilidad en solución acuosa. Una forma de solubilizar paclitaxel es formularlo en una mezcla de Cremophor-EL y etanol anhidro (1:1, v / v) (Sparreboom et al. "Cremophor EL-mediated Alteration of Paclitaxel Distribution in Human Blood: Clinical Pharmacokinetic Implications." Cancer Research 1999, 59, 1454-1457). Esta formulación se comercializa actualmente como Taxol® (Bristol-Myers Squibb). Otro método de solubilizar paclitaxel es por emulsificación usando homogeneización de alto cizallamiento (Constantinides et al.

"Formulation Development and Antitumor Activity of a Filter-Sterilizable Emulsion of Paclitaxel." *Pharmaceutical Research* 2000, 17, 175-182). Recientemente, se han propuesto conjugados polímeros-paclitaxel (Ruth Duncan "The Dawning era of polymer therapeutics." *Nature Reviews Drug Discovery* 2003, 2, 347-360). Más recientemente, paclitaxel se ha formulado en nano-partículas con proteína albúmina humana y ha sido utilizado en estudios clínicos (Damascelli et al. "Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity." *Cancer*. 2001, 92, 2592-602, and Ibrahim et al. "Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel." *Clin Cancer Res.* 2002, 8, 1038-44). Esta formulación se comercializa actualmente como Abraxane® (American Pharmaceutical Partners, Inc.).

[0009] La Imagen por Resonancia Magnética (IRM) es una herramienta importante en el diagnóstico y la estadificación de la enfermedad porque es no es invasiva y no irradiante (ver Bulte et al. "Magnetic resonance microscopy and histology of the CNS." *Trends in Biotechnology* 2002, 20, S24-S28). Si bien pueden ser obtenidas imágenes de los tejidos, IRM con agentes de contraste mejora significativamente su resolución. Sin embargo, los iones metálicos paramagnéticos adecuados para los agentes de contraste para IRM son con frecuencia tóxicos. Uno de los métodos para reducir la toxicidad es quelar estos iones metálicos con moléculas polidentadas como la molécula de pentaacetato de dietilentriamina (DTPA). Gd-DTPA fue aprobado por la FDA en 1988 para usos clínicos, y se comercializa en la actualidad como Magnevist®. Otros quelatos de Gd fueron aprobados por la FDA y comercializados, y muchos otros están en fase de desarrollo. (Ver Caravan et al. "Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications." *Chem. Rev.* 1999, 99, 2293-2352).

[0010] Sin embargo, Gd-DTPA no es ideal para dirigirse a tejidos tumorales, ya que carece de especificidad. Cuando Gd-DTPA es administrado por inyección vía IV, se difunde espontánea y rápidamente en el espacio extravascular de los tejidos. Por lo tanto, suelen ser necesarias grandes cantidades de agentes de contraste para producir imágenes de contraste razonables. Además, es rápidamente eliminado a través de filtración renal. Para evitar la difusión y la filtración, han sido desarrollados agentes macromoleculares de contraste de IRM. (Ver Caravan et al. "Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications." *Chem. Rev.* 1999, 99, 2293-2352). Estos agentes de contraste macromoleculares en IRM incluyen quelatos de proteínas-IRM (ver Lauffer et al. "Preparation and Water Relaxation Properties of Proteins Labeled with Paramagnetic Metal Chelates." *Magn. Reson. Imaging* 1985, 3, 11-16), quelatos polisacárido-IRM (ver Sirlin et al. "Gadolinium-DTPA-Dextran: A Macromolecular MR Blood Pool Contrast Agent." *Acad Radiol.* 2004, 11, 1361-1369), y polímero-IRM quelatos (ver Lu et al. "Poly(Lglutamic acid) Gd(III). DOTA Conjugate with a Degradable Spacer for Magnetic Resonance Imaging." *Bioconjugate Chem* 2003, 14, 715-719, y Wen et al. "Synthesis and Characterization of Poly(L-glutamic acid) Gadolinium Chelate: A New Biodegradable MRI Contrast Agent." *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 1408-14-15).

[0011] Recientemente, se han desarrollado agentes de contraste IRM tejido-específicos (ver Weinmann et al. "Tissue-specific MR contrast agents." *Eur. J. Radiol.* 2003, 46, 33-44). Sin embargo, no se han informado agentes de contraste tumor-específicos en aplicaciones clínicas. Se ha informado que las nanopartículas permiten dirigirlo a tejidos tumorales mediante un efecto de permeación y retención mejoradas (EPR). (ver Brannon-Peppas et al. "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy." *ADDR* 2004, 56, 1649-1659).

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] Los agentes de imagen y fármacos relativamente hidrofóbicos (como ciertos fármacos anticancerosos hidrofóbicos, proteínas y polipéptidos terapéuticos) tienen con frecuencia escasa biodisponibilidad. Se cree que este problema es debido al menos en parte a la escasa solubilidad de estos agentes de imagen y fármacos en sistemas acuosos. Ciertos medicamentos enzimáticamente degradables también tienen una escasa biodisponibilidad debido a que se degradan de forma relativamente rápida en el sistema circulatorio, dando como resultado una rápida eliminación del cuerpo.

[0013] Los inventores han descubierto una serie de nuevos poliglutamato-aminoácidos que son capaces de conjugar a una serie de agentes, tales como agentes de imagen y/o fármacos. En ciertas realizaciones, los polímeros y los conjugados resultantes se acumulan preferentemente en ciertos tejidos (por ejemplo, tejidos tumorales), y por lo tanto son útiles para la administración de fármacos (por ejemplo, fármacos anticancerosos) y/o agentes de imagen a partes específicas del cuerpo (por ejemplo, tumores). En ciertas realizaciones, los polímeros y los polímeros conjugados resultantes forman nanopartículas que solubilizan de forma eficaz el agente de imagen y/o el fármaco en sistemas acuosos dispersándolo a nivel molecular, aumentando así la funcionalidad y/o biodisponibilidad.

[0014] Una realización proporciona un polímero conjugado que comprende una unidad recurrente de la fórmula (I) y una unidad recurrente de la fórmula (II) como se establece a continuación, en donde: cada n es independientemente 1 ó 2; cada A¹ es oxígeno o NR⁵; cada A² es oxígeno; R¹ y R² son seleccionados cada uno independientemente del grupo constituido por alquilo C₁₋₁₀, arilo C₆₋₂₀, amonio, metal alcalino, un ligando polidentado, un precursor de ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidos, y un compuesto que comprende un agente; donde el agente es seleccionado entre el grupo constituido por un fármaco anticanceroso, un agente de orientación, un agente de imagen óptica, y un agente de imagen de resonancia magnética; en donde al menos uno de R¹ y R² es un grupo que

comprende un agente; R³ y R⁴ son seleccionados cada uno independientemente del grupo constituido por hidrógeno, amonio, y un metal alcalino; donde el polímero conjugado comprende una cantidad del agente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 50% (peso/peso) basado en la relación de masa del agente a la del polímero conjugado; R⁵ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄, y donde la cantidad del agente, el porcentaje de la unidad recurrente de fórmula (I) y el porcentaje de la unidad recurrente de fórmula (II) se seleccionan para proporcionar una solubilidad del polímero conjugado que es mayor que la de un conjugado de ácido poliglutámico comparable que comprende sustancialmente la misma cantidad del agente, la solubilidad del polímero conjugado es mayor cuando una solución ensayada de polímero conjugado, que comprende al menos 5 mg/ml de polímero conjugado en solución acuosa 0,9% en peso NaCl a aproximadamente 22°C, tiene mayor claridad óptica en un intervalo de pH más amplio que el de una solución ensayada de conjugado de ácido poliglutámico.

[0015] Otra realización proporciona un método para hacer el polímero conjugado descrito anteriormente, que comprende disolver o disolver parcialmente un reactivo polimérico en un disolvente para formar un reactivo polimérico disuelto o parcialmente disuelto; y reaccionar el reactivo polimérico disuelto o disuelto parcialmente con un segundo reactivo, en el que el segundo reactivo comprende al menos uno seleccionado del grupo constituido por el ligando polidentado, el precursor de ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidos y el compuesto que comprende el agente.

[0016] Otra realización proporciona una composición farmacéutica que comprende el polímero conjugado descrito aquí, y que además comprende al menos uno seleccionado de un excipiente, un portador, y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0017] Otra realización proporciona un método para tratar o aliviar una enfermedad o afección que comprende administrar una cantidad eficaz del polímero conjugado descrito aquí a un mamífero que lo necesita.

[0018] Otra realización proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad o afección que comprende la administración de una cantidad eficaz del conjugado de polímero descrito aquí a un mamífero.

[0019] Otra realización proporciona un uso del polímero conjugado descrito aquí para la preparación de un medicamento para el tratamiento o alivio de una enfermedad o afección.

[0020] Otra realización proporciona un uso del polímero conjugado descrito aquí para la preparación de un medicamento para el diagnóstico de una enfermedad o afección.

[0021] Estas y otras realizaciones se describen con mayor detalle a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0022] La Figura 1 ilustra un esquema de reacción para la preparación de poli-(γ-L-aspartil glutamina).

[0023] La figura 2 ilustra un esquema de reacción para la preparación de ácido poli-(γ-L-aspartil glutamina)-poli-L-glutámico.

[0024] La Figura 3 ilustra otro esquema de reacción para la preparación de poli-(γ-L-aspartil glutamina).

[0025] La Figura 4 ilustra un esquema de reacción para la preparación de poli-(γ-L-glutamil glutamina).

[0026] La Figura 5 ilustra un esquema de reacción para la preparación de ácido poli-(γ-L-glutamil glutamina)-poli-L-glutámico.

[0027] La Figura 6 ilustra un esquema de reacción para la preparación de PGA-97-A- Texas Red.

[0028] La Figura 7 ilustra un esquema de reacción para la preparación de PGA-97-A-DTPA.

[0029] La Figura 8 ilustra un esquema de reacción para la preparación de PGA-97-A-DTPA-Gd (III).

[0030] La Figura 9 ilustra un esquema de reacción general para la preparación de PGA-A-PTX.

[0031] La Figura 10 ilustra un esquema de reacción general para la preparación de PGA-G-PTX.

[0032] La figura 11 muestra las estructuras químicas de ácido C2'-paclitaxel- glutámico y el ácido C7-paclitaxel- glutámico, y sus tiempos para HPLC y LC-MS.

[0033] La Figura 12 ilustra un esquema de reacción para la preparación de PGA-97-G-27.

[0034] La Figura 13 muestra un gráfico que ilustra el efecto de PGA-44-A-20, de PGA-97-20-A, y PGA (97K)-PTX-20 (control) sobre la proliferación de células de melanoma B16F0 a varias concentraciones diferentes del fármaco.

- [0035] La Figura 14 muestra un gráfico que ilustra el efecto de PGA-97-A-10, de PGA (97K)-PTX-10, de la sal sódica de poli-(γ-L-aspartil glutamina), y Taxol sobre la proliferación de células de melanoma B16F0 a varias concentraciones diferentes del fármaco.
- 5 [0036] La figura 15 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones plasmáticas de paclitaxel, de PGA-44-A-19 y de Taxol en tumores de melanoma B16F0 en ratones atímicos nu / nu con el tiempo.
- [0037] La figura 16 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de paclitaxel tumorales de PGA-44-A-19 y Taxol en tumores de melanoma B16F0 ratones atímicos nu / nu con el tiempo.
- 10 [0038] La figura 17 muestra un gráfico que ilustra el cambio en peso corporal (%) tras el tratamiento con PGA-21-G-20, PGA-32-G-20, Abraxane, y solución salina en sus respectivas dosis máximas de tolerancia en ratones atímicos nu / nu con el tiempo.
- [0039] La figura 18 muestra un gráfico que ilustra el efecto antitumoral de PGA-21-G-20, PGA-32-G-20, Abraxane, y solución salina en sus respectivas dosis máximas de tolerancia en los tumores de melanoma B16F0 transformados con EGF en ratones atímicos nu / nu con el tiempo.
- 15 [0040] La figura 19 muestra un gráfico que ilustra el cambio en el peso corporal (%) tras el tratamiento con PGA-97-G-20, Taxol, Abraxane, y solución salina en sus respectivas dosis máximas de tolerancia en ratones atímicos nu / nu con tiempo.
- [0041] La figura 20 muestra un gráfico que ilustra el efecto antitumoral de PGA-97-G-20, Taxol, Abraxane, y solución salina en sus respectivas dosis máximas de tolerancia en los tumores de melanoma B16F0 transformados por EGF en ratones atímicos nu / nu con el tiempo.
- 20 [0042] La Figura 21 muestra un gráfico que ilustra el cambio de peso corporal (%) por tratamiento con PGA-32-G-20, PGA (32k)-PTX-20, y solución salina en sus respectivas dosis máximas de tolerancia en ratones atímicos nu / nu con el tiempo.
- [0043] La figura 22 muestra un gráfico que ilustra efecto antitumoral de la PGA-32-G-20, PGA (32k)-PTX-20, y solución salina en sus respectivas dosis máximas de tolerancia en tumores de melanoma B16F0 transformados por EGF en ratones atímicos nu / nu con el tiempo.
- 25 [0044] La figura 23 muestra un gráfico que ilustra la liberación de paclitaxel en el tiempo a una concentración de 2 mg por ml de conjugados polímero-paclitaxel en tampones de fosfato.
- [0045] La Figura 24 muestra un gráfico que ilustra la concentración de paclitaxel en el plasma de PGA-21-G-19, PGA-32-G-19, PGA-97-G-24, y taxol con el tiempo.
- 30 [0046] La Figura 25 muestra un gráfico que ilustra la concentración de paclitaxel en un tumor de PGA-21-G-19, PGA-32-G-19, PGA-97-G-24, y taxol con el tiempo.
- [0047] Figura 26 muestra un gráfico que ilustra el efecto de acumulación tumoral de PGA-97-A-DTPA-Gd (III) y OMNISCAN™ (gadodimide) en tumores de melanoma B16F0 en ratones atímicos nu / nu con el tiempo.
- 35 [0048] Figura 27 ilustra una copia de una fotografía de la imagen de microscopía electrónica fracturada por congelación de PGA-44-A-20.
- [0049] La figura 28 muestra un gráfico que ilustra la dispersión de luz estática (tamaño de partícula) frente a la concentración de PGA-44-A-20 y PGA-97-A-20.
- [0050] La figura 29 muestra un gráfico que ilustra la dispersión de luz estática (tamaño de partícula) frente a la concentración de la PGA-21-G-20 y PGA-32-G-20.
- 40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS
- [0051] El término "éster" se utiliza aquí en su sentido ordinario, y por lo tanto incluye una fracción química con la fórmula $-(R)_n\text{-COOR}'$, donde R y R' son seleccionados independientemente del grupo constituido por alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) y heteroalíclico (unido a través de un carbono del anillo), y donde n es 0 o 1.
- 45 [0052] El término "amida" se utiliza aquí en su sentido ordinario, y por lo tanto incluye una fracción química con la fórmula $-(R)_n\text{C(O)NHR}'$ o $-(R)_n\text{-NHC(O)R}'$ donde R y R' son seleccionados independientemente del grupo constituido por alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, (unido a través de un carbono del anillo) y heteroalíclico (unido a través de un carbono del anillo), y donde n es 0 ó 1. Una amida puede estar incluida en un aminoácido o una molécula de péptido unida a la molécula de fármaco como se describe aquí, formando con ello un profármaco.

[0053] Cualquier cadena lateral con un grupo amino, hidroxilo, o carboxilo en los compuestos aquí descritos puede ser esterificada o amidificada. Los procedimientos y los grupos específicos que se utilizan para lograr este fin son conocidos por los expertos en la técnica y fácilmente se pueden encontrar en las fuentes de referencia tales como Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999, que se incorpora aquí en su totalidad.

[0054] Como se usa aquí, "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que comprende un grupo hidrocarburo totalmente saturado (sin dobles o triples enlaces). El grupo alquilo puede tener de 1 a 20 átomos de carbono (siempre que aparezca en este documento, un intervalo numérico como "1 a 20" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "1 a 20 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede constar de 1 átomo de carbono, de 2 átomos de carbono, de 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 20 átomos de carbono, aunque la presente definición cubre también la aparición del término "alquilo" donde no se designa intervalo numérico). El grupo alquilo puede ser también un alquilo de tamaño medio con 1 a 10 átomos de carbono. El grupo alquilo también podría ser un alquilo inferior con 1 a 5 átomos de carbono. El grupo alquilo de los compuestos puede ser designado como "alquilo C₁-C₄" o designaciones similares. A modo de ejemplo solamente, "alquilo C₁-C₄" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena alquilo, es decir, la cadena alquilo se selecciona del grupo que consta de un grupo metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero no están de ninguna manera limitados a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo, y similares.

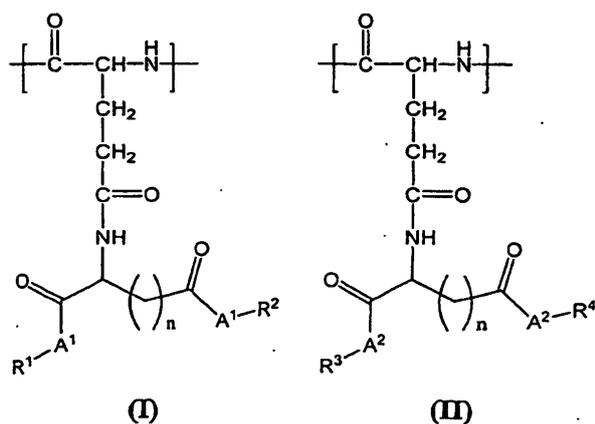
[0055] El grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente (s) es (son) uno o más grupo (s) seleccionados de forma individual e independiente entre alquenoilo, alquinoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, cicloalquinoilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, aralquilo, heteroaralquilo, (heteroalíclico) alquilo, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxi, ariloxi, acilo, éster, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halógeno, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxi, C-carboxi protegido, O-carboxi, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, sililo, sulfenilo, sulfinilo, sulfonilo, haloalquilo, haloalcoxi, trihalometanosulfonil, trihalometanosulfonamido, y amino, incluyendo grupos amino mono y di-sustituidos, y los derivados protegidos de los mismos. Dondequiera que un sustituyente es descrito como siendo "opcionalmente sustituido" ese sustituyente puede estar sustituido con uno de los sustituyentes anteriores.

[0056] Un "quelato de metal paramagnético" es un complejo en el que está enlazado un ligando a un ion metálico paramagnético. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA)-Gd (III), DOTA-Itrio-88, DOTA-Indio-111, ácido dietilentriaminopentacético (DTPA)-Gd (III), DTPA-Itrio-88, DTPA-indio-111.

[0057] Un "ligando polidentado" es un ligando que puede unirse a través de dos o más puntos de fijación a un ion metálico a través de, por ejemplo, enlaces covalentes coordinados. Ejemplos de ligandos polidentados incluyen, pero no se limitan a, ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), (1,2-etanodiidinitrilo) tetraacetato (EDTA), etilendiamina, 2,2'-bipiridina (bipi), 1,10-fenantrolina (fen), 1,2-bis (difenilfosfina) etano (DPPE), 2,4-pentanodiona (acac), y etanodioato (ox).

[0058] Un "precursor de ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidos" es un ligando polidentado que comprende átomos de oxígeno, tales como los átomos de oxígeno unidos por enlace simple de grupos carboxilo, los cuales están protegidos con grupos protectores adecuados. Los grupos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo inferiores, benzilo y sililo.

[0059] Una realización proporciona un polímero conjugado que comprende una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II):



en donde cada n es 2, cada A^1 es oxígeno o NR^5 , cada A^2 es oxígeno, R^1 y R^2 son seleccionados cada uno independientemente del grupo que consta de un metal alcalino, un ligando polidentado, y un compuesto que comprende un agente. Ejemplos de metales alcalinos incluyen litio (Li), sodio (Na), potasio (K), rubidio (Rb), y cesio (Cs). En una realización, el metal alcalino es sodio.

5 [0060] El agente puede comprender cualquier número de compuestos activos. Por ejemplo, el agente puede seleccionarse del grupo que consta de un fármaco contra el cáncer y un agente formador de imágenes por resonancia magnética. Al menos uno de los grupos R^1 y R^2 es un grupo que comprende el agente. La unidad recurrente de fórmula (II) puede o no comprender un agente. En una realización, R^3 y R^4 son seleccionados cada uno independientemente del grupo que consta de hidrógeno, amonio y un metal alcalino. En otra realización, R^5 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-4} .

[0061] La cantidad de agente presente en el polímero conjugado puede variar en un amplio intervalo. En una realización, el polímero conjugado comprende una cantidad del agente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 50% (peso/peso) basado en la relación de masa del agente al polímero conjugado. En otra realización, el polímero conjugado comprende una cantidad del agente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 40% (peso/peso) basado en la relación de masa del agente al polímero conjugado. En otra realización, el polímero conjugado comprende una cantidad del agente en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 30% (peso/peso) basado en la relación de masa del agente al polímero conjugado.

[0062] Actualmente se ha encontrado que la cantidad del agente y las cantidades porcentuales de las unidades recurrentes de fórmula (I) y fórmula (II) se pueden seleccionar para controlar ventajosamente la solubilidad del polímero conjugado resultante. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, la cantidad del agente y las cantidades porcentuales de las unidades recurrentes de fórmula (I) y fórmula (II) se seleccionan de manera que el polímero conjugado es soluble (o insoluble) a un pH determinado y/o intervalo de pH de interés. En algunas realizaciones, se selecciona también el peso molecular del polímero para controlar la solubilidad. Los ejemplos que figuran a continuación ilustran el control sobre la solubilidad mediante la selección apropiada de la cantidad del agente, las cantidades porcentuales de las unidades recurrentes de fórmula (I) y fórmula (II), y el peso molecular. Los expertos en la técnica, informados por la orientación proporcionada en este documento, pueden utilizar experimentos de rutina para determinar las cantidades adecuadas del agente y las cantidades porcentuales de las unidades recurrentes de fórmula (I) y fórmula (II) que dan como resultado un polímero conjugado con las características de solubilidad deseadas. Tal control sobre la solubilidad puede ser ventajoso, dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, las realizaciones de polímeros conjugados proporcionadas en este documento se pueden utilizar para proporcionar una mejor administración de los fármacos anticancerosos de otro modo poco solubles en los tejidos seleccionados, preferiblemente reduciendo efectos secundarios no deseados, y/o reduciendo la frecuencia con la que un sujeto necesita tomar el medicamento contra el cáncer.

[0063] La cantidad del agente y las cantidades porcentuales de las unidades recurrentes de la fórmula (I) y fórmula (II) se seleccionan preferiblemente para proporcionar una solubilidad del polímero conjugado que es mayor que la de un conjugado de ácido poliglutámico comparable que comprende sustancialmente la misma cantidad del mismo agente. En una realización, la solubilidad del polímero conjugado es mayor que la de un conjugado de ácido poliglutámico comparable. La solubilidad se mide mediante la formación de una solución de polímero conjugado que comprende al menos 5 mg/ml de polímero conjugado en solución acuosa 0,9% en peso de NaCl a aproximadamente 22°C, y determinando la claridad óptica. La claridad óptica se puede determinar turbidimétricamente, por ejemplo, por observación visual o por métodos instrumentales apropiados conocidos por los expertos en la técnica. La comparación de la solubilidad resultante con la de una solución similarmente formada por un conjugado de ácido poliglutámico muestra una solubilidad mejorada como se evidencia por una mayor claridad óptica en un intervalo más amplio de valores de pH. Así, la solubilidad de un polímero conjugado es mayor que la de un conjugado de ácido poliglutámico comparable que comprende sustancialmente la misma cantidad del agente cuando una solución ensayada de polímero conjugado, que comprende al menos 5 mg/ml del polímero conjugado en solución acuosa 0,9% en peso NaCl a aproximadamente 22°C, tiene mayor claridad óptica en un intervalo de pH más amplio que la de una solución ensayada comparable de conjugado de ácido poliglutámico. Los expertos en la técnica comprenderán que un conjugado de ácido poliglutámico "comparable" es un material de control en el que la porción polimérica del conjugado tiene un peso molecular que es aproximadamente el mismo que el del polímero conjugado objeto (que comprende una unidad recurrente del fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II)) a la que se compara.

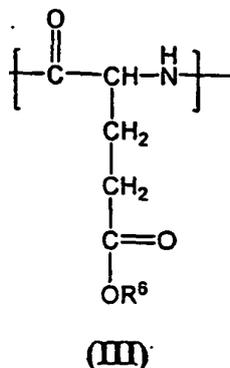
[0064] El polímero conjugado puede contener uno o más átomos de carbono quirales. El carbono quiral (que puede estar indicado con un asterisco *) puede tener la configuración denominada *rectus* (derecha) o *sinister* (izquierda), y por lo tanto la unidad recurrente puede ser racémica, enantiomérica o enriquecida enantioméricamente. Los símbolos de "n" y "*" (que designa un carbono quiral), tal como se utilizan aquí, tienen el mismo significado que se especificó anteriormente, a menos que se indique lo contrario.

[0065] Los polímeros que comprenden una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II) son copolímeros que comprenden dos o más unidades diferentes recurrentes de fórmula (I) y fórmula (II). Además, los polímeros que comprenden una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II) pueden ser copolímeros que comprenden otras unidades recurrentes que no tienen la fórmula (I) ni la fórmula (II). El número

de unidades recurrentes de fórmula (I) y unidades recurrentes de fórmula (II) en el polímero no está limitado, pero está preferiblemente en el intervalo de unas 50 a unas 5.000, y más preferiblemente de unas 100 a unas 2.000.

[0066] Una amplia variedad de otras unidades recurrentes puede estar incluida en el polímero conjugado con la unidad recurrente de fórmula (I) y la unidad recurrente de fórmula (II). En una realización, el polímero conjugado comprende además una unidad recurrente de fórmula (III):

5



en donde el grupo R^6 es hidrógeno, amonio, o un metal alcalino. Cuando el grupo R^6 es hidrógeno, entonces la unidad recurrente de fórmula (III) es una unidad recurrente de ácido glutámico

10 [0067] El compuesto que comprende el agente puede estar conjugado con el polímero de muchas maneras diferentes. En una realización, el compuesto que comprende el agente puede estar conectado directamente a la unidad recurrente. En otra realización, el compuesto que comprende el agente comprende además un grupo enlazador. Un grupo enlazador es un grupo que une el agente (o el compuesto que comprende el agente) al polímero. El grupo enlazador puede ser relativamente pequeño. Por ejemplo, el grupo enlazador puede comprender una amina, una amida, un éter, un éster, un grupo hidroxilo, un grupo carbonilo, o un grupo tiol. Alternativamente, el grupo enlazador puede ser relativamente grande. Por ejemplo, el grupo enlazador puede comprender un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo arilo, un grupo arilo (alquilo C_{1-6}), un grupo heteroarilo, o un grupo heteroarilo (alquilo C_{1-6}).

15

20 [0068] El agente puede comprender cualquier tipo de compuesto activo. En una realización, el agente puede ser un agente de imagen óptica. En una realización preferida, el agente de imagen óptica es uno o más seleccionados del grupo que consta de un colorante de acridina, un colorante de cumarina, un colorante de rodamina, un colorante de xanteno, un colorante de cianina y un colorante de pireno. Por ejemplo, agentes específicos de formación de imágenes pueden incluir Texas Red, colorante Alexa Fluor®, colorante BODIPY®, fluoresceína, colorante Oregon Green®, y colorante Rhodamine Green™, que están disponibles comercialmente o se preparan fácilmente por métodos conocidos por los expertos en la técnica.

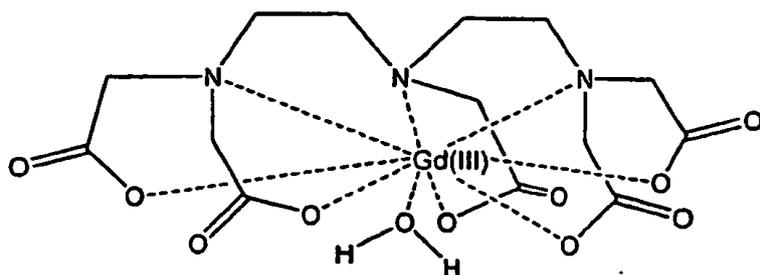
25

30 [0069] En otra realización, el agente comprende un fármaco contra el cáncer. En una realización, el fármaco contra el cáncer puede ser seleccionado del grupo que consta de un taxano, camptotecina y doxorubicina. Cuando el agente comprende taxano, es preferible que el taxano sea paclitaxel o docetaxel. Paclitaxel puede ser conjugado con la unidad recurrente de fórmula (I) o la unidad recurrente de fórmula (II) en el átomo de oxígeno a través del carbono-C2' del paclitaxel. Alternativamente, o además, el paclitaxel se puede conjugar con la unidad recurrente de fórmula (I) o la unidad recurrente de fórmula (II) en el átomo de oxígeno a través del carbono-C7 del paclitaxel.

30

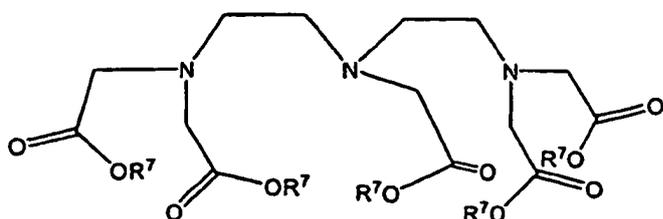
35 [0070] En otra realización, el agente comprende un agente de imagen por resonancia magnética. En una realización, el agente de imagen por resonancia magnética comprende un compuesto de metal paramagnético. Por ejemplo, el agente de imagen por resonancia magnética puede comprender un compuesto de Gd (III). En tal caso, el compuesto de Gd (III) puede ser:

35



[0071] En otra realización, el agente comprende un ligando polidentado. En una realización, el ligando polidentado pueden ser capaz de reaccionar con un metal paramagnético para formar un agente de imagen por resonancia magnética. Por ejemplo, el ligando polidentado puede comprender varios grupos de ácido carboxílico y/o grupos carboxilato. En una realización, el ligando polidentado comprende un compuesto de la siguiente estructura:

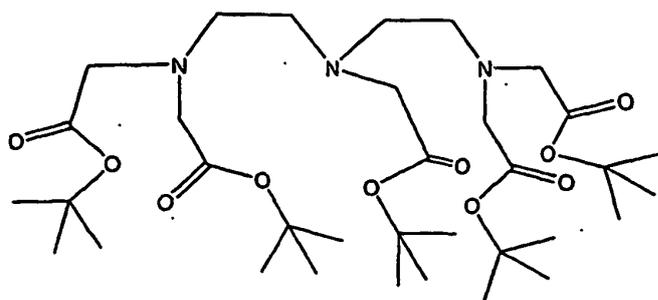
5



en donde cada R^7 es independientemente hidrógeno, amonio, o un metal alcalino.

[0072] En otra realización, el agente comprende un precursor de ligando polidentado. En tal realización, los átomos de oxígeno del ligando polidentado están protegidos por un grupo protector adecuado. Los grupos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo inferior, bencilos, y sililo. Un ejemplo de un precursor de ligando polidentado que tiene grupos protectores se proporciona como sigue:

10



15

[0073] El porcentaje de unidades recurrentes de fórmula (I) en el polímero conjugado, en base al número total de unidades recurrentes, puede variar en un amplio intervalo. En una realización, el polímero puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 99% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I), en base a los moles totales de unidades recurrentes de las fórmulas (I) y (II). En otra realización, el polímero puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 50% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base al total de moles de unidades recurrentes de las fórmulas (I) y (II). En otra realización, el polímero puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 30% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base a los moles totales de unidades recurrentes de las fórmulas (I) y (II). En otra realización, el polímero puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 20% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base a los moles totales de unidades recurrentes de las fórmulas (I) y (II). En otra realización, el polímero puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 10% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base a los moles totales de unidades recurrentes de fórmulas (I) y (II).

