

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 585**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C08G 65/08 (2006.01)

A61P 25/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2004 E 04814802 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 1694363**

54 Título: **Composiciones monodispersas de naloxol PEGilado**

30 Prioridad:

16.12.2003 US 530122 P

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

04.03.2014

73 Titular/es:

**NEKTAR THERAPEUTICS (100.0%)
455 Mission Bay Boulevard South Suite 100
San Francisco CA 94158, US**

72 Inventor/es:

**BENTLEY, MICHAEL D.;
VIEGAS, TACEY X.;
GOODIN, RICHARD R.;
CHENG, LIN y
ZHAO, XUAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 445 585 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

Composiciones monodispersas de naloxol PEGilado**5 Campo de la invención**

Esta invención proporciona moléculas pequeñas modificadas químicamente y métodos relacionados que poseen ciertas ventajas sobre las moléculas pequeñas que carecen de la modificación química. Las moléculas pequeñas modificadas químicamente descritas en la presente memoria se refieren a, y/o tienen una o varias aplicaciones en el campo del descubrimiento de fármacos, la farmacoterapia, la fisiología, la química orgánica, la química de polímeros, entre otros.

Antecedentes de la invención

15 El uso de proteínas como agentes activos se ha expandido en los últimos años debido a varios factores: la mejora de las técnicas para identificar, aislar, purificar y/o producir de manera recombinante proteínas; el aumento de la comprensión de las funciones de las proteínas *in vivo* debido a la aparición de la proteómica; y la mejora de las formulaciones, los vehículos de liberación y los enfoques para la modificación química de proteínas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas.

20 Con respecto a la mejora de los enfoques para la modificación química de proteínas, unión covalente de un polímero tal como poli (etilenglicol) o PEG a una proteína ha sido utilizada para aumentar la vida media en circulación, disminuir la inmunogenicidad y/o reducir la degradación proteolítica. Este enfoque de la unión covalente de PEG a una proteína u otro agente activo se conoce comúnmente como PEGilación. Las proteínas para inyección que son modificadas por la unión covalente de PEG son modificadas típicamente por la unión de polímeros de PEG de peso molecular relativamente alto que a menudo oscilan de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

30 Si bien que la modificación de proteínas relativamente grandes con el fin de mejorar su utilidad farmacéutica es quizás una de las aplicaciones más comunes de la PEGilación, la PEGilación también se ha utilizado, aunque en un grado limitado, para mejorar la biodisponibilidad y facilidad de formulación de fármacos de molécula pequeña que tienen escasa solubilidad en agua. Por ejemplo, se han unido covalentemente polímeros solubles en agua tales como PEG a ácido artilínico para mejorar su solubilidad en agua. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.461.603. De una manera similar, el PEG se ha unido covalentemente a compuestos a base de triazina tales como trimelamol para mejorar su solubilidad en agua y aumentar su estabilidad química. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional WO 02/043772. La unión covalente de PEG a bisindolilmaleimidias se ha empleado para mejorar la escasa biodisponibilidad de dichos compuestos debida a la baja solubilidad en agua. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional WO 03/037384. Las cadenas de PEG unidas a fármacos de molécula pequeña con el fin de aumentar su solubilidad en agua tienen típicamente tamaños que oscilan de aproximadamente 500 Daltons a aproximadamente 5000 Daltons, dependiendo del peso molecular del fármaco de molécula pequeña.

45 Los agentes activos pueden ser dosificados por medio de cualquiera de una serie de rutas de administración incluyendo inyección, oral, inhalación, nasal, y transdérmica. Una de las rutas de administración más preferidas, debido a su facilidad, es la administración oral. La administración oral, más común para fármacos de molécula pequeña (es decir, fármacos, no basados en proteínas), es conveniente y a menudo da como resultado una mayor conformidad del paciente en comparación con otras rutas de administración. Desafortunadamente, muchos fármacos de molécula pequeña poseen propiedades (por ejemplo, baja biodisponibilidad oral) que hacen la administración oral poco práctica. A menudo, las propiedades de los fármacos de molécula pequeña que se requieren para la disolución y la difusión selectiva a través de diversas membranas biológicas entran en conflicto directo con las propiedades requeridas para la afinidad óptima de la diana y la administración. Las membranas biológicas primarias que restringen la entrada de fármacos de molécula pequeña a ciertos órganos o tejidos son membranas asociadas con ciertas barreras fisiológicas, p. ej., la barrera hematoencefálica, la barrera hematoplacentaria, y la barrera hematotesticular.

55 La barrera hematoencefálica protege al cerebro de la mayoría de sustancias tóxicas. Las células especializadas denominadas astrocitos poseen muchas pequeñas ramificaciones, que forman una barrera entre el endotelio capilar y las neuronas del cerebro. Los lípidos de las paredes celulares de astrocitos y uniones muy estrechas entre células endoteliales adyacentes limitan el paso de moléculas solubles en agua. Aunque la barrera hematoencefálica no permite el paso de nutrientes esenciales, la barrera es eficaz en la eliminación del paso de algunas sustancias foráneas y puede disminuir la velocidad a la que otras sustancias atraviesan el tejido cerebral.

60 La barrera placentaria protege el feto en desarrollo y sensible de muchas sustancias tóxicas que pueden estar presentes en la circulación materna. Esta barrera consiste de varias capas de células entre los vasos circulatorios maternos y fetales en la placenta. Los lípidos en las membranas celulares limitan la difusión de sustancias tóxicas

solubles en agua. Otras sustancias tales como nutrientes, gases y residuos del feto en desarrollo pueden, sin embargo, pasar a través de la barrera placentaria. Como en el caso de la barrera hematoencefálica, la barrera placentaria no es totalmente impenetrable pero efectivamente ralentiza la difusión de muchas sustancias tóxicas de la madre al feto en la técnica.

5 Para muchos fármacos administrados por ruta oral, la penetración a través de ciertas membranas biológicas tales como la barrera hematoencefálica o la barrera hematoplacentaria es altamente indeseable y puede dar como resultado efectos secundarios graves tales como neurotoxicidad, insomnio, dolor de cabeza, confusión, pesadillas o teratogenicidad. Estos efectos secundarios, cuando son graves, pueden ser suficientes para detener el desarrollo de fármacos que presentan tal absorción cerebral o placentaria indeseable. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos métodos para la liberación de fármacos con eficacia, y en particular, fármacos de molécula pequeña, a un paciente a la vez que se reducen los efectos secundarios adversos y, a menudo tóxicos de los fármacos de molécula pequeña. Específicamente, existe una necesidad de métodos mejorados para la liberación de fármacos que poseen un equilibrio óptimo de buena biodisponibilidad oral, bioactividad, y perfil farmacocinético. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

20 El documento WO03/032990 describe productos conjugados poliméricos de antagonistas opioides que comprenden un polímero, tal como poli(etilenglicol), unido covalentemente a un antagonista opioide. La conexión entre el polímero y el antagonista opioide es preferentemente hidrolíticamente estable. También se describe un método de tratamiento de uno o más efectos secundarios asociados con el uso de analgésicos opioides, tales como estreñimiento, náuseas o prurito, mediante la administración de un producto conjugado de polímero descrito.

25 Wang et al. en Journal of Neurochemistry (2001) 77(6) 1590-1660 describen que el receptor opioide μ , MOR, muestra acoplamiento a proteína G independiente de agonista (basal) espontánea in vitro. Para determinar si la señalización de MOR basal contribuye a la dependencia de narcóticos, se sometieron a ensayo antagonistas para determinar los efectos intrínsecos sobre la señalización de MOR basal in vitro e in vivo, antes y después del tratamiento previo con morfina. Se sometieron a ensayo los efectos intrínsecos de ligandos de MOR midiendo la unión de GTP γ S a membranas celulares y los niveles de AMPc en células intactas. β -CNA, C-CAM, BNTX y nalmefeno fueron identificados como agonistas inversos (suprimiendo la señalización de MOR basal). La naloxona y la naltrexona fueron antagonistas neutros (no afectando a la señalización basal) en las células no tratadas, mientras que los efectos agonistas inversos se hicieron evidentes sólo después del tratamiento previo con morfina. Por el contrario, el 6α - y 6β -naltrexol y -naloxol y la 6β -naltrexamina fueron antagonistas neutros independientemente del tratamiento previo con morfina. En un modelo de ratón agudo y crónico de dependencia inducida por morfina, el 6β -naltrexol causó un cambio en la abstinencia significativamente reducido en comparación con la naloxona y la naltrexona, a dosis eficaces en el bloqueo de la antinocicepción por morfina. Esto apoya la hipótesis de que los síntomas de la abstinencia inducida por naloxona dan como resultado, al menos en parte, la supresión de la actividad de señalización basal de MOR en animales dependientes de morfina. Los antagonistas neutros son prometedores en el tratamiento de la adicción a los narcóticos.

40 **Resumen de la invención**

La presente invención se basa en el desarrollo y descubrimiento de fármacos de molécula pequeña modificados químicamente que tienen propiedades únicas (tales como tasas más bajas para cruzar una membrana biológica), así como métodos para la preparación y administración de dichos compuestos.

45 En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende productos conjugados monodispersos, cada producto conjugado compuesto por un radical derivado de un fármaco de molécula pequeña unido covalentemente por un enlace estable a un oligómero soluble en agua. Preferiblemente, el oligómero se obtiene a partir de una composición monodispersa (es decir, unimolecular). Los productos conjugados preparados a partir de una composición de oligómero monodispersa son referidos como productos conjugados monodispersos, los productos conjugados preparados a partir de una composición de oligómero bimodal son referidos como productos conjugados como bimodales, etcétera.

55 Ventajosamente, el oligómero soluble en agua, cuando se une al fármaco de molécula pequeña, disminuye eficazmente la capacidad del producto conjugado resultante para cruzar ciertas membranas biológicas, tales como las asociadas con la barrera hematoencefálica o la barrera hematoplacentaria. En una o más realizaciones, se proporciona un producto conjugado que presenta una velocidad de paso a través de la membrana biológica reducida en comparación con la velocidad de paso a través de la membrana biológica del fármaco de molécula pequeña no unido al oligómero soluble en agua.

60 El producto conjugado se puede describir generalmente por tener una estructura O-X-D, en donde O corresponde al oligómero soluble en agua, X corresponde a un enlace estable, y D corresponde a un residuo derivado del fármaco de molécula pequeña.

En una o más realizaciones, el fármaco de molécula pequeña es biodisponible por vía oral. Además, el producto conjugado también es biodisponible por vía oral. En las situaciones en las que tanto el fármaco de molécula pequeña como el correspondiente producto conjugado de fármaco de pequeña molécula-oligómero son biodisponibles, se prefiere que el producto conjugado posea una biodisponibilidad oral que sea al menos 10% de la biodisponibilidad oral del fármaco de molécula pequeña en forma no conjugada. Los porcentajes ilustrativos de la biodisponibilidad oral retenida por el producto conjugado en comparación con el fármaco de molécula pequeña en forma no conjugada incluyen los siguientes: al menos aproximadamente 20%; al menos aproximadamente 30%; al menos aproximadamente 40%; al menos aproximadamente 50%; al menos aproximadamente 60%; al menos aproximadamente 70%; al menos aproximadamente 80%; y al menos aproximadamente 90%.

