

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 163**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
C08G 83/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2008 E 08773378 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 2167031**

54 Título: **Polímeros hiperramificados basados en ciclodextrinas y poli(amidoaminas) para la liberación controlada de fármacos insolubles**

30 Prioridad:

11.06.2007 IT MI20071173

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

26.03.2013

73 Titular/es:

**L'UREDERRA, FUNDACION PARA EL
DESARROLLO TECNOLOGICO Y SOCIAL
(100.0%)**

**AREA INDUSTRIAL PERGUITA CALLE A, NUM. 1
31210 LOS ARCOS, NAVARRA, ES**

72 Inventor/es:

**FERRUTI, PAOLO;
RANUCCI, ELISABETTA;
TROTTA, FRANCESCO;
CAVALLI, ROBERTA y
FERNANDEZ, CLAUDIO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 163 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polímeros hiperramificados basados en ciclodextrinas y poli(amidoaminas) para la liberación controlada de fármacos insolubles

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a sistemas de liberación controlada de fármacos y, en particular, comprende el uso de polímeros hidrófilos capaces de formar complejos y disolverse en fármacos muy hidrófobos en vehículos acuosos, en particular fármacos antitumorales tales como los taxanos (paclitaxel o docetaxel), camptotecina y derivados de la misma y etopósido, de modo que se puedan administrar también mediante inyección. Hasta la fecha, estos fármacos se encuentran entre los fármacos más potentes que se conocen contra ciertos tipos de cáncer, pero
10 su administración acarrea graves problemas debido a su insolubilidad. La presente invención también se aplica a los fármacos antivirales moderadamente solubles tales como aciclovir, y los fármacos relacionados, que presentan las mismas limitaciones en cuanto a la solubilidad.

Antecedentes tecnológicos

15 El problema de la administración de los taxanos (paclitaxel o docetaxel), la camptotecina y sus derivados, el etopósido y compuestos antivirales poco hidrosolubles (tales como el aciclovir), aún no se ha resuelto de manera satisfactoria, a pesar de los numerosos esfuerzos descritos en la bibliografía. Todos los fármacos mencionados anteriormente provocan efectos secundarios graves en los pacientes, por ejemplo, neuropatías periféricas, bradicardia, y toxicidad en las membranas mucosas y en el sistema venoso.

20 A modo de ejemplo, el paclitaxel en la actualidad se formula a una concentración de 2 mg/ml con el derivado polietoxilado del aceite de ricino Cremophor EL®, que contiene etanol al 50%. La preparación se administra mediante inyección. Habitualmente, se produce una hipersensibilidad grave al paclitaxel relacionada con el Cremophor EL® usado para su administración. Como consecuencia de ello, los pacientes reciben un pretratamiento bien de desamfetasona por vía oral o de difenhidramina y ranitidina por vía intravenosa antes de la administración del paclitaxel para reducir el riesgo de padecer hipersensibilidad. Este pretratamiento y los riesgos relacionados para el
25 paciente no necesariamente evitaría el uso de Cremophor®. Además, el coste del tratamiento con paclitaxel se reduciría significativamente.

En la bibliografía, se están describiendo muchos esfuerzos realizados para mejorar la administración de los taxanos a pacientes, pero hasta la fecha, aparentemente, ninguno de ellos ha proporcionado mejoras definitivas. Entre dichos esfuerzos, cabe mencionar los siguientes:

- 30
- Nanoesferas de copolímeros de bloque cargadas con paclitaxel, por ejemplo, compuestos biodegradables de metoxi-PEG-policaprolactona (S. Yeon Kim, *et al. Biomaterials* 22 (2001) 1697-1704) o metoxi-PEG-poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (Ji-Heung Kim *et al. "Polymers for advanced technologies"*, 10 649, 1999) o poli(L-lisina-citramidaimida) hidrofobizada (M. Vert *et al. Journal of Bioactive and compatible polymers*, Vol. 15 N.º 2, 99-114 (2000)).
 - 35 • Polímeros conjugados con dichos polímeros hidrosolubles como ácido poliglútamico, ácido poliaspártico o polilisina (documento US 6.441.025) o profármacos conjugados con derivados de polietilenglicol.
 - Complejos de inclusión de paclitaxel con ciclodextrinas. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos con 6-8 unidades glucosídicas enlazadas por un enlace α -1-4 y se caracterizan por una cavidad hidrófoba en sus estructuras, capaces de disolver fármacos insolubles en agua. A modo de ejemplo, se sabe que la 2-6-dimetil- β -ciclodextrina forma compuestos de inclusión con el paclitaxel, con una solubilidad de 2,3 mmol/l (aproximadamente 3 g/l) (H. Hamahada *et al., Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102, 369-371). El principal inconveniente de los complejos de inclusión de los taxanos con ciclodextrinas modificadas es su baja solubilidad en medios acuosos. En la práctica, la formación de complejos mediante la mezcla de soluciones de paclitaxel en disolventes hidrosolubles, por ejemplo, en alcoholes, con soluciones acuosas de derivados de
40 ciclodextrina, en principio, parece prometedora. Sin embargo, las soluciones transparentes resultantes, con el tiempo, vuelven a liberar paclitaxel insoluble, que se resta del complejo, ya que cristaliza por separado. La liofilización de la solución de paclitaxel seguida de la redisolución del residuo en agua también falla, ya que incluso en este caso el paclitaxel cristaliza. Este problema se resuelve sólo en cierta medida con el uso de moléculas de dímeros de ciclodextrina. Además, las ciclodextrinas individuales se ligan entre sí en estos
45 dímeros mediante puentes de tipo amina, dando a la molécula cierta toxicidad.
 - Polímeros lineales de ciclodextrina en los que los grupos de ciclodextrina tienen una distribución aleatoria a lo largo de la cadena polimérica. Estos polímeros sufren, en la formación de complejos con el paclitaxel o fármacos similares, las mismas restricciones que las ciclodextrinas libres, pues la cooperación de las diferentes unidades de ciclodextrina presentes en el polímero se ve obstaculizada en tanto en cuanto se distribuyen a lo
50 largo de la cadena polimérica y, por lo tanto, están alejadas cuando el polímero de la solución adquiere una configuración relativamente distendida.
- 55

En cuanto a la camptotecina, para superar sus problemas de estabilidad (apertura del anillo de lactona en la forma carboxilato) y de solubilidad, se han investigado varios enfoques. En particular, la formación de complejos con las α -

ciclodextrinas aumenta la estabilidad de la camptotecina, mejorando de este modo la solubilidad y el perfil de citotoxicidad (Kang *et al. Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002, 15, 163-170).

5 El aciclovir tiene una semivida corta (de aproximadamente 2 h) y su absorción no es completa (biodisponibilidad del aproximadamente 15-30%). Debido a su limitada biodisponibilidad oral, el aciclovir se debe tomar por vía oral cinco veces al día (200 mg cada 4 h), mientras que las formulaciones intravenosas (5 mg/kg) se deben administrar cada 8 horas durante al menos 5 días. Además, la dosis intravenosa de aciclovir se debe administrar lentamente durante 1 hora para evitar su precipitación en los túbulos renales.

10 Para aumentar la eficacia de los fármacos antivirales, se han propuesto diversos enfoques de administración como la encapsulación en nanocápsulas de poli(iso-butilcianoacrilato) (Hillaireau *et al., Int. J. Pharm.* 2006, 324, 37-42). Los sistemas de administración de partículas podrían ser capaces de promover la liberación sostenida del fármaco antiviral. Se han desarrollado micropartículas de PLGA que contienen aciclovir para la administración tópica (de Jalon, 2001, 226, 181, 184) y las nanopartículas cargadas con aciclovir mostraron una mayor eficacia contra el virus del herpes simple I en cultivo celular (de Jelouani *et al., Europ. J. Pharm. Biopharm.* (2003) 56, 183-187). Mediante un procedimiento de reticulación en emulsión, se han preparado microesferas de redes poliméricas semi-interpenetrantes de acrilamida injertada en dextrano o quitosano que portan hasta un 79% de aciclovir (Rokhade *et al., Carbohydrate Polym.* (2007) 605-607).

También se han diseñado profármacos para aumentar la biodisponibilidad oral del aciclovir (*Eur. J. Pharmac. Sci.* 2004, 23, 319-325).

20 Se puede disolver un copolímero de poli(amidoamina) (PAA) con β -ciclodextrina mediante la complejación de hasta el 11% p/p del fármaco, mostrando el complejo de aciclovir una actividad antiviral mayor que la del fármaco libre contra el virus herpes simple de tipo I en cultivos celulares (Bencini *et al. J. Control. Publicación de* 2008, 126, 17-25).