20

25

[0074] Además de las unidades recurrentes de fórmulas (I) y (II), el polímero conjugado puede comprender una variedad de otras unidades recurrentes. Por ejemplo, en una realización, el polímero conjugado comprende unidades recurrentes de fórmula (III). El porcentaje de unidades recurrentes de fórmula (I), en base al número total

30

de unidades recurrentes en un polímero conjugado que comprende unidades recurrentes de fórmulas (I), (II), y (III), puede variar en un amplio intervalo. En una realización, el polímero conjugado puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 99% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base a los moles totales de unidades recurrentes de fórmulas (I), (II) y (III). En otra realización, el polímero conjugado puede comprender aproximadamente 1 % en moles a aproximadamente 50% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base a los moles totales de unidades recurrentes de fórmulas (I), (II) y (III). En otra realización, el conjugado de polímero puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 30% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base a los moles totales de unidades recurrentes de fórmulas (I), (II) y (III). En otra realización, el polímero conjugado puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 20% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base a los moles totales de unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II) y (III). En otra realización, el polímero conjugado puede comprender aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 10% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) en base a los moles totales de unidades recurrentes de fórmulas (I), (II) y (III).

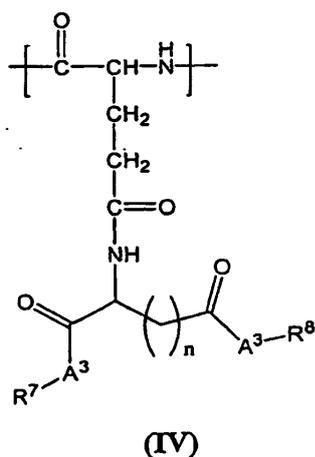
[0075] En una realización, al menos un n en la unidad recurrente de fórmula (I) y la unidad recurrente de fórmula (II) es 1. En otra realización, al menos un n en la unidad recurrente de fórmula (I) y la unidad recurrente de fórmula (II) es 2.

[0076] En una realización, la cantidad del agente, el porcentaje de la unidad recurrente de fórmula (I) y el porcentaje de la unidad recurrente de fórmula (II) en el polímero conjugado se seleccionan para proporcionar una solubilidad del polímero conjugado que es mayor que la de un conjugado de ácido poliglútamico comparable que comprende sustancialmente la misma cantidad del agente. El intervalo de valores de pH en los que el polímero conjugado, que comprende unidades recurrentes de fórmula (I) y fórmula (II), tiene una mayor solubilidad que la de un conjugado de ácido poliglútamico comparable puede ser estrecho o amplio. Como se señaló anteriormente, la solubilidad se mide mediante la formación de una solución de polímero conjugado que comprende al menos 5 mg/ml del polímero conjugado en solución acuosa 0,9% en peso NaCl a aproximadamente 22°C, y determinando la claridad óptica. En una realización, el polímero conjugado es soluble en un intervalo de pH de al menos unas tres unidades de pH. En otra realización, el polímero conjugado es soluble en un intervalo de pH de al menos unas 8 unidades de pH. En otra realización, el conjugado polímero es soluble en un intervalo de pH de al menos unas 9 unidades de pH. En otra realización, el intervalo de pH durante el cual el polímero conjugado es soluble incluye al menos un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, por ejemplo, a pH = 2, pH = 3, pH = 4 y/o pH = 5. Preferiblemente, el intervalo de pH en el cual el polímero conjugado es soluble es más amplio que el intervalo de pH en el que el conjugado de ácido poliglútamico comparable es soluble. Por ejemplo, en una realización, el polímero conjugado es soluble en un intervalo de pH que es al menos aproximadamente una unidad de pH más amplio, preferiblemente al menos aproximadamente dos unidades de pH más amplio, que el intervalo de pH en el cual el conjugado de ácido poliglútamico comparable es soluble.

[0077] La cantidad de polímero conjugado colocado en solución para medir solubilidad también puede variar enormemente. En una realización, la solubilidad se mide cuando la solución ensayada del polímero conjugado comprende al menos aproximadamente 5 mg/ml de polímero conjugado. En otra realización, la solubilidad se mide cuando la solución ensayada del polímero conjugado comprende al menos aproximadamente 10 mg/ml de polímero conjugado. En otra realización, la solubilidad se mide cuando la solución ensayada del polímero conjugado comprende al menos aproximadamente 25 mg/ml de polímero conjugado. En otra realización, la solubilidad se mide cuando la solución ensayada del polímero conjugado comprende al menos aproximadamente 100 mg/ml de polímero conjugado. En otra realización, la solubilidad se mide cuando la solución ensayada del polímero conjugado comprende al menos aproximadamente 150 mg/ml de polímero conjugado. Los expertos en la materia entenderán que el conjugado de ácido poliglútamico comparable es ensayado a aproximadamente la misma concentración que la del polímero conjugado ensayado.

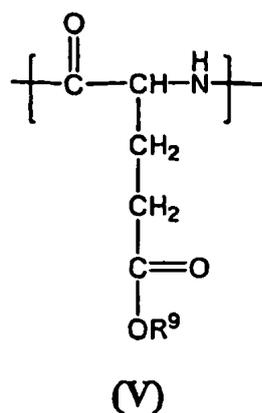
[0078] Los polímeros que comprenden una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II) se pueden preparar de diversas maneras. En una realización, un reactivo polimérico se disuelve o es parcialmente disuelto en un disolvente para formar un reactivo polimérico disuelto o parcialmente disuelto. El reactivo polimérico disuelto o parcialmente disuelto se hace reaccionar entonces con un segundo reactivo para formar un producto intermedio o, en algunas realizaciones, un polímero que comprende una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II).

[0079] El reactivo polimérico puede comprender cualquier material adecuado capaz de formar un polímero que comprende una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II). En una realización, el reactivo polimérico comprende una unidad recurrente de fórmula (IV):



en donde cada n es independientemente 1 ó 2, cada A³ es oxígeno, y R⁷ y R⁸ son cada uno independientemente seleccionados del grupo que consta de un hidrógeno, amonio, y un metal alcalino.

- 5 [0080] En una realización, el reactivo polimérico puede comprender una unidad recurrente de fórmula (V):

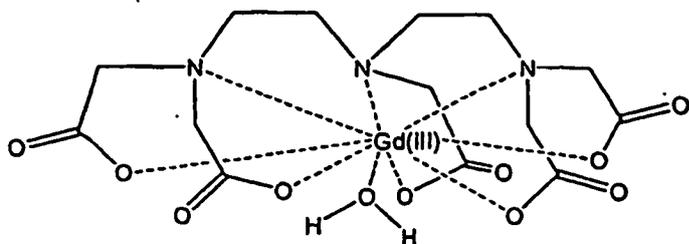


en donde R9 es hidrógeno, amonio, o un metal alcalino.

- 10 [0081] El segundo reactivo puede ser una variedad de compuestos. En una realización, el segundo reactivo comprende al menos uno seleccionado del grupo que consta de un ligando polidentado, un precursor de ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidos, y un compuesto que comprende un agente. En una realización, el segundo reactivo puede comprender un sustituyente. El sustituyente puede ser seleccionado entre el grupo formado por hidroxilo y una amina.
- 15 [0082] En una realización, el segundo reactivo comprende un compuesto que contiene un agente. El agente puede ser cualquier compuesto activo. Por ejemplo, el compuesto que comprende el agente puede estar seleccionado entre el grupo que consta de un fármaco anticanceroso, un agente de focalización, un agente de imagen óptica, y un agente formador de imágenes por resonancia magnética. En una realización, el agente de imagen óptica puede ser seleccionado del grupo que consta de un tinte de acridina, un colorante de cumarina, un colorante de rodamina, un tinte de xanteno, colorante de cianina, y un colorante pireno. En otra realización, el fármaco contra el cáncer puede ser seleccionado del grupo que consta de un taxano, camptotecina y doxorubicina. En una realización preferida, el fármaco contra el cáncer puede comprender taxano, y el taxano se puede seleccionar entre el grupo que consta de paclitaxel y docetaxel.
- 20 [0083] Paclitaxel puede estar conjugado con el polímero de diversas maneras. En una realización, el paclitaxel se conjuga con la unidad recurrente de fórmula (I) en el átomo de oxígeno unido al carbono C2'. En otra realización, el paclitaxel está conjugado con la unidad recurrente de fórmula (I) en el átomo de oxígeno unido al carbono C7.
- 25

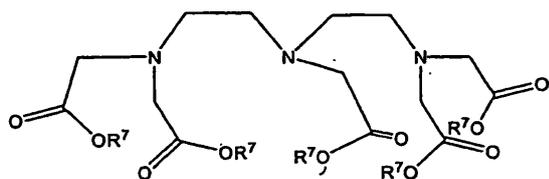
[0084] En una realización, el compuesto que comprende el agente comprende un agente de imagen por resonancia magnética. En otra realización, el agente de imagen por resonancia magnética comprende un compuesto con un metal paramagnético. Preferiblemente, el compuesto que comprende el agente comprende un compuesto de Gd (III). Por ejemplo, el compuesto que comprende el agente puede comprender la siguiente estructura:

5



[0085] En una realización, un ligando polidentado se puede conjugar con el polímero. Cualquier ligando polidentado adecuado puede ser utilizado. En una realización, el ligando polidentado puede ser capaz de reaccionar con un metal paramagnético para formar un agente de imagen por resonancia magnética. Por ejemplo, el ligando polidentado puede comprender varios grupos de ácido carboxílico y/o grupos carboxilato. Por ejemplo, un ligando polidentado de la siguiente estructura se puede conjugar con el polímero:

10

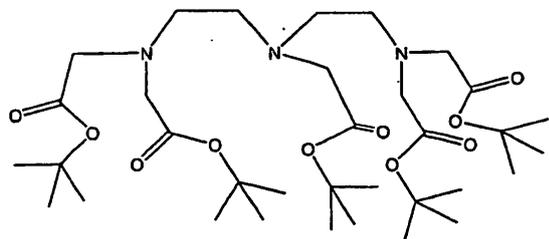


15

en donde cada R^7 es independientemente hidrógeno, amonio, o un metal alcalino.

[0086] En otra realización, un precursor de ligando polidentado con grupos protectores puede estar conjugado con el polímero. Tal precursor tiene sus átomos de oxígeno protegidos por un grupo(s) protector adecuado(s). Los grupos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo inferiores, bencilos y silylo. Un ejemplo de un precursor de ligando polidentado con grupos protectores se proporciona como sigue:

20



[0087] En una realización, un método de hacer el polímero conjugado comprende la reacción del reactivo polimérico disuelto o disuelto parcialmente con el segundo reactivo en presencia de un agente de acoplamiento. Cualquier agente de acoplamiento adecuado puede ser utilizado. En una realización, el agente de acoplamiento se selecciona del grupo que consta de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,1'-carbonil-diimidazol (CDI), N,N'-disuccinimidil carbonato (DSC), N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b] piridina-1-il-metilen]-N-metilmetanaminio hexafluorofosfato N-óxido (HATU), 2-[(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio hexafluorofosfato (HBTU), 2-[(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio hexafluorofosfato (HCTU), benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP®), bromo-tris-pirrolidino-fosfonio

30

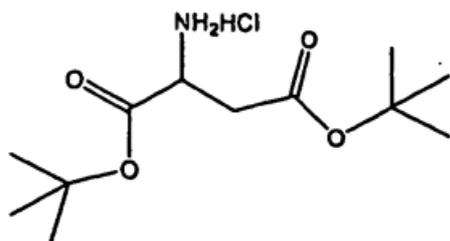
(PyBroP ®), 2 - [(1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametilaminio tetrafluoroborato (TBTU), y benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino) fosfonio (BOP).

5 [0088] Cualquier disolvente adecuado que permita que la reacción tenga lugar puede ser utilizado. En una realización, el disolvente puede ser un disolvente polar aprótico. Por ejemplo, el disolvente se puede seleccionar del grupo que consta de N, N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), N-metil-2-piridona (NMP), y N, N-dimetilacetamida (DMAc).

[0089] En otra realización, la reacción puede comprender, además la reacción del reactivo polimérico disuelto o parcialmente disuelto en presencia de un catalizador. Cualquier catalizador que promueva la reacción puede ser utilizado. En una realización, el catalizador puede comprender 4-dimetilaminopiridina (DMAP).

10 [0090] En una realización, un polímero que comprende una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II) puede ser producido a partir de ácido poliglutámico y un aminoácido tal como ácido aspártico y/o glutámico. Alternativamente, en otra realización, el polímero puede ser creado convirtiendo primero el material de partida, ácido poliglutámico en su forma de sal. La forma de sal del ácido poliglutámico puede obtenerse por
15 reacción de ácido poliglutámico con una base adecuada, por ejemplo, bicarbonato de sodio. Un resto de aminoácido se puede unir al grupo de ácido carboxílico colgante del ácido poliglutámico. El peso molecular medio de ácido poliglutámico no está limitado, pero es preferiblemente de unos 10.000 a unos 500.000 daltons, y más preferiblemente de unos 25.000 a unos 300.000 daltons. Tal reacción puede ser utilizada para crear poli-(γ-L-aspartil-glutamina) o poli-(γ-L-glutamil-glutamina).

20 [0091] En una realización, el amino ácido está protegido por un grupo protector antes de la fijación al ácido poliglutámico. Un ejemplo de resto de aminoácido protegido adecuado para esta reacción es el hidrocloreto del éster del ácido L-aspártico de di-t-butilo, que se muestra a continuación:



éster del ácido L-aspártico de di-t-butilo

25 [0092] La reacción del ácido poliglutámico con el aminoácido puede tener lugar en presencia de cualquier disolvente adecuado. En una realización, el disolvente puede ser un disolvente aprótico. En una realización preferida, el disolvente es N, N'-dimetilformamida.

[0093] En una realización, puede ser utilizado un agente de acoplamiento tal como EDC, DCC, CDI, DSC, HATU, HBTU, HCTU, ® PyBOP, PyBroP ®, TBTU, y BOP. En otras realizaciones, el ácido poliglutámico y un aminoácido pueden reaccionar usando un catalizador (por ejemplo, DMAP).

30 [0094] Una vez completada la reacción, si los átomos de oxígeno del aminoácido están protegidos, los grupos protectores se pueden eliminar mediante métodos conocidos tales como el uso de un ácido adecuado (por ejemplo, ácido trifluoroacético). Si se desea, la forma salina del polímero obtenido a partir de la reacción de ácido poliglutámico con el aminoácido se puede formar por el tratamiento de la forma ácida del polímero con una solución básica adecuada, por ejemplo, solución de bicarbonato sódico.

35 [0095] El polímero se puede recuperar y/o purificar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el disolvente puede ser eliminado por medios adecuados, por ejemplo, por evaporación rotatoria. Adicionalmente, la mezcla de reacción puede ser filtrada en una solución ácida en agua para inducir la precipitación. El precipitado resultante puede ser filtrado, y lavado con agua.

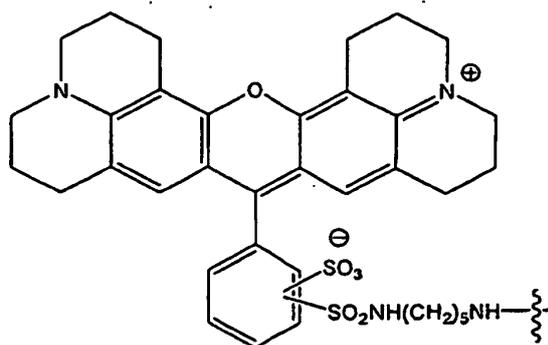
40 [0096] En una realización, un polímero que comprende una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II) también puede incluir una unidad recurrente de fórmula (III) como se expuso anteriormente. Un método para formar un polímero que comprende unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II), y (III) es iniciando con ácido poliglutámico y haciéndolo reaccionar con un aminoácido tal como ácido aspártico y/o glutámico, en una cantidad que es inferior a 1,0 equivalentes de un aminoácido basado en ácido poliglutámico. Por ejemplo, en una
45 realización, 0,7 equivalentes de un aminoácido basado en ácido poliglutámico pueden hacerse reaccionar con ácido poliglutámico, de modo que alrededor del 70% de las unidades recurrentes del polímero resultante comprenden el aminoácido. Como se discutió anteriormente, los átomos de oxígeno del aminoácido se pueden proteger mediante

un grupo protector adecuado. En una realización, el aminoácido puede ser ácido L-aspartico o ácido L-glutámico. En otra realización, los átomos de oxígeno de los aminoácidos pueden ser protegidos con grupos t-butilo. Si los átomos de oxígeno del aminoácido están protegidos, los grupos protectores se pueden eliminar utilizando métodos conocidos tales como un ácido adecuado (por ejemplo, ácido trifluoroacético).

5 [0097] La conjugación de un grupo que comprende un agente, un ligando polidentado, y/o un precursor de ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidos al ácido de polímero o su forma de sal puede llevarse a cabo de varias maneras, por ejemplo, por unión covalente del grupo que comprende un agente, un ligando polidentado, y/o un precursor ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidas a diversos polímeros. Un método para conjugar los grupos antes mencionados al polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o la sal es mediante el uso de calor (por ejemplo, calor utilizando un método de microondas). Alternativamente, la conjugación puede tener lugar a temperatura ambiente. Disolventes apropiados, agentes de acoplamiento, catalizadores y/o tampones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica y/o como se describe aquí pueden ser utilizados para formar el polímero conjugado. Al igual que con el ácido poliglutámico, tanto la forma de sal o de ácido del polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido puede ser utilizada como material de partida para formar el polímero conjugado.

[0098] Los agentes adecuados que pueden ser conjugados con el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido incluyen pero no se limitan a agentes de imagen óptica, fármacos anticancerosos, agentes de focalización, agentes formadores de imágenes por resonancia magnética (por ejemplo, compuestos metálicos paramagnéticos), ligandos polidentados y precursores de ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidos.

20 [0099] En una realización, el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido pueden ser conjugados con un agente óptico. En una realización, el agente óptico puede ser Texas Red-NH₂.



Texas Red-NH-

[0100] En una realización particular, un polímero que comprende al menos una unidad recurrente de fórmula (I) y al menos una unidad recurrente de fórmula (II) puede reaccionar con DCC, colorante Texas Red-NH₂, piridina y 4-dimetilaminopiridina. La mezcla se calienta mediante un método de microondas. En una realización, la reacción se calienta a una temperatura Pp en el intervalo de aproximadamente 100 ° -150°C. En otra realización, el tiempo en el que los materiales son calentados va de 5 a 40 minutos. Si se desea, la mezcla de reacción se puede enfriar a temperatura ambiente. Se pueden utilizar métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica para aislar y/o purificar el polímero conjugado. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede ser filtrada en una solución de agua ácida. El precipitado resultante se puede ser filtrado, y lavado con agua. Opcionalmente, el precipitado puede ser purificado mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, el precipitado puede ser transferido a acetona y disuelto, y la solución resultante se puede filtrar de nuevo en una solución de bicarbonato de sodio. Si se desea, la solución de reacción resultante se puede dializar en agua usando una membrana de celulosa y el polímero puede ser liofilizado y aislado.

35 [0101] Los conjugados que comprenden el colorante Texas Red pueden ser utilizados para administrar un agente formador de imágenes a un tejido seleccionado, como se ejemplifica en los ejemplos siguientes. Los polímeros antes descritos pueden formarse en nanopartículas en solución acuosa, por ejemplo, como se ejemplifica a continuación.

[0102] En una realización, el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido puede estar conjugado con un fármaco contra el cáncer. En una realización, el fármaco contra el cáncer puede ser un taxano, camptotecina, y/o doxorubicina. En una realización preferida, el fármaco contra el cáncer es un taxano, tal como paclitaxel o docetaxel.

[0103] En una realización, el fármaco antitumoral conjugado con el polímero es paclitaxel. En una realización, el paclitaxel puede estar unido al polímero en el átomo C2'-oxígeno. En otra realización, el paclitaxel puede estar unido al polímero en el átomo C7-oxígeno. En otra realización, la cadena de polímero comprende paclitaxel que se acopla

al polímero sólo por el átomo C2'-oxígeno. En aún otra realización, la cadena de polímero comprende paclitaxel que se acopla al polímero sólo por el átomo C7-oxígeno. En otra realización, el polímero comprende ambos grupos C2'-conjugados con paclitaxel y C7-conjugados con paclitaxel.

5 [0104] El fármaco contra el cáncer puede estar conjugado con el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido utilizando los métodos descritos anteriormente con respecto a Texas-Red.

10 [0105] En una realización, el paclitaxel, preferiblemente en presencia de un agente de acoplamiento (por ejemplo, EDC y/o DCC) y un catalizador (por ejemplo, DMAP), se puede hacer reaccionar con el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido en un disolvente (por ejemplo, un disolvente aprótico tal como DMF). Se pueden utilizar agentes adicionales, tales como piridina o hidroxibenzotriazol. En una realización, la reacción puede tener lugar durante un período de 0,5-2 días. Se pueden utilizar métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica para aislar y/o purificar el polímero conjugado. Por ejemplo, la mezcla de reacción se puede verter en una solución ácida para formar un precipitado. El precipitado formado se puede entonces filtrar y lavar con agua. Opcionalmente, el precipitado se puede purificar por cualquier método adecuado. Por ejemplo, el precipitado puede ser transferido a acetona y disuelto, y la solución resultante se puede filtrar de nuevo en una solución de bicarbonato de sodio. Si se desea, la solución de reacción resultante se puede dializar en agua usando una membrana de celulosa y el polímero puede ser liofilizado y aislado. El contenido de paclitaxel en el polímero resultante puede ser determinado por espectrometría UV.

20 [0106] Alternativamente, el compuesto que comprende el agente se puede hacer reaccionar con un aminoácido tal como ácido glutámico y/o aspártico en el cual se acopla el compuesto que comprende el agente se acopla (por ejemplo, por unión covalente) al aminoácido. El compuesto aminoácido-agente se puede hacer reaccionar con ácido poliglutámico o su sal para formar el polímero conjugado. En una realización, el paclitaxel se hace reaccionar con ácido glutámico para formar un compuesto en el que el paclitaxel está covalentemente unido al grupo ácido carboxílico colgante del ácido glutámico. El compuesto ácido glutámico-paclitaxel se puede hacer reaccionar con ácido poliglutámico o su sal para formar el polímero conjugado. En una realización, el paclitaxel se hace reaccionar con ácido aspártico para formar un compuesto en el que el paclitaxel está covalentemente unido al grupo ácido carboxílico colgante del ácido aspártico. El compuesto ácido aspártico-paclitaxel se puede hacer reaccionar con ácido poliglutámico o su sal para formar el polímero conjugado. Si se desea, el paclitaxel unido al aminoácido por el C2'-oxígeno se puede separar del paclitaxel unido al aminoácido por el C7-oxígeno utilizando métodos conocidos de separación (por ejemplo, HPLC).

30 [0107] Después de la formación del polímero conjugado, cualquier cantidad de agente libre no unido covalentemente al polímero también puede ser medida. Por ejemplo, la cromatografía de capa fina (TLC) se puede utilizar para confirmar la ausencia sustancial de paclitaxel libre restante en las composiciones de polímeros conjugados a paclitaxel.

35 [0108] En una realización, el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido puede estar conjugado con un ligando polidentado. Adecuados ligandos polidentados incluyen pero no se limitan a ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), (1,2-etanodiidinitrilo) tetraacetato (EDTA), etilendiamina, 2,2'-bipiridina (bipi), 1,10-fenantrolina (fen), 1,2-es (difeniilfosfino) etano (DPPE), 2,4-pentanodiona (acac), y etanodioato (ox). Los disolventes, agentes de acoplamiento, catalizadores y/o tampones apropiados generalmente conocidos por los expertos en la técnica y/o que se describen aquí pueden ser utilizados para formar el polímero conjugado. En otra realización, el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido puede estar conjugado con un precursor ligando polidentado con los átomos de oxígeno protegidos. Al igual que con el ácido poliglutámico, tanto la forma de sal o ácido del polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido puede ser utilizado como material de partida para formar el polímero conjugado.

45 [0109] En una realización, el ligando polidentado comprende DTPA. En una realización, el ligando polidentado tal como DTPA (con o sin átomos de oxígeno protegidos), preferiblemente en presencia de un agente de acoplamiento (por ejemplo, DCC) y un catalizador (por ejemplo, DMAP), se puede hacer reaccionar con el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido en un disolvente (por ejemplo, un disolvente aprótico tal como DMF). Si los grupos protectores están presentes, la eliminación puede lograrse mediante un tratamiento adecuado. Por ejemplo, el polímero conjugado con el precursor ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidos tales como DTPA con átomos de oxígeno protegidos por grupos t-butilo puede ser tratado con un ácido tal como ácido trifluoroacético. Después de la eliminación de los grupos protectores, el ácido puede ser eliminado por evaporación rotatoria. En una realización, DTPA puede ser tratado con una base adecuada para eliminar los átomos de hidrógeno en los grupos -OH del ácido carboxílico. En algunas realizaciones, la base es el bicarbonato de sodio.

55 [0110] En una realización, el polímero obtenido a partir de ácido poliglutámico y/o sal y un aminoácido puede estar conjugado con un agente de imágenes por resonancia magnética. En una realización, el agente de imágenes por resonancia magnética comprende un compuesto de Gd (III). Un método para formar el agente de imágenes por resonancia magnética es hacer reaccionar un metal paramagnético con el polímero conjugado que comprende un ligando polidentado. Los metales adecuados paramagnéticos incluyen pero no están limitados a Gd (III), Indio-111, e Itrio-88. Por ejemplo, un polímero conjugado que comprende DTPA puede ser tratado con Gd (III) en una solución

60

tampón durante un período de varias horas. Se pueden utilizar métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica para aislar y/o purificar el polímero conjugado. Por ejemplo, la solución de reacción resultante se puede dializar en agua usando una membrana de celulosa y el polímero puede ser liofilizado y aislado. La cantidad de metal paramagnético puede ser cuantificada por espectrometría de emisión óptica-plasma (ICP-OES) acoplada inductivamente.

[0111] Los polímeros conjugados pueden ser utilizados para administrar un agente formador de imágenes y/o un fármaco a un tejido seleccionado, por ejemplo, como se ejemplifica en los ejemplos siguientes. Los polímeros antes descritos pueden formarse en nanopartículas en solución acuosa, por ejemplo, como se ejemplifica a continuación. Los conjugados que comprenden un polímero y un fármaco pueden formarse en nanopartículas de forma similar. Estas nanopartículas pueden ser utilizadas para administrar preferentemente un fármaco a un tejido seleccionado.

Composiciones farmacéuticas

[0112] En algunas realizaciones, se proporcionan profármacos, metabolitos, estereoisómeros, hidratos, solvatos, polimorfos, y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en este documento (por ejemplo, el polímero conjugado y/o el agente que comprende).

[0113] Un "profármaco" se refiere a un agente que se convierte en el fármaco original *in vivo*. Los profármacos son útiles a menudo porque, en algunas situaciones, pueden ser más fáciles de administrar que el fármaco original. Pueden, por ejemplo, ser biodisponibles por vía oral, mientras que el original no lo es. El profármaco puede tener también una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas con respecto al fármaco original. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco podría ser un compuesto que se administra como un éster (el "profármaco") para facilitar la transmisión a través de una membrana celular donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad pero que luego es metabólicamente hidrolizada al ácido carboxílico, la entidad activa, una vez dentro de la célula donde la solubilidad en agua es beneficiosa. Un ejemplo adicional de un profármaco puede ser un péptido corto (poliaminoácidos) unido a un grupo ácido donde el péptido es metabolizado para revelar la fracción activa. Los procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en Design of Prodrugs, (ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0114] El término "éster profármaco" se refiere a derivados de los compuestos descritos aquí formados por la adición de cualquiera de los diversos grupos formadores de ésteres que se hidrolizan en condiciones fisiológicas. Ejemplos de grupos éster pro-fármaco incluyen pivooximetilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo y metoximetilo, así como otros grupos conocidos en la técnica, incluyendo el grupo(5-I-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo. Otros ejemplos de grupos éster pro-fármaco se pueden encontrar en, por ejemplo, T. Higuchi and V. Stella, in "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); and "Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", editado por EB Roche, Pergamon Press: Nueva York, 14-21 (1987) (que proporciona ejemplos de ésteres útiles como profármacos para compuestos que contienen grupos carboxilo). Cada una de las referencias anteriormente mencionadas se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

[0115] El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que no causa irritación significativa a un organismo al que se administra y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto. En algunas realizaciones, la sal es una sal de adición de ácido del compuesto. Las sales farmacéuticas pueden obtenerse por reacción de un compuesto con ácidos inorgánicos tales como un ácido hidrohálico (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido bromhídrico), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales farmacéuticas también pueden obtenerse por reacción de un compuesto con un ácido orgánico tal como ácidos carboxílicos o sulfónicos alifáticos o aromáticos, por ejemplo ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluensulfónico, salicílico o naftalensulfónico. Las sales farmacéuticas también pueden obtenerse por reacción de un compuesto con una base para formar una sal tal como una sal de amonio, una sal de metal alcalino, tal como una sal de sodio o de potasio, una sal de un metal alcalinotérreo, tal como una sal de calcio o magnesio, una sal de bases orgánicas tal como diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina, tris (hidroximetil) metilamina, C₁-C₇ alquilamina, ciclohexilamina, trietanolamina, etilendiamina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

[0116] Si la fabricación de formulaciones farmacéuticas implica la mezcla íntima de los excipientes farmacéuticos y el ingrediente activo en su forma de sal, entonces puede ser deseable utilizar excipientes farmacéuticos que no sean básicos, es decir, excipientes ácidos o neutros.

[0117] En diversas realizaciones, los compuestos aquí descritos (por ejemplo, el polímero conjugado y/o el agente que comprende) se pueden usar solos, en combinación con otros compuestos aquí descritos, o en combinación con uno o más agentes activos en las áreas terapéuticas que aquí se describen.

[0118] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes activos de superficie, vehículos, diluyentes, excipientes, agentes suavizantes, agentes de suspensión, sustancias de formación de película, y auxiliares de revestimiento fisiológicamente aceptables, o una combinación de los mismos; y un compuesto (por ejemplo, el polímero conjugado y/o el agente que comprende) descritos aquí.

Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990), que se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Los conservantes, estabilizantes, colorantes, edulcorantes, aromas, agentes aromatizantes y similares se pueden proporcionar en la composición farmacéutica. Por ejemplo, benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico se pueden añadir como conservantes. Además, pueden ser utilizados antioxidantes y agentes de suspensión. En diversas realizaciones, alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y similares pueden ser usados como agentes activos de superficie; sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidro ligero, aluminato de magnesio, metasilicato-aluminato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrógeno fosfato de calcio, carboximetilcelulosa de calcio, y similares pueden ser utilizados como excipientes; estearato de magnesio, talco, aceite hidrogenado y similares pueden ser utilizados como agentes suavizantes; aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, y de soja se pueden utilizar como agentes de suspensión o lubricantes; el acetato ftalato de celulosa como un derivado de un hidrato de carbono tal como celulosa o azúcar, o el copolímero metilacetato-metacrilato como un derivado de polivinilo pueden ser utilizados como agentes de suspensión; y plastificantes tales como ésteres de ftalato y similares pueden ser utilizados como agentes de suspensión.