En una o más realizaciones, la administración del producto conjugado exhibe una reducción en el metabolismo de primer paso en comparación con el correspondiente fármaco de molécula pequeña en forma no conjugada. Por lo tanto, la invención proporciona (entre otras cosas) un método para reducir el metabolismo de un agente activo, comprendiendo el método las etapas de: proporcionar productos conjugados monodispersos, cada conjugado compuesto de un residuo derivado de un fármaco de molécula pequeña unido covalentemente por medio de un enlace estable a un oligómero soluble en agua, en donde dicho producto conjugado presenta una tasa metabólica reducida en comparación con la tasa metabólica del fármaco de molécula pequeña no unido al oligómero soluble en agua, y administrar dicho producto conjugado a un paciente.

La porción oligomérica de los productos conjugados descritos en la presente memoria se compone de monómeros individuales conectados en serie. Los oligómeros ilustrativos contienen un número de monómeros que se repiten en serie, el número de monómeros que satisfacen uno o más de los siguientes intervalos: 1-25; 1-20; 1-15; 1-12; 1-10 y 2-9. El oligómero puede poseer un número de monómeros que corresponden a uno cualquiera de los siguientes valores: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; 11, y 12.

La porción oligomérica de los productos conjugados proporcionados en la presente memoria puede tener diversas geometrías, estructuras y características. Los ejemplos incluyen arquitecturas de oligómeros lineales y ramificadas.

En una o más realizaciones, los productos conjugados proporcionados en la presente memoria tienen cada uno un único oligómero soluble en agua unido covalentemente a un único radical derivado del fármaco de molécula pequeña. Es decir, la razón de oligómero a radical derivado del fármaco de molécula pequeña es de 1:1.

El enlace que conecta el oligómero soluble en agua y el radical derivado de un fármaco de molécula pequeña puede ser cualquier enlace adecuado para unir moléculas, aunque se prefiere un enlace covalente (a través de uno o más átomos). Los enlaces covalentes adecuados entre el oligómero soluble en agua y el fármaco de molécula pequeña incluyen, sin limitación, los siguientes: éter; amida; uretano; amina; tioéter, y un enlace carbono-carbono.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden comprender sólo una única especie de producto conjugado o las composiciones pueden comprender dos o tres especies de diferentes productos conjugados. Por ejemplo, la composición puede comprender una única especie de producto conjugado de tal manera que están ausentes otras especies de productos conjugados (p. ej., especies de productos conjugados que tienen diferencias en el peso molecular, la estructura molecular y etcétera). Además, las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden contener, por ejemplo, dos especies diferentes de productos conjugados mezclados entre sí en donde (a) está presente el mismo radical derivado de un fármaco de molécula pequeña en todos los productos conjugados en la composición, y (b) el tamaño del oligómero de una especie de producto conjugado es diferente del tamaño de oligómero de las otras especies de producto conjugado. Para aquellas composiciones que comprenden mezclas que tienen diferentes especies de producto conjugado, cada especie estará presente en la composición en una cantidad conocida y definida. Aunque la especie de los productos conjugados en cualquier composición dada puede diferir en el tamaño de oligómero como se ha descrito anteriormente, las diferencias en la especie de producto conjugado también pueden basarse en el tipo de oligómero, el radical derivado del fármaco de molécula pequeña, el estereoisómero del producto conjugado, etcétera.

Se describe un método para la administración de una composición descrita en la presente memoria. A este respecto, el método comprende la etapa de administración de una composición que comprende productos conjugados monodispersos, cada producto conjugado compuesto por un radical derivado de un fármaco de molécula pequeña unido covalentemente por un enlace estable a un oligómero soluble en agua, en donde el producto conjugado exhibe una tasa de paso a través de la membrana biológica reducida en comparación con la tasa de paso a través de la membrana biológica del fármaco de molécula pequeña no unido al oligómero soluble en agua. Convenientemente, la etapa de administración se selecciona entre cualquiera de un número de enfoques de administración incluyendo, por ejemplo, los seleccionados del grupo que consiste en administración oral, administración transdérmica, administración bucal, administración transmucosal, administración vaginal, administración rectal, administración parenteral, y administración pulmonar.

En otro aspecto, se describe un método para optimizar el paso a través selectivo de la membrana biológica de un fármaco de molécula pequeña. A este respecto, el método comprende la etapa de conjugación de un oligómero

soluble en agua a partir de una composición de oligómero monodispersa a un fármaco de molécula pequeña a través de un enlace covalente estable, para formar de este modo un producto conjugado que presenta una velocidad de paso a través de la membrana biológica que se reduce en comparación con la velocidad de paso a través de la membrana biológica del fármaco de molécula pequeña antes de dicha conjugación.

5 En otro aspecto más, se describe un método para la optimización de una reducción en el paso a través de la membrana biológica de un fármaco de molécula pequeña, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) preparar una serie de productos conjugados monodispersos, cada producto conjugado en la serie compuesto de un radical derivado de un fármaco de molécula pequeña unido covalentemente por un enlace estable a un oligómero soluble
10 en agua, en donde cada producto conjugado en la serie se diferencia sólo en el tamaño del oligómero basado en el número de monómeros en el oligómero, (b) caracterizar, para cada producto conjugado en la serie preparado en la etapa (a), la medida en que el producto conjugado no atraviesa la membrana biológica, y (c) basándose en los resultados de (b), identificar el producto conjugado de la serie de productos conjugados preparados en la etapa (a) que posee la reducción óptima del paso a través de la membrana biológica.

15 Se describe un método para preparar un producto conjugado, comprendiendo el método la etapa de unir covalentemente un oligómero soluble en agua obtenido a partir de una composición de oligómero monodispersa a un fármaco de molécula pequeña. De esta manera, se crea un producto conjugado compuesto por un enlace estable que conectar el oligómero a un radical derivado del fármaco de molécula pequeña. Un enfoque ilustrativo para proporcionar un producto conjugado comprende las etapas de hacer reaccionar, en una o más etapas de síntesis, un oligómero soluble en agua a partir de una composición de oligómero monodispersa, en donde el oligómero tiene un grupo reactivo, A, con un fármaco de molécula pequeña que comprende un grupo reactivo, B, adecuado para la reacción con A, en condiciones eficaces para formar un enlace hidrolíticamente estable resultante de la reacción de A con B, para formar de ese modo un producto conjugado de fármaco de molécula pequeña-oligómero soluble en agua.
20
25

En la medida en que el método para preparar un producto conjugado da como resultado en una mezcla de isómeros (u otras especie de producto conjugado), se puede llevar cabo la etapa adicional de separación de los isómeros (u otra especie de producto conjugado) para obtener un único isómero de producto conjugado (o especie de producto conjugado). Opcionalmente, para dos o más composiciones cualesquiera en las que cada composición tiene un único isómero de producto conjugado (o especie de producto conjugado), se puede realizar la etapa de combinar las dos o más composiciones separadas para proporcionar una composición que tienen cantidades conocidas y definidas de cada isómero producto conjugado (o especie de producto conjugado).
30

35 Se describe un método para la preparación de un oligómero soluble en agua monodisperso, tal como oligo(óxido de etileno). El método incluye las etapas de hacer reaccionar un oligo(óxido de etileno) terminado en halo que tiene (m) monómeros con un oligo(óxido de etileno) terminado en hidroxilo que tiene (n) monómeros bajo condiciones eficaces para desplazar el grupo halo para formar un oligo(óxido de etileno) monomérico que tiene (m) + (n) subunidades de monómero (OEG_{m+n}), donde (m) y (n) varían cada uno independientemente de 1 a 10. Preferiblemente, aunque no necesariamente, (m) varía de 2-6 (más preferiblemente 1-3) y (n) varía de 2-6.
40

El método para la preparación de oligómeros solubles en agua monodispersos se lleva a cabo generalmente en presencia de una base fuerte tal como sodio, potasio, hidruro de sodio, hidruro de potasio, metóxido de sodio, metóxido de potasio, terc-butóxido de sodio, o terc-butóxido de potasio, adecuada para convertir el grupo hidroxilo del oligo(etilenglicol) terminado en hidroxilo en el alcóxido correspondiente.
45

Con respecto al grupo halo (o grupo halógeno) asociado con un oligo(óxido de etileno) terminado en halo (u otro oligómero terminado en halo), el grupo halo se selecciona típicamente entre el grupo que consiste en cloro, bromo y yodo. Además, el oligo(óxido de etileno) terminado en halo está protegido terminalmente por lo general en los extremos con, por ejemplo, un grupo metilo o etilo para proporcionar el correspondiente extremo metil- o etil éter. Un oligo(óxido de etileno) terminado en halo preferido es $H_3CO-(CH_2CH_2O)_m-Br$, donde (m) se define como antes.
50

Con respecto al oligo(óxido de etileno) terminado en hidroxilo, tal o tales oligo(óxidos de etileno) terminados en hidroxilo se corresponden con la estructura $HO-(CH_2CH_2O)_n-H$, donde (n) se describe como antes.
55

El método para la preparación de oligómeros solubles en agua monodispersos también puede comprender la etapa de convertir el grupo hidroxilo terminal de la OEG_{m+n} en un grupo halo para formar $OEG_{m+n}-X$, donde X es un grupo halo. Esto puede estar seguido por la reacción de $OEG_{m+n}-X$ con un oligo(óxido de etileno) terminado en hidroxilo que tiene (n) monómeros en condiciones eficaces para desplazar el grupo halo para formar de ese modo un oligo(óxido de etileno) que tiene (m)+2(n) subunidades de monómero (OEG_{m+2N}), en donde (m) y (n) se han descrito anteriormente. Opcionalmente, las etapas anteriores se pueden repetir hasta que se obtiene un oligo(óxido de etileno) monodisperso que tiene un número discreto deseado de monómero.
60

También se describe un método para preparar un producto conjugado utilizando una composición de oligo(óxido de etileno) monodisperso preparada como se ha descrito anteriormente. Si bien son preferidos para su uso en la

preparación de productos conjugados de la presente invención, los oligómeros monodispersos de óxido de etileno descritos anteriormente se pueden usar para la unión a cualquiera de diversos agentes o superficies activos. Los agentes bioactivos preferidos para acoplamiento a un oligo(óxido de etileno) monodisperso preparado por medio del método anterior incluyen agentes terapéuticos de molécula pequeña, agentes de diagnóstico, colorantes, agentes de formación de imágenes, agentes de direccionamiento, tensioactivos, cosméticos, cosmeceúticos, nutracéuticos, y similares.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición monodispersa que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste de

6-CH₃-(OCH₂CH₂)₅-O-naloxol;
6-CH₃-(OCH₂CH₂)₆-O-naloxol, y
6-CH₃-(OCH₂CH₂)₇-O-naloxol;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto es un isómero α-6, un isómero β-6 o una mezcla de isómeros α-6 y β-6.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un gráfico de la concentración de plasma frente al tiempo para el ácido 13-cis-retinoico ("13-cis-RA") y pequeños productos conjugados de PEG ilustrativos del mismo (PEG₃-13-cis retinamida, "PEG₃-13-cis RA"; PEG₅-13-cis retinamida, "PEG₅-13-cis RA"; PEG₇-13-cis retinamida "PEG₇-13-cis RA"; y PEG₁₁-13-cis retinamida "PEG₁₁-13-cis RA") administrados a ratas Sprague Dawley como se describe con detalle en el Ejemplo 7.