25 El documento US 5.985.916 está dirigido a la síntesis de polímeros de poli(amidoamina) mediante poliadición de transferencia de hidrógenos de una amina secundaria a una bisacrilamida (véanse las Figuras 1B y 2). La Figura 3 muestra el producto de reacción de ácido 2,2'-bis-acrilamidoacético, aminometilciclodextrina y 2-metil-piperazina, preparado mediante la reacción de poliadición de Michael. El polímero hidrosoluble hiperramificado obtenido (véase la columna 2, líneas 43-44) también se usa en una formulación farmacéutica para aumentar la solubilidad de fármacos insolubles en agua (véase la columna 2, líneas 24-27). Sin embargo, los macrociclos de ciclodextrina y las estructuras de poli(amidoamina) están ligados a través de un grupo de amina terciaria (véase la figura 3).

30 **Divulgación detallada de la invención**

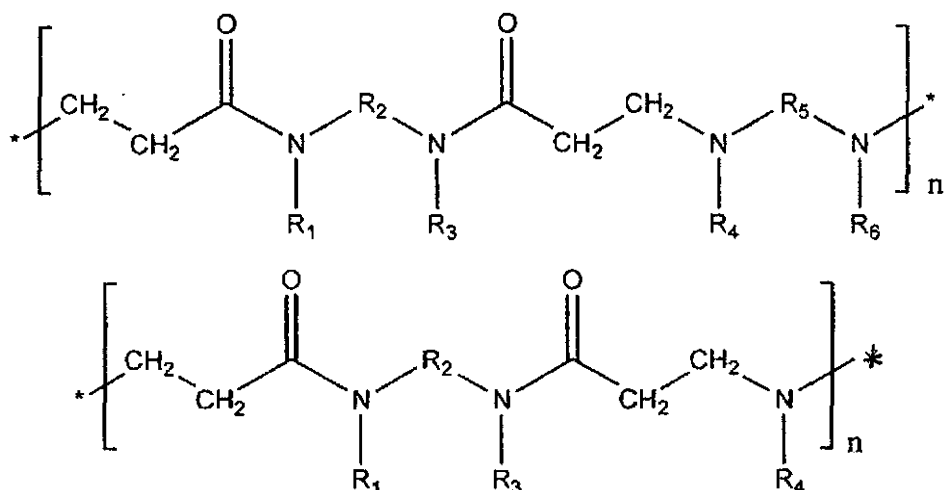
La presente invención se refiere a nuevos polímeros hiperramificados en los que las unidades de ciclodextrina están ligadas por grupos éter a segmentos cortos de poli(amidoaminas), y se preparan mediante la poliadición de Michael de α -, β - o γ -ciclodextrinas y aminas a bisacrilamidas. En la Figura 1, se presenta un esquema de la estructura de los polímeros de la invención.

35 Estos polímeros son completamente hidrosolubles, y aquellos que están ligeramente reticulados son muy hidrófilos y dan suspensiones acuosas transparentes que parecen soluciones. En muchos casos, estas suspensiones poliméricas están en forma de nanopartículas.

40 Preferentemente, los segmentos de poli(amidoamina) son de naturaleza anfótera, por ejemplo, el comonomero de amina es 2-metilpiperazina y la bisacrilamida es ácido 2,2-bisacrilamidoacético. De hecho, las poli(amidoaminas) anfóteras, en particular, la poli(amidoamina) denominada ISA 23, obtenida a partir de los monómeros indicados anteriormente, resultó ser muy biocompatible, ya que no son reconocidas por los sistemas de defensa del organismo y pueden circular durante un largo tiempo en animales de laboratorio sanos, mientras que en los animales de laboratorio portadores de tumores, se concentran selectivamente en la masa tumoral debido al efecto denominado EPR ("efecto de permeación y retención mejoradas"). Este efecto se debe a polímeros de alto peso molecular presentes en la circulación sanguínea que no pueden atravesar las paredes de los capilares normales, pero que son capaces de atravesar las más desconectadas de los capilares nuevos formados en la masa tumoral. Una vez que penetran en los tumores, apenas salen, pues los tumores no tienen un drenaje linfático eficaz. Además, estas poli(amidoaminas) tienen una gran capacidad para disolver sustancias insolubles en agua, ya que son muy hidrófilas. Por último, es posible funcionalizar dichas poli(amidoaminas) con facilidad mediante la introducción de unidades peptídicas capaces de garantizar una orientación precisa hacia células o grupos de células diana, por ejemplo, células tumorales.

Más concretamente, la presente invención se refiere a polímeros en los que:

- las unidades de ciclodextrina (CD, véase la Figura 1) derivan de la α -ciclodextrina, la β -ciclodextrina o la γ -ciclodextrina o sus derivados, en los que al menos uno de los hidroxilos se han transformado en grupos alcoxilo;
- los segmentos de poliamidoamina tienen la estructura presentada a continuación:



en la que:

- 5 R_1 y R_3 , que pueden ser iguales o diferentes, son H o un grupo alquilo C_{1-4} ;
 R_2 es un grupo alqueno C_{1-4} ;
o
 R_1 , R_2 y R_3 forman parte de una sola estructura cíclica que, a su vez, porta sustituyentes laterales de la misma naturaleza que R_1 y R_3 ;
10 R_4 y R_6 , que pueden ser iguales o diferentes, son H o un grupo alquilo C_{1-6} , o uno de dichos residuos que porta, a su vez, sustituyentes laterales de la misma naturaleza que R_1 y R_3 ;
o
 R_4 , R_5 y R_6 forman parte de una sola estructura cíclica que, a su vez, porta sustituyentes laterales de la misma naturaleza que R_1 , R_2 y R_3 ;
o
15 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son grupos alquilo o alqueno como los definidos anteriormente que portan, a su vez, otros sustituyentes adicionales tales como: grupos de amina primaria, secundaria o terciaria; grupos carboxílicos; grupos sulfónicos; grupos fosfóricos; grupos hidroxilo de alcohol;
n varía de 1 a 50, preferentemente, de 2 a 10.

20 La estructura simplificada de dichos polímeros se presenta en la Figura 1. En los polímeros, las unidades de ciclodextrina están ligadas a través de uno o más hidroxilos por enlaces de tipo éter a los segmentos de poli(amidoamina), por ejemplo, como se ilustra en la Figura 2.

25 Según lo indicado anteriormente, los polímeros de la presente invención se obtienen mediante la poliadición de Michael de mezclas de aminas primarias o secundarias y ciclodextrinas alcalino-activadas a bisacrilamidas. La polimerización se lleva a cabo a temperaturas que varían de 0 a 60°C, preferentemente, de 20 a 35°C, durante periodos que varían de 1 hora a 8 días, preferentemente, de 8 horas a 3 días y, lo más preferiblemente, de 1 a 2 días. Los disolventes usados son preferentemente próticos, más preferentemente, agua.

30 Los polímeros de la presente invención se pueden usar para disolver y portar moléculas activas insolubles en agua. Preferentemente, los polímeros de la invención permiten la preparación de formulaciones farmacéuticas inyectables acuosas de fármacos moderadamente hidrosolubles, en particular, taxanos, camptotecinas y derivados, aciclovir y fármacos relacionados. Dichas formulaciones contendrán de 20 mg/ml a 160 mg/ml de un polímero de la invención que contiene, preferentemente, de 1 mg/ml a 8 mg/ml de la molécula activa en el caso del docetaxel o del paclitaxel, de 1 mg/ml a 10 mg/ml en el caso de la camptotecina o de derivados análogos y de 1 a 20 mg/ml en el caso del aciclovir y de fármacos relacionados. Por otra parte, dichas formulaciones pueden contener otros cosolventes o excipientes usados convencionalmente y que cumplan los requisitos reglamentarios para la preparación de
35 formulaciones inyectables.

Los polímeros de la invención y sus formulaciones se pueden liofilizar. Los productos sólidos resultantes se pueden volver a suspender fácilmente en agua tras una simple agitación manual, tanto en presencia como en ausencia de moléculas activas.

40 La estructura hiperramificada no reticulada (o con un grado controlado de reticulación) se obtiene convenientemente variando la estequiometría de la mezcla de partida, la temperatura y el tiempo de reacción.

El procedimiento de preparación empleado se basa en la siguiente premisa teórica.

La reacción de polimerización en cuestión es una poliadición por etapas. Es ampliamente conocido que en las polimerizaciones en las que participan monómeros que portan por separado dos funciones complementarias "a" y

"b", en las que "a" es, por convención, la función minoritaria, los dos parámetros que rigen el procedimiento son la proporción estequiométrica inicial "r", que se define como

$$r = \frac{Na_0}{Nb_0} \quad (1)$$

5 en la que Na_0 y Nb_0 son el número de funciones a y b presentes inicialmente y el grado de conversión "p", definido como:

$$p = \frac{Na_0 - Na}{Na_0} \quad (2)$$

en la que Na es el número de funciones a presente en el momento de la observación.