[0119] El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito en este documento (por ejemplo, el polímero conjugado y/o el agente que comprende) con otros componentes químicos, tales como diluyentes o vehículos. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. Existen múltiples técnicas de administrar un compuesto, incluyendo, pero no limitadas a, administración oral, inyección, aerosol, parenteral y tópica. Las composiciones farmacéuticas también pueden obtenerse por reacción de compuestos con ácidos inorgánicos u orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

[0120] El término "vehículo" se refiere a un compuesto químico que facilita la incorporación de un compuesto en células o tejidos. Por ejemplo sulfóxido de dimetilo (DMSO) es un portador comúnmente utilizado, ya que facilita la absorción de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo.

[0121] El término "diluyente" se refiere a compuestos químicos diluidos en agua que disuelven el compuesto de interés (por ejemplo, el polímero conjugado y/o el agente que comprende), así como estabilizan la forma biológicamente activa del compuesto. Las sales disueltas en soluciones tamponadas se utilizan como diluyentes en la técnica. Una solución tamponada comúnmente utilizada es la solución salina tamponada con fosfato debido a que imita las condiciones salinas de la sangre humana. Puesto que las sales del tampón pueden controlar el pH de una solución a bajas concentraciones, un diluyente tamponado raramente modifica la actividad biológica de un compuesto. El término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto.

[0122] Las composiciones farmacéuticas descritas aquí pueden ser administradas a un paciente humano *per se*, o en composiciones farmacéuticas en donde se mezclan con otros ingredientes activos, como en la terapia de combinación, o con vehículos adecuados o excipiente (s). Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud se pueden encontrar en "Pharmaceutical Sciences de Remington, "Mack Publishing Co., Easton, PA, 18^a edición, 1990.

[0123] Las vías adecuadas de administración pueden, por ejemplo, incluir la oral, rectal, transmucosa, tópica, o intestinal; administración parenteral, incluyendo intramuscular, subcutánea, intravenosa, inyecciones intramedulares, así como intratecal, intraventricular directa, intraperitoneal, intranasal, o inyecciones intraoculares. Los compuestos (por ejemplo, el polímero conjugado y/o el agente que comprende) también se pueden administrar en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, incluyendo inyecciones depot, bombas osmóticas, píldoras, parches transdérmicos (incluyendo electrotransporte), y similares, para una administración prolongada y/o temporizada, pulsada a un ritmo predeterminado.

[0124] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de modos generalmente conocidos, por ejemplo, por medio de procesos convencionales, tales como mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulamiento, atrapamiento o formación de comprimidos.

[0125] Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser formuladas de un modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que pueden seleccionarse de excipientes y agentes auxiliares que facilitan la transformación de los compuestos activos en las preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la ruta de administración elegida. Cualquiera de las técnicas bien conocidas, vehículos y excipientes se pueden utilizar como adecuados y como se entiende en la técnica; por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormenre.

[0126] Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina,

albúmina, glutamato sódico, hidrocloreto de cisteína, y similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes reguladores de pH, y similares. Los tampones fisiológicamente compatibles incluyen, pero no se limitan a, solución de Hanks, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. Si se desea, se pueden utilizar preparaciones potenciadores de la absorción (por ejemplo, liposomas).

[0127] Para la administración transmucosal, se pueden utilizar en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que se ha de atravesar.

[0128] Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral por inyección, por ejemplo, en bolo o infusión continua, incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse en forma de suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados o incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, u otros aceites orgánicos tales como aceites de soja, pomelo o almendra, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil-celulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de monodosis, por ejemplo, en ampollas en envases multidosis por ejemplo, con un conservante añadido. Las composiciones pueden presentarse como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0129] Para administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención sean formulados como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, geles líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente que ha de ser tratado. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse usando un excipiente sólido mezclado con el compuesto activo, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y tratando la mezcla de gránulos después de añadir agentes auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados incluyen: cargas tal como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; y preparaciones de celulosa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, gomas, metil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio, o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar-agar, o ácido alginico o una de sus sales, tal como alginato de sodio. A los núcleos de grageas se les proporciona revestimientos adecuados. Para fin se pueden usar soluciones concentradas de azúcares, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, polivinil-pirrolidona, gel de Carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de lacas, y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. A los revestimientos de comprimidos o grageas pueden añadirse colorantes o pigmentos para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

[0130] Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tales como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos mezclados con cargas, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los agentes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafinas líquidas, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

[0131] Para administración bucal, las composiciones pueden tener la forma de comprimidos o pastillas de chupar formuladas del modo convencional.

[0132] Para administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un agente propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación de un aerosol presurizado puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida previamente establecida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina para uso en un inhalador o insuflador y similares pueden formularse de modo que contengan una mezcla de polvos del compuesto y una base de polvo adecuada, tales como lactosa o almidón.

[0133] Además se describen aquí varias composiciones farmacéuticas bien conocidas en la técnica farmacéutica para uso que incluyen una administración intraocular, intranasal e intraauricular. Los agentes penetrantes adecuados para estos usos son generalmente conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas para la administración intraocular incluyen soluciones oftálmicas acuosas de los compuestos activos en la forma soluble en agua, tales

como gotas para los ojos, o en goma gellan (Shedden et al., Clin. Ther., 23(3):440-50 (2001)) o hidrogeles (Mayer et al., Ophthalmologica, 210 (2):101-3 (1996)); pomadas oftálmicas; suspensiones oftálmicas, tales como micropartículas, fármacos que contienen pequeñas partículas poliméricas que están suspendidas en un medio portador líquido (Joshi, A., J. Ocul. Pharmacol., 10 (1) :29-45 (1994)), formulaciones solubles en lípidos (Alm et al., Prog. Clin. Biol. Res., 312:447-58 (1989)), y microesferas (Mordenti, Toxicol. Sci., 52(1):101-6 (1999)); e insertos oculares. Todas las referencias anteriormente mencionadas, se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Estas formulaciones farmacéuticas adecuadas son con mayor frecuencia, y preferiblemente estériles, isotónicas y tamponadas para la estabilidad y el confort. Las composiciones farmacéuticas para la administración intranasal también pueden incluir gotas y aerosoles a menudo preparados para simular en muchos aspectos las secreciones nasales para asegurar el mantenimiento de la acción ciliar normal. Como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990), que se incorpora aquí por referencia en su totalidad, y es bien conocido por los expertos en la técnica, las formulaciones adecuadas son con mayor frecuencia y de preferiblemente isotónicas, ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5, y con más frecuencia y preferiblemente incluyen conservantes antimicrobianos y estabilizantes de fármacos adecuados. Las formulaciones farmacéuticas para la administración intraauricular incluyen suspensiones y ungüentos para aplicación tópica en el oído. Los disolventes comunes para tales formulaciones aurales incluyen glicerina y agua.

[0134] Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, supositorios convencionales que contienen bases, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

[0135] Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales polímeros o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, en forma de una sal escasamente soluble.

[0136] Para los compuestos hidrofóbicos, un vehículo farmacéutico adecuado puede ser un sistema codisolvente que comprende un alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible con el agua, y una fase acuosa. El sistema codisolvente puede ser un sistema codisolvente VPD. VPD es una solución de 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del tensioactivo no polar polisorbato 80TM, y 65% p/v de polietilenglicol 300, completado hasta el volumen final con etanol absoluto. Naturalmente, las proporciones de un sistema codisolvente pueden ser variadas considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes de codisolvente pueden ser variadas: por ejemplo, en lugar de POLISORBATO 80TM se pueden emplear otros tensioactivos no polares; el tamaño de la fracción del polietilenglicol puede ser variado; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, por ejemplo, polivinil-pirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden reemplazar a la dextrosa.

[0137] Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de administración para los compuestos farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos conocidos de portadores o vehículos de administración para fármacos hidrófobos. También se pueden emplear ciertos disolventes orgánicos, tal como dimetilsulfóxido, aunque usualmente con el coste de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos pueden administrarse empleando un sistema de liberación prolongada, tales como matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrófobos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido y se conocen por los expertos en la técnica diversos materiales de liberación prolongada. Las cápsulas de liberación prolongada pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante unas pocas horas o semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

[0138] Agentes destinados para la administración intracelular se pueden administrar utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, estos agentes pueden ser encapsulados en liposomas. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación del liposoma se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposomales están protegidos del micro-entorno externo y, debido a la fusión de los liposomas con las membranas celulares, son administrados de forma eficiente en el citoplasma celular. El liposoma se puede recubrir con un anticuerpo específico del tejido. Los liposomas se dirigirán a y se recogerán selectivamente por el órgano deseado. Alternativamente, pequeñas moléculas orgánicas hidrófobas puede ser administradas directamente intracelularmente.

[0139] Otros agentes terapéuticos o de diagnóstico pueden ser incorporados en las composiciones farmacéuticas. Alternativamente o adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden ser combinadas con otras composiciones que contienen otros agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Métodos de administración

[0140] Los compuestos o composiciones farmacéuticas se pueden administrar al paciente por cualquier medio adecuado. Ejemplos no limitativos de métodos de administración incluyen, entre otros, (a) la administración por vía

oral, que incluye la administración de cápsulas, tabletas, gránulos, aerosol, jarabe, u otras formas tales como, (b) la administración a través de vías no orales tales como rectal, vaginal, intrauretral, intraocular, intranasal, o intraauricular, en la que la administración incluye la administración como suspensión acuosa, preparación oleosa o similar o como goteo, aerosol, supositorio, ungüento, pomada o similar, (c) la administración mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, o similar, incluyendo la administración con bomba de infusión, (d) la administración local, tal como por inyección directamente en la zona renal o cardíaca, por ejemplo, por implantación de liberación prolongada, así como (e) la administración por vía tópica; según se considere oportuno por los expertos en la técnica para poner el compuesto activo en contacto con los tejidos vivos.

[0141] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para conseguir su finalidad. La cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos descritos en este documento requieren una dosis que dependerá de la vía de administración, el tipo de animal, incluidos los seres humanos que se está tratando, y las características físicas del animal específico bajo consideración. La dosis se puede adaptar para lograr un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores que los expertos en técnica médica reconocerán. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto a tratar. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada aquí contenida.

[0142] Como será evidente para un experto en la técnica, la dosis *in vivo* útil a administrar y el modo particular de administración variarán dependiendo de la edad, el peso y la especie de mamíferos tratado, los compuestos particulares empleados, y el uso específico para el cual estos compuestos son empleados. La determinación de los niveles de dosificación eficaz, es decir los niveles de dosificación necesarios para lograr el resultado deseado, se puede lograr por un experto en la técnica utilizando métodos farmacológicos de rutina. Típicamente, las aplicaciones clínicas en los seres humanos de los productos se inician a niveles de dosificación bajos, incrementando el nivel de la dosis hasta lograr el efecto deseado. Alternativamente, estudios *in vitro* aceptables pueden utilizarse para establecer las dosis útiles y vías de administración de las composiciones identificadas por los métodos presentes utilizando métodos los farmacológicos establecidos.

[0143] En estudios animales no-humanos, las aplicaciones de los potenciales productos se inician a niveles de dosificación más altos, reduciendo el nivel de la dosis hasta que el efecto deseado ya no se consigue o desaparecen los efectos secundarios adversos. La dosificación puede variar ampliamente, dependiendo de los efectos deseados y la indicación terapéutica. Típicamente, las dosis pueden ser de entre aproximadamente 10 microgramos/kg y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 100 microgramos/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Alternativamente las dosis pueden estar basadas y calculadas sobre el área superficial del paciente, como se entiende por los expertos en la técnica.

[0144] La formulación, vía de administración y dosificación exacta para las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser elegidas por el propio médico teniendo en cuenta el estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl et al. 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", que se incorpora aquí como referencia en su totalidad, con particular referencia al Cap. 1, pág. 1). Típicamente, el intervalo de dosis de la composición administrada al paciente puede ser de aproximadamente 0,5 a 1000 mg / kg de peso corporal del paciente. La dosificación puede ser única o una serie de dos o más dada durante uno o más días, según lo necesite el paciente. En el caso en el que las dosificaciones de los compuestos en humanos han sido establecida para por lo menos alguna afección, la presente invención utilizará esas mismas dosificaciones, o dosificaciones que están entre aproximadamente 0,1% y 500%, más preferiblemente entre aproximadamente 25% y 250% de la dosificación establecida en humanos. Cuando no está establecida la dosis en seres humanos, como será el caso para composiciones farmacéuticas descubiertas recientemente, una dosificación para humanos adecuada puede deducirse de los valores ED50 o ID50, u otros valores apropiados derivados de estudios *in vitro* o *in vivo*, así como por estudios cualificados de toxicidad y eficacia en animales.

[0145] Cabe señalar que el médico tratante podría saber cómo y cuándo poner fin, interrumpir, o ajustar la administración debido a la toxicidad o a disfunciones orgánicas. A la inversa, el médico tratante debería saber también ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera la adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el tratamiento del trastorno de interés variará con la gravedad de la condición a tratar y de la vía de administración. La gravedad de la afección puede, por ejemplo, ser evaluada, en parte, por los métodos estándar de evaluación de pronóstico. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis, también variará según la edad, peso corporal, y la respuesta individual del paciente. Un programa comparable al descrito anteriormente puede ser utilizado en medicina veterinaria.

[0146] Aunque la dosis exacta se determina sobre una base de fármaco por fármaco, en la mayoría de los casos, se pueden hacer algunas generalizaciones acerca de la dosificación. El régimen de dosificación diaria para un paciente humano adulto puede ser, por ejemplo, una dosis oral de entre 0,1 mg y 2000 mg de cada ingrediente activo, preferiblemente entre 1 mg y 500 mg, por ejemplo 5 a 200 mg. En otras realizaciones, se utiliza una dosis intravenosa, subcutánea o intramuscular de cada ingrediente activo de entre 0,01 mg y 100 mg, preferiblemente

- entre 0,1 mg y 60 mg, por ejemplo, 1 a 40 mg. En los casos de administración de una sal farmacéuticamente aceptable, la dosificación puede ser calculada como la base libre. En algunas realizaciones, la composición se administra de 1 a 4 veces por día. Alternativamente, las composiciones de la invención pueden administrarse por infusión intravenosa continua, preferiblemente a una dosis de cada ingrediente activo hasta 1000 mg por día. Como se entenderá por los expertos en la técnica, en ciertas situaciones puede ser necesario administrar los compuestos descritos en este documento en cantidades que exceden, o incluso superan con creces, la mencionada anteriormente, en el intervalo de dosificación preferido para tratar con eficacia y de manera agresiva las enfermedades o las infecciones especialmente agresivas. En algunas realizaciones, los compuestos se administrarán durante un período de terapia continua, por ejemplo durante una semana o más, o meses o años.
- 5 [0147] La cantidad de dosis y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar unos niveles plasmáticos de la fracción activa que son suficientes para mantener los efectos de modulación, o la concentración mínima efectiva (CME). La CME variará para cada compuesto, pero puede ser estimada a partir de los datos *in vitro*. Las dosis necesarias para lograr la CME va a depender de las características individuales y vía de administración. No obstante, se pueden utilizar ensayos por HPLC o bioensayos para determinar las concentraciones plasmáticas.
- 10 [0148] Los intervalos de dosificación también pueden determinarse utilizando el valor de CME. Las composiciones deben ser administradas con un régimen que mantiene los niveles en plasma por encima del CME para 10-90% del tiempo, preferiblemente entre 30-90% y más preferiblemente entre 50-90%.
- [0149] En los casos de administración local o absorción selectiva, la concentración efectiva local del fármaco no puede estar relacionada con la concentración plasmática.
- 20 [0150] La cantidad de composición administrada puede ser dependiente del sujeto a tratar, del peso del sujeto, la gravedad de la enfermedad, de la forma de administración y el juicio del médico que prescribe.
- [0151] Los compuestos descritos aquí (por ejemplo, el polímero conjugado y/o el agente que comprende) pueden ser evaluados en su eficacia y toxicidad utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología de un compuesto particular, o de un subconjunto de los compuestos, que comparten ciertas fracciones químicas, puede ser establecida determinando la toxicidad *in vitro* hacia una línea celular, tal como la línea celular de un mamífero, y
- 25 preferiblemente humano. Los resultados de estos estudios son a menudo predictivos de toxicidad en los animales, tales como mamíferos, o más específicamente los seres humanos. Alternativamente, la toxicidad de los compuestos particulares en un modelo animal, tales como ratones, ratas, conejos, o monos, puede determinarse utilizando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto particular puede establecerse utilizando varios métodos reconocidos, tal como métodos *in vitro*, modelos animales, o ensayos clínicos con humanos. Existen modelos *in vitro* reconocidos para casi todas las clases de condición, incluyendo pero no limitado al cáncer, enfermedades cardiovasculares y diversas disfunciones inmune. De manera similar, los modelos animales aceptables se pueden utilizar para establecer la eficacia de los productos químicos para el tratamiento de dichas condiciones. Al seleccionar un modelo para determinar la eficacia, el experto en la
- 30 técnica puede guiarse por el estado de la técnica para elegir un modelo apropiado, dosis y vía de administración, y el régimen. Por supuesto, los ensayos clínicos en humanos también se pueden utilizar para determinar la eficacia de un compuesto en seres humanos.
- [0152] Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de unidosis que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por las instrucciones para la administración. El paquete o dispensador también puede ir acompañada de un aviso en el envase en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya notificación refleja la aprobación por la agencia de la forma del fármaco para la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser el etiquetado aprobado por U.S. Food and Drug Administration para medicamentos recetados, o el prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, disponer en un envase apropiado, y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada.
- 40
- 45
- Ejemplo
- [0153] Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de describir aún más las realizaciones descritas aquí, y no limitan el alcance de la invención.
- 50

Materiales

- [0154] Sales de poli-L-glutamato sódico con diferentes pesos moleculares (pesos moleculares medios de 41.400 (PGA (97K)), 17.600 (PGA (44k)), 16.000 (PGA (32k)), y 10.900 (PGA (21k)) daltons en base a la dispersión de luz multi-ángulo (MALS)); 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC); hidroxibenzotriazol (HOBt); piridina, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), N, N'-dimetilformamida (DMF); acetato de gadolinio; cloroformo; y bicarbonato sódico se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Company. Poli-L-glutamato
- 55

fue convertido a ácido poli-L-glutámico utilizando solución 2 N de ácido clorhídrico. Ácido trifluoroacético (TFA) se adquirió de Bioscience. Omniscan™ (gadodiamida) fue adquirido de GE Healthcare

5 [0155] El hidrocloreto del éster β-t-butilo α-t-butilo del ácido L-aspartico (H-Asp (OtBu)- OtBu HCl) , hidrocloreto del éster di-t-butilo del ácido L-glutámico (H-Glu (OtBu)-OtBu · HCl), éster α-bencílico del ácido N-α-CBZ-L-glutámico (Z-Glu-OBzl) fueron adquiridos de Novabiochem (La Jolla, CA). Paclitaxel se adquirió de Polymed (Houston, Texas). 3 H-paclitaxel se adquirió de Moravek Biochemicals, Inc. Colorante sulforodamina B para el test citotóxico MTT (viabilidad celular) se adquirió de Molecular Imaging Products Company (Michigan). El producto químico p-NH₂ -Bn-DTPA-penta (tBu éster) se adquirió de Macrocylics (Dallas, Texas). Texas Red® cadaverina (colorante Texas Red-NH₂) se adquirió de Molecular Probe. El suero bovino se adquirió de Sigma. Se centrifugó a 10.000 rpm para eliminar cualquier partícula.

10 [0156] ¹H RMN se obtuvo de Joel (400 MHz), y el tamaño de partícula se midió por ZetalPals (Brookhaven Instruments Corporation). Los procesos químicos en microondas se llevaron a cabo en Biotage. Los pesos moleculares de los polímeros se determinaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinado con un detector de dispersión de luz multiángulo (MALS) (Wyatt Corporation):

15 Condiciones de análisis SEC-MALS:

[0157]

20	. Sistema de HPLC:	Agilent 1200
	. Columna :	Shodex SB 806M HQ (límite de exclusión para (Pululano es 20.000.000, tamaño
		de partícula: 13micrones, tamaño (mm) Dlxlongitud; 8.0.
	. Fase móvil:	x300) 1xDPBS o 1% en DPBS LiBr (pH 7,0)
	. Velocidad de flujo:	1 ml / min
	. detector MALS:	HELEOS DAWN de Wyatt
	. detector DRI:	Optilab Rex de Wyatt
25	. Viscosímetro on-line :	ViscoStar de Wyatt
	. Software:	ASTRA 5.1.9 de Wyatt
	. concentración de la muestra:	1.2 mg / ml
	. volumen de inyección:	100 µl

valor dn / dc del polímero: 0,185 fue utilizado en la medición.
BSA fue usado como un control antes de analizar las muestras reales.

30 [0158] Utilizando del sistema y las condiciones descritas anteriormente (en adelante, denominado como sistema Heleos con detector MALS), el peso molecular medio para los polímeros de partida (sales de poli-L-glutamato sódico con pesos moleculares medios de 41.400, 17.600, 16.000 y 10.900 daltons informados por Sigma-Aldrich usando su sistema con MALS) se encontraron valores experimentales de

35 49.000, 19.800, 19.450, y 9.400 daltons, respectivamente.

[0159] El contenido de paclitaxel en polímeros conjugados de paclitaxel se estimó por espectrometría UV / VIS (Lambda Bio 40, PerkinElmer) basado en una curva patrón generada con concentraciones conocidas de paclitaxel en metanol (λ = 228 nm).

40 [0160] La síntesis de conjugados poli-L-glutamato-paclitaxel (PGA-PTX) se llevó a cabo como se informó en la bibliografía anterior. Véase Li et al. . "Complete Regression of Well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate." Cancer Research 1998, 58, 2404-2409", cuyo contenido se incorpora aquí por referencia en su totalidad. La cantidad de paclitaxel en PGA (97K)-PTX-20 y PGA (32k)-PTX-20, preparado a partir de ácido poliglutámico con pesos moleculares medios de 49.000 y 19.450 daltons, respectivamente, fue cuantificada por espectrometría UV a λ = 229 nm como 20% en peso/peso. Al reducir la cantidad de paclitaxel a 10%

45 en peso referido al peso total, se obtuvo para PGA (97K)-PTX-10 a partir de ácido poliglutámico con pesos moleculares medios de 49.000 dalton.

EJEMPLO 1

[0161] Poli-(γ-L-aspartil-glutamina) se prepara de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 1 como sigue:

50 [0162] Ácido poliglutámico (0,75 g), con un peso molecular medio de 49.000 daltons basados en el sistema Heleos con detector MALS, fue parcialmente añadido en 100 ml de diclorometano (DCM). DCC (8,7 mL, 1 M en DCM) se

añadió y se agitó durante 20 minutos. DCM se separó luego por evaporación rotatoria, y el residuo fue disuelto en DMF (80 ml). H-Asp (OtBu) - (OtBu) (2,44 g), piridina (4 ml), y DMAP (0,1 g) se añadieron y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15-24 horas. La mezcla de reacción se filtró en una solución de agua ácida (500 ml, pH <2 medido con papel pH). Se formó un precipitado blanco, se filtró y se lavó con agua. El precipitado blanco se disolvió después en acetona (100 ml). La solución se filtró a través de un filtro de 0,2- μ m, y la acetona se eliminó por evaporación rotatoria. La estructura del polímero intermedio se confirmó a través de ¹H-RMN por la presencia de un pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm.

[0163] El polímero intermedio se trató con ácido trifluoroacético (TFA) al 95% en DCM durante 5-8 horas. DCM se añadió a continuación hasta formar un precipitado. El disolvente se eliminó, y el residuo se lavó con más DCM. El residuo se colocó bajo vacío para eliminar el DCM. El residuo se re-disolvió en metanol y agua y después se dializó usando una semi-membrana de celulosa (peso molecular de corte 10.000 dalton) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante una noche. Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) resultó ser ópticamente transparente a pH 7 en agua después de la diálisis. Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) (1,2 g) se obtuvo como un polvo blanco después de haber sido liofilizada. El polímero se confirmó a través de ¹H-RMN por la desaparición de un pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm.

EJEMPLO 2

[0164] Ácido poli-(γ -L-aspartil-glutamina)-poli-L-glutámico se prepara de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 2 como sigue:

[0165] Ácido poliglutámico con un peso molecular medio de 49.000 daltons en base al sistema Heleos con detector MALS (0,075 g) fue parcialmente disuelto en DMF (3 ml). DCC (130 mg), H-Asp (OtBu) - (OtBu) (0,11 g), piridina (200 μ l), y DMAP (0,010 g) se añadieron a continuación. La reacción se llevó a cabo utilizando un horno microondas a 120°C durante 30 minutos. La reacción se enfrió después a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se siguió monitorizando la completa desaparición de H-Asp (OtBu) - (OtBu) utilizando cromatografía en capa fina (TLC, R_f en acetato de etilo = 0,4). Al terminar, la mezcla de reacción se filtró en una solución de agua ácida (150 ml, pH <2 medido con papel pH). Se formó un precipitado blanco, se filtró y se lavó con agua. El precipitado blanco se disolvió luego en acetona (50 ml). La solución se filtró en una solución de bicarbonato de sodio (0,5 M) y se dializó usando una membrana semipermeable de celulosa (peso molecular de corte 10.000 dalton) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante una noche. El intermedio éster de polímero obtenido era de color blanco después de haber sido liofilizado. La estructura del polímero fue confirmado a través de ¹H-RMN por la presencia de un pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm.

[0166] El polímero intermedio se trató entonces con ácido trifluoroacético (TFA) al 95% en DCM durante 5 horas. DCM se añadió a continuación hasta formar un precipitado. El disolvente se eliminó, y el residuo se lavó con más DCM. El residuo se colocó bajo vacío para eliminar el DCM. El residuo se re-disolvió en metanol y agua y después se dializó usando una semi-membrana de celulosa (peso molecular de corte 10.000 dalton) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante una noche. El ácido poli-(γ -L-aspartil-glutamina)-poli-L-glutámico (0,10 g) se obtuvo como un polvo blanco después de haber sido liofilizado. La estructura del polímero fue confirmado a través de ¹H-RMN por la desaparición del pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm.

EJEMPLO 3

[0167] Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) se prepara de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 3 como sigue:

[0168] La sal sódica de poliglutamato (10,0 g) con un peso molecular medio de 49.000 daltons en base al sistema Heleos con detector MALS, EDC (33,8 g), HOBt (15,9 g), y H-Asp (OtBu) - (OtBu)-HCl (32,0 g) se mezclaron en DMF (700 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15-24 horas, y luego se vertió en una solución de agua (3 l). Se formó un precipitado blanco, se filtró y se lavó con agua. El polímero intermedio se liofilizó. La estructura del polímero intermedio se confirmó a través de ¹H-RMN por la presencia de un pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm.

[0169] El polímero intermedio se trató con TFA (200 ml) durante 5 horas. Después, el TFA se eliminó parcialmente por evaporación rotatoria. Se añadió agua al residuo y el residuo se dializó usando una membrana semi-permeable de celulosa (peso molecular de corte 10.000 dalton) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante una noche. Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) resultó ser transparente a pH 7 en agua después de la diálisis. Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) (15,0 g) se obtuvo como un polvo blanco después de haber sido liofilizada. La estructura del polímero fue confirmado a través de ¹H-RMN por la desaparición del pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm. El peso molecular medio de poli-(γ -L-aspartil-glutamina) se midió y resultó ser de 99.400 daltons.

EJEMPLOS 3A-3B

[0170] La síntesis de poli-(γ -L-aspartil-glutamina) a partir de sales de poliglutamato sódico con diferentes pesos moleculares medios (19.800 y 9.400 daltons basados en el sistema Heleos con detector MALS) se llevó a cabo

utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, y el promedio peso molecular de los polímeros resultantes de poli-(γ -L-aspartil-glutamina) se midió y resultó ser de 39.700, y 17.700 daltons, respectivamente.

[0171] Poli-(γ -L-glutamil-glutamina) se preparó de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 4 como sigue:

5 [0172] Sal sódica de poliglutamato (0,40 g) con un peso molecular medio de 19.800 daltons en base al sistema Heleos con detector MALS, EDC (1,60 g), HOBt (0,72 g), y H-Glu (OtBu) - (OtBu)-HCl (1,51 g) se mezclaron en DMF (30 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15-24 horas y luego se vertió en solución de agua destilada (200 ml). Se formó un precipitado blanco, se filtró y se lavó con agua. El polímero intermedio se liofilizó. La estructura del polímero intermedio se confirmó a través de $^1\text{H-RMN}$ por la presencia de un
10 pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm.

[0173] El polímero intermedio se trató con TFA (20 mL) durante 5-8 horas. Después, el TFA se eliminó parcialmente por evaporación rotatoria. Se añadió agua al residuo y el residuo se dializó usando una membrana semi-permeable de celulosa (peso molecular de corte 10.000 dalton) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante una noche. Poli-(γ -L-glutamil-glutamina) resultó ser transparente a pH 7 en agua después de la diálisis. Poli-(γ -L-glutamil-glutamina) (0,6 g) se obtuvo como un polvo blanco después de haber sido liofilizado. La estructura del polímero fue confirmada a través de $^1\text{H-RMN}$ por la desaparición del pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm. El peso molecular medio de poli-(γ -L-glutamil-glutamina) se midió y resultó ser de 38.390 daltons.

EJEMPLOS 4a-4c

20 [0174] La síntesis de poli-(γ -L-glutamil-glutamina) a partir de sales de poli-L-glutamato sódico con diferentes pesos moleculares medios (49.000, 19.450, 10.900 y en base al sistema Heleos con detector MALS) se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. Los pesos moleculares de los polímeros de poli-(γ -L-glutamil-glutamina) se midieron y resultaron ser 110.800, 37.400, y 19.800 daltons, respectivamente.

EJEMPLO 5

25 [0175] El ácido poli-(γ -L-glutamil-glutamina)-poli-L-glutámico se prepara de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 5 como sigue:

[0176] Sal sódica de poliglutamato (0,50 g) con un peso molecular medio de 49.000 daltons en base al sistema Heleos con detector MALS, EDC (0,26 g), HOBt (0,11 g), y H-Glu (OtBu) - (OtBu)-HCl (0,05 g) se mezclaron en DMF (30 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15-24 horas y luego se vertió en solución de agua destilada (500 ml). Se formó un precipitado blanco, se filtró y se lavó con agua. El polímero intermedio se liofilizó. La estructura del polímero intermedio se confirmó a través de $^1\text{H-RMN}$ por la presencia de un
30 pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm.

[0177] El polímero intermedio se trató con TFA (20 mL) durante 5-8 horas. El TFA se eliminó parcialmente por evaporación rotatoria. Se añadió agua al residuo y el residuo se dializó usando una membrana semi-permeable de celulosa (peso molecular de corte 10.000 dalton) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante una noche. El ácido poli-(γ -L-glutamil-glutamina)-poli-L-glutámico resultó ser transparente a pH 7 en agua después de la diálisis. El ácido poli-(γ -L-glutamil-glutamina)-poli-L-glutámico (0,25 g) se obtuvo como un polvo blanco después de haber sido liofilizado. La estructura del polímero fue confirmada a través de $^1\text{H-RMN}$ por la desaparición del pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm. El peso molecular medio de poli-(γ -L-glutamil-glutamina) se midió y resultó ser de 57.400 daltons.

EJEMPLO 6

[0178] El polímero conjugado referido aquí como PGA-97-A- Texas Red se prepara de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 6 como sigue:

45 [0179] Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) con un peso molecular medio de 99,400 daltons (100 mg) se disolvió parcialmente en DMF (3 ml). DCC Anhidro (130 mg), colorante Texas Red-NH 2 (15 mg), piridina (200 μl), y DMAP (10 mg) se añadieron a continuación. La reacción se llevó a cabo utilizando un horno microondas a 120°C durante 30 minutos. La reacción se enfrió después a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró en una solución de agua ácida (200 ml, pH <2 medido con papel pH). Se formó un precipitado púrpura, se filtró y se lavó con agua. El precipitado púrpura se disolvió luego en acetona (50 ml). La solución se filtró en una solución de bicarbonato de sodio (0,5 M) y se dializó usando una membrana semipermeable de celulosa (peso molecular de corte 10.000 dalton) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante una noche. El intermedio éster de polímero
50 obtenido era de color blanco después de haber sido liofilizado. La estructura del polímero fue confirmado a través de $^1\text{H-RMN}$ por la presencia de un pico para el grupo O-tBu a 1,4 ppm. El polímero PGA-97-A-Texas Red (80 mg) se obtuvo como un sólido púrpura después de haber sido liofilizado.