La Fig. 2 es un gráfico de concentración en plasma frente al tiempo para 6-naloxol y pequeños productos conjugados de PEG ilustrativos del mismo (polímeros de 3 unidades, de 5 unidades, de 7 unidades) administrados a ratas Sprague Dawley como se describe en detalle en el Ejemplo 7.

La Fig. 3 es un gráfico que demuestra el efecto de la longitud de la cadena de PEG en el transporte intestinal (como indicador de la biodisponibilidad oral) de diversos productos conjugados de PEG-13-cis-RA y 13-cis-RA en ratas Sprague-Dawley.

La Fig. 4 es un gráfico que demuestra el efecto de la unión covalente de diversos polímeros de PEG de diferentes tamaños sobre el transporte a través de la barrera hematoencefálica de 13-cis-RA y diversos productos conjugados de PEG-13-cis-RA.

La Fig. 5 es un gráfico que demuestra el efecto de la unión covalente de diversos polímeros de PEG de diferentes tamaños sobre el transporte intestinal (como indicador de la biodisponibilidad oral) de naloxona y PEG_n-Nal.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el efecto de la unión covalente de diversos polímeros de PEG de diferentes tamaños en el transporte a través de la barrera hematoencefálica de naloxona y PEG_n-Nal.

La Fig. 7 es un gráfico que demuestra la farmacocinética de la naloxona y PEG_n-Nal en ratas después de alimentación forzada por ruta oral.

La Fig. 8 y la Fig. 9 son gráficos que demuestran el efecto de la unión covalente de diversos polímeros de PEG de diferentes tamaños sobre el nivel de metabolitos de naloxona y metabolitos de PEG_n-Nal.

La Fig. 10 es el espectro de masas de metoxi-PEG-350 obtenido de una fuente comercial (Sigma-Aldrich). Como se puede observar a partir del análisis, aunque el reactivo se comercializa como metoxi-PEG que tiene un peso molecular de 350, el reactivo es en realidad una mezcla de 9 oligómeros de PEG distintos, oscilando el número de subunidades monoméricas de aproximadamente 7 a aproximadamente 15.

Descripción detallada de la invención

Cabe señalar que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se describen a continuación.

"Soluble en agua" como en un "oligómero soluble en agua" indica un oligómero que es al menos 35% (en peso) soluble en, y preferiblemente más de 95% soluble, en agua a temperatura ambiente. Típicamente, una preparación acuosa sin filtrar de un oligómero "soluble en agua" transmite al menos 75%, más preferiblemente al menos 95%, de la cantidad de luz transmitida por la misma solución después de filtrar. Sobre una base de peso, un oligómero "soluble en agua" es preferiblemente al menos 35% (en peso) soluble en agua, más preferiblemente al menos 50% (en peso) soluble en agua, aún más preferiblemente al menos 70% (en peso) soluble en agua, y todavía más preferiblemente al menos 85% (en peso) soluble en agua. Lo más preferido, sin embargo, es que el oligómero soluble en agua sea al menos 95% (en peso) soluble en agua o completamente soluble en agua.

Los términos "monómero", "subunidad monomérica" y "unidad monomérica" se utilizan en la presente memoria indistintamente y se refieren a una de las unidades estructurales básicas de un polímero u oligómero. En el caso de

un homo-oligómero, éste se define como una unidad repetitiva estructural del oligómero. En el caso de un co-oligómero, una unidad monomérica se define más útilmente como el residuo de un monómero que se oligomeriza para formar el oligómero, ya que la unidad repetitiva estructural puede incluir más de un tipo de unidad monomérica. Los oligómeros preferidos de la invención son homo-oligómeros.

Un "oligómero" es una molécula que posee de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 monómeros. La arquitectura de un oligómero puede variar. Los oligómeros específicos para su uso en la invención incluyen aquellos que tienen una variedad de geometrías, tales como lineal, ramificado, o en forma de horquilla, que se describirá con mayor detalle a continuación.

Se pretende que "PEG" o "polietilenglicol", según se utiliza en la presente memoria, abarque cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. A menos que se indique lo contrario, un "oligómero de PEG" o un oligoetilenglicol es aquel en el que todas las subunidades monoméricas son subunidades de óxido de etileno. Típicamente, todas, o sustancialmente todas las subunidades monoméricas son subunidades de óxido de etileno, aunque el oligómero puede contener distintos radicales o grupos funcionales de protección terminal, p. ej., para la conjugación. Típicamente, los oligómeros de PEG para su uso en la presente invención comprenderán una de las dos siguientes estructuras: $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ o $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2-$, dependiendo de si el oxígeno o los oxígenos terminales han sido desplazados o no, p. ej., durante una transformación sintética. Como se indicó anteriormente, para los oligómeros de PEG de la invención, la variable (n) oscila de 1 a 30, y los grupos terminales y la arquitectura del PEG global puede variar. Cuando el PEG comprende adicionalmente un grupo funcional, A, para unirse a, p. ej., un fármaco de molécula pequeña, el grupo funcional cuando está unido covalentemente a un oligómero de PEG, no da como resultado la formación de (i) un enlace oxígeno-oxígeno (-O-O-, un enlace peróxido), o (ii) un enlace nitrógeno-oxígeno (N-O, O-N).

Un "grupo de protección terminal" es generalmente un grupo que contiene carbono no reactivo unido a un oxígeno terminal de un oligómero de PEG. Se prefieren los grupos de protección terminal que tienen pesos moleculares relativamente bajos tales como metilo o etilo. El grupo de protección terminal puede comprender también un marcador detectable. Tales marcadores incluyen, sin limitación, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, radicales utilizados en el marcaje enzimático, marcadores colorimétricos (p. ej., colorantes), iones metálicos, y radicales radiactivos.

"Ramificado", en referencia a la geometría o estructura global de un oligómero, se refiere a un oligómero que tiene dos o más "brazos" de polímero que se extienden desde un punto de ramificación.

"En forma de horquilla", en referencia a la geometría o estructura global de un oligómero, se refiere a un oligómero que tiene dos o más grupos funcionales (típicamente a través de uno o más átomos) que se extienden desde un punto de ramificación.

Un "punto de ramificación" se refiere a un punto de bifurcación que comprende uno o más átomos en los que se ramifica un oligómero a partir de una estructura lineal en uno o más brazos adicionales.

El término "reactivo" o "activado" se refiere a un grupo funcional que reacciona fácilmente o a una velocidad práctica en condiciones convencionales de síntesis orgánica. Esto está en contraste con aquellos grupos que o bien no reaccionan o que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción poco prácticas para reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

"No fácilmente reactivo", con referencia a un grupo funcional presente en una molécula en una mezcla de reacción, indica que el grupo sigue estando en gran parte intacto en condiciones eficaces para producir una reacción deseada en la mezcla de reacción.

Un "grupo protector" es un radical que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo particular en una molécula bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que esté siendo protegido así como de las condiciones de reacción que se vayan a emplear y de la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula. Los grupos funcionales que pueden ser protegidos incluyen, a modo de ejemplo, grupos ácido carboxílico, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos carbonilo y similares. Los grupos protectores representativos para los ácidos carboxílicos incluyen ésteres (tales como un éster *p*-metoxibencílico), amidas e hidrazidas; para los grupos amino, carbamatos (tales como *tert*-butoxicarbonilo) y amidas; para los grupos hidroxilo, éteres y ésteres; para los grupos tiol, tioéteres y tioésteres; para los grupos carbonilo, acetales y cetales, y similares. Tales grupos protectores son bien conocidos para los expertos en la técnica y son descritos, por ejemplo, por T.W. Greene y G.M. Wuts, en *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Tercera Edición, Wiley, Nueva York, 1999, y referencias allí citadas.

Un grupo funcional en "forma protegida" se refiere a un grupo funcional que porta un grupo protector. según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo abarque las formas protegidas del mismo.

5 Un enlace "fisiológicamente escindible" o "hidrolizable" o "degradable" es un enlace relativamente lábil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no solo del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Los enlaces hidrolíticamente inestables o débiles apropiados incluyen, pero no se limitan a éster carboxilato, éster fosfato, anhídridos, acetales, cetales, éter de aciloxialquilo, iminas, ortoésteres, péptidos, oligonucleótidos, tioésteres, tiolésteres, y carbonatos.

Un "enlace enzimáticamente degradable" significa un enlace que está sujeto a degradación por una o más enzimas.

15 Una unión o enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, no experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas en un grado apreciable durante un período prolongado de tiempo. Los ejemplos de las uniones hidrolíticamente estables incluyen pero no se limitan a las siguientes: enlaces carbono-carbono (por ejemplo, en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos, aminas, y similares. Generalmente, una unión hidrolíticamente estable es aquella que muestra una tasa de hidrólisis de menos de aproximadamente el 1-2% por día en condiciones fisiológicas. las tasas de hidrólisis de los enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de los libros de texto de química convencionales.

20 "Sustancialmente" o "esencialmente" significa casi totalmente o completamente, p. ej., 95% o más, más preferiblemente 97% o más, aún más preferiblemente 98% o más, incluso más preferiblemente 99% o más, aún todavía más preferiblemente 99,9% o más, siendo los más preferido 99,99% o más de alguna cantidad dada.

30 "Monodisperso" se refiere a una composición de oligómero en la que sustancialmente la totalidad de los oligómeros en la composición tienen un peso molecular único (es decir, el mismo) bien definido y un número definido de monómeros, como se determina por medio de cromatografía o espectrometría de masas. Las composiciones de oligómeros monodispersas son en un sentido puro, es decir, teniendo sustancialmente un número único y definible (como número entero) de monómeros en lugar de una gran distribución. Una composición de oligómero monodispersa de la invención posee un valor de Mw/Mn de 1,0005 o menos, y más preferiblemente, un valor de Mw/Mn de 1,0000. Por extensión, una composición compuesta de productos conjugados monodispersos significa que sustancialmente todos los oligómeros de todos los productos conjugados en la composición tienen un número único y definible (como número entero) de monómeros en lugar de una gran distribución y poseerían un valor de Mw/Mn de 1,0005, y más preferiblemente, un valor de Mw/Mn de 1,0000 si el oligómero no estuviera unido al radical derivado de un fármaco de molécula pequeña. Una composición que comprende productos conjugados monodispersos puede, sin embargo, incluir una o más sustancias no conjugadas tales como disolventes, reactivos, excipientes, etc.