Como es evidente, por definición, tanto r como p son ≤ 1 .

10 Las polimerizaciones por etapas en las que participan monómeros que portan más de dos grupos funcionales (polimerizaciones por etapas multi- o polifuncionales) pueden dar lugar a productos reticulados insolubles a valores de p superior a un valor determinado " p_c " denominado "grado de avance crítico". Para $p > p_c$, el sistema pierde su movilidad y, por esta razón, p_c también se denomina "punto de gelificación".

15 Cuando las funciones relacionadas con los monómeros polifuncionales son de un solo tipo, el grado de avance crítico p_c se representa mediante la ecuación de Flory-Stockmayer (véase, por ejemplo: G. Odian "Principles of Polymerization" III Ed., John Wiley & Sons, EE.UU., 1991):

$$p_c = \frac{1}{\{r[1 + \rho(f - 2)]\}^{1/2}} \quad (3)$$

en la que ρ es la fracción de funciones pertenecientes al monómero con funcionalidad > 2 con respecto a la cantidad total de las funciones del mismo tipo presentes en el sistema:

$$\rho = \frac{a^f}{a_0} \quad (4)$$

20 y r es como se define anteriormente.

Es evidente que en la ecuación (3), p_c y r están relacionados. En particular, existe una proporción estequiométrica crítica, que se señala como r_c , en la que el sistema es incapaz de gelificarse y producir polímeros hiperramificados que sigan siendo solubles.

25 Puesto que p (y, por tanto, también p_c) no pueden ser > 1 , el valor teórico de r_c se obtiene a partir de la ecuación (3), suponiendo que $p_c = 1$ y determinando r . Por lo tanto, se tiene:

$$r_c = \frac{1}{1 + \rho(f - 2)} \quad (5)$$

y si $p = 1$, es decir, en el sistema, el monómero polifuncional es el único que porta ese tipo de función, la ecuación (4) se reducirá a:

$$r_c = \frac{1}{f - 1} \quad (6)$$

La ecuación 5 proporciona una herramienta convencional para determinar las funciones activas de un monómero potencialmente multifuncional, es decir, en este caso, el número de hidrógenos del monómero multifuncional, es decir, las ciclodextrinas, que se puede someter a la reacción de adición. Esto se puede obtener determinando experimentalmente el valor r_c para mezclas reactivas estequiométricamente desequilibradas con un exceso de enlaces dobles. Operativamente, se permitirá la polimerización de una serie de mezclas de reacción desequilibradas con un exceso de enlaces dobles progresivamente mayor durante un tiempo suficiente para alcanzar el grado máximo de conversión. El exceso mínimo de enlaces dobles que inhibe la gelificación conduce inmediatamente a r_c , y luego a f . En las condiciones de reacción adoptadas, se determinó la f de la β -ciclodextrina y se encontró en el intervalo de 5,5-6.

Además, se pueden utilizar ambas ecuaciones (3) y (5) para la obtención de polímeros hiperramificados solubles o polímeros reticulados con un grado controlado de reticulación. De hecho, con $r < r_c$ a todos los grados de conversión, se obtendrán productos hiperramificados, pero no reticulados. Por el contrario, con $r > r_c$, se obtendrán productos hiperramificados, pero no reticulados mediante un grado de conversión $p < p_c$ y productos reticulados mediante grados de conversión de $p > p_c$.

En ambos casos, se obtendrán productos ligeramente reticulados mediante $r \geq r_c$ o $p \geq p_c$, es decir, cuando ambos valores sólo difieren ligeramente de los valores críticos.

Está comúnmente reconocido que la ecuación (3) no es válida en presencia de compuestos monofuncionales; para estos sistemas, se ha creado la siguiente ecuación alternativa:

$$p_c = \frac{1}{[r(f_{W,A} - 1)(f_{W,B} - 1)]^{1/2}} \quad (6)$$

en la que $f_{W,A}$ y $f_{W,B}$ son la media en peso de las funcionalidades de los monómeros (incluyendo, los monofuncionales), definidas como:

$$f_{W,A} = \frac{\sum f_{A,j}^2 N_{A,j}}{\sum f_{A,j} N_{A,j}} ; \quad (7)$$

$$f_{W,B} = \frac{\sum f_{B,j}^2 N_{B,j}}{\sum f_{B,j} N_{B,j}} \quad (8)$$

en las que " $f_{A,j}$ " y " $f_{B,j}$ " representan la funcionalidad de cada monómero de tipo "A" y "B" respectivamente, y en la que " $N_{A,j}$ " y " $N_{B,j}$ " son el número correspondiente de moles del sistema (véase, por ejemplo, G. Odian "Principles of Polymerization", III Ed., John Wiley & Sons, EE.UU., 1991).

También en este caso, es posible definir una proporción crítica r_c , en la que el sistema es incapaz de gelificarse y producir polímeros hiperrramificados que sigan siendo solubles. Esto se determinará poniendo $p_c = 1$ y determinando r . La ecuación resultante es:

$$r_c = \frac{1}{(f_{W,A} - 1)(f_{W,B} - 1)} \quad (9)$$

5 Los siguientes ejemplos ilustrarán más detalladamente la información anteriormente expuesta.

Ejemplo 1:

En un matraz de fondo redondo de dos bocas dotado de un agitador magnético y una entrada de nitrógeno, se disolvieron ácido 2,2-bis(acrilamido)acético BAC (8 mmol, 1,6147 g; 98,18%) y monohidrato de hidróxido de litio (8 mmol, 0,3990 g; 99,00%) en agua destilada (4,5 ml) bajo una corriente de nitrógeno. Se añadió 2-metil-piperazina MeP, purificada previamente mediante cristalización, (4 mmol, 0,4282 g; 93,56%). Una vez completada la disolución, se añadieron β -ciclodextrina (1 mmol, 1,1464 g; 0,99%, que contenía el 13,7% p/p de agua) y monohidrato de hidróxido de litio (4,5 mmol, 0,1907 g; 99,00%). El pH de la mezcla de reacción resultó ser de 12,5. Se mantuvo la reacción 24 horas a 28°C, en la oscuridad, bajo una atmósfera de nitrógeno. A continuación, se diluyó la solución con agua destilada (20 ml), se acidificó hasta pH 3 con HCl al 37%, se ultrafiltró a través de una membrana con un corte de peso molecular nominal de 3.000 y, finalmente, se liofilizó. El rendimiento fue del 72%.

El análisis de RMN de ^1H del producto indicó un contenido de β -ciclodextrina del 39,5% (p/p) (Figura 3). El análisis de LS-SEC en línea indicó una \overline{M}_n de 7.000 y una \overline{M}_p de 17.000.

El análisis de MALDI-TOF se muestra en la Figura 4. Concuera con una distribución de macromoléculas que portan unidades de β -ciclodextrina conectadas con segmentos de BAC/MeP.

20 Ejemplo 2:

En un matraz de fondo redondo de dos bocas dotado de un agitador magnético y una entrada de nitrógeno, se disolvieron ácido 2,2-bis(acrilamido)acético BAC (8 mmol, 1,6147 g; 98,18%) y monohidrato de hidróxido de litio (8 mmol, 0,3990 g; 99,00%) en agua destilada (3 ml) bajo una corriente de nitrógeno. Se añadió 2-metil-piperazina MeP, purificada previamente mediante cristalización, (4 mmol, 0,4282 g; 93,56%). Una vez completada la disolución, se añadieron β -ciclodextrina (1 mmol, 1,1464 g; 0,99%, que contenía el 13,7% p/p de agua), monohidrato de hidróxido de litio (4,5 mmol, 0,1907 g; 99,00%), y finalmente, *N,N*-dimetilacrilamida (6,891 mmol, 0,697 g; 99,13%). El pH de la mezcla de reacción resultó ser de 12,5. Se dejó reaccionar la mezcla de reacción durante una semana a 30°C en la oscuridad bajo una corriente de nitrógeno. A continuación, se aisló el producto y se purificó como en el caso anterior. El rendimiento fue del 63,8%. En la Figura 5, se presenta la estructura de este polímero.

30 El análisis de RMN de ^1H del producto, se muestra en la Figura 6. Demuestra un contenido de β -ciclodextrina del 39,36% (p/p). El análisis de LS-SEC en línea indicó una \overline{M}_n de 8.700 y una \overline{M}_p de 36.300.