EJEMPLO 7

[0180] El polímero conjugado referido aquí como PGA-97-A- DTPA se prepara de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 7 como sigue:

5 [0181] Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) con un peso molecular medio de 99,400 daltons (100 mg) se disolvió en DMF (5 ml). DCC (200 mg) se añadió a continuación a la solución. Una solución de p-NH₂-BN-DTPA-penta-(tBu éster) (400 mg) en DMF (5 ml) se añadió también a la mezcla de reacción. A continuación se añadieron piridina anhidra (300 μ l) y el catalizador de DMAP (20 mg). La mezcla de reacción se agitó y se calentó hasta 120°C durante 30 minutos bajo condiciones de microondas. La mezcla de reacción se enfrió luego a temperatura ambiente, formándose un precipitado. El precipitado se filtró, y el sobrenadante se acidificó a un pH de aproximadamente 2 con ácido clorhídrico diluido en agua. La solución que contiene el polímero intermedio se dializó en agua durante 2 días con membrana de celulosa (peso molecular de corte 10.000 daltons), y el polímero intermedio se liofilizó. La estructura del polímero intermedio se confirmó por ¹H-RMN.

10 [0182] El polímero intermedio se trató con TFA durante 4 horas. El TFA se eliminó parcialmente por evaporación rotatoria. El residuo se disolvió en agua y la solución se dializó en agua con una membrana de celulosa (peso molecular de corte 10.000 daltons). El polímero se liofilizó después. La estructura de PGA-97-A-DTPA fue confirmada por ¹H-NMR.

EJEMPLO 8

[0183] El polímero conjugado referido aquí como PGA-97-A-DTPA-Gd (III) se preparó de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 8 como sigue:

20 [0184] PGA-97-A-DTPA obtenido del Ejemplo 7 se trató con acetato de Gd (III) en una solución tampón durante 4 horas. La solución de reacción se dializó en agua con una membrana de celulosa (peso molecular de corte 10.000 daltons) durante 3 días y se liofilizó para obtener el polímero (86 mg). La cantidad de Gd (III) se cuantificó por medición de espectroscopia de emisión óptica-plasma (ICP-OES) inductivamente acoplada. La cantidad de Gd (III) presente se encontró que era del 7% en peso/peso del polímero en base a estándares de Gadolinium ICP (Ricca Chemical Company, Arlington, Texas (Cat. N ° PGD1KN-500)).

EJEMPLO 9

[0185] El polímero conjugado referido aquí como PGA-97-A-10 se prepara de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 9 como sigue:

30 [0186] Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) de peso molecular medio de 99,400 daltons (351 mg) se disolvió parcialmente en DMF (40 ml). DCC (120 mg) y paclitaxel (44 mg) se añadieron, respectivamente, en la mezcla. DMF (10 ml) y una cantidad catalítica de DMAP (100 mg) se añadió a continuación en la mezcla. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. La finalización de la reacción se verificó por TLC que confirmó la ausencia de paclitaxel libre. La mezcla se vertió en cloroformo (300 ml) y se formó un precipitado. El residuo se obtuvo después de filtración y posterior redisolución en metanol. La precipitación fue inducida mediante la adición de una solución 0,2 N de ácido clorhídrico acuoso y el residuo se aisló después de centrifugación a 10.000 rpm. El residuo se re disolvió después en una solución de bicarbonato de sodio 0,5 M. La solución de polímero se dializó en agua desionizada utilizando una membrana de celulosa (de corte 10.000 daltons) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante 1 día. Se obtuvo una solución clara y se liofilizó. Se obtuvo PGA-97-A-10 (340 mg) y se confirmó por ¹H RMN. El contenido de paclitaxel en PGA-97-A-10 se determinó por espectrometría UV como 10% en peso/peso. La ausencia de paclitaxel libre se confirmó también mediante TLC.

EJEMPLO 10

[0187] El polímero conjugado referido aquí como PGA-97-A-20 se preparó de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 9 como sigue:

45 [0188] Poli-(γ -L-aspartil-glutamina) de peso molecular medio de 99.400 daltons (750 mg) se disolvió parcialmente en DMF (50 ml). EDC (450 mg) y paclitaxel (210 mg) se añadieron, respectivamente, en la mezcla. DMAP (100 mg), que actúa como catalizador, se añadió a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. La finalización de la reacción se verificó mediante TLC. La mezcla se vertió en una solución 0,2 N de ácido clorhídrico acuoso (300 ml). Se formó un precipitado y se recogió después de la centrifugación a 10.000 rpm. El residuo se re disolvió después en una solución de bicarbonato de sodio 0,5 M NaHCO₃. La solución de polímero se dializó en agua des ionizada utilizando una membrana de celulosa (de corte 10.000 daltons) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante 1 día. Se obtuvo una solución clara y se liofilizó. Se obtuvo PGA-97-A-20 (700 mg) y se confirmó la estructura por ¹H RMN. El contenido de paclitaxel en PGA-97-A-20 se determinó por espectrometría UV como 20% en peso/peso.

EJEMPLOS 10a-10b

[0189] La síntesis de los polímeros conjugados referidos aquí como PGA - 44-A-20 y PGA-21-A-20 a partir de polímeros poli-(γ -L-aspartil-glutamina) con pesos moleculares medios de 39.700 y 17.700 daltons, respectivamente, se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 10. El contenido de paclitaxel en los polímeros se determinó por espectrometría UV como 20% en peso/peso.

EJEMPLO 10c

[0190] La síntesis de un polímero conjugado referido aquí como PGA-44-A-19 a partir de poli-(γ -L-aspartil-glutamina) con un peso molecular medio de 39.700 se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 10, con una modificación en la adición de una mezcla de paclitaxel y 3 H-paclitaxel en lugar de añadir sólo paclitaxel. El contenido de paclitaxel en el polímero se determinó por espectrometría UV como 19% en peso/peso.

EJEMPLO 11

[0191] El polímero conjugado referido aquí como PGA - 97-G-20 se preparó de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 10 como sigue:

[0192] Poli-(γ -L-glutamil-glutamina) de peso molecular medio de 110.800 daltons (1,0 g) se disolvió parcialmente en DMF (55 ml). EDC (600 mg) y paclitaxel (282 mg) se añadieron, respectivamente, en la mezcla. DMAP (300 mg), que actúa como catalizador, se añadió a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. La finalización de la reacción se verificó mediante TLC. La mezcla se vertió en una solución diluida 0,2 N de ácido clorhídrico (300 ml). Se formó un precipitado y se recogió después de la centrifugación a 10.000 rpm. El residuo se re disolvió después en una solución de bicarbonato de sodio 0,5 M NaHCO₃. La solución de polímero se dializó en agua des ionizada utilizando una membrana de celulosa (de corte 10.000 daltons) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante 1 día. Se obtuvo una solución clara y se liofilizó. Se obtuvo PGA-97-A-20 (1,1g) y se confirmó por ¹H RMN. El contenido de paclitaxel en PGA-97-A-20 se determinó por espectrometría UV como 20% en peso/peso.

EJEMPLOS 11a-11c

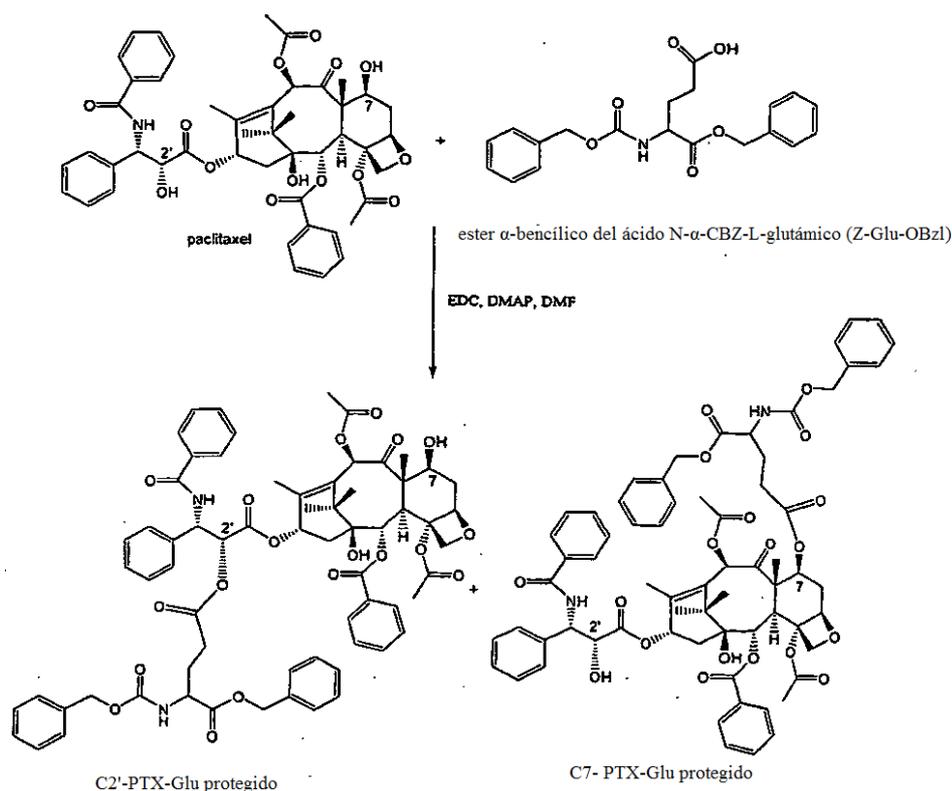
[0193] La síntesis de polímeros conjugados referidos aquí como PGA - 44-G-20, PGA-32-G-20, y PGA-21-G-20 a partir de polímeros de poli-(γ -L-glutamil-glutamina) con pesos moleculares medios de 38,390, 37,400, y 19.800 daltons, respectivamente, se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 11. El contenido de paclitaxel en cada uno de los polímeros se determinó por espectrometría UV como 20% en peso/peso. Al aumentar la cantidad de paclitaxel, se obtuvo una concentración mayor de paclitaxel. Por ejemplo, la PGA - 32-G-40 se preparó a partir de polímeros de poli-(γ -L-glutamil-glutamina) que tienen un peso molecular medio de 37.400 daltons y usando el procedimiento del Ejemplo 11. El contenido de paclitaxel se determinó por espectrometría UV y se encontró que era 40% en peso/peso.

EJEMPLOS 12a-12c

[0194] La síntesis de polímeros conjugados referidos aquí como PGA-97-G-24, PGA - 32-G-19, PGA-21-G-19 a partir de polímeros de poli-(γ -L-glutamil-glutamina) con pesos moleculares medios de 110.800, 37.400, y 19.800 daltons, respectivamente, se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 11, con una modificación en la adición de una mezcla de paclitaxel y 3 H-paclitaxel en lugar de añadir sólo paclitaxel. El contenido de paclitaxel en PGA-97-G-24, PGA-32-G-19, PGA-21-G-19 se determinó por espectrometría UV como 24%, 19% y 19%, en peso/peso, respectivamente.

EJEMPLO 13Síntesis de C2'-PTX-Glu protegido y C7-PTX Glu-protegido

[0195]

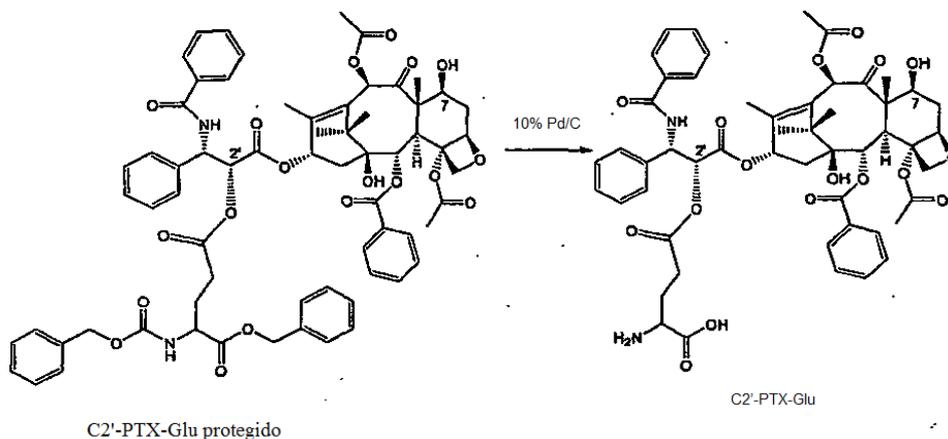


- [0196] Z-Glu-OBzl (2,6 g), paclitaxel (2,0 g), EDC (1,5 g), y DMAP (300 mg) se mezclaron en DMF (20 ml) y la mezcla se agitó durante 15 horas. La medida por TLC confirmó la ausencia de paclitaxel libre en la mezcla. La mezcla se vertió entonces en ácido clorhídrico acuoso 0,2 N (100 ml) y el producto orgánico se extrajo en acetato de etilo (dos veces x 50 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con solución 0,5 M de bicarbonato de sodio (100 ml). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro. El acetato de etilo se separó por evaporación rotatoria, y los productos se purificaron por cromatografía en gel de sílice (hexano: acetato de etilo, 1:1). $^1\text{H-RMN}$ confirmó que los productos resultantes fueron C2'-PTX-Glu protegido (2,2 g) y C7-PTX-Glu protegido (0,42 g).

Ejemplo 13 a

10 Síntesis de C2'-PTX-Glu

[0197]



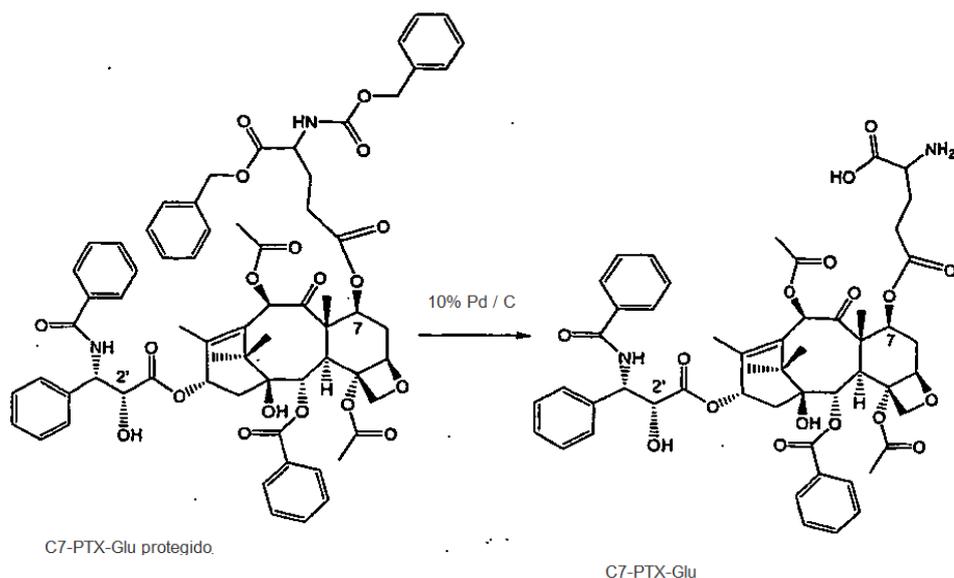
- [0198] C2'-PTX-Glu protegido (2,2 g) y 10% Pd / C (0,20 g) fueron agitados en metanol desoxigenado (150 ml). El gas hidrógeno se introdujo mediante un tubo. La reacción se hidrogenó durante cuatro horas. La finalización de la reacción se verificó por TLC. La solución se filtró a través de un filtro de 0,2- μm . La solución resultó transparente y el metanol se eliminó por evaporación rotatoria. El producto bruto se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa utilizando gradiente agua / acetonitrilo. C2'-PTX-Glu (600 mg) se obtuvo después de purificación por HPLC,

se liofilizó, y el producto se confirmó por LC-MS. El resultado se muestra en la Figura 11. C2'-PTX-Glu tenía un tiempo de HPLC de aproximadamente 32 minutos y un tiempo de LC-MS de alrededor de 6,2 minutos.

EJEMPLO 13b

Síntesis de C7-PTX-Glu

5 [0199]



[0200] C7-PTX-Glu protegido (250 mg) y 10% Pd / C (0,20 g) se agitaron en una solución de metanol desoxigenado (150 ml). El gas hidrógeno se introdujo en la solución usando un tubo, y la reacción se hidrogenó durante cuatro horas. La finalización de la reacción se verificó por TLC, la solución se filtró a través de un filtro de 0,2µm. La solución resultó transparente y el metanol se eliminó por evaporación rotatoria. El producto bruto se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa utilizando gradiente agua/acetonitrilo. C7-PTX-Glu (30 mg) se obtuvo después de purificación por HPLC, se liofilizó, y el producto se confirmó por LC-MS. El resultado se muestra en la Figura 11. C7-PTX-Glu tenía un tiempo de HPLC de aproximadamente 35 minutos y un tiempo de LC-MS de alrededor de 6,4 minutos.

EJEMPLO 14

[0201] El polímero conjugado referido aquí como PGA-97-G-27 se preparó de acuerdo con el esquema general que se ilustra en la Figura 12 como sigue:

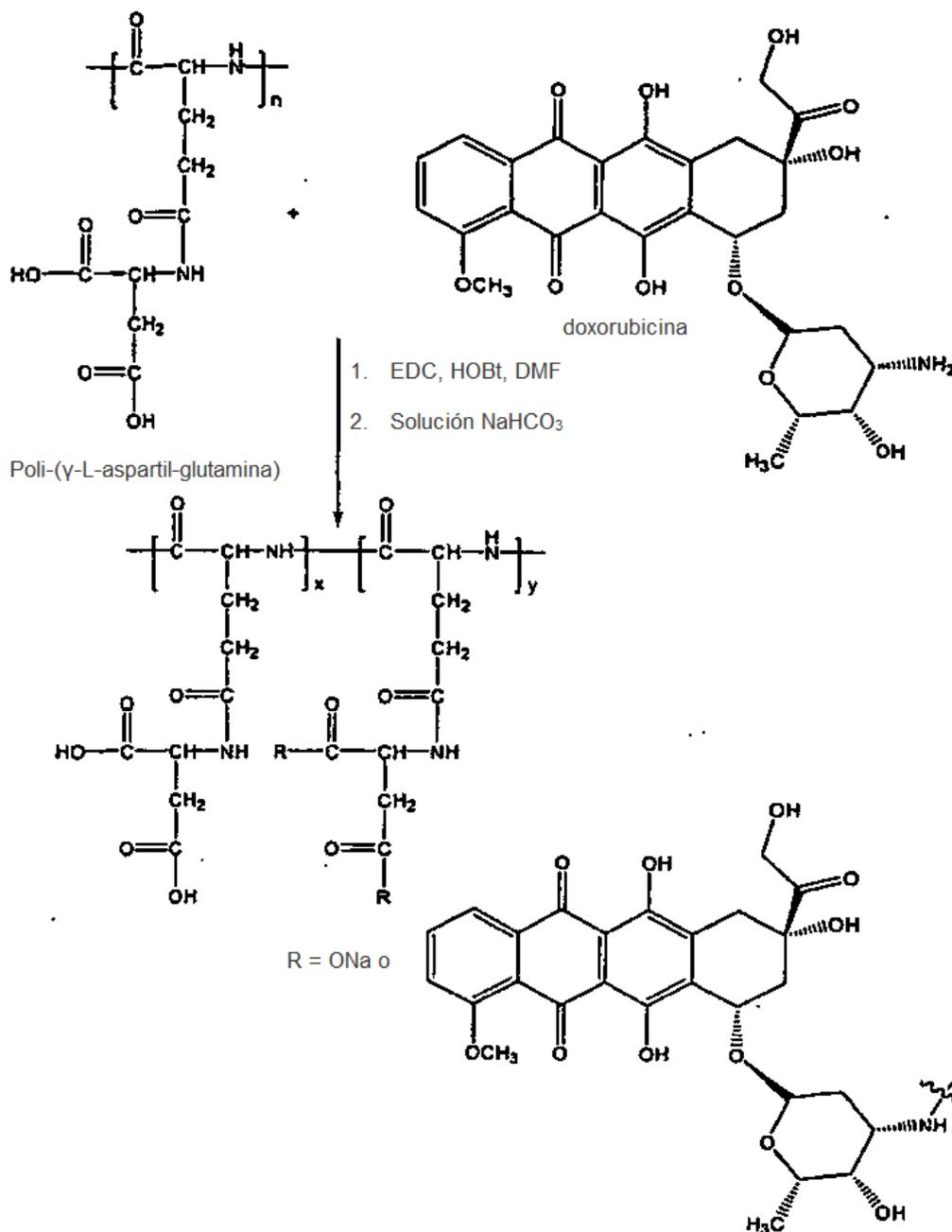
[0202] Se disolvió ácido poli-L-glutámico (210 mg) en DMF (10 ml). EDC (65% en moles) y NHS (65% en moles) se añadieron a la mezcla y se agitó durante 15 horas. Una solución de C2'-PTX-Glu (105 mg) en DMF (2 ml) se añadió a la mezcla. A continuación, se añadió una solución de bicarbonato de sodio 0,5 M (3 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas, y luego se vertió en una solución diluida de ácido clorhídrico 0,2 N (300 ml). Se formó un precipitado y se recogió después de la centrifugación a 10.000 rpm.

[0203] El residuo se redisolvió después en una solución de bicarbonato de sodio 0,5 M. La solución de polímero se dializó en agua desionizada utilizando una membrana de celulosa (de corte 10.000 daltons) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante 1 día. Se obtuvo una solución clara y se liofilizó. El producto resultante fue PGA-97-A-27 (250 mg), y se confirmó por ¹H RMN. El contenido de paclitaxel en PGA-97-A-27 se determinó por espectrometría UV como 27% en peso/peso.

EJEMPLO 15

Síntesis de PGA-97-G-Doxorubicina

[0204]

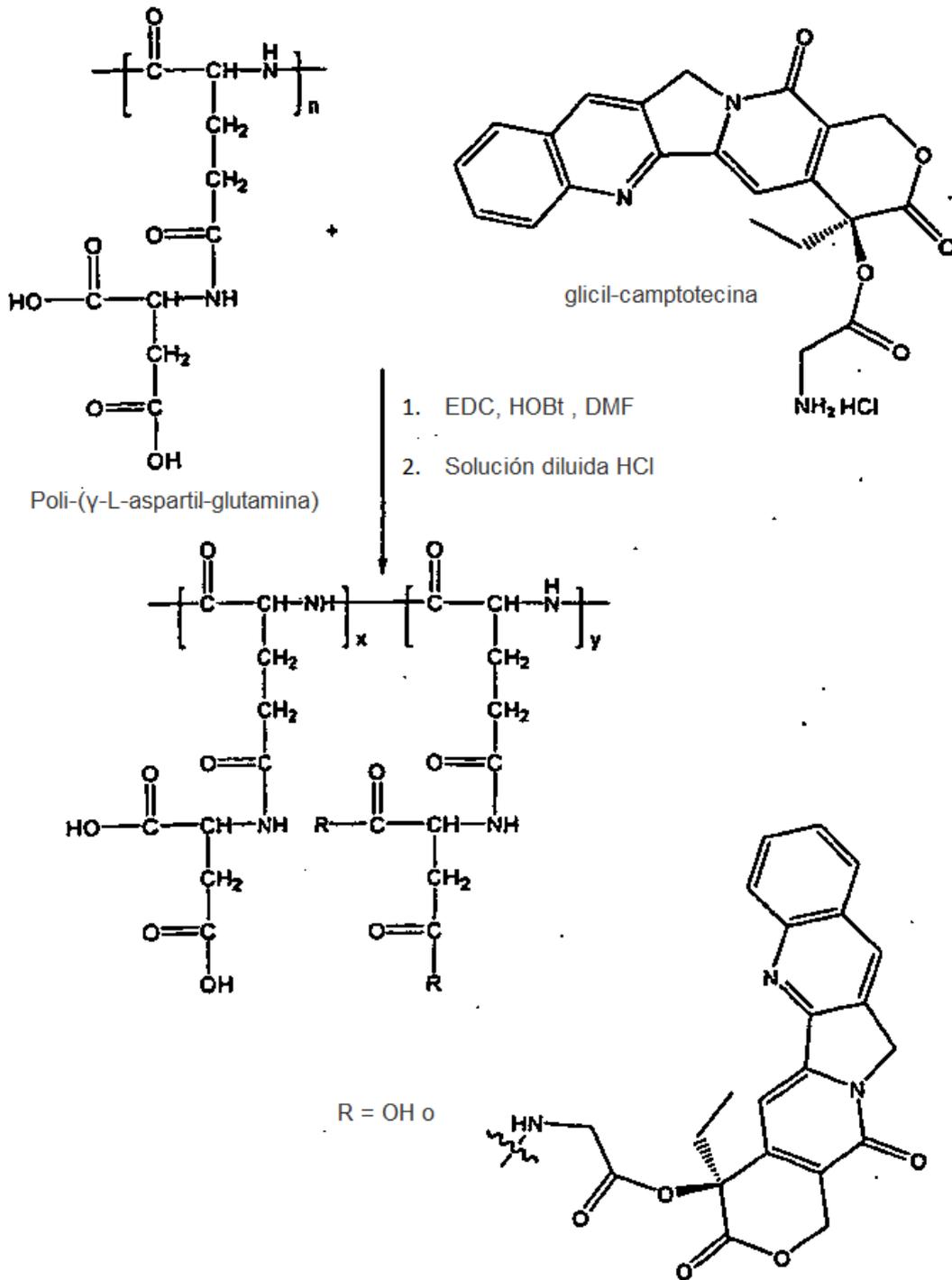


5 [0205] Poli-(γ-L-aspartil-glutamina) (70 mg), doxorubicina (30 mg), EDC (50 mg), HOBT (15 mg) se disolvieron en DMF (4 ml). La mezcla se colocó en un horno microondas a 120°C durante 10 minutos, y luego se vertió en una solución diluida de bicarbonato sódico 0,5 M y se dializó en agua desionizada utilizando una membrana de celulosa (de corte 10.000 daltons) en agua de ósmosis inversa (cambio de agua 4 veces) durante 1 día. Se obtuvo una solución de color rojo claro y se liofilizó. La estructura del producto resultante PGA-97-G-doxorubicina (80 mg) se confirmó por ¹H RMN.

10 EJEMPLO 16

Síntesis de PGA-97-G-Camptotecina

[0206]



5 [0207] Poli-(γ-L-aspartil-glutamina) (70 mg), glicil-camptotecina (30 mg), EDC (50 mg), HOBT (15 mg) se disolvieron en DMF (4 ml). La mezcla se calentó en un horno microondas a 120°C durante 10 minutos. La mezcla se vertió en DCM (150 ml), y se formó un precipitado. El residuo se sonicó en una solución diluida de ácido clorhídrico 0,2 N durante 15 minutos. El sólido resultante se filtró, se lavó con agua destilada y, a continuación se liofilizó. PGA-97-G-camptotecina se recogió como un sólido de color amarillo claro (50 mg).

EJEMPLO 17

Solubilidad

10 [0208] La solubilidad de diversos polímeros se ensayó a diferentes valores de pH y se comparó con un control de ácido poli-L-glutámico (PGA-19,800), de peso molecular medio de 19.800 daltons. Los polímeros ensayados fueron

5 poli-(γ -glutamil)-poli-L-glutamina (PGPG-19, 800), con un peso molecular medio de 19.800 daltons; poli-(γ -glutamil)-poli-L-glutamina (PGPG-37,400), con un peso molecular medio de 37.400 daltons; Poli-L-glutamato-paclitaxel-20% (PGA (32k)-PTX-20), que se preparó a partir de un polímero de partida PGA-19,800 y que tiene un contenido de paclitaxel de 20% en peso/peso ; PGA-21-G-20, que se preparó a partir de un polímero a partir de poli-(γ -glutamil)-poli-L-glutamina-19, 800 y que tiene un contenido de paclitaxel de 20% en peso por peso; y PGA de 32- G-20, que se preparó a partir de un polímero de partida de poli-(γ -glutamil)-poli-L-glutamina-37, 400 con un contenido de paclitaxel de 20% en peso/peso.

10 [0209] Cada polímero (5 mg) se añadió a un tampón de pH (1 mL) y la mezcla se sonicó durante 2 minutos. Después, la mezcla se dejó sedimentar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solubilidad se observó a simple vista y se registró en la escala de 1 a 10, donde 1 es muy insoluble, 5 es una suspensión turbia, y 10 es una solución muy clara. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 1.

TABLA 1 SOLUBILIDAD

pH \ Polymer	2	3	4	5	6	7	7.4
PGA-19,800	1	1	2	4	10	10	10
PGPG-19,800	10	10	10	10	10	10	10
PGPG-37,400	10	10	10	10	10	10	10
PGA(32k)-PTX-20	1	1	2	10	10	10	10
PGA-21-G-20	2	4	10	10	10	10	10
PGA-32-G-20	2	4	10	10	10	10	10

15 EJEMPLO 18 a

Cultivo de células y preparación:

20 [0210] Se adquirieron células B16F0 de ATCC (CRL-6322, ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD) y se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% suero fetal bovino y 100 unidades / ml de penicilina. Las células se incubaron a 37°C en un ambiente del 5% de CO₂. El medio de cultivo se separó y se desechó. Las células fueron lavadas con Solución Tampón Fosfato Dulbecco (DPBS), se añadió (0,5 ml) de solución de Tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y las células se observaron bajo un microscopio invertido para asegurarse que estaban dispersas. Se añadió medio de cultivo completo (6,0 a 8.0ml), y las células fueron aspiradas pipeteando suavemente. La suspensión de células en alícuotas apropiadas se transfirió a placas de cultivo nuevas. Las células se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 24 horas antes de experimentos adicionales.

25 EJEMPLO 18b

Estudios *in vitro* de captación celular

30 [0211] PGA-97-A-Texas Red y colorante Texas Red (TR) se disolvieron por separado en DPBS. Ambas soluciones que contienen el colorante se añadieron a las células a una concentración final de 0,1 μ M a 10 μ M. Las células con los compuestos se incubaron a 37°C durante 8-24 horas, después de lo cual las células se lavaron 3 veces con DPBS. Las células tratadas fueron examinadas con un microscopio Olympus de fluorescencia, y las longitudes de onda de excitación y emisión se midieron a 591 y 612 nm, respectivamente. Los resultados muestran que las células absorbieron el colorante rojo Texas de PGA-97-A-Texas Red pero no de Texas Red sólo.

35 [0212] Tres recipientes con muestras que contienen aproximadamente el mismo número de células de melanoma B16F0 se incubaron con PGA-97-A-Texas Red a 1 μ M, PGA-97-A-Texas Red a 0.1 μ M, y con Texas Red solo a 10 μ M, respectivamente, durante 24 horas. Las fotografías de captación celular *in vitro* en cada recipiente fueron tomadas con una cámara en un sistema de microscopio de fluorescencia Olympus. En la fotografía de la muestra con PGA-97-A-Texas Red a 1 μ M, aproximadamente el 30% de las células eran de color rojo. En la fotografía de la muestra con PGA-97-A- Texas Red a 0,1 μ M, aproximadamente 10% de las células eran de color
40 rojo. En la fotografía de la muestra con Texas Red solo a 10 μ M, 0% de las células eran de color rojo. Estos

resultados muestran que las células absorben el colorante de PGA-97-A-Texas Red, pero no absorben el colorante rojo de Texas sólo. El polímero conjugado es eficaz es eficaz para la administración intercelular de fármacos.