40 "Bimodal", en referencia a una composición de oligómero, se refiere a una composición de oligómero en donde sustancialmente todos los oligómeros en la composición tienen uno de dos números definibles y diferentes (como números enteros) de monómeros en lugar de una gran distribución, y cuya distribución de pesos moleculares, cuando se representa como una fracción numérica en comparación con el peso molecular, aparece como dos picos identificables separados. Preferiblemente, para una composición de oligómero bimodal como se describe en la presente memoria, cada pico es simétrico alrededor de su media, aunque el tamaño de los dos picos puede variar. Idealmente, el índice de polidispersidad de cada pico en la distribución bimodal, Mw/Mn, es 1,01 o menos, más preferiblemente 1,001 o menos, e incluso más preferiblemente de 1,0005 o menos, y lo más preferiblemente un valor de Mw/Mn de 1,0000. Por extensión, una composición que comprende productos conjugados bimodales significa que sustancialmente todos los oligómeros de todos los productos conjugados en la composición tienen uno de dos números definibles y diferentes (como números enteros) de monómeros en lugar de una gran distribución y poseerían un valor de Mw/Mn de 1,01 o menos, más preferiblemente de 1,001 o menos y aún más preferiblemente de 1,0005 o menos, y lo más preferiblemente un valor de Mw/Mn de 1,0000 si el oligómero no se uniera al radical derivado de un fármaco de molécula pequeña. Una composición que comprende productos conjugados bimodales puede, sin embargo, incluir una o más sustancias no conjugadas tales como disolventes, reactivos, excipientes, etc.

55 Un "fármaco de molécula pequeña" se utiliza ampliamente en la presente memoria para referirse a un compuesto orgánico, inorgánico, u organometálico que tiene típicamente un peso molecular de menos de aproximadamente 1000. Los fármacos de molécula pequeña de la invención abarcan oligopéptidos y otras biomoléculas que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1000.

60 Los términos "radical derivado de un fármaco de molécula pequeña" y "radical de fármaco de molécula pequeña" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a la porción o residuo del fármaco de molécula

pequeña de origen hasta el enlace covalente resultante de la unión covalente del fármaco (o una forma activada o químicamente modificada del mismo) a un oligómero de la invención.

5 Un "membrana biológica" es cualquier membrana, elaborada típicamente a partir de células o tejidos especializados, que sirve como una barrera para al menos algunos xenobióticos o materiales por otra parte no deseables. Según se utiliza en la presente memoria una "membrana biológica" incluye aquellas membranas que están asociadas con las barreras fisiológicas protectoras que incluyen, por ejemplo: la barrera hematoencefálica; la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo; la barrera hematoplacentaria; la barrera hematólactea; la barrera hematotesticular; y las barreras de la mucosa incluyendo la mucosa vaginal, la mucosa uretral, la mucosa anal, la mucosa bucal, la mucosa sublingual, 10 la mucosa rectal, etcétera). A menos que el contexto dicte claramente lo contrario, el término "membrana biológica" no incluye las membranas asociadas con el tracto gastrointestinal medio (p. ej., el estómago y el intestino delgado).

Una "velocidad de paso a través de la membrana biológica", según se utiliza en la presente memoria, proporciona una medición de la capacidad de un compuesto para cruzar una barrera biológica, tal como la barrera hematoencefálica ("BHE"). Se puede utilizar una variedad de métodos para evaluar el transporte de una molécula a través de cualquier membrana biológica dada. Los métodos para evaluar la velocidad de paso a través de la membrana biológica asociada con cualquier barrera biológica dada (por ejemplo, la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo, la barrera hematoplacentaria, la barrera hematólactea, la barrera intestinal, etcétera), son conocidos, se describen en la presente memoria y/o en la literatura relevante, y/o se pueden determinar por un experto normal en la técnica. 15 20

Un compuesto que "atraviesa la barrera hematoencefálica" de acuerdo con la invención es uno que atraviesa la BHE a una velocidad mayor que la del atenolol utilizando los métodos descritos en la presente memoria.

25 Un "reducción de la tasa metabólica", se refiere a una reducción medible en la tasa metabólica de un producto conjugado de oligómero soluble en agua-fármaco de molécula pequeña en comparación con la tasa metabólica del fármaco de molécula pequeña no unido al oligómero soluble en agua (es decir, el propio fármaco de molécula pequeña) o un material de referencia convencional. En el caso especial de la "reducción de la tasa metabólica de primer paso", se requiere la misma "reducción de la tasa metabólica", salvo que el fármaco de molécula pequeña (o material convencional de referencia) y el producto conjugado correspondiente se administran por ruta oral. Los fármacos administrados por ruta oral se absorben desde el tracto gastrointestinal a la circulación portal y deben pasar a través del hígado antes de alcanzar la circulación general. Debido a que el hígado es el sitio principal de metabolismo del fármaco o biotransformación, una cantidad sustancial de fármaco puede ser metabolizada antes de que llegue a la circulación general. El grado de metabolismo de primer paso, y por lo tanto, cualquier reducción del mismo, se puede medir por medio de varios enfoques diferentes. Por ejemplo, se pueden recoger muestras de sangre de animales a intervalos de tiempo y analizar el plasma o el suero por medio de cromatografía/espectrometría de masas de líquido para determinar los niveles de metabolitos. Otras mecanismos para la medición de una "reducción de la tasa metabólica" asociada con el metabolismo de primer paso y otros procesos metabólicos son conocidos, descritos en la presente memoria y/o en la literatura relevante, y/o pueden ser determinados por un experto normal en la técnica. Preferiblemente, un producto conjugado de la invención puede proporcionar una tasa reducida de reducción de metabolismo que satisfaga al menos uno de los siguientes valores: al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%; al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%; al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, y al menos aproximadamente 90%. 30 35 40 45

Un compuesto (tal como un fármaco de molécula pequeña o producto conjugado del mismo) que es "biodisponible por ruta oral" es uno que posee biodisponibilidad cuando se administra por ruta oral a más de 1%, y preferiblemente más de 10%, donde la biodisponibilidad de un compuesto es la fracción de fármaco administrado que llega a la circulación general en forma no metabolizada. 50

"Alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada, que oscila típicamente de aproximadamente 1 a 20 átomos de longitud. Tales cadenas de hidrocarburos están preferiblemente pero no necesariamente saturadas y pueden ser de cadena lineal o ramificada, aunque se prefiere típicamente la cadena lineal. Los ejemplos de los grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares. Según se utiliza en la presente memoria, "alquilo" incluye cicloalquilo cuando se referencian tres o más átomos de carbono. 55

"Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y puede ser de cadena lineal o ramificada, como se ilustra por metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo 60

"Sustituyentes no interferentes" son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, son típicamente no reactivos con otros grupos funcionales contenidos dentro de la molécula.

"Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R-, en donde R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C₁-C₂₀ (p. ej., metoxi, etoxi, propiloxi, bencilo, etc.), preferiblemente C₁-C₇.

5 "Electrófilo" se refiere a un ión, átomo o una colección iónica o neutra de átomos que tienen un centro electrófilo, es decir, un centro que está buscando electrones, capaz de reaccionar con un nucleófilo.

"Nucleófilo" se refiere a un ión o átomo o una colección iónica o neutra de átomos que tienen un centro nucleófilo, es decir, un centro que está buscando un centro electrófilo, y capaz de reaccionar con un electrófilo.

10 "Fármaco", según se utiliza en la presente memoria incluye cualquier agente, compuesto, composición de materia o mezcla que proporciona algún efecto farmacológico, con frecuencia beneficioso que puede demostrarse *in vivo* o *in vitro*. Esto incluye alimentos, suplementos alimenticios, nutrientes, nutracéuticos, medicamentos, vacunas, anticuerpos, vitaminas y otros agentes beneficiosos. Según se utiliza en la presente memoria, estos términos incluyen adicionalmente cualquier sustancia fisiológicamente o farmacológicamente activa que produce un efecto
15 localizado o generalizado en un paciente.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que puede ser incluido en las composiciones de la invención y que no causa efectos toxicológicos adversos significativos al paciente.

20 "Cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad fisiológicamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan indistintamente en la presente memoria para significar la cantidad de un producto conjugado de oligómero soluble en agua-fármaco de molécula pequeña presente en una composición que se necesita para proporcionar un nivel deseado de agente y/o producto conjugado activo en el torrente sanguíneo o en el tejido diana. La cantidad
25 precisa dependerá de numerosos factores, p. ej., el agente activo concreto, los componentes y las características físicas de la composición, la población de pacientes deseada, las consideraciones del paciente, y similares, y puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica, basándose en la información proporcionada en la presente memoria y en la literatura relevante.

30 Un oligómero "difuncional" es un oligómero que tiene dos grupos funcionales contenidos en el mismo, típicamente en sus extremos. Cuando los grupos funcionales son el mismo, se dice que el oligómero es homobifuncional. Cuando los grupos funcionales son diferentes, se dice que el oligómero es heterobifuncional.

35 Un reactivo alcalino o ácido descrito en la presente memoria incluye neutro, cargado, y cualquier forma de sal correspondiente del mismo.

El término "paciente" se refiere a un organismo vivo que padece o es propenso a una afección que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de un producto conjugado como el descrito en la presente memoria, típicamente, pero no necesariamente, en forma de un producto conjugado de oligómero soluble en agua- fármaco de
40 molécula de pequeña, e incluye tanto seres humanos como animales.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que puede o no producirse la circunstancia descrita a continuación, por lo que la descripción incluye casos en los que se produce la circunstancia y casos en los que no.

45 La presente descripción se refiere a composiciones de fármacos de molécula pequeña que se modifican químicamente mediante unión covalente de un oligómero soluble en agua obtenido a partir de una composición monodisperso o bimodal de oligómeros solubles en agua. Debido a que el oligómero soluble en agua se obtiene a partir de una composición monodispersa de oligómeros solubles en agua, las composiciones de fármaco de molécula pequeña-oligómero resultantes de la invención son extremadamente pura y bien definidas desde el punto
50 de vista estructural. En la presente invención, el fármaco de molécula pequeña es el naloxol.

Una ventaja de los productos conjugados descritos en la presente memoria es su capacidad para exhibir una velocidad de paso a través membrana biológica reducida en comparación con el agente activo correspondiente en forma no conjugada. Si bien no se desea vincularse a la teoría, se cree que el tamaño molecular es un factor
55 importante para determinar si y en qué medida cualquier molécula dada puede pasar o atravesar cualquier membrana biológica dada. Por ejemplo, la mayoría si no todas las barreras protectoras, se basan al menos en parte en las células altamente empaquetadas que forman una membrana que tiene uniones estrechas a través de las cuales pueden pasar solo moléculas relativamente pequeñas. Por lo tanto, para un fármaco de molécula pequeña dado, la unión de un polímero soluble en agua al fármaco de molécula pequeña proporciona un producto conjugado
60 que es necesariamente más grande y con la expectativa de que se evitará que el producto conjugado atraviese una membrana biológica o tendrá una velocidad reducida de paso a través de la membrana biológica en comparación con fármaco de molécula pequeña no conjugado.

Como se mostrará con más detalle a continuación y en la sección Experimental, sin embargo, la reducción de la velocidad de paso a través de una membrana biológica por medio del aumento de tamaño molecular por conjugación de un oligómero soluble en agua a un fármaco de molécula pequeña no proporciona típicamente un producto conjugado completamente satisfactorio. Idealmente, el producto conjugado se puede proporcionar en forma de una composición que comprende productos conjugados monodispersos. Una vez más, si bien no se vincularse a la teoría, se cree que incluso muy pequeñas diferencias en el número de monómeros entre los productos conjugados pueden proporcionar diferencias relativamente grandes en propiedades tales como la actividad farmacológica, el metabolismo, la biodisponibilidad oral, la velocidad de paso a través de la membrana biológica, la solubilidad y otras.