Ejemplo 3:

La reacción se llevó a cabo como se informa en el Ejemplo 1, usando 3,0 ml de agua en lugar de 4,5 ml. En estas condiciones se obtuvo un producto ligeramente reticulado pero muy hidrófilo, que en agua dio lugar a dispersiones finas y transparentes que parecían soluciones. Se analizaron éstas mediante microscopía TEM, cuyos resultados, que se muestran en la Figura. 7, demuestran claramente las dimensiones nanométricas de las partículas.

Ejemplo 4:

La reacción se llevó a cabo según lo informado en el Ejemplo 1, sustituyendo la α -ciclodextrina (0,973 g) por β -ciclodextrina. El polímero resultante resultó tener un contenido de ciclodextrina del 33% en peso (datos de RMN de ^1H). El LS-SEC en línea indicó una \overline{M}_n de 14.000 y una \overline{M}_p de 38.000. Rendimiento = 59%.

Ejemplo 5:

La reacción se llevó a cabo según lo presentado en el Ejemplo 1, sustituyendo la γ -ciclodextrina (1,297 g) por β -ciclodextrina. El polímero resultante resultó tener un contenido de ciclodextrina del 40% en peso (datos de RMN de ^1H). El LS-SEC en línea indicó una \overline{M}_n de 17.000 y una \overline{M}_p de 42.000. Rendimiento = 67%.

Ejemplo 6:

La reacción se llevó a cabo según lo informado en el Ejemplo 1, sustituyendo la *N,N'*-dimetiletilendiamina (0,353 g, 4 mmol) por 2-metilpiperazina. El polímero resultante resultó tener un contenido de ciclodextrina del 44% en peso (datos de RMN de ^1H). El LS-SEC en línea indicó una \overline{M}_n de 16.000 y una \overline{M}_p de 48.000. Rendimiento = 66%.

5 **Ejemplo 7:**

El presente ejemplo expone la determinación experimental del número de funciones de β -ciclodextrina (f_{exp}) y la preparación de una serie de polímeros hiperramificados reticulados o completamente solubles.

La molécula de β -ciclodextrina contiene siete grupos hidroxilo primarios y, por lo tanto, en principio, se puede someter a una adición de Michael con siete enlaces dobles activados. En otras palabras, la β -ciclodextrina se podría considerar como un monómero heptavalente. Sin embargo, en las condiciones adoptadas, la funcionalidad real puede ser inferior debido, principalmente, al impedimento estérico, aumentando a medida que transcurre la reacción. Por lo tanto, con el fin de controlar la reacción, se determinó experimentalmente la funcionalidad real f mediante la realización de un conjunto de reacciones en las que la proporción molar entre las especies reactivas (r) era igual a la proporción molar crítica (r_c) calculada suponiendo diferentes funcionalidades de la β -ciclodextrina en el intervalo de 4,5-6,0, permitiendo que la reacción avanzara hasta casi completarse y observando la aparición de la gelificación, cuando la hubo. Todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura de 28°C. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Los resultados de la Tabla 1 indican claramente que, en las condiciones adoptadas, la f real de la β -ciclodextrina está entre 5,5 y 6.

20 **Tabla 1:** Determinación de la funcionalidad f de la β -ciclodextrina en la adición de tipo Michael a bisacrilamidas en las condiciones adoptadas, determinando experimentalmente la proporción crítica de monómeros r_c

Código	BAC (mmol)	MeP (mmol)	β CD (mmol)	f hipotética	r	r_c^*	El estado del producto
1	12,25	4	1	4,5	0,5263	0,5263	Reticulado
2	14,00	4	1	5,0	0,4642	0,4642	Reticulado
3	16,37	4	1	5,5	0,4122	0,4122	Reticulado
4	19,00	4	1	6,0	0,3684	0,3684	Hiperramificado soluble

*Calculada según la hipótesis de f (véase la columna anterior).

Ejemplo 8:

El presente ejemplo informa sobre la capacidad de solubilización de los polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados.

25 La capacidad de solubilización de los polímeros se determinó usando paclitaxel como modelo de fármaco muy poco hidrosoluble. Se añadieron 4 mg de paclitaxel a viales con tapón de rosca que contenían 3 ml de cada tipo de solución acuosa de polímero a una concentración de 23 mg/ml. Se incubaron las mezclas con agitación durante 24 h. Todos los polímeros pudieron disolver el paclitaxel formando una nanosuspensión opalescente. Se centrifugaron todas las muestras y se analizaron los sobrenadantes mediante CLAR en fase inversa usando una columna C18 y se detectaron a 227 nm. La fase móvil fue una mezcla de acetato de amonio 0,17 M pH 5,0: metanol:acetonitrilo (50:10:40 v/v)). Los polímeros mejoraron de forma significativa la solubilidad acuosa del paclitaxel. La concentración de paclitaxel en los sobrenadantes varió de 1,25 mg/ml a 3,8 mg/ml según la estructura del polímero.

Ejemplo 9:

35 El presente ejemplo informa sobre la capacidad de carga de paclitaxel de los polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados ligeramente reticulados.

La capacidad de carga de paclitaxel se determinó usando muestras liofilizadas. Se pesaron aproximadamente 5 mg de sólido liofilizado de polímero de paclitaxel y se disolvieron en metanol. Tras la dilución con la fase móvil, se determinó la cantidad de fármaco mediante CLAR de fase inversa usando una columna C18 y se detectó a 227 nm. 40 La fase móvil fue una mezcla de acetato de amonio 0,17 M pH 5,0: metanol: acetonitrilo (50:10:40 v/v)). Los porcentajes de carga de paclitaxel se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Capacidad de carga de paclitaxel de los polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados ligeramente reticulados.

Polímero	Porcentaje de fármaco cargado (p/p)
Producto del Ejemplo 3	4,63
Producto del Ejemplo 2	3,20
Producto del Ejemplo 1	1,17
Producto del Ejemplo 6	2,15

Ejemplo 10:

5 El presente ejemplo informa sobre la determinación de la estabilidad térmica de los polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados.

10 Se usó un análisis de calorimetría diferencial de barrido (CDB) para determinar la estabilidad térmica de la serie de polímeros. Se pesaron aproximadamente 3 mg de polímero en recipientes de muestras de aluminio y después se calentaron a una velocidad de 10°C/min en el intervalo de 25-300°C bajo una purga de nitrógeno usando un calorímetro DSC 7 (Perkin Elmer). En la Figura 8, se muestra un rastreo típico. Todos los polímeros fueron estables hasta al menos 200°C. Esto pudo permitir la esterilización en autoclave.

Ejemplo 11:

El presente ejemplo informa sobre la estabilidad de los complejos de polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados/paclitaxel ante la liofilización de sus nanosuspensiones acuosas.

15 Se liofilizaron las nanosuspensiones de paclitaxel de los diferentes polímeros, obteniéndose un polvo seco que se pudo volver a suspender fácilmente en agua mediante agitación sin que se produjeran fenómenos de agregación.

Se llevó a cabo una microscopía electrónica de transmisión de las nanosuspensiones de fármaco antes y después de la liofilización para verificar el aspecto morfológico de las muestras. La fotomicrografía del polímero ligeramente reticulado que portaba paclitaxel antes y después de la liofilización se presenta en la Figura 9, que muestra que el sistema mantuvo su estructura y el fármaco no cristalizó.

Ejemplo 12:

El presente ejemplo informa sobre la determinación de la cinética de liberación *in vitro* del paclitaxel desde sus complejos con polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados.

25 La liberación *in vitro* del paclitaxel desde los sistemas poliméricos se realizó usando una bolsa de membrana de diálisis (corte en 3.000 Da) y solución de SDS al 1% como medio de lavado. Se colocó toda la bolsa en 50 ml de la solución de SDS. En el momento establecido, se retiraron 0,5 ml de la solución y se analizó la concentración de paclitaxel mediante el procedimiento de CLAR.

En la Figura 10, se presentan las curvas de liberación típicas.

Ejemplo 13:

30 El presente ejemplo informa sobre la determinación de análisis de citotoxicidad *in vitro* de los complejos de paclitaxel con polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados.

35 Se cultivaron células humanas de carcinoma de mama (MCF-7) en monocapa en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal desactivado con calor al 10% y antibióticos, a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. Se sembraron células en crecimiento exponencial en placas de 24 pocillos y se trataron durante 24 y 48 h con diversas concentraciones de paclitaxel (libre o que portaba el polímero ligeramente reticulado). Las concentraciones de paclitaxel variaron de 0,5 a 3,0 µg/ml para la solución y las nanoesponjas.

Se examinó la viabilidad de las células mediante el análisis de exclusión con azul de tripano. La citotoxicidad se expresó como el porcentaje de células control (células sin tratar).

Los estudios de citotoxicidad del paclitaxel revelaron que el complejo es más potente que el paclitaxel puro, como se muestra en las gráficas presentadas en la Figura 11.