EJEMPLO 18 c

5 [0213] La captación celular también fue confirmada por microscopía confocal (Olympus FV1000). Los núcleos de las células fueron teñidos con Hoechst 33342 durante 5-20 minutos, se lavaron con DPBS 2-3 veces, y se observaron con un microscopio de escaneo láser confocal. Las longitudes de onda de excitación y emisión de Hoechst33342 se midieron a 405 y 461 nm, respectivamente. Rojo Texas (TR) fue excitado con un láser de 543nm, y se detectó a 615 nm en ambiente de CO₂ al 5% a 37°C. Los resultados muestran que el colorante Texas Red de PGA-97-A-Texas Red fue absorbido por las células B16F0 células después de 24 horas de exposición. El colorante rojo de Texas de PGA-97-A-Texas Red se halló en el citoplasma y excluido del núcleo.

10 [0214] Las fotografías que muestran la captación celular in vitro de PGA-97-A-Texas Red a 1µM se tomaron con microscopía confocal (Olympus FV100) para comparar la absorción en el citoplasma y la absorción en el núcleo. Las fotografías muestran que PGA-97-A-Texas Red fue absorbido por las células B16F0 después de 24 horas de exposición. PGA-97-A-Rojo Texas se halló en el citoplasma y excluido del núcleo.

EJEMPLO 19

Modelo de tumor singénico

20 [0215] Animales: ratones nu / nu, hembra, 6-8 semanas (22-25 g). Se produjeron tumores solitarios por inyección de 2×10^5 células (B16F0) de melanoma de ratón en el muslo derecho por vía subcutánea. 5-7 días después, cuando el tumor alcanzó aproximadamente 500 mm³, se inyectó por vía intravenosa PGA-97-A-Texas Red o Texas Red al tumor.

EJEMPLO 20

Administración de PGA-97-A-Texas Red o TR y sección de criostato

25 [0216] PGA-97-A-Texas Red y Texas Red se disolvieron por separado en DPBS y se filtraron a través de un filtro de 0.2 µm antes de ser administrados a los animales. 100 µl. de PGA-97-A-Texas Red (carga de TR de 2,5%) o Texas Red a 0,1-10 mM se inyectaron por vía intravenosa al tumor utilizando el modelo de tumor singénico del Ejemplo 19. Los tumores fueron disecados, incrustados bajo condiciones de temperatura óptima de corte y se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizaron secciones de criostato (6-15µm) y se fijaron con paraformaldehído al 4% con sacarosa 0,03 M en hielo durante 10-30 minutos. Las secciones se lavaron 2 veces con DPBS, se tiñeron con Hoechst 33342 (1µg/ml) durante 10minutos, y se lavaron de nuevo con DPBS. Las secciones fueron entonces montadas con un medio de montaje fluorescente (Dako Cytomation) y cubiertas con un cubreobjetos. Las secciones de criostato del tumor se observaron con un microscopio de escaneo láser confocal. Las imágenes mostraron el colorante rojo Texas de PGA-97-A-Texas Red acumulado en las células tumorales *in vivo* después de 24 horas de la administración intravenosa del PGA-97-A-Texas Red, pero no con el colorante Texas Red solo.

30 [0217] Se tomaron fotografías de la sección transversal de criostato de absorción del colorante PGA-97-A-Texas Red y de Texas Red solo en el tejido tumoral *in vivo*. Para cada uno, fueron tomadas tres secciones transversales diferentes de un total de seis imágenes. Tres fotografías de diferentes secciones transversales del colorante Texas Red solo se observaron como verde, naranja-amarillo y negro esencialmente. Tres fotografías de diferentes secciones transversales de PGA-97-A-Texas Red se observaron como verde, naranja-amarillo, y alguna zona roja. El colorante Texas Red de PGA-97-A-Texas Red se observó en los tejidos tumorales en una de las fotografías. Por otra parte, el colorante Texas Red no se observó en la fotografía similar Texas Red solo. Estos resultados muestran el colorante Texas Red de PGA-97-A-Texas Red acumulado en las células tumorales in vivo después de 24 horas de administración intravenosa de PGA-97-A-Texas Red, pero no con el colorante Texas Red solo.

35 [0218] Además, el colorante rojo Texas de PGA-97-A-Texas Red también podía verse en las células endoteliales a lo largo del vaso sanguíneo del tumor. Fotografías adicionales fueron tomadas de otra sección transversal de criostato del tejido tumoral. El colorante Red se observó a lo largo del vaso sanguíneo después de 24 horas de la administración intravenosa en la vena de la cola de PGA-97-ATexas Red. Los resultados muestran que el Rojo PGA-97-A-Texas podía verse en las células endoteliales a lo largo del vaso sanguíneo del tumor.

EJEMPLO 21

Estudios in vitro de citotoxicidad MTT

50 [0219] Los polímeros conjugados descritos aquí que contienen paclitaxel fueron evaluados para determinar su efecto sobre la proliferación de células de melanoma B16F0 a concentraciones diferentes varias del fármaco. El ensayo citotóxico MTT se llevó a cabo según se informó en Monks et al. JNCI 1991, 83, 757-766, que se incorpora aquí por

referencia en su totalidad. PGA-44-A-20 se preparó como en los Ejemplos 10a, a partir de poli (γ -L-aspartil-glutamina) con un peso molecular medio de 39.700 daltons en base al sistema Heleos con detector MALS, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero era del 20% en peso. PGA-97-A-20 se preparó como en el Ejemplo 10, a partir de poli (γ -L-aspartil-glutamina) con un peso molecular medio de 99.400 daltons basados en el sistema Heleos con detector MALS, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero era del 20% en peso. PGA (97K)-PTX-20 fue utilizado como polímero de control de este ejemplo y se preparó según el procedimiento de la bibliografía anterior a partir de ácido poli-L-glutámico con un peso molecular medio de 49.000 daltons en base al sistema Heleos con detector MALS, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero era del 20% en peso (ver Li et al., "Complete Regression of Well-established tumors using a novel water soluble poly (L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate." Cancer Research 1998, 58, 2404-2409). Los resultados se muestran en la Figura 13. La viabilidad de las células de melanoma disminuye con el aumento de concentración del fármaco, como se muestra en la Figura 13. Estos resultados indican que PGA-44-A-20 y PGA-97-20-A son agentes anticancerosos eficaces.

EJEMPLO 22

Estudios in vitro de citotoxicidad MTT

[0220] Un polímero conjugado que contiene paclitaxel se comparó con un polímero de control, un polímero que no contiene paclitaxel, y un control de taxol sin polímero para ver su efecto sobre la proliferación de células de melanoma B16F0 a varias concentraciones diferentes del fármaco. El ensayo citotóxico MTT se llevó a cabo según se informó en Monks et al. JNCI 1991, 83, 757-766. PGA-97-A-10 se preparó como en el Ejemplo 9, a partir de poli(γ -L-aspartil-glutamina) con un peso molecular medio de 99.400 dalton, en base al sistema Heleos con detector MALS, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero era del 10%. PGA (97K)-PTX-10 utilizado como polímero de control de este ejemplo se preparó de acuerdo con la literatura anterior (Li et al. "Complete Regression of Well-established tumors using a novel water soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate." Cancer Research 1998, 58, 2404-2409), a partir de ácido poli-L-glutámico con un peso molecular medio de 49.000 daltons en base al sistema Heleos con detector MALS, el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero de un 10%. El polímero que no contiene paclitaxel fue una sal sódica de poli-(γ -L-aspartil-glutamina).

[0221] Los resultados se muestran en la Figura 14. La sal sódica del polímero al no tener ningún medicamento antitumoral tuvo poco efecto sobre la viabilidad de las células de melanoma. Además, PGA-97-A-10 se comparó favorablemente con el polímero de control que contiene el fármaco antitumoral. Como se muestra en la Figura 14, PGA-97-A-10 actúa como un agente anticanceroso eficaz.

EJEMPLO 23

Modelos de Animales y tumores para estudios farmacocinéticos

[0222] Ratones desnudos (6-7 semanas de edad, peso corporal de 25-30 gramos, hembras) fueron adquiridos de Charles River Lab (Willington, MA). Líneas celulares B16F0 fueron adquiridas de ATCC (CRL-6322, ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD). Las células B16F0 se cultivaron en DMEM enriquecido con 10% suero fetal bovino, 2 μ M glutamina, 1mM aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio, 100U/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin. Las células B16F0 recolectadas a partir del cultivo de tejido fueron contadas y re-suspendidas a una concentración de 5 x 10⁶ por ml. Utilizando una jeringa TB, se administró 0,4 ml (un total de 2 x 10⁶ células) por vía subcutánea en cada ratón. Se inocularon cuatro tumores por animal en el hombro derecho, el hombro izquierdo, la cadera derecha y la cadera izquierda.

EJEMPLO 23a

[0223] En el punto en que el volumen medio del tumor para toda la población de ratones del Ejemplo 23 llegó a 200-300 mm³ (6-8 mm de diámetro), cada animal portador de un tumor recibió una sola inyección en bolo IV de 3H-Taxol (control) o PGA-44-A-19 vía vena de la cola.

[0224] PGA-44-A-19 se preparó como en el Ejemplo 10 c, a partir de poly(γ -L-aspartyl-glutamina) con un peso molecular medio de 39.700 Dalton en base al sistema de Heleos con detector de MALS, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero fue del 19% en peso. El control para este ejemplo fue Taxol. La dosis de ³H-Taxol libre (control) y PGA-44-A-19 fue de 20 mg en paclitaxel equivalente/kg. Para cada fármaco, fueron anestesiados grupos de 4 ratones a varios tiempos (cada unidad es en horas): 0 (es decir, tan pronto como posible después de la inyección IV), 0,083, 0,25, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 48, 72, 96, 120 y 144. Se extrajeron 0,5 ml de sangre obtenida por punción cardíaca o retro-orbital en tubos heparinizados. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados antes de recuperarse de la anestesia. Las muestras de sangre de cada ratón se centrifugaron a 11.000 rpm. El plasma sobrenadante (0.2-0.3 ml) de las muestras de sangre se recogieron y se transfirieron a un nuevo vial. 0,1 ml de plasma de cada muestra se transfirió por separado a un nuevo vial de 10 ml, y se añadió al vial una solución de líquido de centelleo (5 ml). El contenido del paclitaxel fue analizado mediante un Contador de Líquido de Centelleo LS6500 (Beckman) y fue calculado a partir de una curva estándar para cada muestra. Los resultados se muestran en la figura 15. La concentración de paclitaxel de PGA-44-A-19 se mantuvo mucho más alta durante un período de

tiempo más largo. Estos resultados indican que paclitaxel de PGA-44-A-19 es más eficaz a largo plazo en la circulación sanguínea comparado con Taxol solo.

EJEMPLO 24

5 [0225] En el momento en que el volumen medio del tumor para toda la población de ratones del Ejemplo 23 llegó a 200-300 mm³ (6-8 mm de diámetro), cada animal portador de un tumor (ratones desnudos nu/nu) recibió una sola inyección en bolo IV de ³H-Taxol (control) o PGA-44-A-19 a través de una vena de la cola.

10 [0226] PGA-44-A-19 se preparó como en el Ejemplo 10 c, a partir de poly(γ -L-aspartyl-glutamina) con un peso molecular medio de 39.700 Dalton en base al sistema de Heleos con detector de MALS, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero fue del 19%. La dosis de ³H-Taxol libre (control) y PGA-44-A-19 fue de 20 mg en paclitaxel equivalente /kg. Para cada fármaco, se anestesiaron grupos de 4 ratones a varios tiempos (cada unidad es en horas): 0 (es decir, tan pronto como posible después de la inyección IV), 0.083, 0,25, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 48, 72, 96, 120 y 144. Se recogieron de forma independiente tumores de las dos caderas y de los dos hombros. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados antes de recuperarse de la anestesia. Aproximadamente 80-180 mg de cada tumor fue colocado en un vial de centelleo, y el tumor fue digerido con Soluene (solubilizador de tejido) (1 mL). A 15 continuación, 0,1 mL de tejido digerido fue transferido a un vial de 10 mL, y se añadió al vial una solución de líquido de centelleo (5 ml). El contenido del paclitaxel fue analizado mediante un Contador de Centelleo Líquido LS6500 (Beckman) y fue calculado a partir de una curva estándar para cada muestra. PGA-44-A-19 se comparó con el control de Taxol. Los resultados se muestran en la figura 16. La acumulación de paclitaxel de PGA-44-A-19 en el tumor se mantuvo mucho más alta durante un período de tiempo más largo. Estos resultados indican que paclitaxel de 20 PGA-44-A-19 mejoró la acumulación en los tumores comparado con Taxol solo.

Modelos de Animales y Tumores para Estudios de Eficacia *in vivo*

25 [0227] Ratones desnudos (6-8 semanas de edad, peso corporal 21-25 gramos, machos) fueron adquiridos de Charles River Lab (Willington, MA). Las células B16-F0-EGFP se mantuvieron estables en un medio de cultivo de células DMEM enriquecido con 10% de suero bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Las células se dividieron 48 horas antes de la inoculación por lo que estaban en fase logarítmica de crecimiento cuando se recolectaron. Las células fueron recolectadas desde el cultivo de tejido usando tripsina-EDTA y el número de células viables fue determinado por recuento en un hemocitómetro en presencia de azul de tripano. Las células se suspendieron a una concentración de 5x10⁶ por ml en un medio DMEM sin suero. La suspensión de células tumorales se inoculó con una jeringa de 1 cc de insulina a una concentración de 5 x 10⁶ por ml en cada hombro y cada cadera mediante la inyección de 0,1 ml de suspensión de las células tumorales (4 sitios / ratón). 30

[0228] En el día de la inoculación del tumor, los ratones fueron secuencialmente colocados en uno de los 6 grupos y se alojaron 3 ratones en una jaula con un número total de 12 jaulas. A cada ratón se le perforó una oreja bajo anestesia en el momento de la inoculación del tumor de modo que pudiera ser identificado durante todo el experimento. Cada jaula fue identificada con el fármaco, la dosis de fármaco administrada a los animales que 35 contenía, y el número de animales que contenía.

EJEMPLO 25a

[0229] Se midió la pérdida de peso y la toxicidad a la dosis máxima tolerada (DMT) de polímeros preparados según los Ejemplos 11a-11c. DMT se define aquí como la dosis que produce una pérdida máxima del 15% del peso corporal en 2 semanas. PGA-21-G-20 y PGA-32-G-20 se prepararon como se describe en los Ejemplos 11c y 11b, respectivamente., a partir de polímeros poli(γ -L-glutamyl-glutamina) con peso molecular medio de 19.800 y 37.400 daltons, respectivamente, en base al sistema Heleos con detector MALS, y el porcentaje en peso de paclitaxel en cada uno de los polímeros fue de 20%. PGA-21-G-20 y PGA-32-G-20 se disolvieron en solución salina a 50 mg por ml. El fármaco anticanceroso control para este ejemplo fue Abraxano, el cual está aprobado por la FDA como un medicamento contra el cáncer. Se utilizó solución salina también como un control negativo sin fármaco antitumoral. 40 La cantidad real de fármaco inyectable se determinó a partir del peso corporal de cada animal. La primera dosis del fármaco se administró a los ratones cuando el tamaño del tumor promedio de toda la población de ratones alcanzó de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 mm³ (el tamaño del tumor fue estimado a partir de la fórmula (W² x 1) / 2 donde "1" es el diámetro mayor del tumor y "w" es el diámetro perpendicular al diámetro mayor medido en milímetros). Los ratones recibieron 2 dosis del fármaco en dos días consecutivos mediante una inyección 45 administrada en la vena de la cola sin anestesia. Las soluciones madre se prepararon frescas en el día de la inyección. Las soluciones madre de los fármacos se recogieron en una jeringa de 1-cc y se inyectaron por vía intravenosa. Los ratones se pesaron con una precisión de 0,1 g. Los ratones desnudos nu / nu fueron inyectados con cantidades de dosificación más altas de PGA-21-G-20 a una dosis de 175 mg / kg y de PGA-32-G-20 a una dosis de 150 mg / kg en comparación con Abraxano a una dosis de 100 mg / kg en paclitaxel equivalente. El cambio en el peso corporal (%) tras el tratamiento de cada fármaco se observó de forma independiente y se registró con el tiempo (días). Los resultados se muestran en la Figura 17. PGA-21-G-20 muestra poca pérdida de peso corporal a dosis mucho más alta. PGA-32-G-20 mostró una pérdida de peso corporal comparable a Abraxano a una dosis mucho mayor. Estos resultados indican que los polímeros preferidos de la presente invención conjugados con 55 fármacos anticancerosos son menos tóxicos para los ratones.

EJEMPLO 26Estudios de eficacia *in vivo*

[0230] Los efectos antitumorales de PGA-21-G-20, PGA-32-G-20, y Abraxano, a la dosis máxima tolerada (DMT) en tumores de melanoma B16F0-EGF se midieron en ratones desnudos nu / nu con el tiempo como se describe en el Ejemplo 25 con una solución salina como control negativo. PGA-21-G-20 y PGA-32-G-20 se disolvieron en solución salina a 50 mg por ml. El fármaco anticanceroso control para este ejemplo fue Abraxano, el cual está aprobado por la FDA como un medicamento contra el cáncer. Se utilizó también solución salina como un control negativo sin fármaco antitumoral. La cantidad real de fármaco inyectable se determinó a partir del peso corporal de cada animal. La primera dosis de fármaco se administró a los ratones cuando el tamaño del tumor promedio de toda la población de ratones en el estudio alcanzó de 15 a 50 mm³. Los ratones recibieron 2 dosis del fármaco en dos días consecutivos mediante una inyección administrada por vía intravenosa en la vena de la cola sin anestesia. Las soluciones madre se prepararon frescas en el día de la inyección. Las soluciones madre de los fármacos se recogieron en una jeringa de 1-cc y se inyectaron por vía intravenosa. El tamaño del tumor se midió con una precisión de 0,1 mm. Los ratones desnudos nu / nu fueron inyectados con cantidades de dosificación más altas de PGA-21-G-20 a una dosis de 175 mg / kg y de PGA-32-G-20 a una dosis de 150 mg / kg en comparación con el control Abraxano a una dosis de 100 mg / kg en paclitaxel equivalente. El cambio en el volumen del tumor tras el tratamiento de cada fármaco se observó de forma independiente y se registró con el tiempo (días). Los resultados se muestran en la Figura 18. Tanto PGA-21-G-20 como PGA-32-G-20 inhiben significativamente el crecimiento tumoral. Estos resultados indican que los polímeros preferidos de la presente invención conjugados con fármacos anticancerosos son agentes anticancerosos eficaces.

EJEMPLO 27

[0231] La pérdida de peso y la toxicidad a la dosis máxima tolerada (DMT) se midieron en los polímeros preparados según el Ejemplo 11. PGA-97-G-20 se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 11. El material de partida fue poli (γ-L-glutamilglutamina) con un peso molecular medio de 110.800 daltons en base al sistema Heleos con detector MALS. El porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero fue de 20%. PGA-97-G-20 se disolvió en solución salina a 50 mg por ml. Los fármacos anticancerosos control para este ejemplo fueron Taxol y Abraxano, los cuales están aprobados por la FDA como medicamentos contra el cáncer. Se utilizó también solución salina como un control negativo sin fármaco antitumoral. La cantidad real de fármaco inyectable se determinó a partir del peso corporal de cada animal. La primera dosis de fármaco se administró a los ratones cuando el tamaño del tumor promedio de toda la población de ratones en el estudio alcanzó de 15 a 50 mm³. Los ratones recibieron 2 dosis del fármaco en dos días consecutivos mediante una inyección administrada por vía intravenosa en la vena de la cola sin anestesia. Las soluciones madre se prepararon frescas en el día de la inyección. Las soluciones madre de los fármacos se recogieron en una jeringa de 1-cc y se inyectaron por vía intravenosa. Los ratones se pesaron con una precisión de 0,1 g. Los ratones desnudos nu / nu fueron inyectados con cantidades de dosificación más altas de PGA-97-G-20 (60 mg / kg) en comparación con Abraxano (100 mg / kg) y Taxol (50 mg / kg) en paclitaxel equivalente. El cambio en el peso corporal (%) tras el tratamiento de cada fármaco se observó de forma independiente y se registró con el tiempo (días). Los resultados se muestran en la figura 19. Como se muestra en la Figura 19, PGA-97-G-20 mostró una pérdida de peso comparable al control en una dosis mucho mayor. Estos resultados indican que los polímeros preferidos de la presente invención conjugados con un fármaco anticanceroso tienen una toxicidad comparable a la de un medicamento clínicamente aprobado.

EJEMPLO 28Estudios de eficacia *in vivo*

[0232] Los efectos antitumorales de PGA-97-G-20, Taxol, y Abraxano, a la dosis máxima tolerada (DMT) en tumores de melanoma B16F0-EGF se midieron en ratones desnudos nu / nu con el tiempo con solución salina como control negativo. PGA-97-G-20 se disolvió en solución salina a 50 mg por ml. Los fármacos anticancerosos control para este ejemplo fueron Taxol y Abraxano, los cuales están aprobados por la FDA como medicamentos contra el cáncer. Se utilizó también solución salina como un control negativo sin fármaco antitumoral. La cantidad real de fármaco inyectable se determinó a partir del peso corporal de cada animal. La primera dosis de fármaco se administró cuando el tamaño del tumor promedio de toda la población de ratones en el estudio alcanzó de 15 a 50 mm³. Los ratones recibieron 2 dosis del fármaco en dos días consecutivos mediante una inyección por vía intravenosa en la vena de la cola sin anestesia administrada al día siguiente. Las soluciones madre se prepararon frescas en el día de la inyección. Las soluciones madre de los fármacos se recogieron en una jeringa de 1-cc y se inyectaron por vía intravenosa. El tamaño del tumor se midió con una precisión de 0,1 mm. Los ratones desnudos nu / nu fueron inyectados con cantidades de dosificación más altas de PGA-97-G-20 a una dosis de 60 mg / kg en comparación con Abraxano a una dosis de 100 mg / kg y Taxol 50 mg / kg en paclitaxel equivalente. El cambio en el volumen del tumor tras el tratamiento de cada fármaco se observó de forma independiente y se registró con el tiempo (días). Los resultados se muestran en la figura 20. Como se muestra en la figura 20, PGA-97-G-20 tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento del tumor y mejor rendimiento que el Taxol y Abraxano. Estos resultados indican que los polímeros preferidos de la presente invención conjugados con fármacos anticancerosos son agentes anticancerosos eficaces.

EJEMPLO 29

[0233] La pérdida de peso y la toxicidad a la dosis máxima tolerada (DMT) de polímeros conjugados con paclitaxel para el ácido poliglutámico conjugado con paclitaxel se midieron. PGA-32-G-20 se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 11b. El material de partida fue poli (γ -L-glutamil-glutamina) con un peso molecular medio de 37.400 daltons basados en el sistema Heleos con detector MALS, y el porcentaje en peso de paclitaxel en cada uno de los polímeros fue de 20%. PGA-32-G-20 se comparó con un control de ácido poliglutámico con un peso molecular de 19.450 dalton (en base al sistema Heleos con MALS) conjugado con paclitaxel tal que el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero es 20% (PGA (32k)-PTX-20). Se utilizó también solución salina como un control negativo sin fármaco antitumoral. Tanto PGA-32-G-20 como PGA(32k)-PTX-20 se disolvieron en solución salina a 50 mg por ml. Se utilizó solución salina como control sin ningún fármaco antitumoral. La cantidad real de fármaco inyectable se determinó a partir del peso corporal de cada animal. La primera dosis de fármaco se administró cuando el tamaño del tumor promedio de toda la población de ratones en el estudio alcanzó de 15 a 50 mm³. Los ratones recibieron 2 dosis del fármaco en dos días consecutivos mediante una inyección por vía intravenosa en la vena de la cola sin anestesia administrada al día siguiente. Las soluciones madre se prepararon frescas en el día de la inyección. Las soluciones madre de los fármacos se recogieron en una jeringa de 1-cc y se inyectaron por vía intravenosa. Los ratones se pesaron con una precisión de 0,1 g. Los ratones se pesaron con una precisión de 0,1 g. Los ratones desnudos nu / nu fueron inyectados con cantidades de dosificación más altas de PGA-32-G-20 a una dosis de 125 mg / kg en comparación con PGA (32k)-PTX-20 a una dosis de 100 mg / kg en paclitaxel equivalente. El cambio en el peso corporal (%) tras el tratamiento de cada fármaco se observó de forma independiente y se registró con el tiempo (días). Los resultados se muestran en la Figura 21. PGA-32-G-20 mostró una pérdida de peso corporal comparable a la del control a una dosis mucho mayor. Estos resultados indican que los polímeros preferidos de la presente invención conjugados con fármacos anticancerosos tienen una toxicidad comparable al fármaco en investigación.

EJEMPLO 3025 Estudios de eficacia in vivo

[0234] Los efectos antitumorales de PGA-32-G-20, PGA(32k)-PTX-20, a la dosis máxima tolerada (DMT) en tumores de melanoma B16F0-EGF se midieron en ratones desnudos nu / nu con el tiempo con una solución salina como control negativo. PGA-32-G-20 y PGA(32k)-PTX-20 se disolvieron en solución salina a 50 mg por ml. Se utilizó también solución salina como un control negativo sin fármaco. La cantidad real de fármaco inyectable se determinó a partir del peso corporal de cada animal. La primera dosis de fármaco se administró a los ratones cuando el tamaño del tumor promedio de toda la población de ratones en el estudio alcanzó de 15 a 50 mm³. Los ratones recibieron 2 dosis del fármaco mediante una inyección por vía intravenosa en la vena de la cola sin anestesia administrada al día siguiente. Las soluciones madre se prepararon frescas en el día de la inyección. Las soluciones madre de los fármacos se recogieron en una jeringa de 1-cc y se inyectaron por vía intravenosa. Los ratones se pesaron con una precisión de 0,1 g. Los ratones desnudos nu / nu fueron inyectados con cantidades de dosificación más altas de PGA-32-G-20 a una dosis de 125 mg / kg en comparación con PGA (32k)-PTX-20 a una dosis de 100 mg / kg en paclitaxel equivalente. El cambio en el volumen del tumor tras el tratamiento de cada fármaco se observó de forma independiente y se registró con el tiempo (días). Los resultados se muestran en la Figura 22. Tanto PGA-21-G-20 como PGA-32-G-20 inhiben significativamente el crecimiento tumoral. Estos resultados indican que los polímeros preferidos de la presente invención conjugados con fármacos anticancerosos son agentes anticancerosos eficaces. PGA-32-G-20 tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento del tumor y un mejor rendimiento que PGA (32k)-PTX-20. Estos resultados indican que los polímeros preferidos de la presente invención conjugados con fármacos anticancerosos son agentes anticancerosos eficaces.

EJEMPLO 31

45 [0235] Los polímeros conjugados fueron probados para determinar la velocidad a la que se libera paclitaxel en relación con la selección de diferentes pesos moleculares de los polímeros. PGA-21-G-20, PGA-32-G-20, PGA-97-G-20 y un control de PGA(97k)-PTX-20 fueron colocados en tampones fosfato a una concentración de 2 mg/ml y se midió la tasa de liberación. La solución de polímeros conjugados de paclitaxel se incubó a 37°C. Una alícuota de 50 μ l se tomó a diferentes tiempos y se congeló. Todas las alícuotas se analizaron después por LC-MS. Se midió el área de integración del pico del fármaco liberado en el perfil HPLC. La cantidad de paclitaxel liberado se calculó a partir de la curva estándar. Los resultados están ilustrados en la figura 23 y muestran que según aumenta el peso molecular del polímero conjugado, el porcentaje de paclitaxel liberado disminuye. Estos resultados indican que la tasa de liberación del paclitaxel puede controlarse mediante la selección de diferentes pesos moleculares para el polímero

55 EJEMPLO 32Modelos de Animales y Tumor para Estudios Farmacocinéticos

[0236] Ratones desnudos (6-7 semanas de edad, peso corporal 25-30 gramos, hembras) fueron adquiridos de Charles River Lab (Willington, MA). Líneas celulares B16F0 fueron adquiridas de ATCC (CRL-6322, ATCC American

Type Culture Collection, Rockville, MD). Las células B16F0 se cultivaron en DMEM enriquecido con 10% suero fetal bovino, 2µM glutamina, 1mM aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio, 100U/ml penicilina y estreptomycin 100µg/ml. Las células recolectadas B16F0 a partir de cultivo de tejido fueron contadas y re-suspendidas a una concentración de 5×10^6 por ml. Utilizando una jeringa TB, se administró 0,4 ml (un total de 2×10^6 células) por vía subcutánea en cada ratón. Se inocularon cuatro tumores por animal en el hombro derecho, el

5

[0237] Varios polímeros conjugados-fármacos se probaron frente a un control de Taxol para determinar la concentración de paclitaxel en plasma con el tiempo. En el momento en que el volumen del tumor promedio para toda la población de ratones del Ejemplo 32 llegó a 200-300 mm³ (6-8 mm de diámetro), cada animal portador de un tumor recibió una sola inyección en bolo IV de ³H-Taxol (control), PGA-21-A-19, PGA-32-A-19, PGA-97-A-24, a través de una vena de la cola.

10

[0238] PGA-21-G-19 se preparó a partir del polímero reactivo poly-(γ-L-glutamyl-glutamina) de peso molecular 19.800 Dalton, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero era 19%. PGA-32-G-19 se preparó a partir del reactivo polímero poly-(γ-L-glutamyl-glutamina) de peso molecular 37.400 Dalton. y el porcentaje en peso del paclitaxel en el polímero era 19%. PGA-97-G-24 se preparó a partir del reactivo polímero poly-(γ-L-glutamyl-glutamina) de peso molecular 110.800 Dalton y el porcentaje de peso de paclitaxel en el polímero era 24%.

15

[0239] La dosis de ³H-Taxol libre (control), PGA-21-A-19, PGA-32-A-19 y PGA-97-A-24 fue 20 mg de paclitaxel equivalente/kg. Para cada fármaco, fueron anestesiados grupos de 4 ratones a varios tiempos (cada unidad es en horas): 1.0, 2.0, 4.0 y 24. Se extrajeron 0,5 ml de sangre obtenida por punción cardíaca o retro-orbital en tubos heparinizados. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados antes de recuperarse de la anestesia. Las muestras de sangre de cada ratón se centrifugaron a 11.000 rpm. El plasma sobrenadante (0.2-0.3 ml) de las muestras de sangre se recogió y se transfirió a un nuevo vial. 0,1 ml de plasma de cada muestra se transfirió por separado a un nuevo vial de 10 ml, y se añadió al vial una solución de centelleo líquido (5 ml). El contenido del paclitaxel fue analizado mediante un Contador de Centelleo Líquido LS6500 (Beckman) y fue calculado a partir de una curva estándar para cada muestra. Los resultados se muestran en la figura 24. Estos resultados muestran que el fármaco paclitaxel en polímeros conjugados preferidos de la presente invención tiene una permanencia mayor en el plasma, en comparación con Taxol.

20

25

EJEMPLO 33

[0240] Varios conjugados polímero-fármaco se probaron frente a un control de Taxol para determinar la concentración de paclitaxel en un tumor con el tiempo. En el momento en que el volumen del tumor promedio para toda la población de ratones del Ejemplo 32 llegó a 200-300 mm³ (6-8 mm de diámetro), cada animal portador de un tumor recibió una sola inyección en bolo IV de ³H-Taxol (control), PGA-21-A-19, PGA-32-A-19, PGA-97-A-24, a través de una vena de la cola.