Además, tal como se evidencia en el espectro de masas proporcionado en la FIG. 10, las composiciones de oligómeros disponibles comercialmente, tales como PEG-350 son, de hecho, relativamente impuras ya que está presente en la composición una variedad de tamaños de oligómeros. Por lo tanto, el uso de tales composiciones de oligómeros relativamente impuras (sin purificación adicional) en la síntesis de productos conjugados daría como resultado a una amplia variedad de tamaños de pesos moleculares de productos conjugados (como resultado de la amplia variedad de pesos moleculares en la composición utilizada para formar el producto conjugado). Como consecuencia de ello, la composición de producto conjugado resultante comprende muchas especies de productos conjugados, en donde se esperaría que cada producto conjugado tuviera diferentes propiedades. Desde un punto de regulador y medicinal, las composiciones que comprenden radicales que tienen propiedades marcadamente diferentes se evitan idealmente.

Como resultado, la presente invención proporciona productos conjugados que no solo son relativamente grandes (en comparación con el correspondiente fármaco de molécula pequeña no conjugado) para reducir el paso a través de la membrana biológica (de nuevo, en comparación con el correspondiente fármaco de molécula pequeña no conjugado), sino que son sustancialmente puros también para asegurar la actividad consistente y deseada y otras propiedades de la composición. Por lo tanto, se proporciona una composición que comprende productos conjugados monodispersos, cada producto conjugado compuesto por un radical derivado de un fármaco de molécula pequeña unido covalentemente por medio de un enlace estable a un oligómero soluble en agua, en donde dicho producto conjugado presenta una velocidad de paso a través de la membrana biológica reducida en comparación con la velocidad de paso a través de la membrana biológica del fármaco de molécula pequeña no unido al oligómero soluble en agua.

Como se indicó anteriormente, el uso de oligómeros discretos de una composición bien definida de oligómeros para formar productos conjugados puede alterar ventajosamente ciertas propiedades asociadas con el correspondiente fármaco de molécula pequeña. Por ejemplo, un producto conjugado de la invención, cuando se administra por cualquiera de varias rutas de administración adecuadas, tales como parenteral, oral, transdérmica, bucal, pulmonar, o nasal, exhibe una reducción de la penetración a través de una membrana biológica (tal como las membranas biológicas asociadas con la barrera hematoencefálica y la barrera hematoplacentaria). Se prefiere que los productos conjugados exhiban un paso ralentizado, mínimo o nulo a través de las membranas biológicas, (tales como las membranas biológicas asociadas con la barrera hematoencefálica y la barrera hematoplacentaria), mientras que todavía pasan a través de las paredes gastrointestinales (GI) y a la circulación general si se pretende la administración oral. Si se pretende la administración pulmonar, el producto conjugado administrado preferiblemente no pasará a la circulación general o tendrá una velocidad de paso a través de la barrera de tejido pulmonar-sangre reducida de modo que los niveles pulmonares locales se mantienen para la actividad farmacológica local en el pulmón. Por otra parte, los productos conjugados de la invención mantienen un grado de bioactividad, así como biodisponibilidad en su forma conjugada.

Con respecto a la barrera hematoencefálica ("BHE"), esta barrera restringe el transporte de fármacos de la sangre al cerebro. Esta barrera consiste de una capa continua de células endoteliales únicas conectadas mediante uniones estrechas. Los capilares cerebrales, que comprenden más de 95% de la superficie total de la BHE, representan la principal ruta para la entrada de la mayoría de los solutos y los fármacos al sistema nervioso central.

Aunque puede ser deseable para algunos compuestos que alcancen concentraciones adecuadas en el tejido cerebral para actuar farmacológicamente en el mismo, muchos otros compuestos que no tienen actividad farmacológica útil en el tejido cerebral pueden en última instancia llegar a los tejidos del sistema nervioso central. Mediante la reducción de la velocidad de paso a través de entrada al sistema nervioso central de estos compuestos que no actúan centralmente, se reduce el riesgo de efectos secundarios en el sistema nervioso central e incluso se puede aumentar el efecto terapéutico puede incluso ser aumentada.

Para los compuestos cuyo grado de capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica no se conoce fácilmente, tal capacidad se puede determinar utilizando un modelo animal adecuado tal como un modelo de perfusión de cerebro de rata ("RBP" por "Rat Brain Perfusion") *in situ* como se describe en la presente memoria. En resumen, la técnica de RBP implica la canulación de la arteria carótida seguido de perfusión con una solución de compuesto bajo condiciones controladas, seguido de una fase de lavado para eliminar el compuesto que queda en el espacio

vascular. (Tales análisis se pueden realizar, p. ej., por organizaciones de investigación por contrato, tales como Abortion Systems, Exton, PA). Más específicamente, en el modelo de RBP, se coloca una cánula en la arteria carótida izquierda y las ramas laterales se ligan. Un tampón fisiológico que contiene el compuesto (5 micromolar) se perfunde a una velocidad de flujo de 10 ml/min en un solo experimento de paso por perfusión. Después de 30 segundos, la perfusión se detuvo y el contenido vascular del cerebro se lava con tampón libre de compuesto durante 30 segundos. Después se retira el tejido cerebral y se analiza para determinar las concentraciones de compuesto a través de cromatografía de líquidos con detección mediante espectrometría de masas tándem (LC/MS/MS). Alternativamente, se puede estimar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica basándose en el cálculo del área de superficie polar molecular del compuesto ("PSA"), que se define como la suma de las contribuciones de superficie de los átomos polares (por lo general oxígenos, nitrógenos e hidrógenos anclados) en un molécula. Se ha demostrado que la PSA se correlaciona con propiedades de transporte de compuestos tal como el transporte a través de la barrera hematoencefálica. Los métodos para la determinación de la PSA de un compuesto se puede encontrar, p. ej., en, Ertl, P., et al., J. Med. Chem. 2000, 43, 3714-3717; y Kelder, J., et al., Pharm. Res. 1999, 16, 1514-1519.

Una barrera similar a la barrera hematoencefálica es la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo. La barrera sangre-líquido cefalorraquídeo crea una barrera o reduce de otra manera la cantidad de sustancias tóxicas o no deseables que alcanzan el líquido cefalorraquídeo, que se encuentra principalmente en el sistema ventricular y el espacio subaracnoideo. Para determinar si y en qué medida un compuesto (p. ej., un fármaco de molécula pequeña o producto conjugado) administrado a un paciente puede cruzar la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo, se puede administrar una cantidad conocida del compuesto a ratones mediante inyección. Unos pocos días después de la administración del compuesto, las muestras de líquido cefalorraquídeo del ratón se pueden analizar para determinar la presencia y cantidad del compuesto.

La barrera hematoplacentaria protege al feto en desarrollo de la mayoría de los tóxicos distribuidos en la circulación materna. Esta barrera consiste de varias capas celulares entre los vasos circulatorios maternos y fetales en la placenta. Como en el caso de la barrera hematoencefálica, la barrera placentaria no es totalmente impenetrable pero se ralentiza eficazmente la difusión de la mayoría de sustancias tóxicas. Para determinar si y en qué medida un compuesto (p. ej., un fármaco de molécula pequeña o producto conjugado) administrado a un mamífero preñado puede cruzar la barrera hematoplacentaria, se puede administrar una cantidad conocida del compuesto a ratones preñados por inyección. Pocos días después de la administración del compuesto, las muestras de tejido fetal de ratón se pueden analizar para determinar la presencia y cantidad del compuesto.

La barrera hematólacteas es similar a la barrera hematoencefálica ya que una membrana biológica separa y limita el paso de ciertas sustancias de la circulación general. En el caso de la barrera hematólacteas, la membrana biológica evita que ciertas sustancias pasen a las glándulas mamarias. Para determinar si y en qué medida un compuesto (p. ej., un fármaco de molécula pequeña o producto conjugado) se administra a un mamífero preñado puede cruzar la barrera hematólacteas, se puede administrar una cantidad conocida del compuesto a ratones lactantes por inyección. Pocos días después de la administración del compuesto, las muestras de leche de las glándulas mamarias se pueden analizar para determinar la presencia y cantidad del compuesto.

La barrera hematotesticular se compone de células de sostén (células de Sertoli), las células que revisten el tracto reproductivo masculino y están conectadas por uniones estrechas. Para determinar si y en qué medida un compuesto (p. ej., un fármaco de molécula pequeña o producto conjugado) administrado a un mamífero macho puede cruzar la barrera hematotesticular, se puede administrar una cantidad conocida del compuesto a ratones macho por inyección. Pocos días después de la administración del compuesto, los testículos del ratón se pueden retirar y se analizar para determinar la presencia y la cantidad del compuesto.

Las barreras mucosas representan otra membrana biológica que bloquea típicamente o reduce las sustancias indeseables alcancen la circulación general. La administración de un compuesto a la zona de la mucosa concreta de interés y a continuación, el análisis de una muestra de sangre para la presencia y la cantidad del compuesto puede determinar si y en qué medida el compuesto cruza esa zona concreta de la mucosa.

Con respecto a cualquier membrana biológica, el producto conjugado de oligómero soluble en agua-fármaco de molécula pequeña presenta una velocidad de paso a través de la membrana biológica que se reduce en comparación con la velocidad de paso a través de la membrana biológica del fármaco de molécula pequeña no unido a la oligómero soluble en agua. Los ejemplos de las reducciones en las velocidades de paso a través de membranas biológicas incluyen reducciones de: al menos aproximadamente 5%; al menos aproximadamente 10%; al menos aproximadamente 25%; al menos aproximadamente 30%; al menos aproximadamente 40%; al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%; al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90%, en comparación con la velocidad de paso a través de la membrana biológica del fármaco de molécula pequeña no unido a la oligómero soluble en agua. Una reducción preferida de la velocidad de paso a través de la membrana biológica para un producto conjugado es al menos

aproximadamente 20%. En algunos casos, se prefiere que el propio fármaco de molécula pequeña sea uno que cruce una o más de las membranas biológicas descritas en la presente memoria.

5 Los productos conjugados que presentan una velocidad de paso de membrana biológica reducida comprenderán típicamente la estructura

O-X-D

10 en donde: O corresponde a un oligómero soluble en agua, X corresponde a un enlace estable, y D corresponde al radical derivado de un fármaco de molécula pequeña.

15 El radical derivado de un fármaco de molécula pequeña es, en cierto sentido, diferente del fármaco de molécula pequeña de origen ya que está ligado, típicamente a través de un enlace covalente, a un átomo que no está asociado con el fármaco de molécula pequeña de origen. Excepto por la diferencia de estar ligado a otro átomo, sin embargo, el radical derivado de un fármaco de molécula pequeña es esencialmente el mismo que el fármaco de molécula pequeña y tendrá un mecanismo farmacológico de acción similar. Por lo tanto, una discusión del fármaco de molécula pequeña sirve igualmente bien para describir el radical derivado de un fármaco de molécula pequeña.