40

Ejemplo 14:

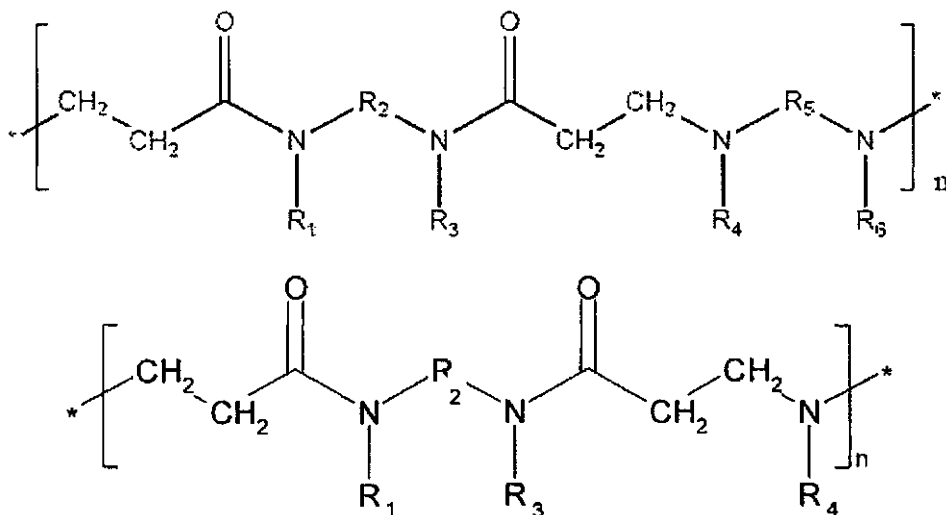
El presente ejemplo informa sobre la determinación de la capacidad de carga de camptotecina de los polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Capacidad de carga de camptotecina de los polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados.

Polímero	Porcentaje de camptotecina del complejo (p/p)
Producto del Ejemplo 1	0,25
Producto del Ejemplo 2	0,92
Producto del Ejemplo 3	12,94

REIVINDICACIONES

1. Polímeros hidrosolubles hiperramificados obtenibles mediante la poliadición de Michael de α -, β - y γ -ciclodextrinas y aminas a bisacrilamidas, **caracterizados porque** dichas unidades de ciclodextrina están ligadas mediante enlaces de tipo éter a segmentos de poli(amidoamina).
- 5 2. Los polímeros según lo reivindicado en la reivindicación 1, en los que al menos uno de los grupos hidroxilo de la α -dextrina, β -dextrina o γ -ciclodextrina, o derivados de las mismas, se ha transformado en grupos metoxilo.
3. Los polímeros según lo reivindicado en la reivindicación 1 ó 2, en los que los segmentos de poliamido-amino tienen la fórmula:



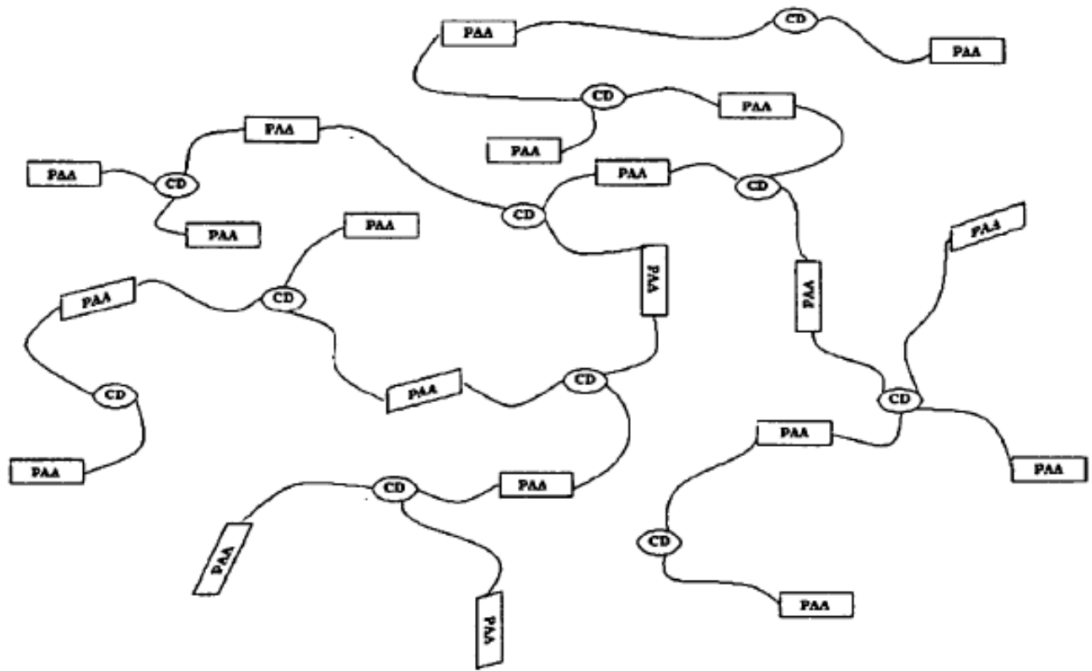
10

en la que:

- R_1 y R_3 , que pueden ser iguales o diferentes, son H o un grupo alquilo C_{1-4} ;
- R_2 es un grupo alquilenos C_{1-4} ;
- o
- 15 R_1 , R_2 y R_3 forman parte de una sola estructura cíclica que, a su vez, porta sustituyentes laterales seleccionados del grupo que consiste en R_1 y R_3 , siendo R_1 y R_3 como se definen anteriormente;
- R_4 y R_6 , que pueden ser iguales o diferentes, son H o un grupo alquilo C_{1-6} , o un grupo alquilo C_{1-6} que porta, a su vez, sustituyentes laterales seleccionados entre R_1 y R_3 , siendo R_1 y R_3 como se definen anteriormente;
- o
- 20 R_4 , R_5 y R_6 forman parte de una sola estructura cíclica que, a su vez, porta sustituyentes laterales seleccionados del grupo que consiste en R_1 , R_2 y R_3 , siendo R_1 , R_2 y R_3 como se definen anteriormente;
- o
- 25 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son grupos alquilo o alquilenos como los definidos anteriormente y que portan, a su vez, otros sustituyentes adicionales seleccionados entre grupos de amina primaria, secundaria o terciaria; grupos carboxílicos; grupos sulfónicos; grupos fosfóricos; grupos hidroxilo de alcohol;
- n varía de 1 a 50, preferentemente, de 2 a 10.

4. Formulaciones farmacéuticas que comprenden un polímero según lo reivindicado en las reivindicaciones 1-3 como un agente de solubilización para fármacos insolubles en agua.
5. Las formulaciones farmacéuticas según lo reivindicado en la reivindicación 4, en las que los fármacos están
- 30 seleccionados entre taxanos, camptotecina y sus derivados, etopósido y aciclovir.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que los taxanos son paclitaxel o docetaxel.

Figura 1: Estructura general de los polímeros de PAA/ciclodextrina hiperramificados de la presente invención



CD = Unidades de ciclodextrina

PAA = Segmentos de poli(amidoamina)

Figura 2: Estructura del polímero del PAA/ β -ciclodextrina hiperramificado sintetizado según lo expuesto en el Ejemplo 1