30

[0241] PGA-21-G-19 se preparó a partir del polímero reactivo poly-(γ-L-glutamyl-glutamina) de peso molecular 19.800 Dalton, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero del 19%. PGA-32-G-19 se preparó a partir del polímero reactivo poly-(γ-L-glutamyl-glutamina) de peso molecular 37.400 Dalton y el porcentaje en peso del paclitaxel en el polímero era 19%. PGA-97-G-24 se preparó a partir del reactivo polímero poly-(γ-L-glutamyl-glutamina) de peso molecular 110.800 Dalton y el porcentaje de peso de paclitaxel en el polímero era 24%.

35

[0242] La dosis de ³H-Taxol libre (control), PGA-21-A-19, PGA-32-A-19 y PGA-97-A-24 fue 20 mg de paclitaxel equivalente/kg. Para cada fármaco, fueron anestesiados grupos de 4 ratones a varios tiempos (cada unidad es en horas): 1.0, 2.0, 4.0 y 24. Se recogieron de forma independiente tumores de las dos caderas y de los dos hombros. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados antes de recuperarse de la anestesia. Aproximadamente 80-180 mg de cada tumor fue colocado en un vial de centelleo, y el tumor fue digerido con Soluene (solubilizador de tejido) (1 mL). A continuación, 0,1 mL de tejido digerido fue transferido a un vial de 10 mL, y se añadió al vial una solución de líquido de centelleo (5 ml). El contenido del paclitaxel fue analizado mediante un Contador de Centelleo Líquido LS6500 (Beckman) y fue calculado a partir de una curva estándar para cada muestra. Los resultados se muestran en la figura 25. Estos resultados muestran que el fármaco paclitaxel en polímeros conjugados preferidos de la presente invención está más concentrado en el tumor a lo largo del tiempo, en comparación con Taxol.

40

45

EJEMPLO 34

Modelos de Animales y Tumores

50

[0243] Ratones desnudos (6-7 semanas de edad, peso corporal de 25-30 g, machos) fueron adquiridos de Charles River Lab (Willington, MA). La línea celular B16 se adquirió de ATCC (CRL-6322, ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD). Las células B16 se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino, 2 µM de glutamina, 1mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio, 100U/ml penicilina y 100µg/mL de estreptomycin. Las células B16 recolectadas a partir del cultivo de tejido se contaron y se re-suspendieron a una concentración de 5×10^6 por ml. Utilizando una jeringa TB, se administró 0,2 ml (un total de 1×10^6 células) por vía subcutánea a cada ratón. Se inoculó un tumor por animal en la cadera derecha. El sitio de la inoculación del tumor se afeitó antes de la inoculación para hacer más fácil la medida del tumor a medida que crece.

55

EJEMPLO 35Imagen de resonancia magnética de acumulación tumoral

[0244] Las imágenes de los ratones fueron obtenidas en un escáner GE RM 3T utilizando una bobina de rodilla antes y después del contraste. Los parámetros de imagen fueron los siguientes TE: minful, TR = 250 ms, FOV: 8 y 24 cortes/placa, y 1,0 mm de espesor de corte coronal. PGA-97-A-DTPA-Gd (III) se preparó como en los ejemplos 7-8, a partir de poli-(γ -L-aspartil-glutamina) con un peso molecular medio de 99,400 daltons basados en el sistema Heleos con detector MALS. El material de control para este Ejemplo fue OMNISCAN-Gd (III) - (DTPA-BMA (0,1 mmol de Gd(III) / kg) La dosis de inyección de PGA-97-A-DTPA-Gd (III) fue de 0,1 mmol de Gd (III) / kg. La dosis de inyección de OMNISCAN™ fue de 0,1 mmol de Gd (III) / kg. Los dos compuestos fueron inyectados a través de una vena de la cola en ratones anestesiados y las imágenes fueron obtenidas en la pre-inyección y de 6 minutos a 4 horas después de la inyección de los agentes de contraste. Los resultados de la resonancia magnética se muestran en la Figura 26. Como se muestra en la Figura 26, la cantidad de quelato PGA-97-A-DTPA-Gd (III) acumulado en el tejido tumoral es mayor que la molécula pequeña OMNISCAN-Gd (III). Estos resultados indican que los quelatos PGA-97-A-DTPA-Gd (III) tienen una mayor especificidad y retención.

EJEMPLO 36Estudios sobre la formación de nano-partículas

[0245] Se añadieron varias soluciones (filtradas a través de un filtro de 0,2 μ m) al poli-(γ -aspartil-glutamina de peso molecular de 99,400 daltons) a 1 mg/ml excepto donde se indica. Todas las soluciones se disolvieron homogéneamente. El tamaño de partícula, polidispersidad e índice basal se midió por ZetalPals de dispersión de luz (Brookhaven Instrument Corporation). Los resultados se resumen en la Tabla 2. El agua MilliQ significa agua que se filtró a través de un sistema de transferencia con un filtro 0.2 μ m.

Tabla 2. Poliqlutamato-ácido aspártico forma nano-partículas

	diámetro efectivo	polidispersidad	índice basal
MilliQ agua	244.8 nm	0.264	9.6
MilliQ agua (0.1 mg/mL)	198.0 nm	0.176	8.6
MilliQ agua (0.1M NaNO ₃)	169.4 nm	0.336	10.0
PBS (pH 7.4)	138.8 nm	0.345	7.8
PBS (pH 5.0)	141.0 nm	0.325	9.9

EJEMPLO 37**Formación de nanopartículas de PGA-97-A-10.**

[0246] PGA-97-A-10 se disolvió en agua desionizada a varias concentraciones. El tamaño de partícula, polidispersidad, e índice basal se midieron por la dispersión de la luz (ZetaPals, Brookhaven Instruments Corporation). Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 3:

Tabla 3 - Formación de nano-partículas de PGA-97-A-10 en agua desionizada

Conc. (μ g/mL)	Tamaño (nm)	Polidispersidad	Índice basal
722	438.9	0.133	9.7
289	379.0	0.169	8.8
100	357.5	0.226	9.1
50	309.4	0.215	9.5
10	209.6	0.220	9.3
5	194.9	0.208	8.1

(continuación)

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Tamaño (nm)	Polidispersidad	Índice basal
1	178.0	0.172	7.4
0.5	N/A	0.122	0

EJEMPLO 38

5 [0247] Se tomó una imagen por microscopía electrónica de una fractura por congelación de un conjugado polímero-fármaco fue tomada por Nano Analytical Laboratory (San Francisco, CA). El polímero fue PGA-44-A-20 que se preparó a partir de poly-(γ -L-aspartyl-glutamine) donde el peso molecular era de 39.700 Dalton, y el porcentaje en peso de paclitaxel en el polímero del 20%. Se hizo a una concentración de 1 mg/mL en solución salina después de sonicación (~ 5 min). Después, se envolvió en parafilm y se envió a la compañía de inmediato. (en total alrededor de un día en tránsito). A su llegada, se almacenó a 4° C. El polímero se puso entonces en una solución salina acuosa para determinar si se formarían nanopartículas. Una reproducción de la imagen por microscopía electrónica se muestra en la Figura 27. Como puede verse en la imagen, las nanopartículas de un conjugado polímero-fármaco preferido de la presente invención se formaron cuando el polímero conjugado se puso en una solución acuosa.

EJEMPLO 39

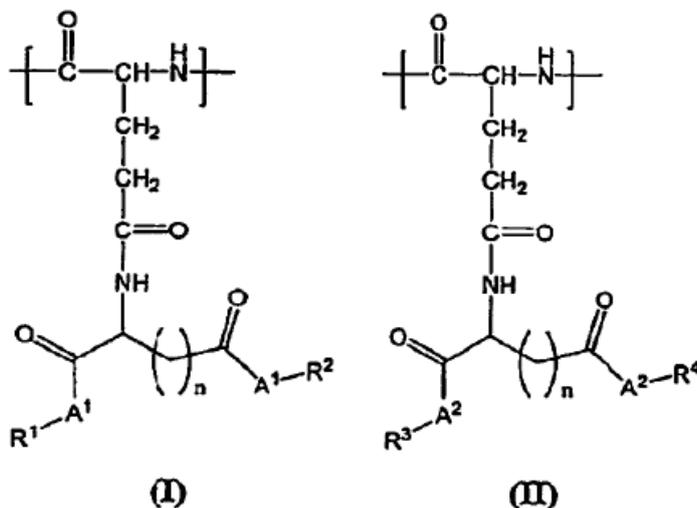
15 [0248] Se ensayaron partículas de los conjugados polímero-fármaco para determinar la estabilidad a diferentes concentraciones de fármaco. Se formaron partículas de PGA-44-A-20 y PGA-97-A-20 a varias concentraciones de fármaco y se midió el tamaño de partícula. Los resultados se muestran en la Figura 28. Las partículas se mantuvieron en el intervalo de tamaño de las nanopartículas y se mantuvieron estables incluso con una concentración del fármaco mayor. Estos resultados indican que se pueden formar nanopartículas estables en un amplio intervalo de concentración del fármaco.

EJEMPLO 40

25 [0249] Se ensayaron partículas de los conjugados polímero-fármaco para determinar la estabilidad a diferentes concentraciones de fármaco. Se formaron partículas de PGA-21-G-20 y PGA-32-G-20 a varias concentraciones de fármaco y se midió el tamaño de partícula. Los resultados se muestran en la Figura 29. Las partículas se mantuvieron en el intervalo de tamaño de las nanopartículas y se mantuvieron estables incluso con una concentración del fármaco mayor. Estos resultados indican que se pueden formar nanopartículas estables en un amplio intervalo de concentración del fármaco.

REIVINDICACIONES

1. Un polímero conjugado que comprende una unidad recurrente de la fórmula (I) y una unidad recurrente de la fórmula (II):



- 5 en donde
 cada n es 2,
 cada A^1 es oxígeno o NR^5 ,
 cada A^2 es oxígeno,
 R^1 y R^2 son seleccionados cada uno independientemente del grupo que consta de un metal alcalino, un
 10 ligando polidentado, y un compuesto que comprende un agente;
 donde el agente es seleccionado entre el grupo constituido por un fármaco anticanceroso, un agente de
 imagen de resonancia magnética;
 en donde al menos uno de R^1 y R^2 es un grupo que comprende un agente;
 15 R^3 y R^4 son seleccionados cada uno independientemente del grupo constituido por hidrógeno, amonio, y un
 metal alcalino;
 donde el polímero conjugado comprende una cantidad del agente en el intervalo de aproximadamente 1 a
 aproximadamente 50% (peso/peso) basado en la relación de masa del agente al de polímero conjugado;
 R^5 es hidrógeno o alquilo C_{1-4} ; y
 20 donde la cantidad del agente, el porcentaje de la unidad recurrente de fórmula (I) y el porcentaje de la
 unidad recurrente de fórmula (II) se seleccionan para proporcionar una solubilidad del polímero conjugado
 que es mayor que la de un conjugado de ácido poliglutámico comparable que comprende sustancialmente
 la misma cantidad del agente, la solubilidad del polímero conjugado es mayor cuando una solución
 25 analizada de polímero conjugado, que comprende al menos 5 mg/ml de polímero conjugado en solución
 acuosa 0,9% en peso NaCl a aproximadamente 22°C, tiene mayor claridad óptica en un intervalo de pH
 más amplio que la de una solución analizada de conjugado de ácido poliglutámico .
 2. El polímero conjugado de la Reivindicación 1, en donde el porcentaje en peso del agente está en el
 intervalo de aproximadamente 5% a aproximadamente 40% o en el intervalo de aproximadamente 10% a
 aproximadamente 30%.
 3. El polímero conjugado de la Reivindicación 1 o 2, en donde el agente es un fármaco contra el
 30 cáncer tal como paclitaxel.
 4. El polímero conjugado de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente es un agente
 de imagen de resonancia magnética, tal como un compuesto de Gd (III).

5. El polímero conjugado de la Reivindicación 4, en donde el porcentaje en peso del compuesto de Gd (III) es de aproximadamente 7%.
- 5 6. Una composición farmacéutica que comprende el polímero conjugado de alguna de las Reivindicaciones 1 a 5 y al menos uno seleccionado entre un excipiente, un portador y un diluyente farmacéuticamente aceptables.
7. Una composición farmacéutica de la Reivindicación 6 en la forma de un líquido inyectable.
8. El uso de un polímero conjugado de alguna de las Reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o alivio de una enfermedad o afección, o para la preparación de un medicamento para el diagnóstico de una enfermedad o afección.
- 10 10. Un polímero conjugado de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 para uso en medicina.
11. El uso según la reivindicación 8 o el polímero conjugado según la Reivindicación 10, en donde la enfermedad o afección es cáncer.
- 15 12. El uso o polímero conjugado según la Reivindicación 11, en donde el cáncer es melanoma.
13. Un método para fabricar el polímero conjugado de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, que comprende disolver o disolver parcialmente un reactivo polimérico en un disolvente para formar un reactivo polimérico disuelto o parcialmente disuelto; y hacer reaccionar el reactivo polimérico disuelto o disuelto parcialmente con un segundo reactivo, en el que el segundo reactivo comprende al menos uno seleccionado del grupo que consta de un ligando polidentado, un precursor del ligando polidentado con átomos de oxígeno protegidos y el compuesto que comprende el agente.
- 20 14. El método de la Reivindicación 13, que comprende además reaccionar el reactivo polimérico disuelto o parcialmente disuelto en presencia de un catalizador.
- 25 15. El método de la Reivindicación 13 o 14, que comprende además reaccionar el reactivo polimérico disuelto o parcialmente disuelto en presencia de un agente de acoplamiento.

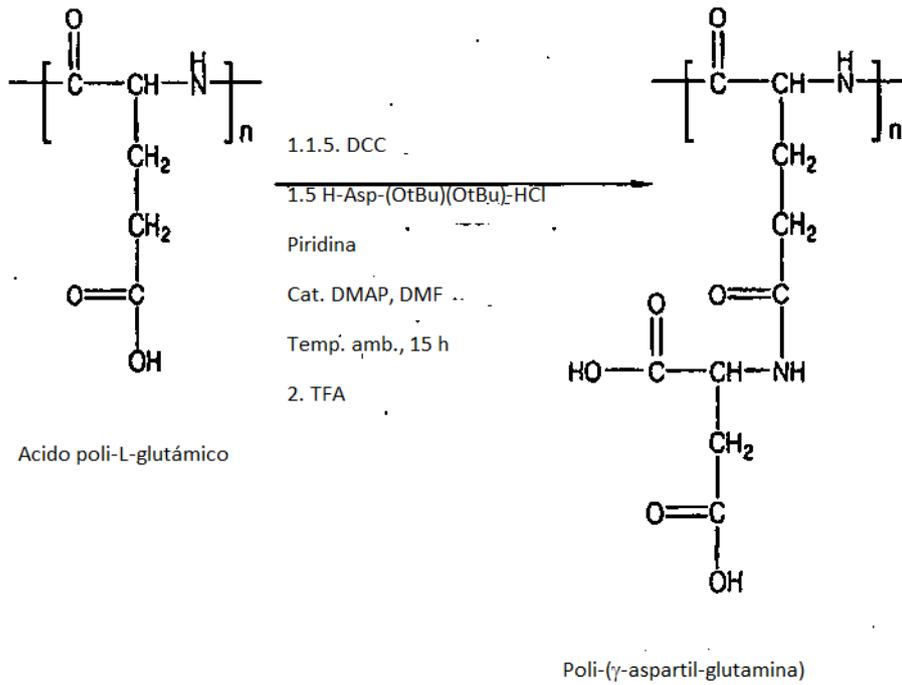


FIG. 1

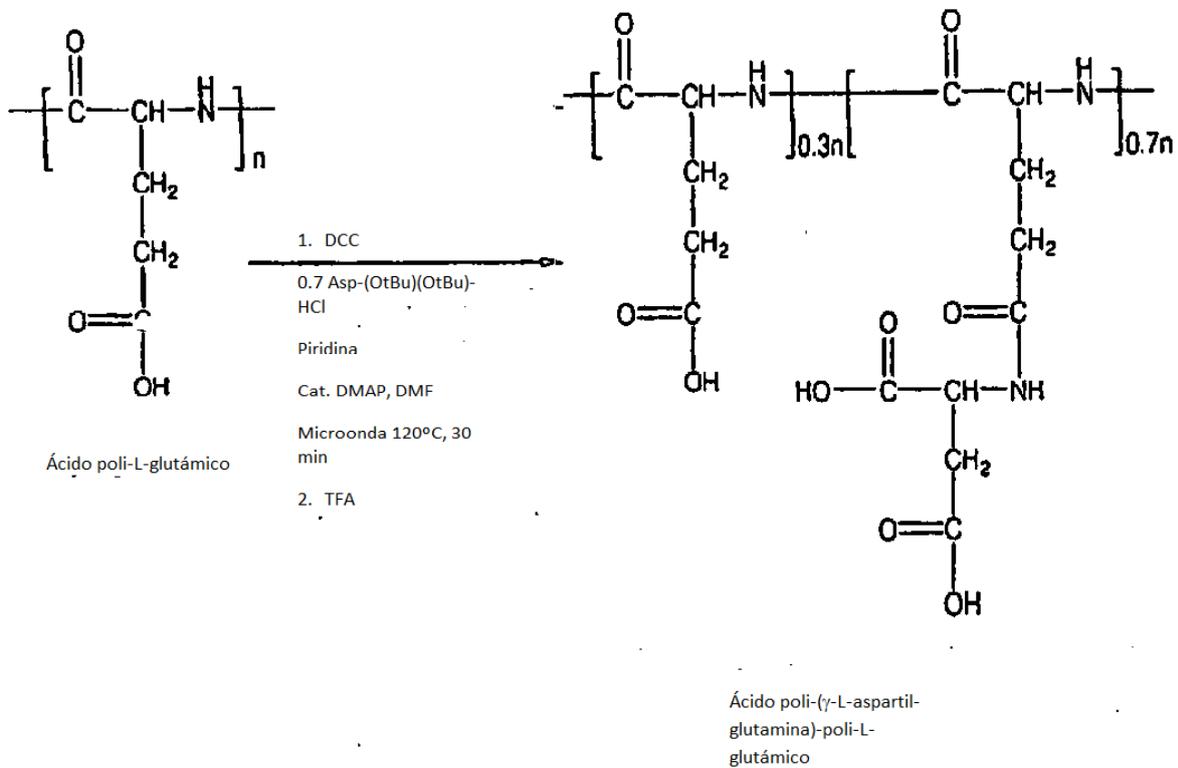


FIG. 2

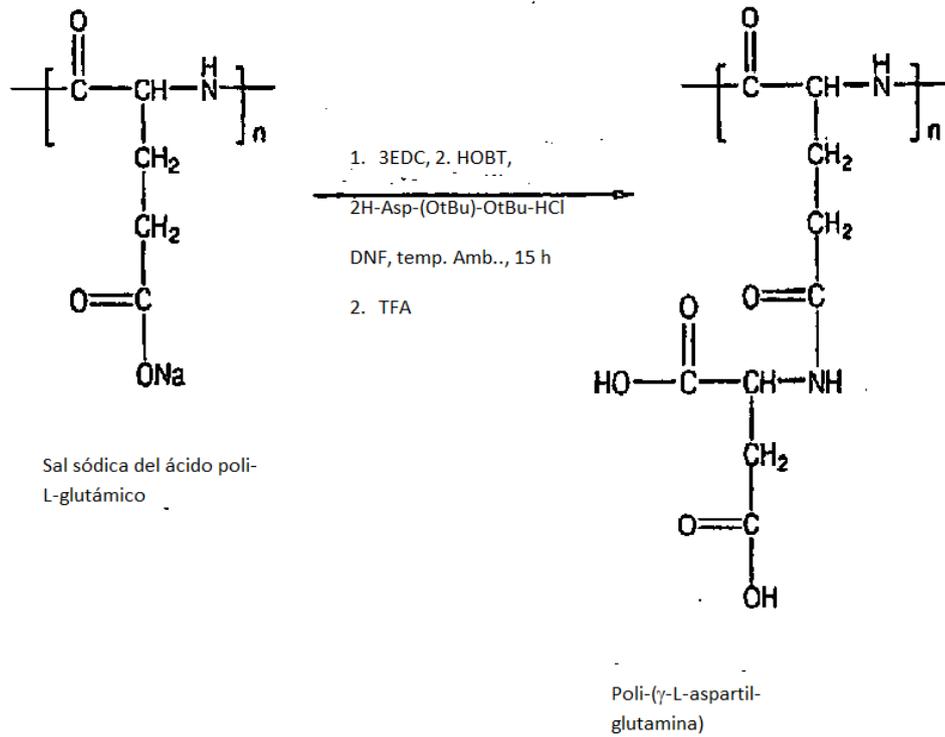


FIG. 3

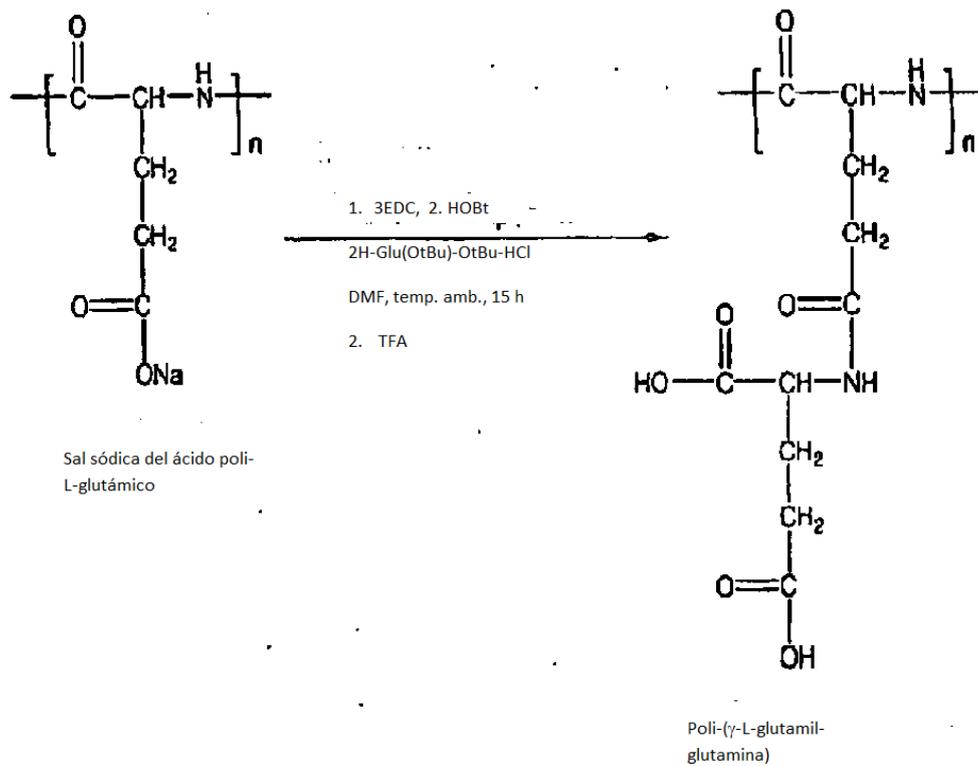
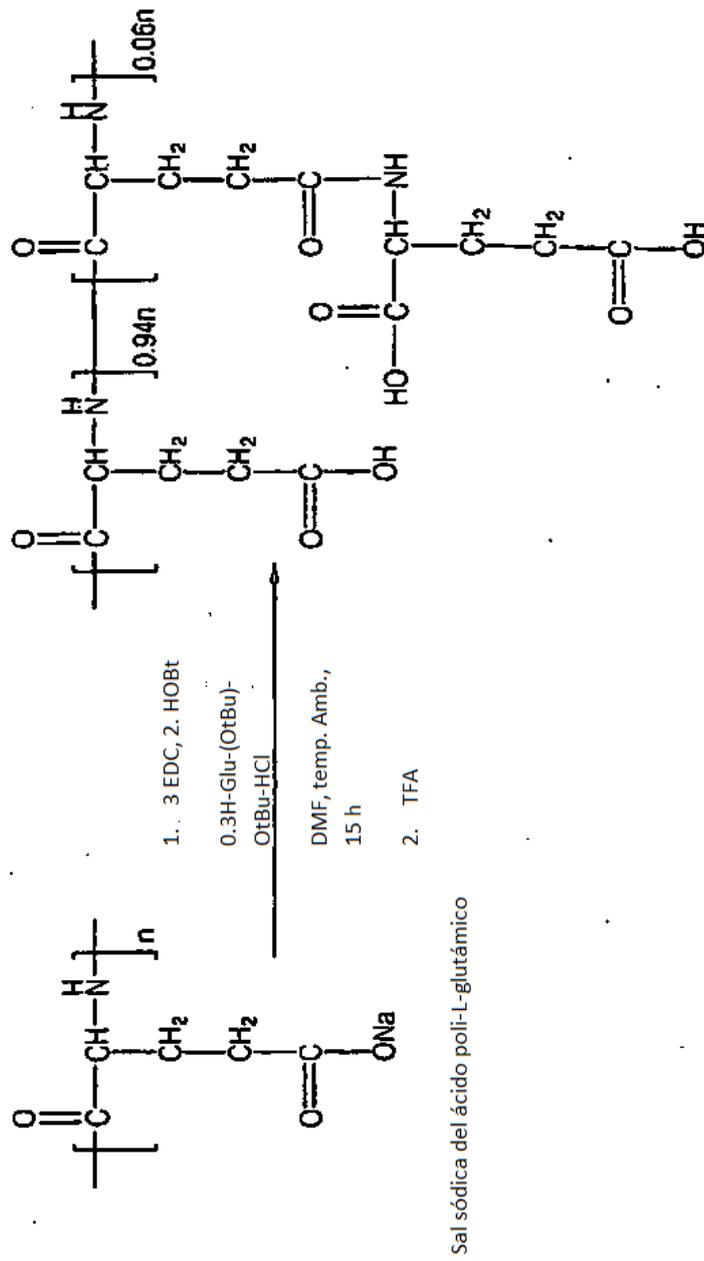


FIG. 4



Ácido poli-(γ-L-glutamil-glutamina)-poli-L-glutámico

FIG. 5

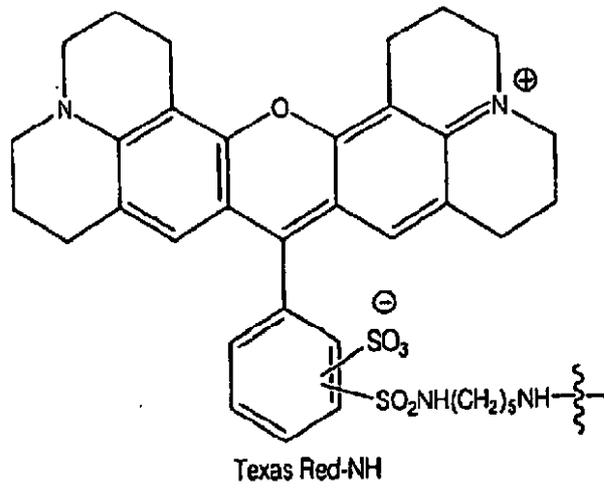
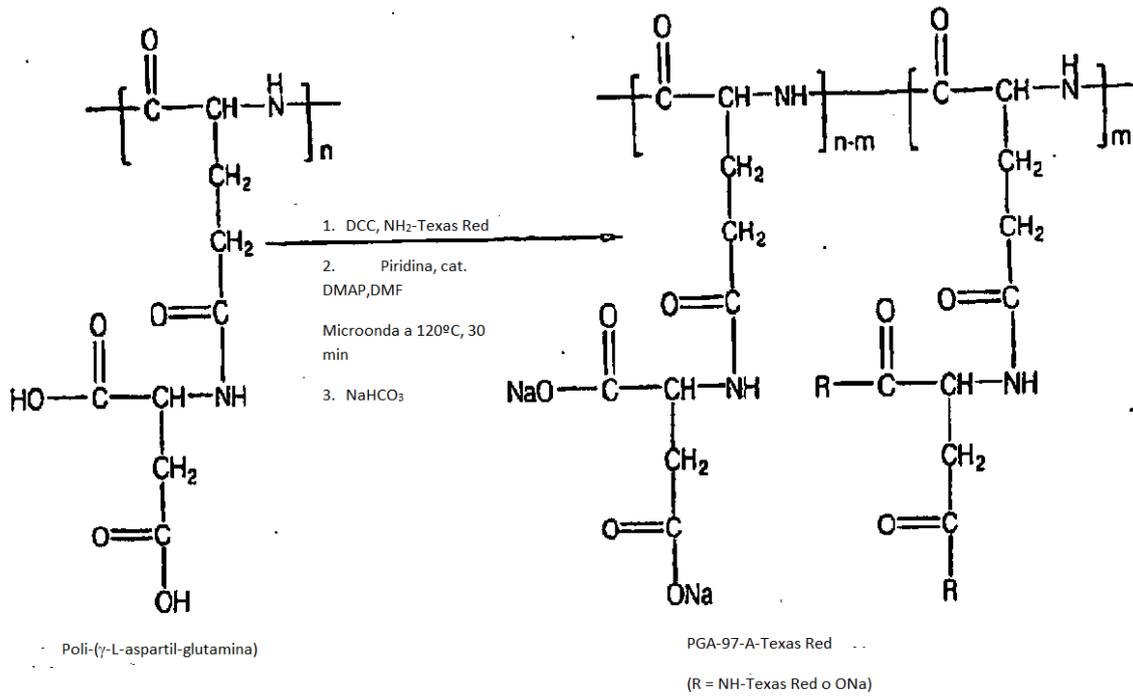