20 Los agentes activos utilizados en los productos conjugados son fármacos de molécula pequeña, es decir, compuestos farmacológicamente activos que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1000 Daltons. Los fármacos de molécula pequeña incluyen oligopéptidos, oligonucleótidos y otras biomoléculas que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1000 Daltons. También se incluye en el término "fármaco de molécula pequeña" cualquier fragmento de un péptido, proteína o anticuerpo, incluyendo secuencias nativas y variantes que caen dentro del intervalo de peso molecular indicado anteriormente.

25 Los pesos moleculares ilustrativos de los fármacos de molécula pequeña incluyen pesos moleculares de: menos de aproximadamente 950; menos de aproximadamente 900; menos de aproximadamente 850; menos de aproximadamente 800; menos de aproximadamente 750; menos de aproximadamente 700; menos de aproximadamente 650; menos de aproximadamente 600; menos de aproximadamente 550; menos de aproximadamente 500; menos de aproximadamente 450; menos de aproximadamente 400; menos de aproximadamente 350, y menos de aproximadamente 300.

35 El fármaco de molécula pequeña, si fuera quiral, se podría obtener a partir de una mezcla racémica, o una forma ópticamente activa, por ejemplo, un único enantiómero ópticamente activo, o cualquier combinación o proporción de enantiómeros. Además, el fármaco de molécula pequeña puede poseer uno o más isómeros geométricos. Con respecto a los isómeros geométricos, una composición puede comprender solo un único isómero geométrico o una mezcla de dos o más isómeros geométricos. Un fármaco de molécula pequeña puede ser más activo de lo habitual, o puede poseer cierto grado de modificación. Por ejemplo, un fármaco de molécula pequeña puede tener un agente de redireccionamiento, etiqueta, o transportador unidos al mismo, antes o después de la unión covalente de un oligómero. Alternativamente, el fármaco de molécula pequeña puede poseer un radical lipófilo unido al mismo, tal como un fosfolípido (p. ej., diesteoilfosfatidiletanolamina o "DSPE", dipalmitoilfosfatidiletanolamina o "DPPE", etcétera) o un ácido graso pequeño. En algunos casos, sin embargo, se prefiere que el radical de fármaco de molécula pequeña no incluya la unión a un radical lipófilo.

45 Una molécula pequeña para el uso en el acoplamiento a un oligómero puede ser cualquiera de los siguientes. Los agentes adecuados pueden seleccionarse, p. ej., entre fármacos respiratorios, anticonvulsivos, relajantes musculares, antiinflamatorios, supresores del apetito, agentes antimigrañosos, contractores musculares, anti-infecciosos (antibióticos, antivirales, antifúngicos, vacunas) antiartríticos, antimaláricos, antieméticos, broncodilatadores, agentes antitrombóticos, antihipertensivos, fármacos cardiovasculares, antiarítmicos, antioxidantes, agentes antiasmáticos, diuréticos, agentes reguladores de lípidos, agentes antiandrogénicos, antiparasitarios, anticoagulantes, neoplásicos, antineoplásicos, hipoglucémicos, agentes y suplementos nutricionales, suplementos de crecimiento, agentes antienteritis, vacunas, anticuerpos, agentes de diagnóstico y agentes de contraste.

55 Más concretamente, el agente activo puede encontrarse en uno de varias clases estructurales, incluyendo, pero no limitadas a moléculas pequeñas, oligopéptidos, polipéptidos o miméticos, fragmentos, o análogos de proteínas, esteroides, nucleótidos, oligonucleótidos, electrolitos, y similares. Preferiblemente, un agente activo para el acoplamiento a un oligómero posee un grupo hidroxilo, carboxilo, tio, amino, o similares libre (es decir, "asa") adecuado para la unión covalente al oligómero. Alternativamente, el fármaco se modifica por medio de la introducción de un "asa" adecuada, preferiblemente por medio de la conversión de uno de sus grupos funcionales existentes en un grupo funcional adecuado para la formación de un enlace covalente estable entre el oligómero y el fármaco. Ambos enfoques se ilustran en la sección Experimental.

60

Los ejemplos específicos de agentes activos adecuados para la unión covalente a un oligómero incluyen miméticos fragmentos activos de molécula pequeña y (incluyendo variantes) de los siguientes: asparraginas, amdoxovir (DAPD), antide, becaplermina, calcitoninas, cianovirina, denileucina difitox, eritropoyetina (EPO), agonistas de EPO (p. ej., péptidos de aproximadamente 10-40 aminoácidos de longitud y que comprenden una secuencia núcleo particular, como se describe en el documento WO 96/40749), dornasa alfa, proteína estimuladora de la eritropoyesis (NESP), factores de coagulación tales como el Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XII, Factor XIII, factor de von Willebrand; cerezasa, cerezima, alfa-glucosidasa, colágeno, ciclosporina, defensinas alfa, defensinas beta, exedina-4, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), trombopoyetina (TPO), inhibidor de alfa-1 proteinasa, elcatonina, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), fibrinógeno, filgrastim, hormonas de crecimiento, hormona de crecimiento humana (hGH), hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), GRO-beta, anticuerpo GRO-beta, proteínas morfogénicas óseas tales como la proteína morfogénica ósea-2, proteína morfogénica ósea-6, OP-1; factor de crecimiento para fibroblastos ácido, factor de crecimiento para fibroblastos básico, ligando de CD-40, heparina, albúmina de suero humano, heparina de bajo peso molecular (HBPM), interferones tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, interferón consenso; interleucinas y receptores de interleucina tales como receptor de interleucina 1, interleucina 2, proteínas de fusión de interleucina 2, antagonista de receptores de interleucina 1, interleucina-3, interleucina 4, receptor de interleucina 4, interleucina 6, interleucina 8, interleucina 12, receptor de interleucina 13, receptor de interleucina 17; lactoferrina y fragmentos de lactoferrina, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), insulina, pro-insulina, análogos de insulina (p. ej., insulina monoacilada como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.922.675), amilina, péptido C, somatostatina, análogos de somatostatina incluyendo octreotida, vasopresina, hormona estimuladora del folículo (FSH), vacuna de influenza, factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), insulintropina, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), activadores de plasminógeno tales como alteplasa, uroquinasa, reteplasa, estreptoquinasa, pamiteplasa, lanoteplasa, y tenecteplasa; factor de crecimiento nervioso (NGF), osteoprotegerina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento de tejidos, factor de crecimiento transformante 1, factor de crecimiento endotelial vascular, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento glial (GGF), receptores de células T, moléculas/antígenos CD, factor de necrosis tumoral (TNF), proteína quimioatrayente de monocitos 1, factores de crecimiento endoteliales, hormona paratiroidea (PTH), péptido de tipo glucagón, somatotropina, timosina alfa 1, inhibidor de timosina alfa 1 IIb/IIIa, timosina beta 10, timosina beta 9, timosina beta 4, alfa-1 antitripsina, compuestos de fosfodiesterasa (PDE), VLA-4 (antígeno muy tardío-4), inhibidores de VLA-4, bisfosfonatos, anticuerpos contra el virus respiratorio sincitial, regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), desoxirribonucleasa (ADNasa), proteínas bactericida/aumentadora de la permeabilidad (BPI), y anticuerpo anti-CMV. Los anticuerpos monoclonales ilustrativos incluyen etanercept (una proteína de fusión dimérica que consiste en la porción de unión al ligando extracelular del receptor de TNF humano de 75 kD ligado a la porción Fc de IgG1), abciximab, afelimomab, basiliximab, daclizumab, infliximab, ibritumomab tiuxetan, mitumomab, muromonab-CD3, producto conjugado de yodo 131 tositumomab, olizumab, rituximab y trastuzumab (Herceptina).

Los agentes adicionales adecuados para la unión covalente a un oligómero incluyen amifostina, amiodarona, ácido aminocaproico, aminohipurato de sodio, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, ácido aminosalicílico, amsacrina, anagrelida, anastrozol, asparraginas, antraciclina, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfán, cabergolina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucina, cilastatina sódica, cisplatino, cladribina, clodronato, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, camptotecinas, ácido 13-cis retinoico, ácido todo trans-retinoico, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, deferoxamina, dexametasona, diclofenaco, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estramustina, etopósido, exemestano, fexofenadina, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, epinefrina, L-Dopa, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecan, itraconazol, goserelina, letrozol, leucovorina, levamisol, lisinopril, lovotiroxina sódica, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, bitartrato metaraminol, metotrexato, metoclopramida, mexiletina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, naloxona, nicotina, nilutamida, octreotida, oxaliplatino, pamidronato, pentostatina, pilcamicina, porfímero, prednisona, procarbazona, proclorperazina, ondansetrón, raltitrexed, sirólamo, estreptozocina, tacrólimo, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tetrahidrocannabinol, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecan, tretinoína, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, dolasetrón, granisetrón, formoterol, fluticasona, leuprolida, midazolam, alprazolam, anfotericina B, podofilotoxinas, antivirales nucleósidos, aroilhidrazonas, sumatriptano; macrólidos tales como eritromicina, oleandomicina, troleandomicina, roxitromicina, claritromicina, davercina, azitromicina, fluritromicina, diritromicina, josamicina, espiromicina, midecamicina, leucomicina, miocamicina, roquitamicina, andazitromicina y swinolida A; fluoroquinolonas, tales como ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trovafloxacina, alatrofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, lomefloxacina, espaxfloxacina, temafloxacina, pefloxacina, amifloxacina, fieroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina y sitafloxacina, aminoglucósidos tales como gentamicina, netilmicina, paramecina, tobramicina, amicacina, kanamicina, neomicina y estreptomycin, vancomicina, teicoplanina, rampolanina, mideplanina, colistina, daptomicina, gramicidina, colistimetato; polimixinas tales como polimixina B, bacitracina, capreomicina, penemos; penicilinas incluyendo agentes sensibles a la penicilinas tales como penicilina G, penicilina V; agentes resistentes a la penicilinas como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, nafcilina; agentes activos contra microorganismos gram negativos, tales como ampicilina, amoxicilina, y hetacilina, cilina y galampicilina; penicilinas

antipseudomonas tales como carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina; cefalosporinas tales como cefpodoxima, cefprozil, ceftbuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradrina, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefaloridina, cefaclor, cefadroxilo, cefaloglicina, cefuroxima, cefotaxima, ceforanida, cefatrizina, cefacetilo, cefepima, cefixima, cefonicida, cefoperazona, cefotetan, cefmetazol, ceftazidima, loracarbef y moxalactama, monobactamas como aztreonam, y carbapenemos tales como imipenemo, meropenemo, isetionato de pentamidina, sulfato de albuterol, lidocaína, sulfato de metaproterenol, dipropionato de beclometasona, triamcinolona acetamida, acetónido de budesonida, fluticasona, bromuro de ipratropio, flunisolida, cromoglicato sódico y tartrato de ergotamina; taxanos tales como paclitaxel, SN-38 y tirfostinas. El agente activo de la invención es el Naloxol.