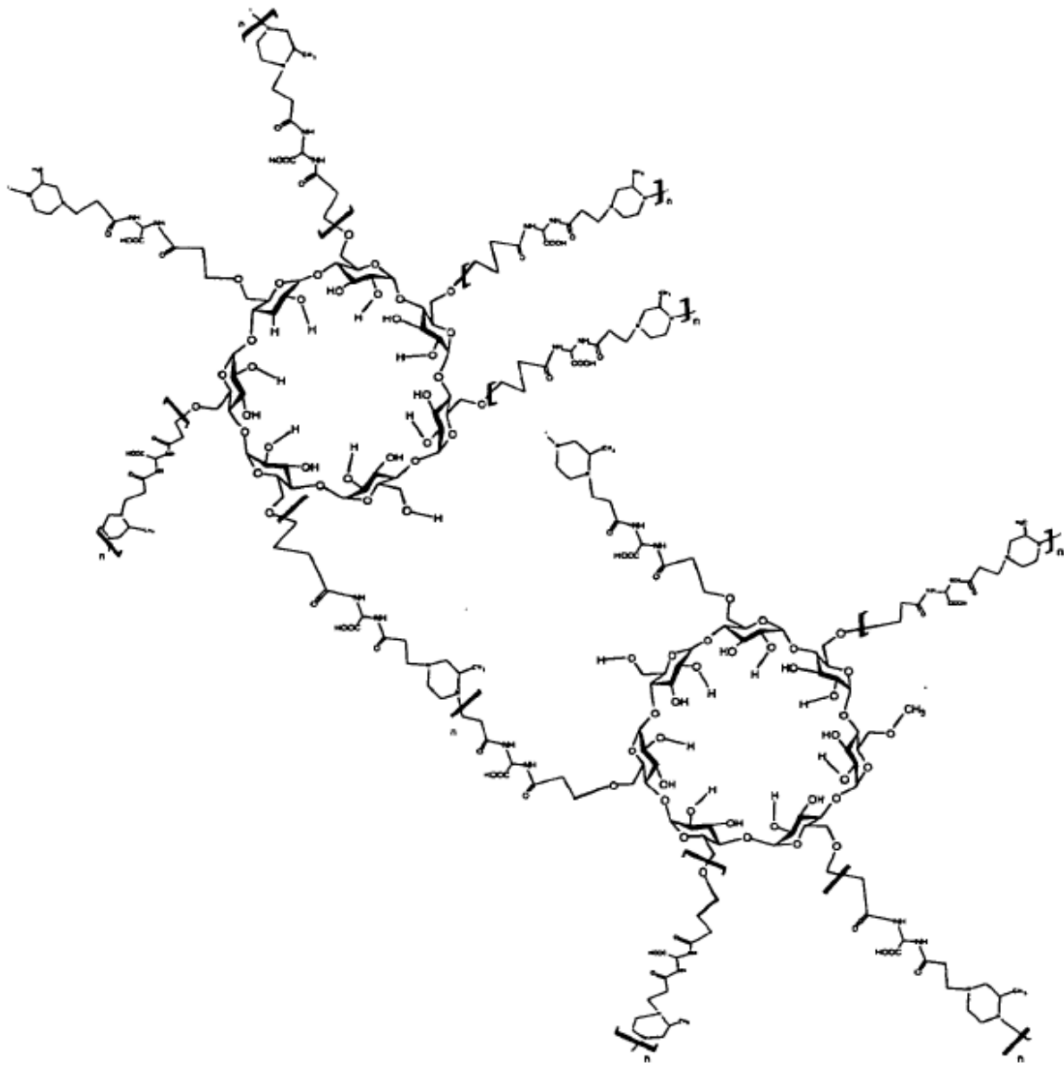


Figura 3: Espectro de RMN de ^1H del polímero de PAA/ β -ciclodextrina hiperramificado sintetizado según lo expuesto en el Ejemplo 1

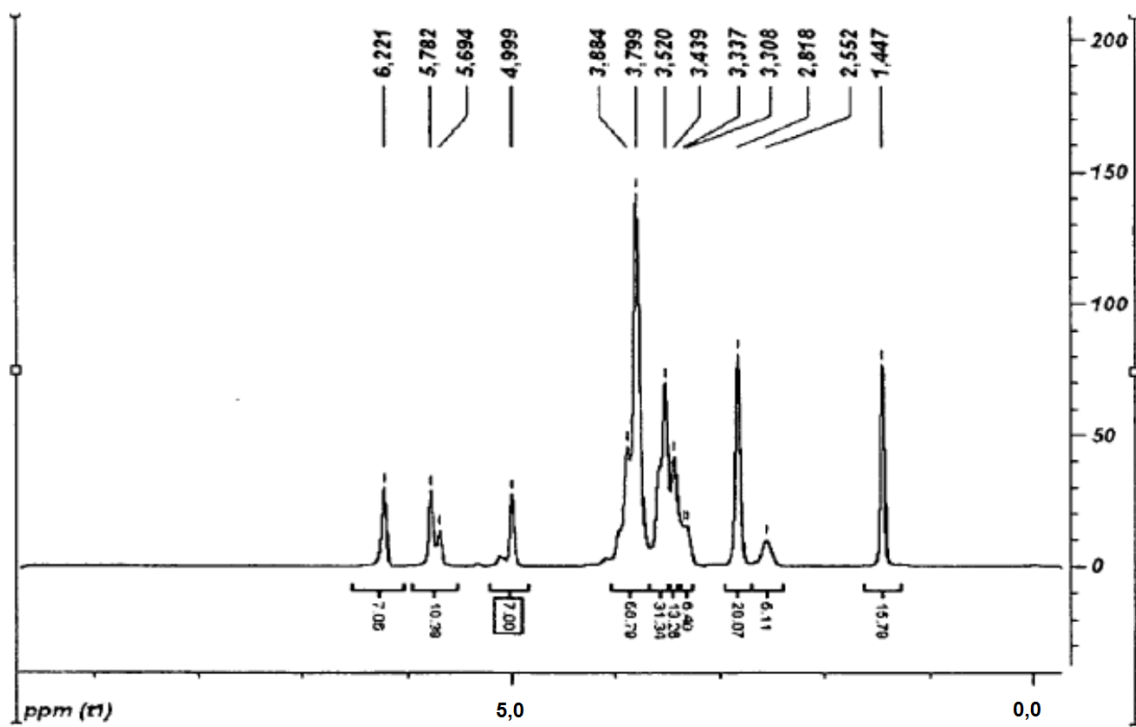


Figura 4: Espectro de MALDI-TOF del polímero del Ejemplo 1

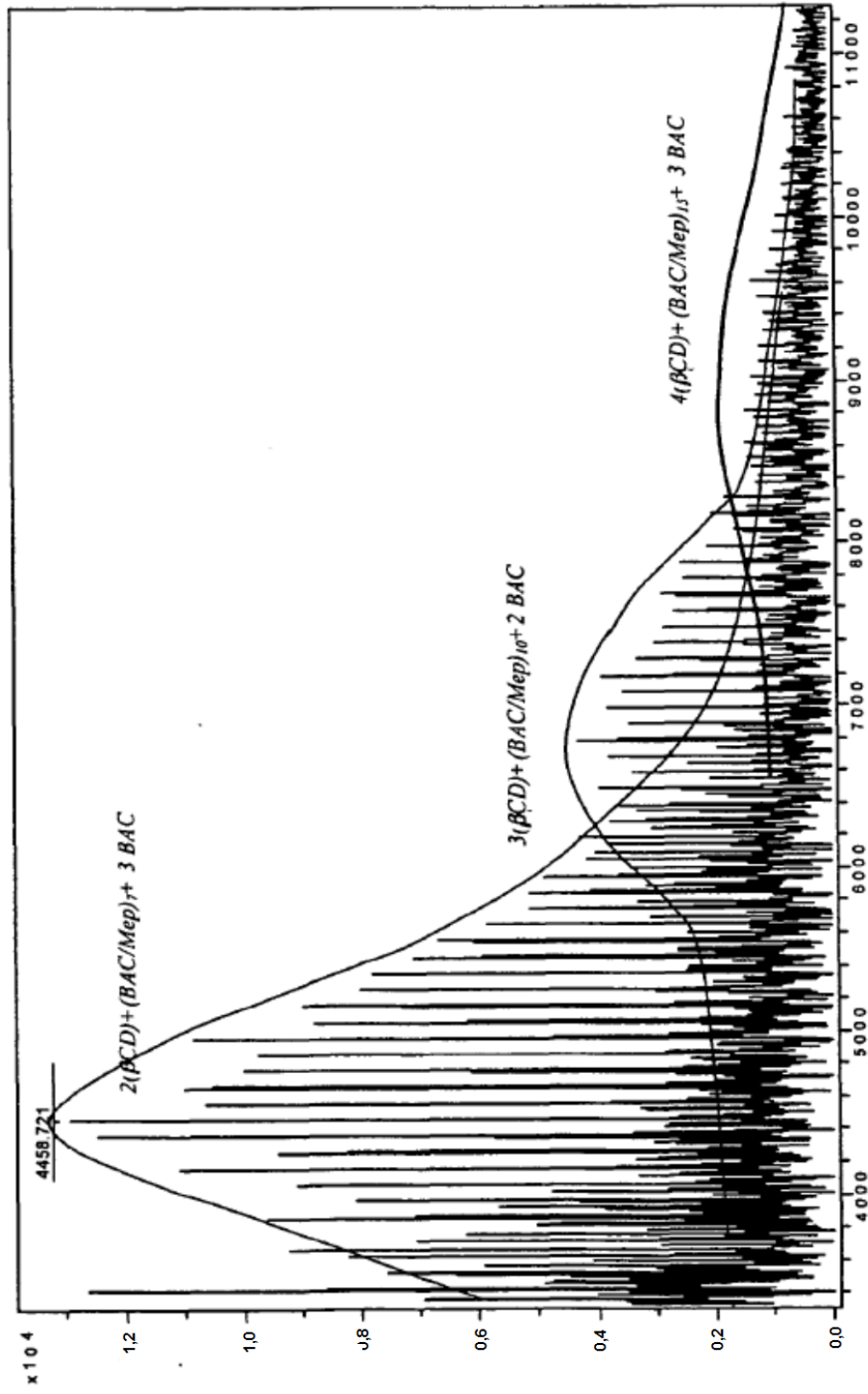


Figura 5: Representación esquemática del polímero de PAA/ β -ciclodextrina hiperramificado sintetizado con *N,N'*-dimetilacrilamida como terminador de cadena monofuncional (Ejemplo 2)