FIG. 6

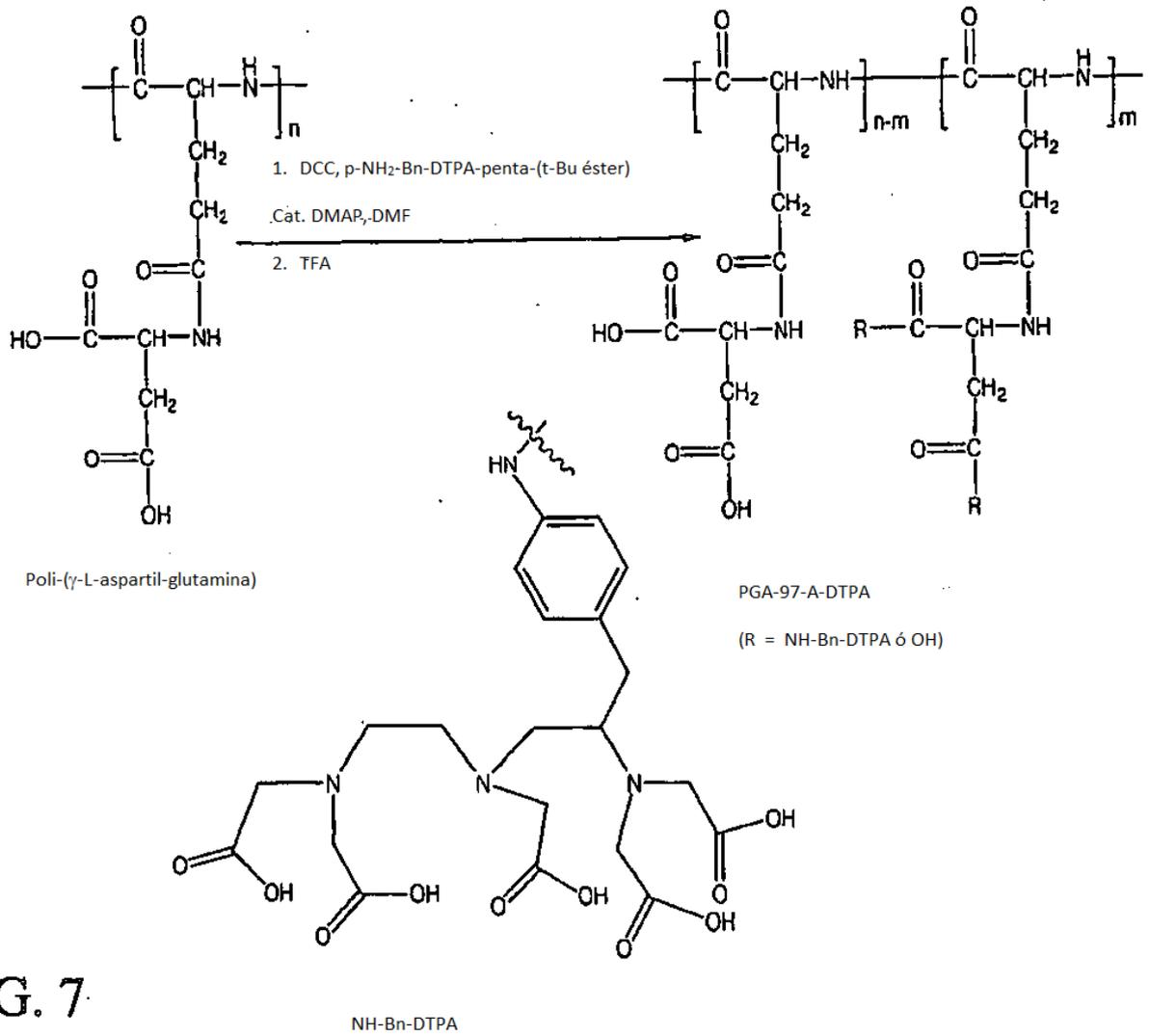
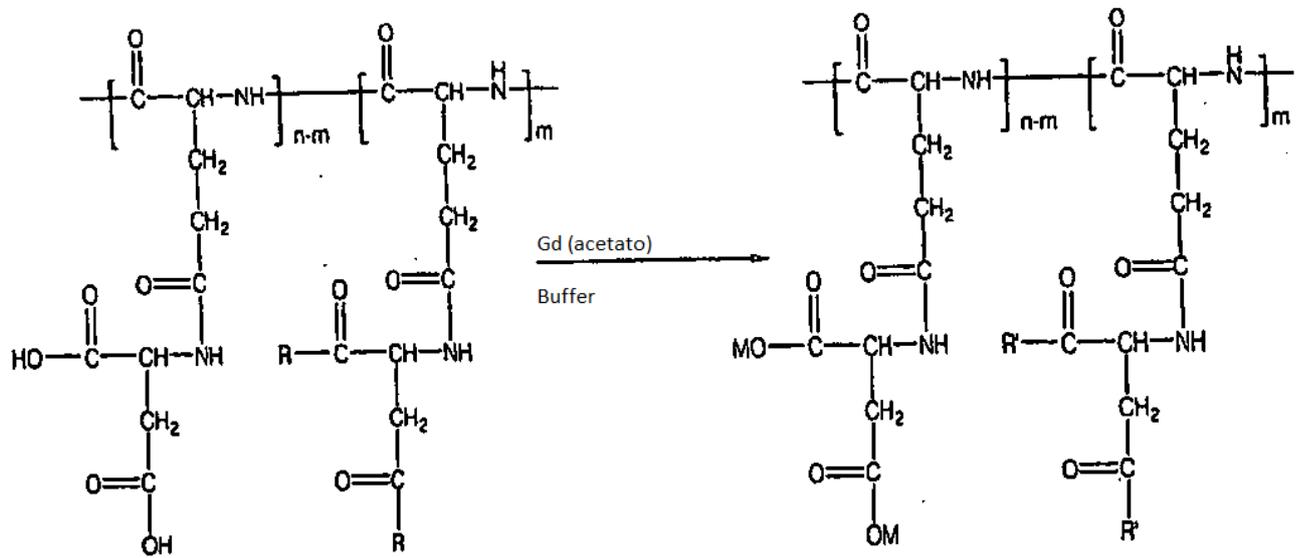


FIG. 7



PGA-97-A-DTPA

(R = NH-Bn-DTPA ó OH)

PGA-97-A-DTPA-Gd (III)

(M=metal alcalino o sal de amonio)

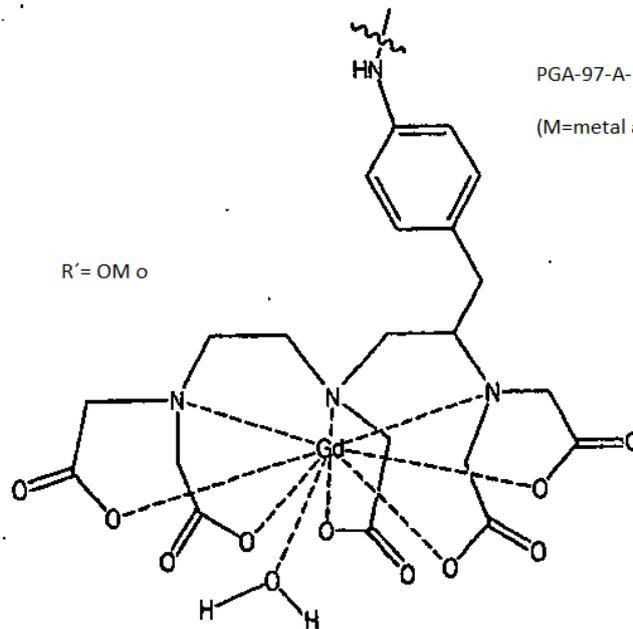


FIG. 8

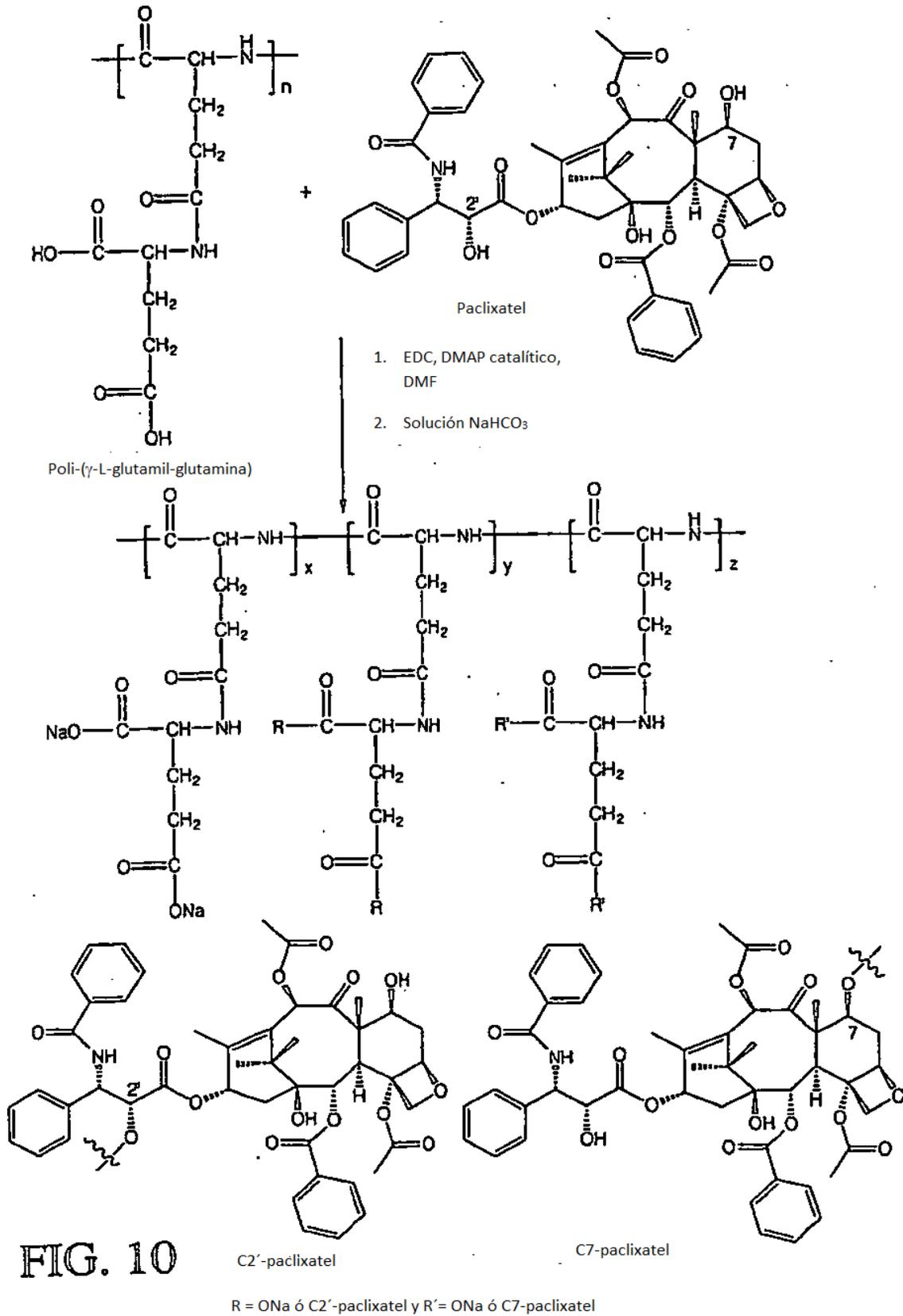
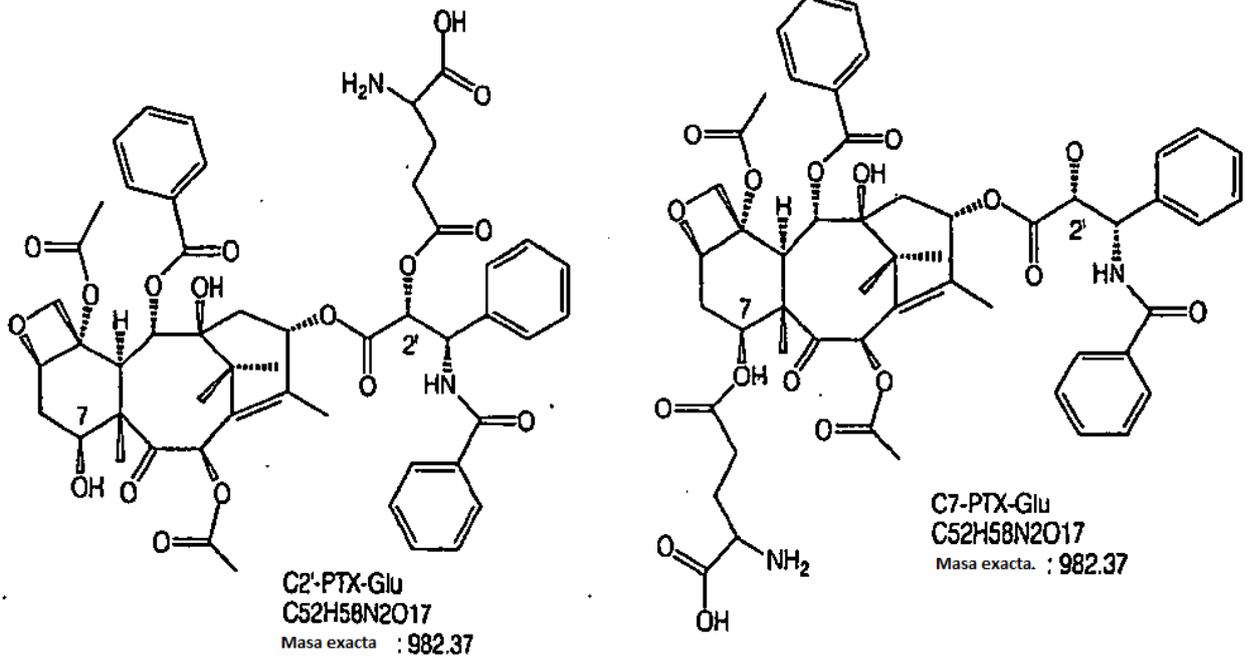


FIG. 10

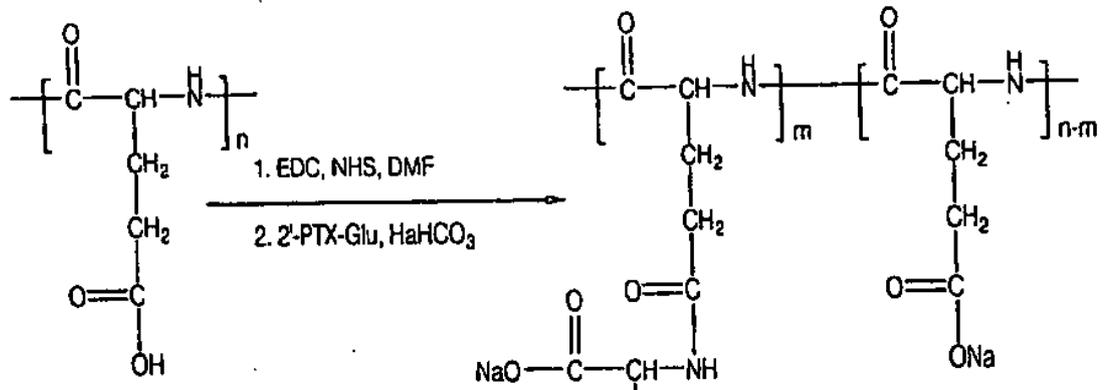


Compuesto	HPLC (tiempo)	LC-MS (tiempo)	Masa detectada por	LC-MS
2'-PTX-Glu	~32 min	~6.2 min	982	
7-PTX-Glu	~35 min	~6.4 min	982	

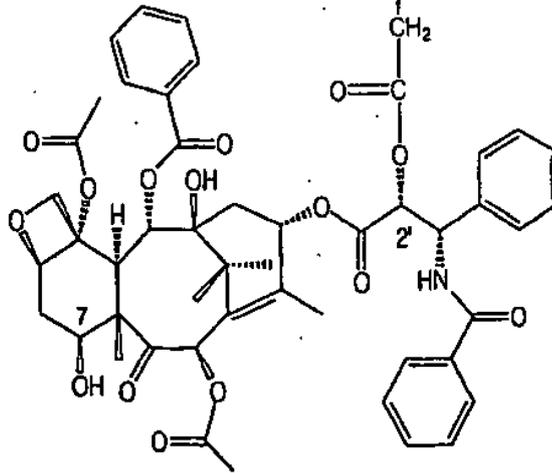
La misma columna HPLC y condiciones para ambos compuestos

La misma columna LC-MS y condiciones para ambos compuestos

FIG. 11



Ácido poli-L-glutámico (PGA)