Se entiende que los medicamentos ilustrativos anteriores abarca, cuando sea aplicable, análogos, agonistas, antagonistas, inhibidores, isómeros, formas polimorfas, y formas farmacéuticamente aceptables de los mismos. Así, p. ej., en la medida en que un fármaco ilustrativo proporcionado anteriormente es relativamente grande y pudiera no ser clasificado como fármaco de molécula pequeña, el fármaco ilustrativo todavía es enumerado puesto que se puede utilizar un análogo de esa molécula grande que tiene una actividad similar pero tamaño pequeño.

Los fármacos de molécula pequeña particularmente bien adaptados son los que pueden atravesar apreciablemente una membrana biológica. También se contemplan los fármacos de molécula pequeña que exhiben el paso a través de la barrera cutánea. En algunos casos, el fármaco de molécula pequeña es uno, que cuando se administra por ruta oral o incluso parenteral, cruza no deseablemente una barrera biológica en un grado significativo. Por ejemplo, un fármaco de molécula pequeña que cruza indeseablemente la barrera hematoencefálica es aquel que exhibe una tasa de captación en el cerebro mayor que el atenolol. En este sentido, los fármacos de molécula pequeña que tienen una tasa de captación en el cerebro ("TCC"), cuando se mide como se describe en la presente memoria, de más de aproximadamente 15 pmol/g de cerebro/seg son ejemplos de fármacos de molécula pequeña que cruzan no deseablemente la barrera hematoencefálica.

Por lo tanto, con respecto a la barrera hematoencefálica, se prefieren los fármacos de molécula pequeña destinados a indicaciones del sistema nervioso no central que, sin embargo cruzan la barrera hematoencefálica puesto que la conjugación de estos fármacos proporciona una molécula que tiene efectos secundarios sobre el sistema nervioso central. Por ejemplo, se prefieren los nucleótidos y nucleósidos estructuralmente relacionados (por ejemplo, 8-azaguanina, 6-mercaptapurina, azatiopreno, tioinosinato, 6-metilthioinosinato, ácido 6-tioúrico, 6-tioguanina, vidarabina, cladribina, ancitabina, azacitidina, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina, fludarabina, gemcitabina, etcétera).

Con respecto a la fludarabina, este fármaco de molécula pequeña exhibe aproximadamente 70% de biodisponibilidad oral, y se utiliza para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, así como para el tratamiento de la leucemia de células pilosas, el linfoma no Hodgkin, y la micosis fungoide. La fludarabina también exhibe efectos secundarios relacionados con el sistema nervioso central, con graves efectos neurológicos, incluyendo ceguera, coma y hasta la muerte. Los estudios en animales realizados en ratas y conejos indican que el medicamento también puede ser teratogénico. Por lo tanto, se espera que un producto conjugado de fludarabina sea eficaz, en el bloqueo de la penetración de los fármacos a través de la barrera hematoencefálica y/o la barrera sangre-placenta o al menos para ralentizar la velocidad de paso a través a través de estas barreras, de manera que se mejoren los efectos secundarios adversos de fludarabina.

Otra clase de fármaco de molécula pequeña que tiene efectos secundarios relacionados con el sistema nervioso central comunes, aunque se utiliza normalmente para actividades periféricas, es la clase de fármacos de molécula pequeña de los antihistamínicos. Estructuralmente, los antihistamínicos, como clase, están relacionados como aminoalquiléteres. Tales fármacos de molécula pequeña incluyen difenhidramina, bromodifenhidramina, doxilamina, carbinoxamina, clemastina, dimenhidrinato, tripelenamina, pirlamina, metapirileno, tonzilamina, feniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, bromofeniramina, dexbromofeniramina, pirrobutamina, triprolidina, prometazina, trimeprazina, metdilazina, ciclizina, clorciclizina, difenilpiralina, fenindamina, dimetindeno, meclizina, buclizina, antazolina, ciproheptadina, azatadina, terfenadina, fexofenadina, astemizol, cetirizina,azelastina, azatadina, loratadina, y desloratadina.

Otra clase más de fármaco de molécula pequeña en la que se desea una reducción de la velocidad de paso a través de la barrera hematoencefálica son los antagonistas opioides. Los antagonistas opioides incluyen, naloxona, N-metilnaloxona, 6-amino-14-hidroxi-17-alilnordesomorfina, naltrendol, naltrexona, metilnaltrexona N-, nalbufina, butorfanol, ciclazocina, pentazocina, nalmeveno, naltrendol, naltrindol, norbinaltorfimina, oxilofano, 6-amino-6-desoxo-naloxona, pentazocina, levalorfanmetilnaltrexona, buprenorfina, ciclorfano, levalorfano, y nalorfina, así como los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.159.081, 5.250.542, 5.270.328, y 5.434.171 y por Knapp et al., en "The pharmacology of Opioid Peptides" L.F. Tseng, Ed, pág. 15, Harwood Academic Publishers, 1995. Generalmente, sin embargo, cualquier miembro de la clase química de la oximorfona (incluidos los antagonistas opioides anteriores, así como oximorfona, codeína, oxiconona, morfina, etilmorfina, diacetilmorfina, hidromorfona, dihidrocodeína, dihidromorfina y metildihidromorfina).

Otra clase química de fármacos de molécula pequeña son los medicamentos basados en complejos de coordinación de platino. Estos incluyen, p. ej., cis-platino, hidropatino, carboplatino, y oxaliplatino.

Otra clase de fármacos de molécula pequeña particularmente bien adaptados para ser conjugados es la clase de los esteroides. Los esteroides preferidos tienen un grupo hidroxilo en su estructura molecular (o un grupo acilo que se puede reducir para formar un grupo hidroxilo). Los ejemplos de los esteroides incluyen aldosterona, desoxicorticosterona, fludrocortisona, cortisona, hidrocortisona, prednisolona, prednisona, medrisona, meprednisona, alclometasona, beclometasona, betametasona, dexametasona, diflorasona, flumetasona, metilprednisolona, parametasona, amcinonida, desonida, fluocinolona, flunisolida, flurandrenolida, triamcinolona, clobetasol, halcinonida, mometasona, clocortolona y desoximetasona.

Las fluoroquinolonas y fármacos de molécula pequeña relacionados en esta clase se puede utilizar para formar productos conjugados. Las fluoroquinolonas ilustrativas incluyen la ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trovafloxacina, alatrofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, lomefloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, pefloxacina, amifloxacina, fleroxacina, tosufloxacina, prulifloxacina, irloxacina, pazufloxacina, clinafloxacina y sitafloxacina.

Otra clase de medicamento que se utiliza generalmente para las indicaciones periféricas, algunos miembros de los cuales se sabe que son teratogénicos, es la clase de los retinoides de fármacos de molécula pequeña. La clase estructuralmente relacionada de retinoides incluye, sin limitación, retinol, retinal, 3-deshidretinol, α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, δ -caroteno, critoxantina, tretinoína, isotretinoína, etretinato, y eretina. Debido a la posibilidad de teratogenicidad para esta clase de fármaco de molécula pequeña (o cualquier clase de fármaco que cause teratogenicidad), es deseable reducir el daño potencial al feto mediante la eliminación completa o la disminución de la velocidad de paso a través de barrera hematoplacentaria barrera de los agentes sospechosos de ser teratogénos.

Los fármacos de molécula pequeña adicionales para su uso como parte de los productos conjugados descritos en la presente memoria incluyen fenotiazinas, dibenzo-diazepinas, galactogogos tales como metoclopramida y tiazidas. Los ejemplos de las fenotiazinas incluyen proclorperazina, perfenazina, trifluoroperazina y flufenazina. Los ejemplos de las dibenzo-diazepinas incluyen clozapina, olanzapina y quetiapina. Otros fármacos de molécula pequeña incluyen amlodipina, nifedipina, nimodipina, nimodipina, 5-hidroxitriptófano, ácido retinoico, e isotretinoína. Otro fármaco preferido es la nevirapina, que atraviesa fácilmente la barrera placentaria.

Los fármacos de molécula pequeña adicionales adecuados para uso en la invención se pueden encontrar, p. ej., en "The Merck Index, 13^a Edición, Merck & Co., Inc. (2001); "The AHFS Drug Handbook, 2^a Edición", American Society of Health System Pharmacist and Lippincot, Williams and Wilkins; "The Physician Desk Reference", Thomson Healthcare Inc., 2003, y "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 19^a Edición, 1995.

La modificación de la molécula de fármaco pequeña proporcionada anteriormente con la unión covalente de un oligómero soluble en agua obtenido a partir de una composición de oligómero monodispersa o bimodal, puede dar como resultado cambios significativos en el transporte del fármaco de molécula pequeña y las propiedades farmacológicas. El uso de un oligómero soluble en agua a partir de una composición de oligómero monodispersa permite la adaptación de las propiedades de los fármacos, ya que los productos conjugados resultantes forman una composición bien definida en lugar de una distribución de una serie de especies de producto conjugado de fármaco de molécula pequeñas-oligómero que tiene una distribución de subunidades monoméricas (y por lo tanto, de pesos moleculares). Como se estableció anteriormente, se observa que la adición o deleción de tan poco como un monómero tiene un efecto medible sobre las propiedades del producto conjugado resultante. La selección de una matriz de oligómeros discretos de diferentes tamaños (de 1 a 30 subunidades monoméricas) se puede realizar en una cantidad de tiempo razonable, y permite la adaptación de la modificación de productos conjugados que tienen propiedades optimizadas.

Los oligómeros, cuando se unen al fármaco de molécula pequeña, proporcionan diferencias en las propiedades en comparación con la molécula pequeña de fármaco original. El uso de pequeños oligómeros (en comparación con las cadenas poliméricas de 5K a 60K que normalmente se unen a proteínas) también aumenta la probabilidad de que el fármaco mantenga al menos un grado, y preferiblemente un grado significativo, de su bioactividad. Esta característica se demuestra en la Tabla VI (Ejemplo 10), que proporciona los datos de bioactividad (CE_{50}) para productos conjugados ilustrativos de la invención. Los productos conjugados ilustrativos de oligómero de PEG-naloxona/naloxol poseen bioactividades que oscilan de aproximadamente 5% a aproximadamente 35% del fármaco de origen no modificado, lo que demuestra adicionalmente las características beneficiosas de los compuestos de la invención.

El oligómero comprende típicamente 5, 6 o 7 monómeros unidos en serie para formar una cadena de monómeros. El oligómero se puede formar a partir de un solo tipo de monómero (es decir, es homo-oligomérico) o dos o tres tipos de monómeros (es decir, es co-oligomérico). Preferiblemente, cada oligómero es un co-oligómero de dos monómeros o, más preferiblemente, es un homo-oligómero. El monómero o los monómeros empleados dan como resultado un oligómero que es soluble en agua tal como se define en la presente memoria, es decir, >95% soluble

en agua, preferiblemente >99% soluble en agua, en agua a temperatura ambiente a pH fisiológico (aproximadamente de 7,2 a 7,6).