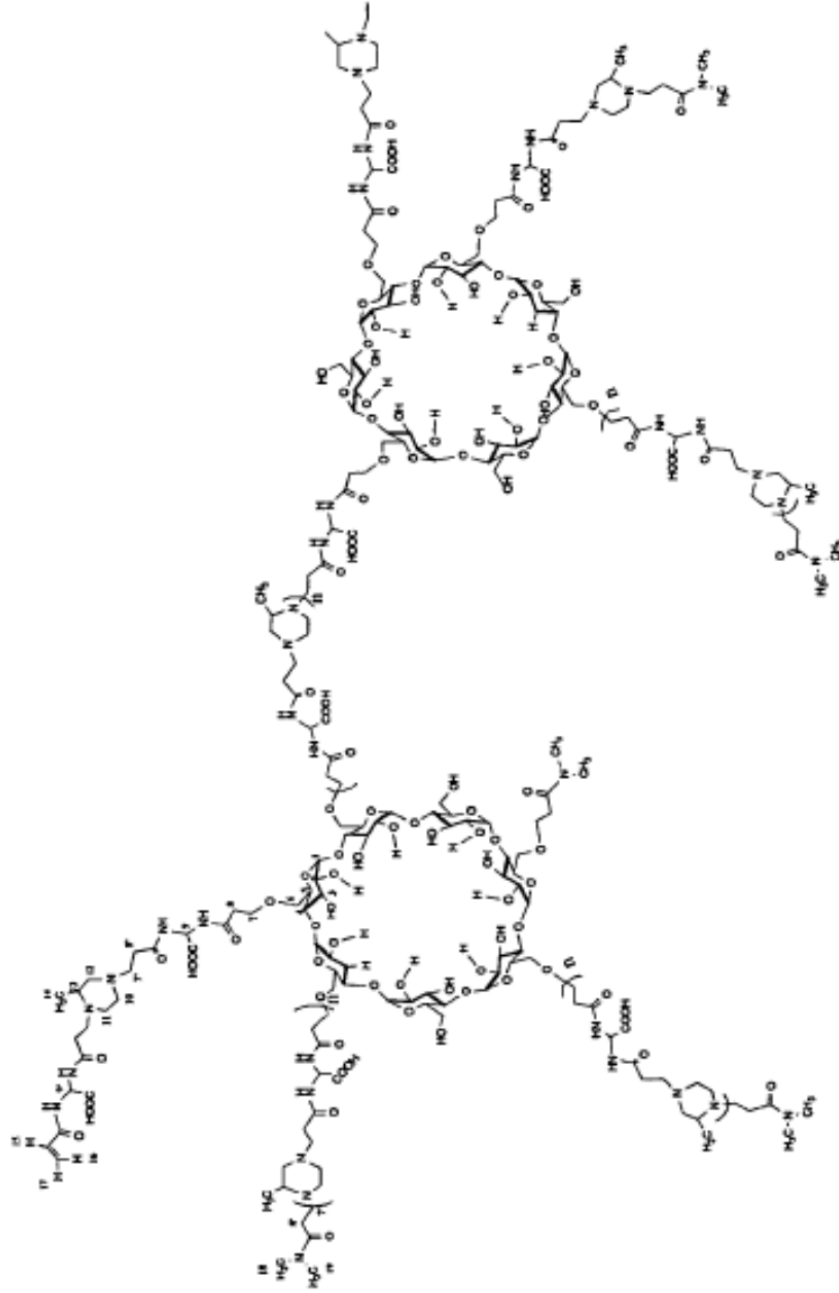


Figura 6: Espectro de RMN de ^1H del polímero de PAA/ β -ciclodextrina hiperramificado sintetizado con *N,N'*-dimetilacrilamida como terminador de cadena (Ejemplo 2)

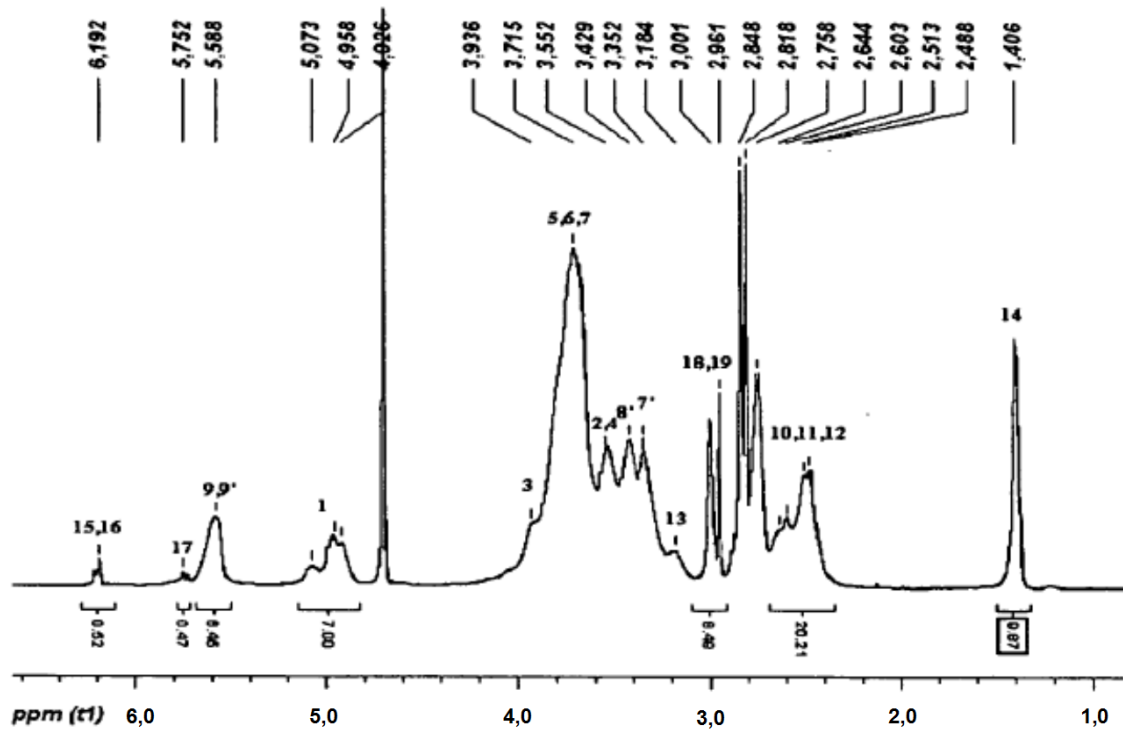


Figura 7: Micrográfrica de TEM del polímero del Ejemplo 3 de dispersiones acuosas (ampliación: x 69.000)