PGA-97-G-27

FIG. 12

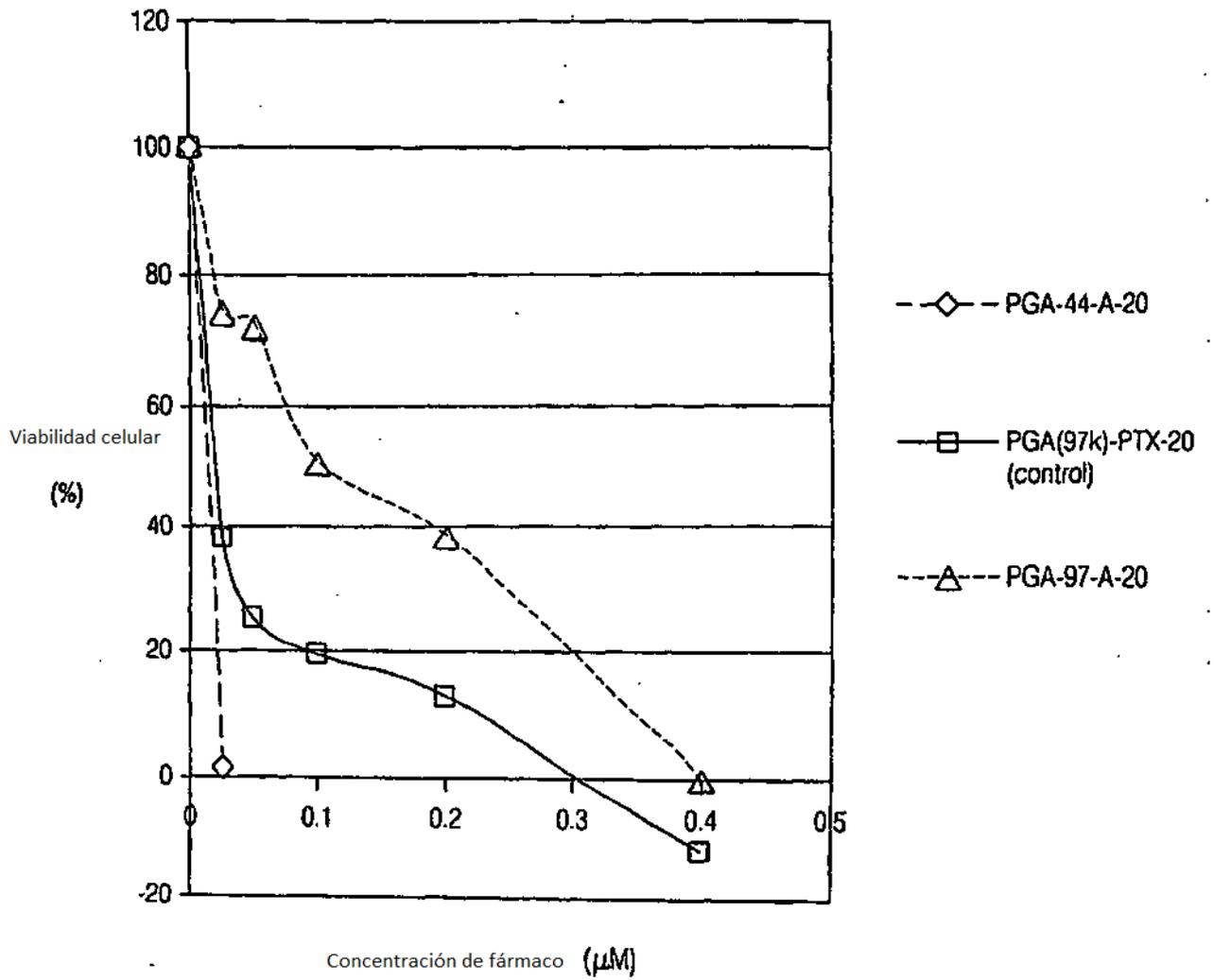


FIG. 13

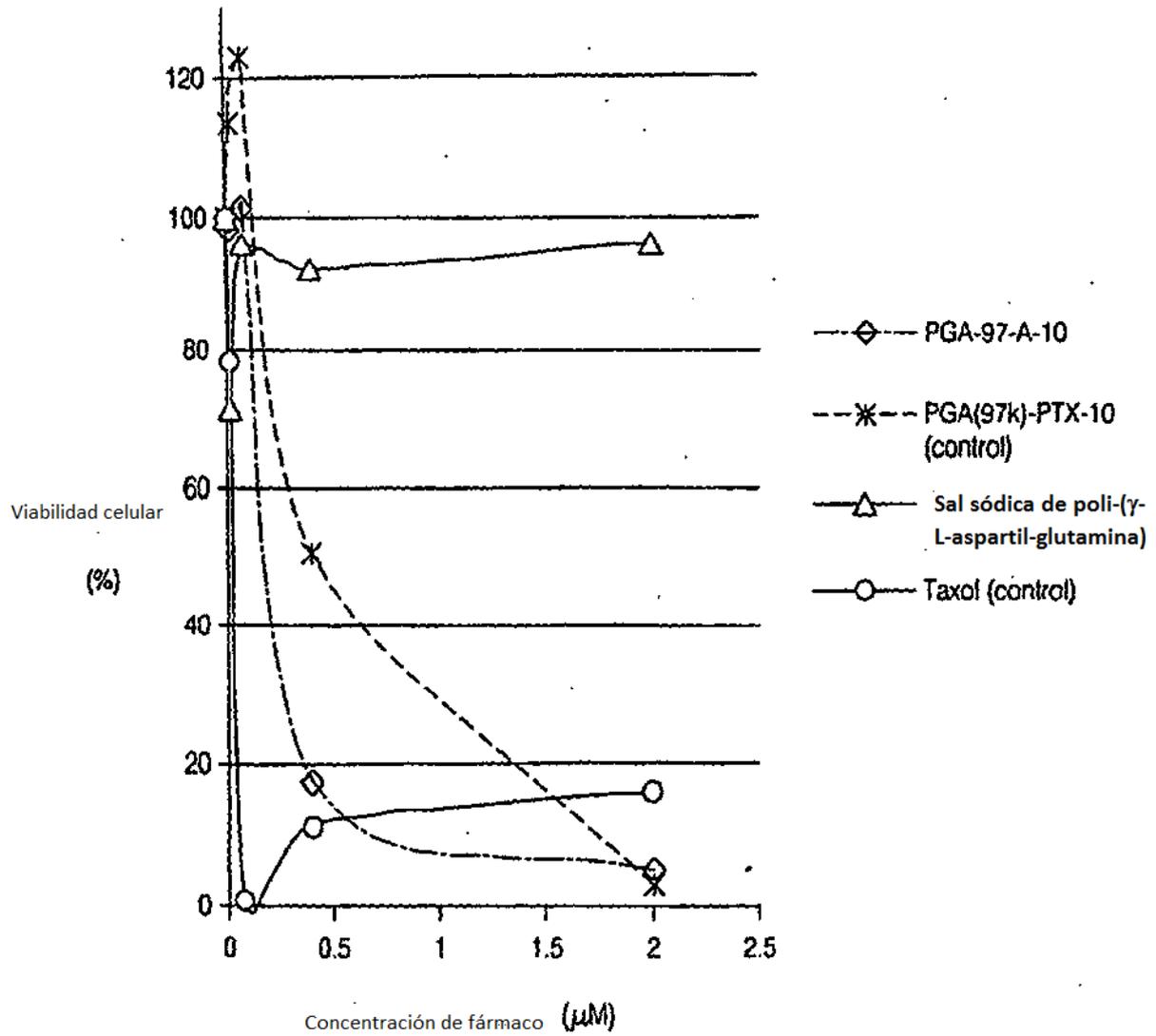


FIG. 14

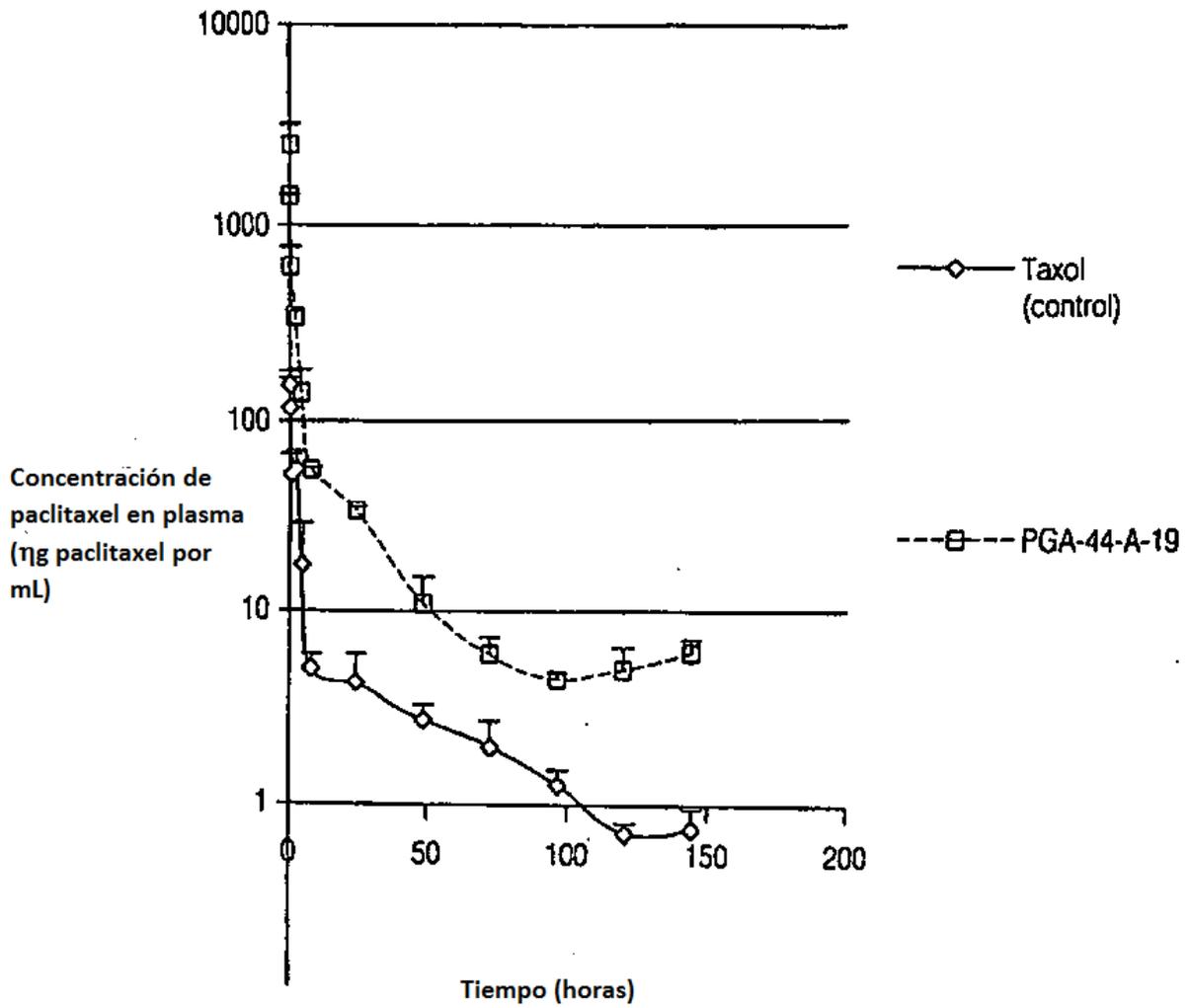


FIG. 15

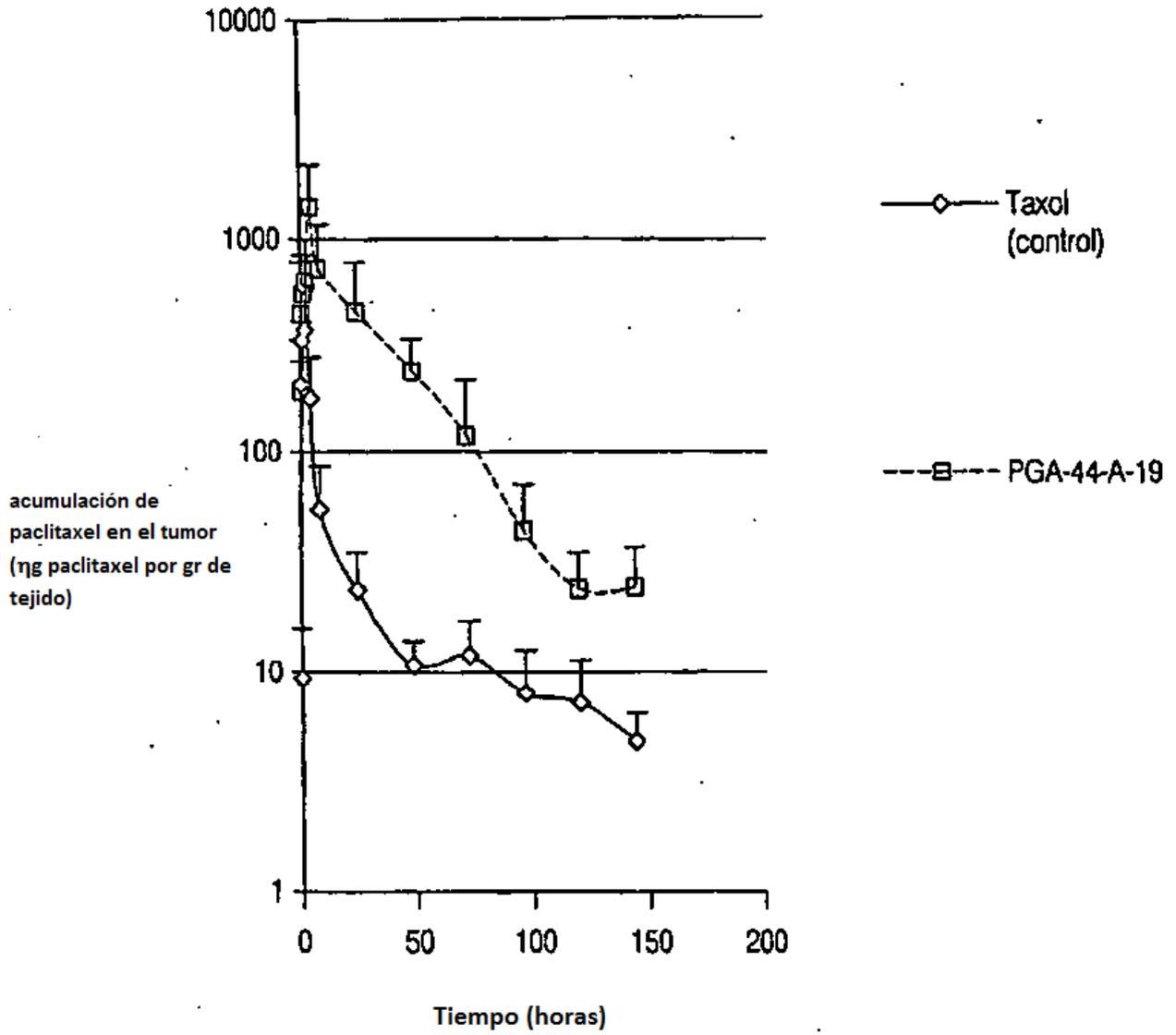


FIG. 16

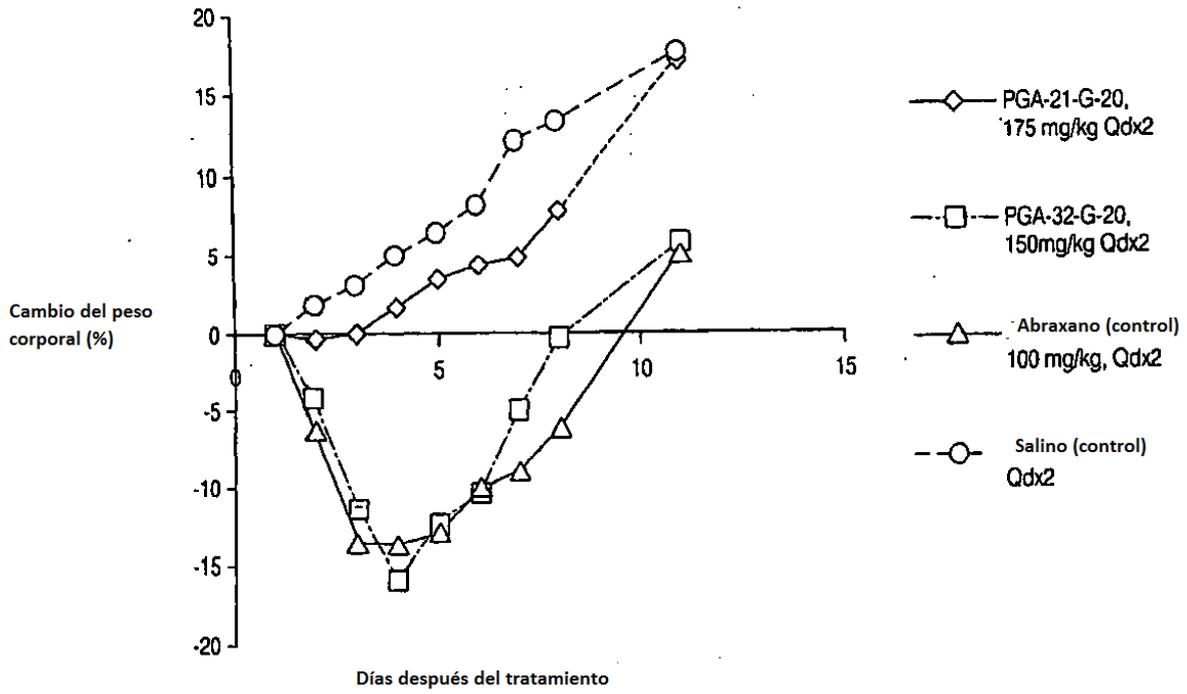


FIG. 17

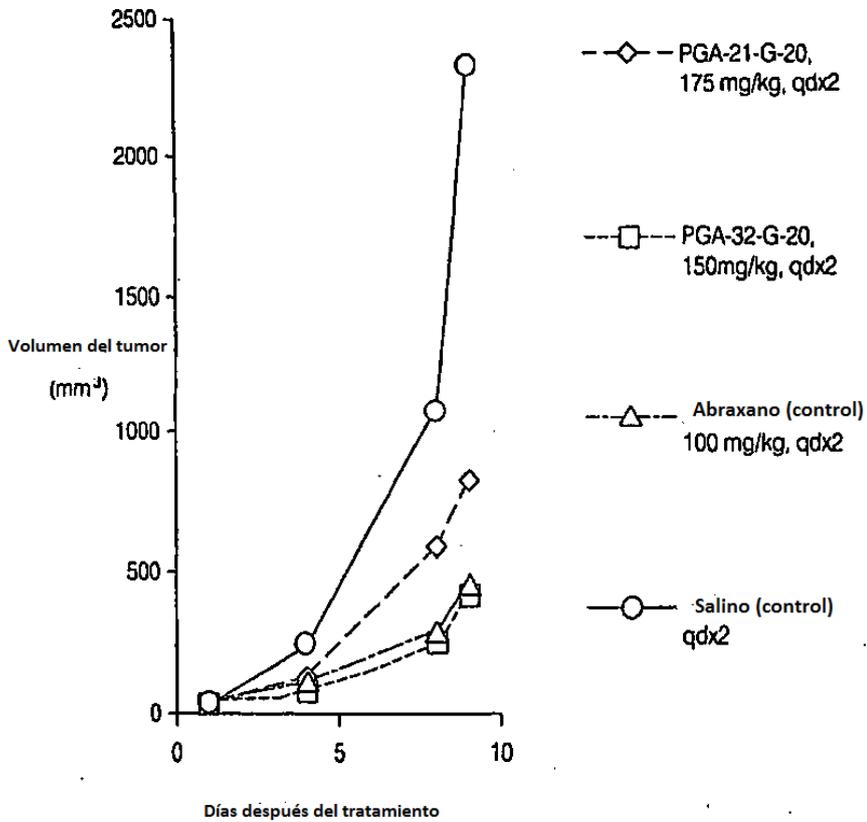


FIG. 18

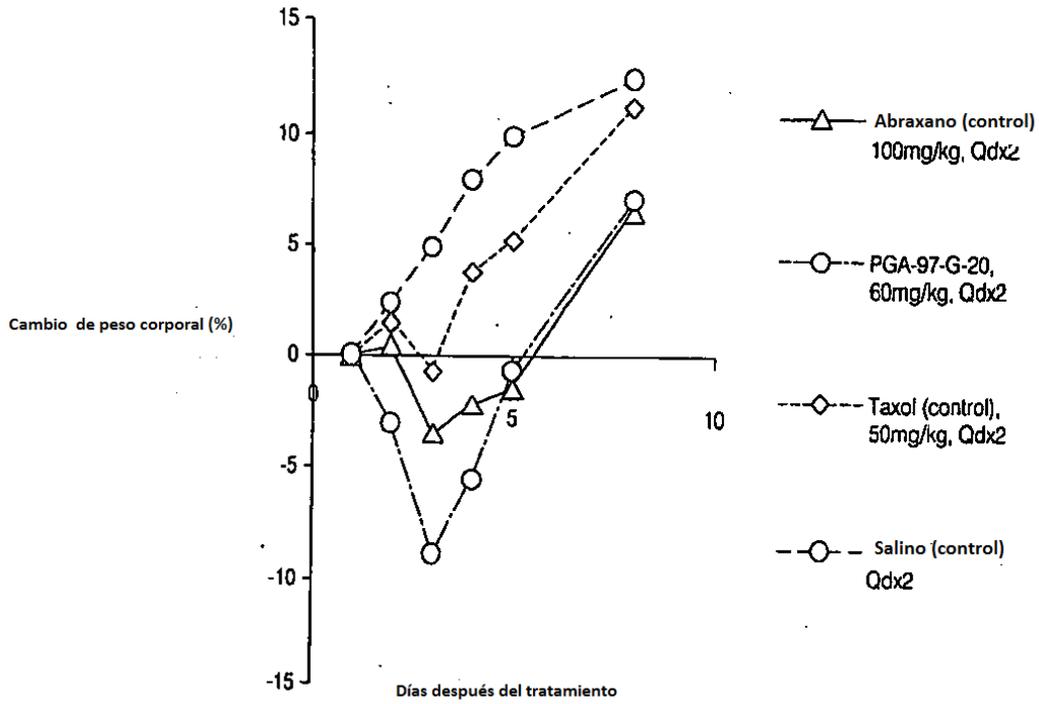


FIG. 19

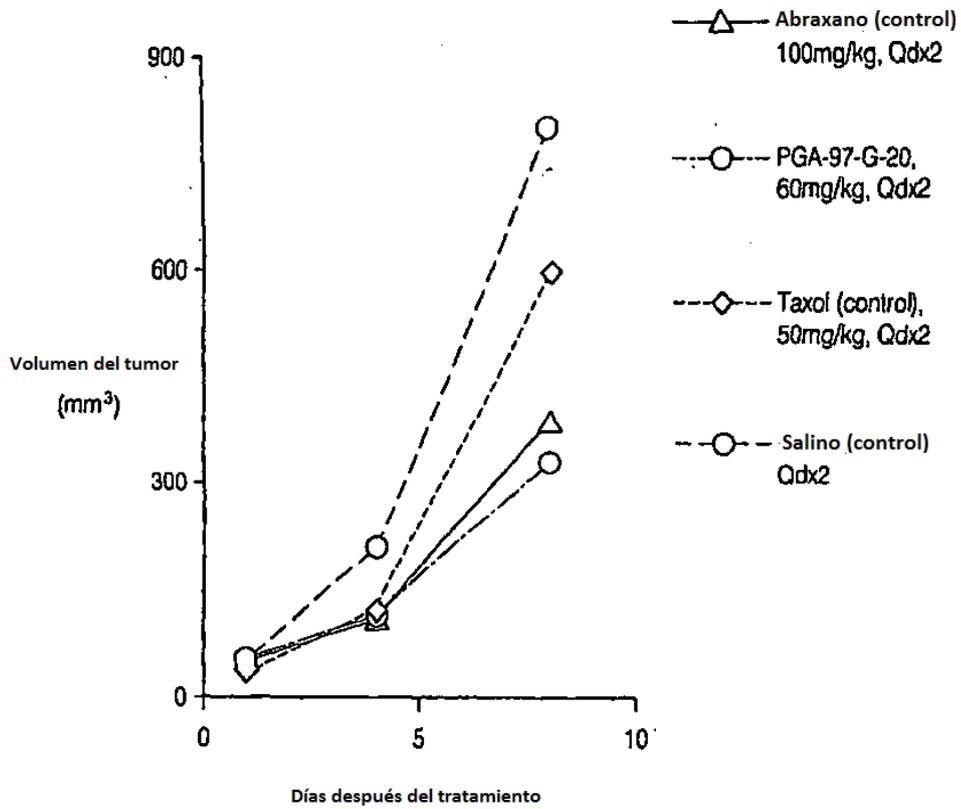


FIG. 20

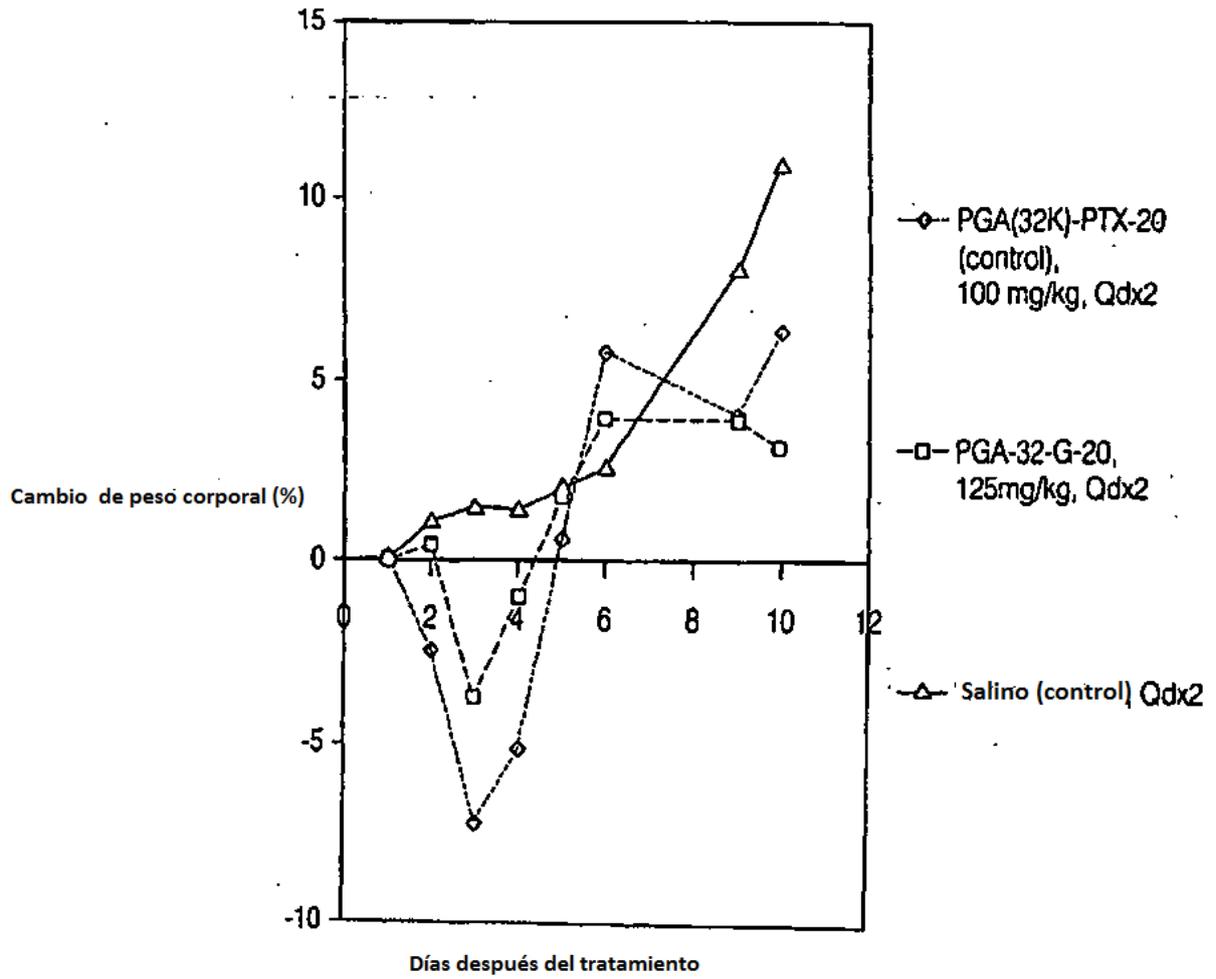


FIG. 21

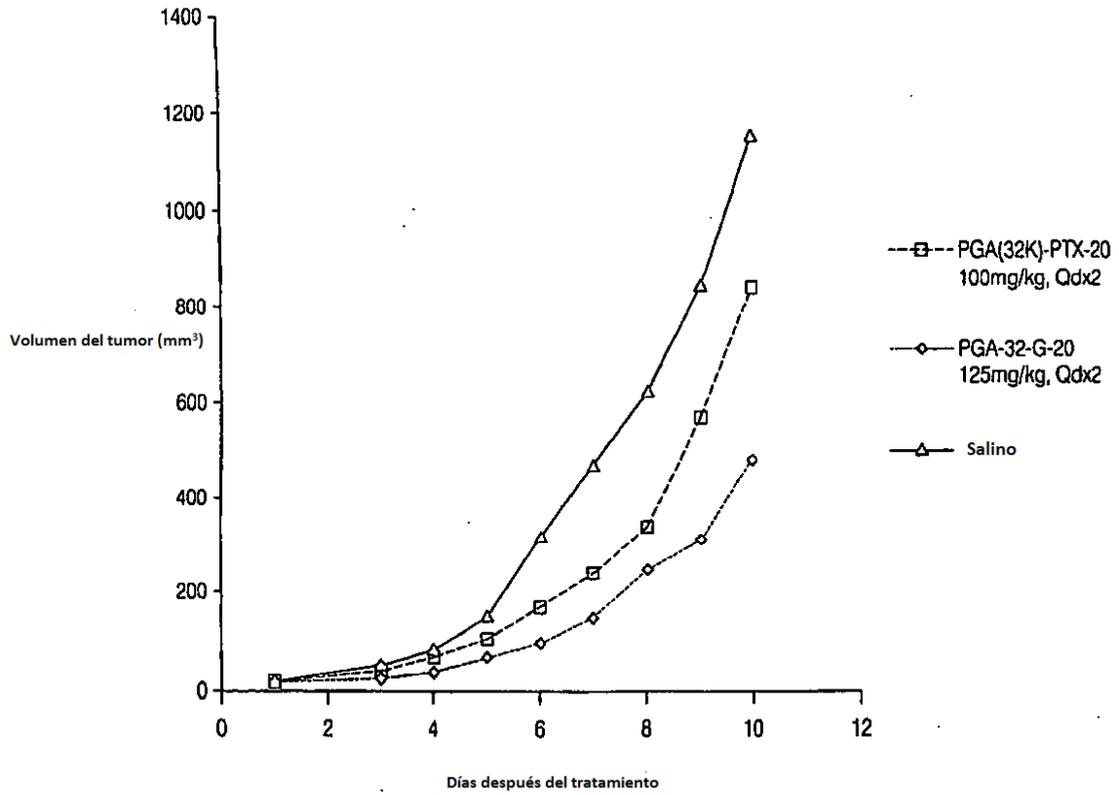


FIG. 22

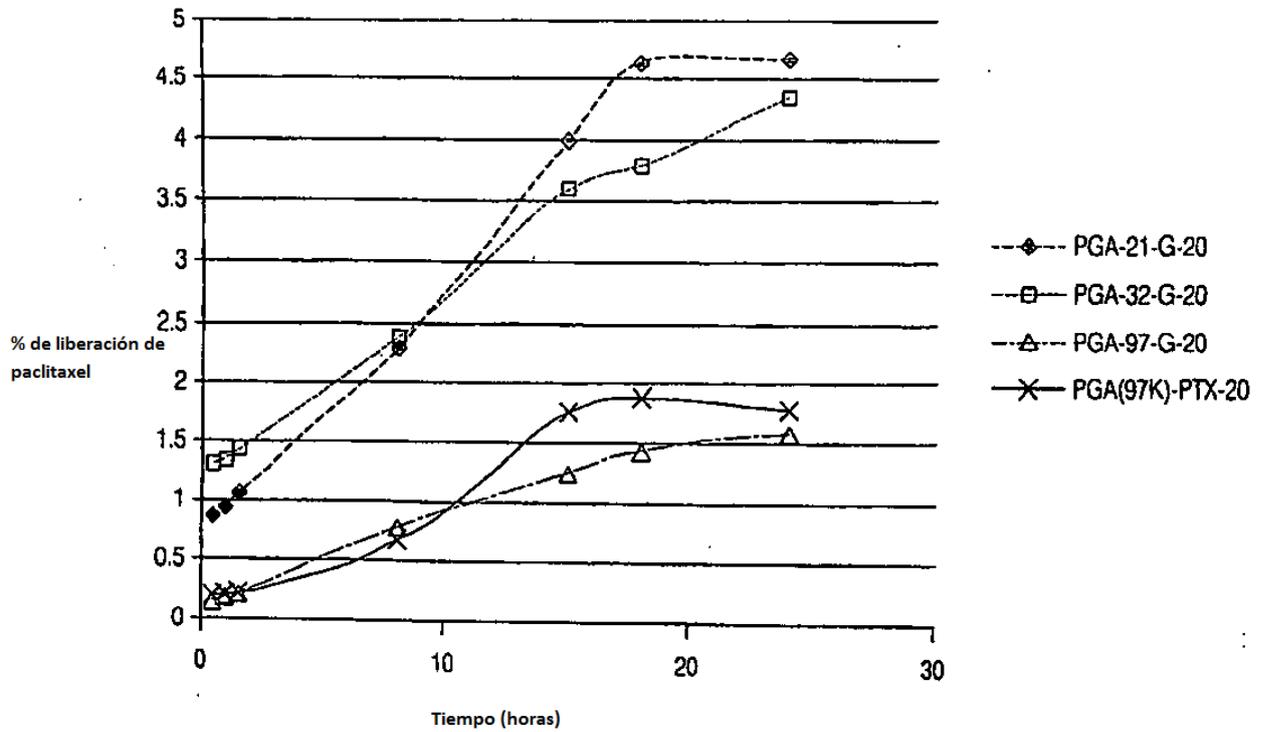


FIG. 23

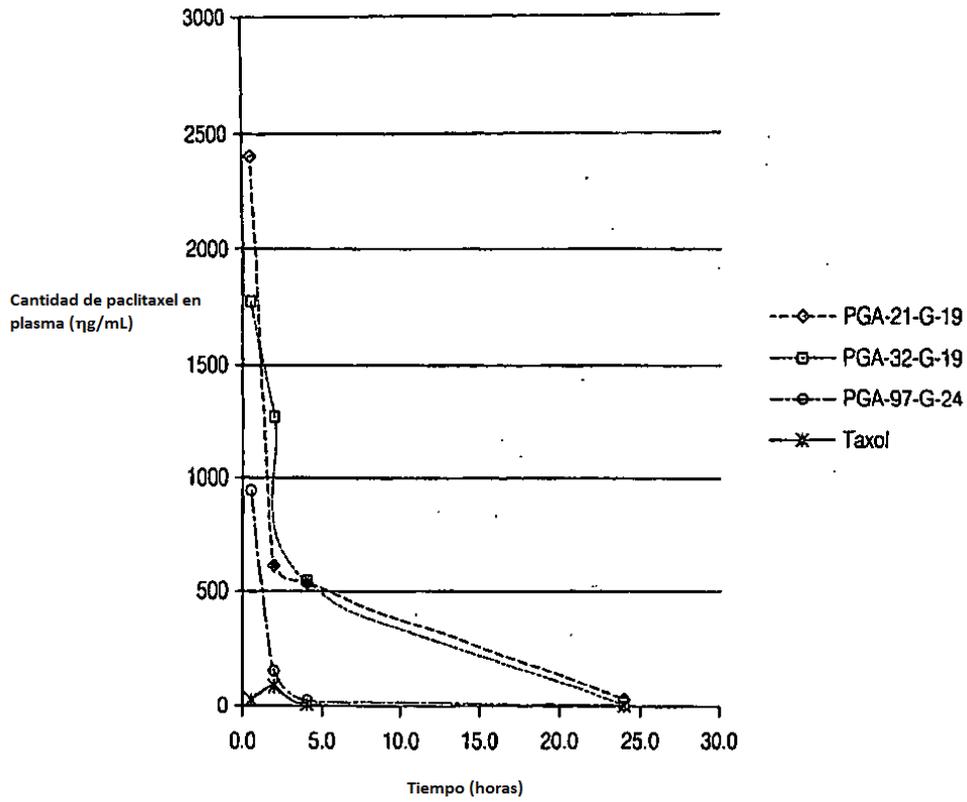


FIG. 24

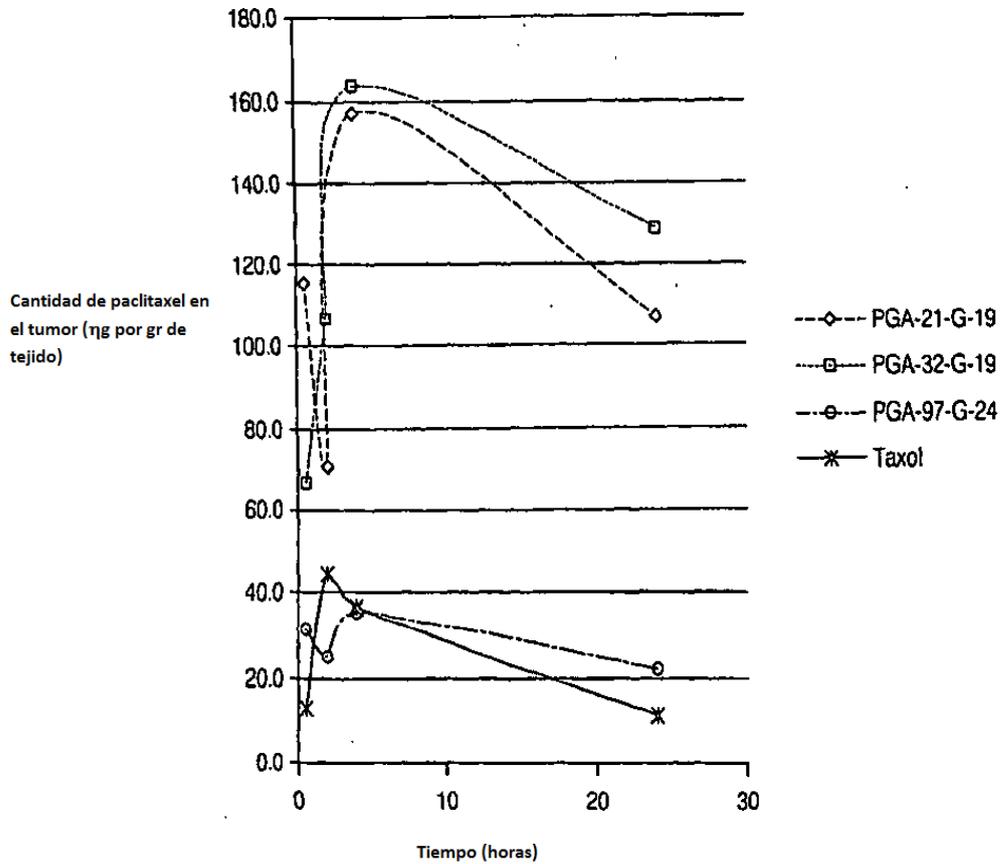


FIG. 25

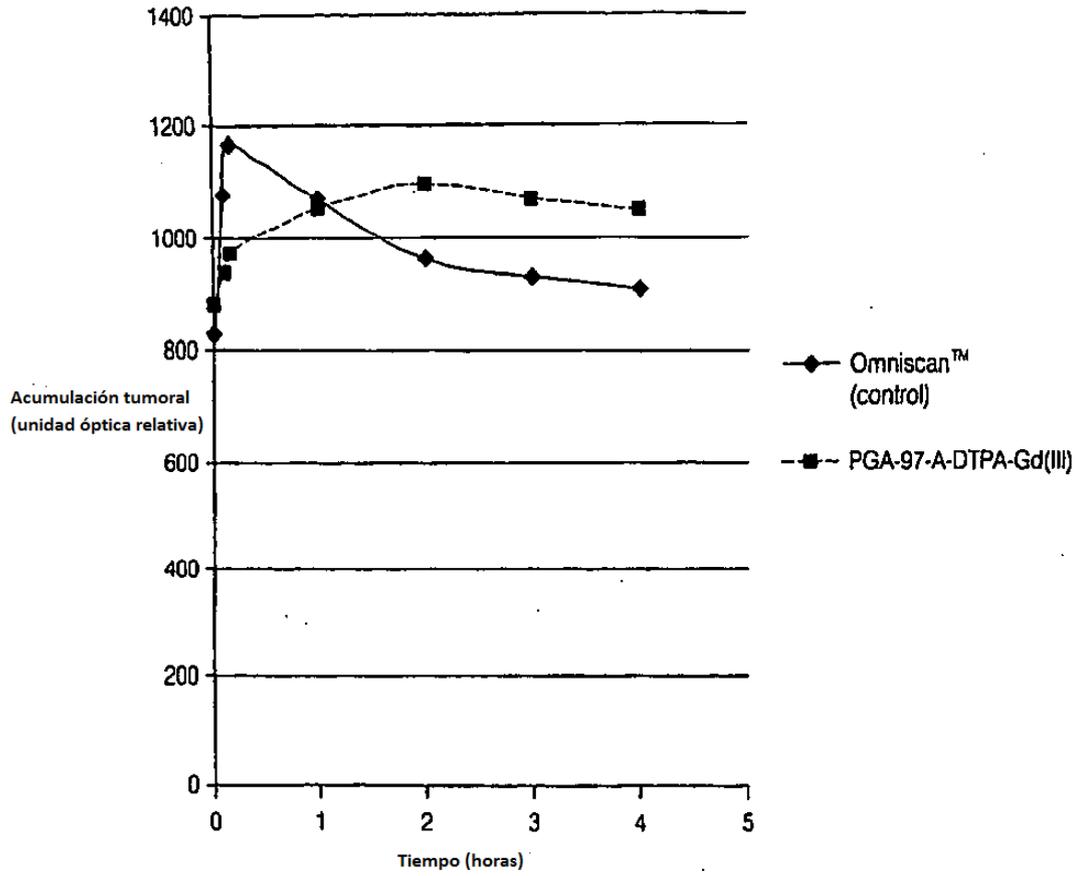


FIG. 26

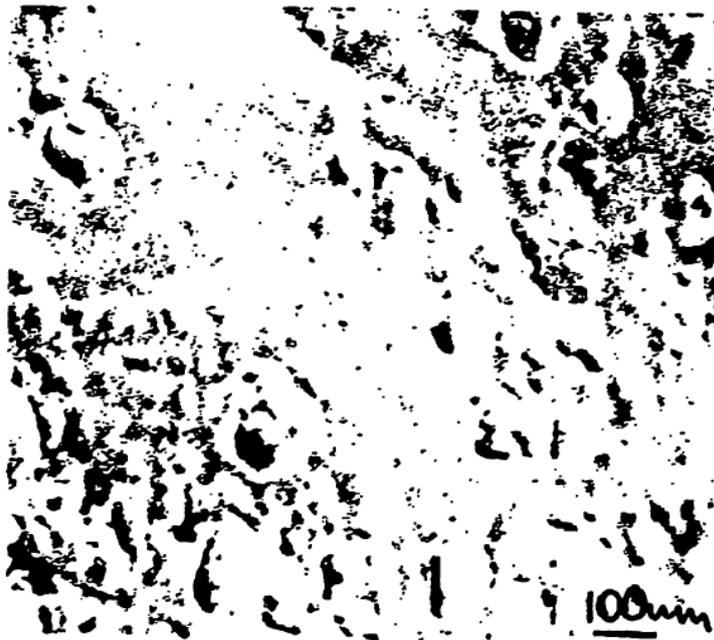


FIG. 27

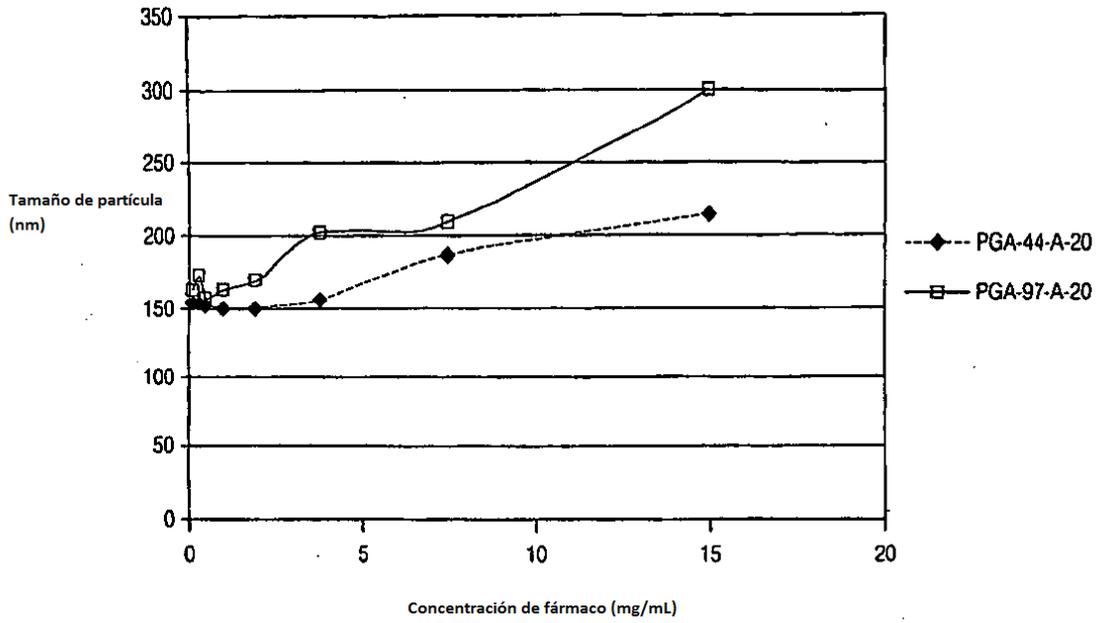


FIG. 28

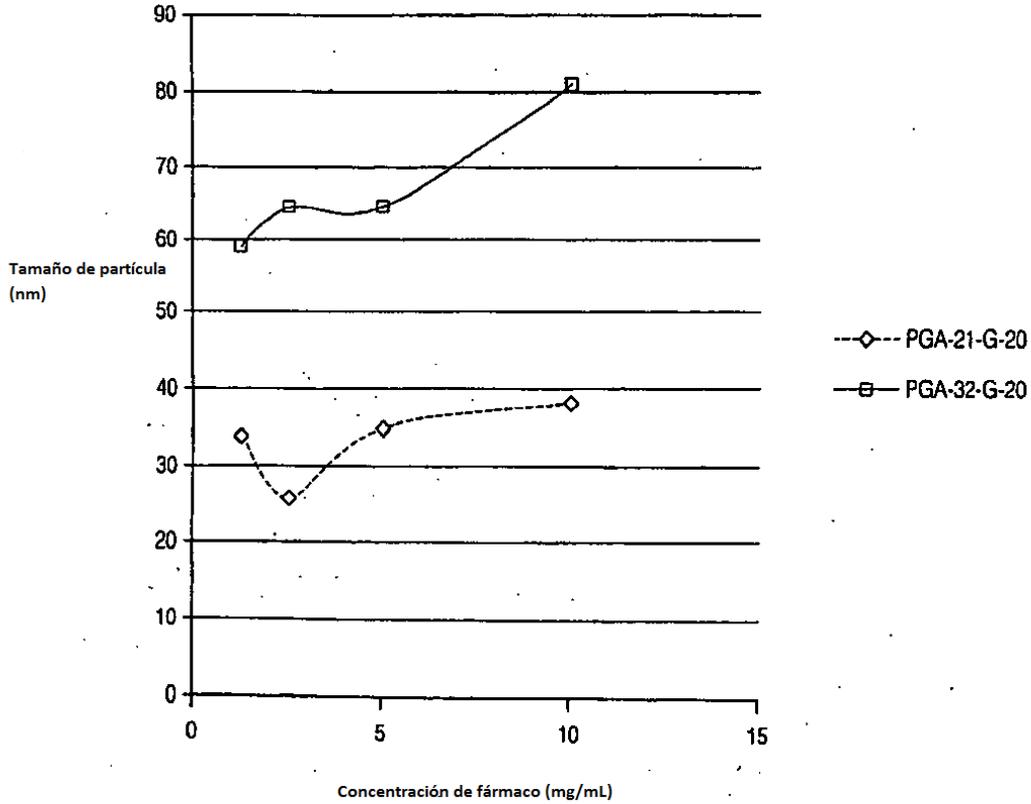


FIG. 29