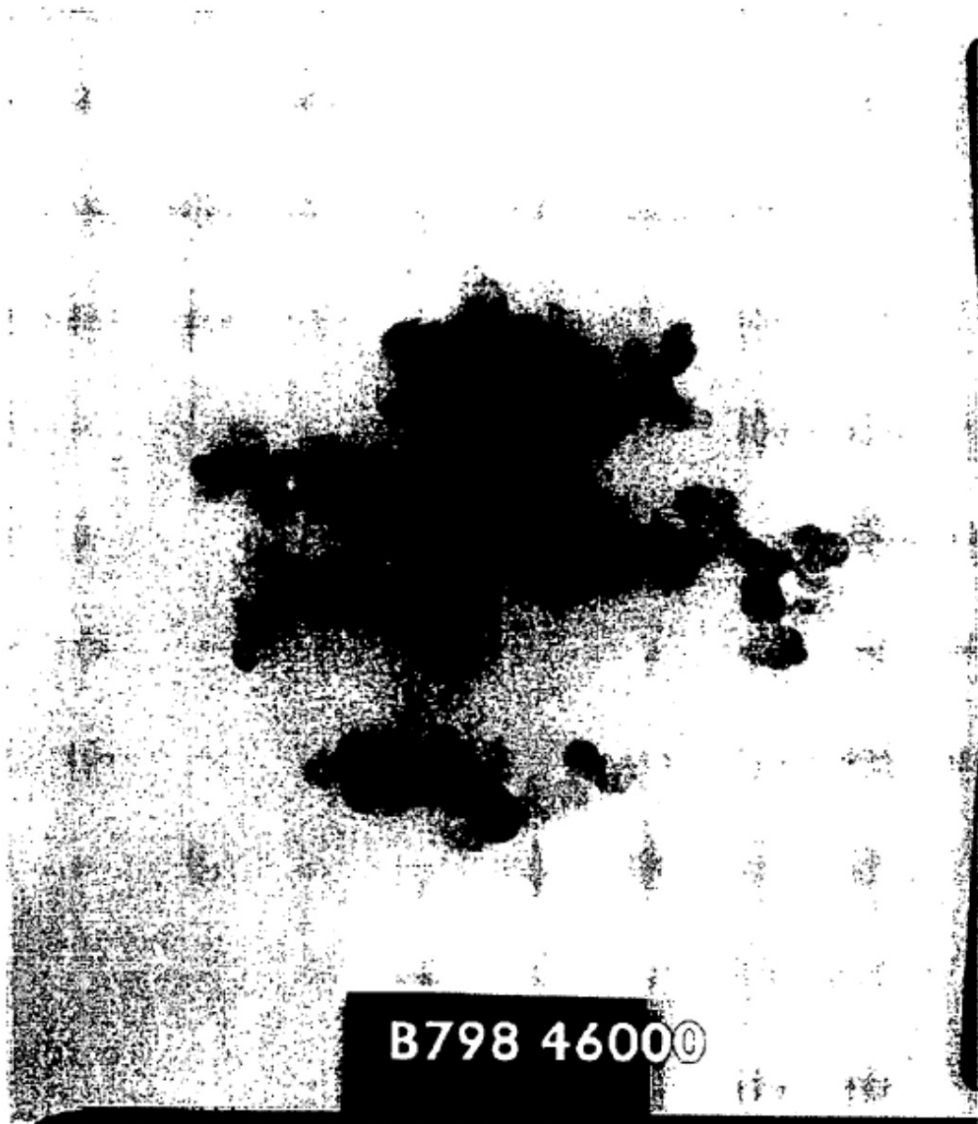


Figura 8: Rastreo de CDB del polímero expuesto en el Ejemplo 3

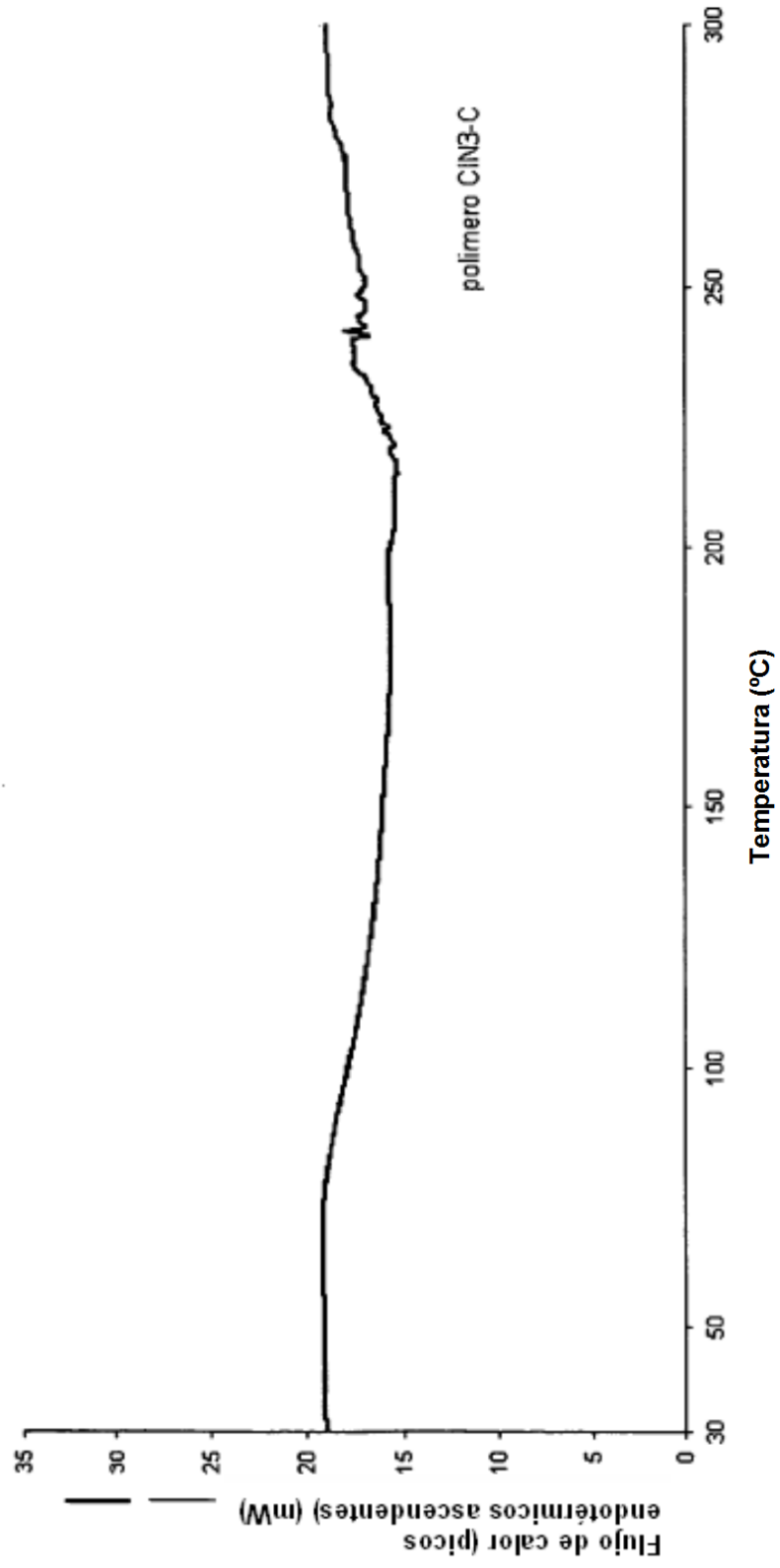


Figura 9: Micrográficas de TEM del complejo de paclitaxel del polímero expuesto en el Ejemplo 3 antes (a) y después (b) de la liofilización de sus dispersiones acuosas



(a)



(b)

Figura 10: Cinética de liberación del paclitaxel desde sus complejos con polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados típicos

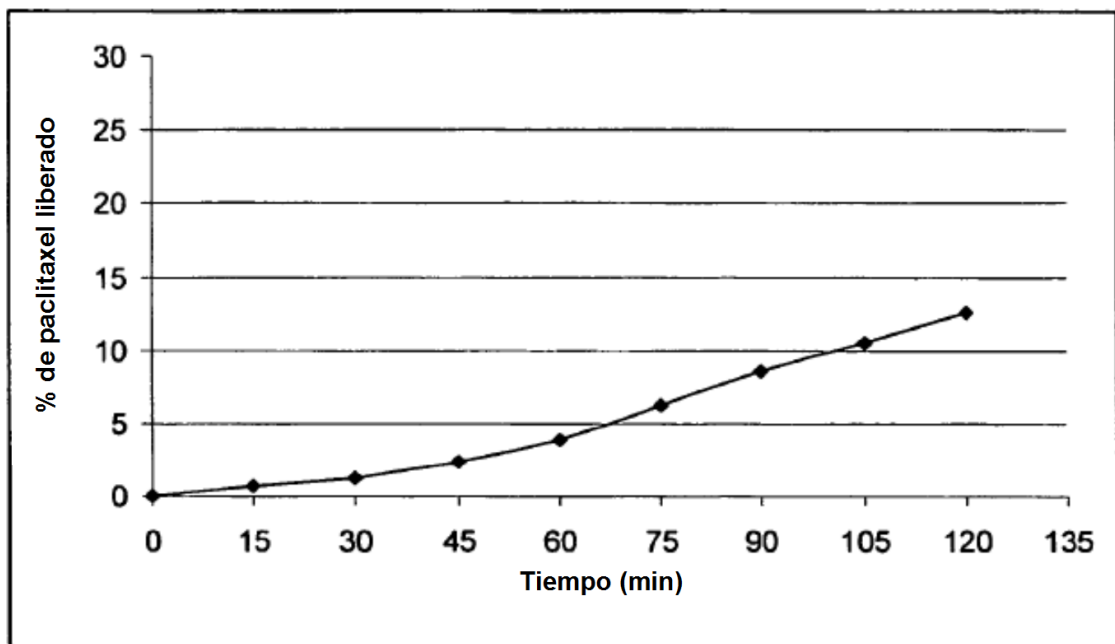


Figura 11: Análisis de citotoxicidad *in vitro* del paclitaxel libre y de sus complejos con polímeros de PAA-ciclodextrina hiperramificados