5 Por lo tanto, cada oligómero se compone de hasta tres tipos diferentes de monómeros seleccionados del grupo que consiste en: óxido de alquileo, tal como óxido de etileno u óxido de propileno; alcohol olefínico, tal como alcohol vinílico, 1-propenol o 2-propenol; vinilpirrolidona; hidroxialquilmacrilamida o metacrilato de hidroxialquilo, donde el alquilo es preferiblemente metilo; α -hidroxiácido, tal como ácido láctico o ácido glicólico; fosfaceno, oxazolina, aminoácidos, hidratos de carbono tales como monosacáridos, sacárido o manitol; y N-acriloilmorfolina. Los tipos de monómeros preferidos incluyen óxido de alquileo, alcohol olefínico, metacrilamida o metacrilato de hidroxialquilo, N-acriloilmorfolina, y α -hidroxiácido. Preferiblemente, cada oligómero es, independientemente, un co-oligómero de dos tipos de monómeros seleccionados de este grupo, o, más preferiblemente, es un homo-oligómero de un tipo de monómero seleccionado de este grupo.

15 Los dos tipos de monómeros en un co-oligómero pueden ser del mismo tipo de monómero, por ejemplo, dos óxidos de alquileo, tales como óxido de etileno y óxido de propileno. Preferiblemente, el oligómero es un homo-oligómero de óxido de etileno. Por lo general, aunque no necesariamente, el extremo (o extremos) del oligómero que no está unido covalentemente a una molécula pequeña se protege terminalmente para volverlo no reactivo. Alternativamente, el extremo puede incluir un grupo reactivo. Cuando el extremo es un grupo reactivo, el grupo reactivo se selecciona de tal manera que no sea reactivo en las condiciones de formación del oligómero final o durante la unión covalente del oligómero a un fármaco de molécula pequeña, o que esté protegido según sea necesario. Un grupo de extremo funcional común es hidroxilo o -OH, en particular para los óxidos oligoetileno.

25 El oligómero soluble en agua ("O" en la fórmula conjugada O-X-D) puede tener cualquiera de diversas geometrías diferentes. Por ejemplo, "O" (en la fórmula O-X-D) puede ser lineal, ramificado o bifurcada. Más típicamente, el oligómero soluble en agua es lineal o es ramificado, por ejemplo, cuando tiene un punto de ramificación. Aunque gran parte de la discusión en la presente memoria se centra en el poli(óxido de etileno) como oligómero ilustrativo, la discusión y las estructuras presentadas en la presente memoria se pueden ampliar fácilmente para abarcar cualquiera de los oligómeros solubles en agua descritos anteriormente.

30 El peso molecular del oligómero soluble en agua, excluyendo la parte conectora, es en general relativamente bajo. Los valores ilustrativos del peso molecular del polímero soluble en agua incluyen: por debajo de aproximadamente 1.500; por debajo de aproximadamente 1.400; por debajo de aproximadamente 1.300; por debajo de aproximadamente 1.200; por debajo de aproximadamente 1.100; por debajo de aproximadamente 1.000; por debajo de aproximadamente 900; por debajo de aproximadamente 800; por debajo de aproximadamente 700; por debajo de aproximadamente 600; por debajo de aproximadamente 500; por debajo de aproximadamente 400; por debajo de aproximadamente 300; por debajo de aproximadamente 200, y por debajo de aproximadamente 100 Daltons.

40 Los intervalos ilustrativos de pesos moleculares del oligómero soluble en agua, (excluyendo el conector) incluyen: de aproximadamente 100 a aproximadamente 1400 Daltons; de aproximadamente 100 a aproximadamente 1200 Daltons; de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 Daltons; de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 Daltons; de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 Daltons; de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 Daltons; de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 Daltons; de aproximadamente 75 a 1.000 daltons; y de aproximadamente 75 a aproximadamente 750 Daltons.

45 El número de monómeros en serie en el oligómero (y el producto conjugado correspondiente) es uno de 5, 6, o 7.

50 Cuando el oligómero soluble en agua tiene 5, 6 o 7, monómeros, estos valores corresponden a un oligo(óxido de etileno) protegido terminalmente con metoxi que tiene un peso molecular de 251, 295 y 339, Daltons, respectivamente.

55 Como se describió anteriormente, el oligómero soluble en agua se obtiene a partir de una composición que es monodispersa. Es decir, los oligómeros en la composición poseen el mismo valor discreto de peso molecular en lugar de una distribución de pesos moleculares. Algunos oligómeros monodispersos se pueden adquirir de fuentes comerciales tales como los disponibles de Sigma-Aldrich, o alternativamente, se pueden preparar directamente a partir de materiales de partida asequibles comercialmente, tales como Sigma-Aldrich. Por ejemplo, los oligoetilenglicoles de la invención se pueden preparar como describen, p. ej., Chen Y., Baker, GL, en J. Org. Chem., 6870-6873 (1999), o en el documento WO 02/098949 A1. Alternativamente, tales oligómeros se pueden preparar como se describe en la presente memoria en el Ejemplo 9.

60 Como se describió anteriormente, se describe un método mejorado de preparación de un oligómero monodisperso tal como un oligo(óxido de etileno). Estos oligómeros se pueden utilizar en cualquiera de una variedad de aplicaciones, incluyendo, pero no limitadas a la preparación de un producto conjugado de fármaco de molécula pequeña-oligómero soluble en agua que tiene las propiedades beneficiosas establecidas anteriormente.

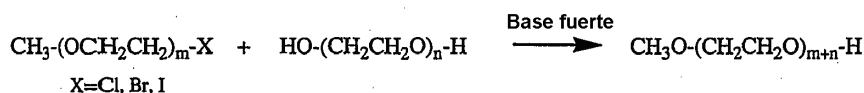
Con el fin de proporcionar los oligómeros monodispersos deseados, se utilizó un nuevo enfoque. Se descubrió que los reactivos de oligómeros terminados en halo son más reactivos y producen mayores rendimientos de productos monofuncionales en comparación con los reactivos descritos anteriormente.

5 Por lo tanto, se describe un método para preparar composiciones de oligómeros monodispersas. El método implica la reacción de un oligómero terminado en halo, tales como un oligo(óxido de etileno) que tiene (m) monómeros con un oligo(óxido de etileno) terminado en hidroxilo que tiene (n) monómeros. Generalmente, el grupo halo en el oligoetilenglicol terminado en halo es un grupo cloro, bromo o yodo. Preferiblemente, sin embargo, el grupo halo es bromo. La reacción se lleva a cabo en condiciones eficaces para desplazar el grupo halo del oligómero terminado en halo para formar de ese modo un oligo(óxido de etileno) que tiene (m) + (n) subunidades monoméricas (OEG_{m+n}), donde (m) y (n) independientemente oscilan entre 1 y 10. Es decir, cada uno de (m) y (n) es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. Preferiblemente, (m) y (n) oscilan cada uno independientemente de 1 a aproximadamente 6. En realizaciones seleccionadas, (m) es 1, 2, o 3 y (n) oscila de 1 a 6. En otros casos, (m) es 1, 2, o 3, y (n) varía de 2 a 6. Típicamente, la reacción se lleva a cabo en presencia de una base fuerte eficaz para convertir el grupo hidroxilo del óxido de oligoetileno terminado en hidroxilo en la especie de alcóxido correspondiente. Las bases adecuadas incluyen sodio, potasio, hidruro de sodio, hidruro de potasio, metóxido de sodio, metóxido de potasio, terc-butóxido de sodio, y terc-butóxido de potasio. En una realización preferida, el oligoetilenglicol terminado en halo posee un grupo de protección terminal tal como metoxi o etoxi.

20 Los oligo(etilenglicoles) terminados en hidroxilo representativos se corresponde con la estructura HO-(CH₂CH₂O)_n-H, donde (n) se describe como antes. El método incluye preferiblemente en ese caso la etapa de conversión del grupo hidroxilo terminal de OEG_{m+n} en un grupo halo, -X, para formar OEG_{m+n}-X. Las etapas anteriores se repiten después hasta que se obtiene un oligómero unimolecular que tiene el número deseado de subunidades.

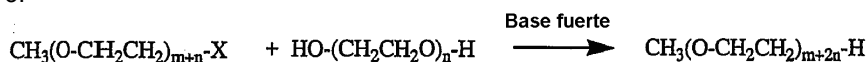
25 Un esquema de reacción ilustrativo es el siguiente.

1.



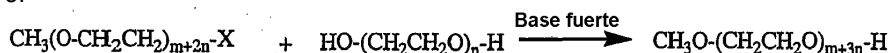
30 2. CH₃O-(CH₂CH₂O)_{m+n}-H → CH₃(O-CH₂CH₂)_{m+n}-X

3.



35 4. CH₃O(CH₂CH₂O)_m 2 N-H → CH₃(O-CH₂CH₂)_m 2 N-X

5.



40 Como se muestra, el método implica el acoplamiento de dos especies de oligómeros unimoleculares mediante el empleo de una reacción de sustitución donde se hace reaccionar un haluro de un oligómero, preferiblemente un óxido de etileno oligomérico, e incluso más preferiblemente, un metiléter de oligo(óxido de etileno) derivatizado con halo, con un alcóxido de oligoetilenglicol para generar el oligómero correspondiente (ver la reacción 1 anterior).

45 El alcóxido se genera típicamente a partir del oligo(óxido de etileno) correspondiente mediante la conversión del hidroxilo terminal en el alcóxido correspondiente en presencia de una base fuerte. La reacción se lleva a cabo generalmente en un disolvente orgánico tal como tetrahidrofurano ("THF") a temperaturas que oscilan de aproximadamente 0°C a aproximadamente 80°C. Los tiempos de reacción oscilan típicamente de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 48 horas. El producto resultante, en la reacción ilustrativa anterior, un oligo(óxido de etileno) protegido terminalmente, contiene la suma del número de monómeros del oligómero derivatizado con halo y el número de monómeros en el alcóxido de oligoetilenglicol [(m) + (n)]. Los rendimientos oscilan típicamente de aproximadamente 25% a aproximadamente 75% para el producto acoplado purificado, oscilando los rendimientos más típicamente de aproximadamente 30 a aproximadamente 60%.

55 En el ejemplo anterior, el extremo hidroxilo en el producto de la reacción 1 se activa a continuación, si fuera necesario, para el acoplamiento a una molécula pequeña. Alternativamente, si se desea, el extremo hidroxilo en el producto ilustrativo mostrado anteriormente [teniendo en el ejemplo anterior (m) + (n) subunidades], se convierte a continuación en un haluro, preferiblemente un bromuro. La conversión de un alcohol en un haluro de alquilo se puede efectuar directamente, o a través de un intermedio tal como un sulfonato o haloformiato. Las condiciones y

reactivos adecuados para efectuar esta transformación se encuentran, por ejemplo, en Larock, R., "Comprehensive Organic Transformations", VCH, 1994, páginas 353-363.

Un método preferido es el establecido en el Ejemplo 11. La adición gradual del haluro de oligo(óxido de etileno) a un oligo(óxido de etileno) se repite a continuación como se ha descrito anteriormente, para formar un oligo(óxido de etileno) que tiene monómeros (m) + 2(n), etcétera. De esta manera, se añaden después subunidades de oligo(óxido de etileno) discretas de forma controlada, de forma gradual al producto de óxido de etileno oligomérico (unimolecular) monomérico existente, para asegurar la preparación de un oligómero bien definido que tiene un número exacto de subunidades.

Son asequibles comúnmente los oligoetilenglicoles unimoleculares que tienen aproximadamente 1-3 subunidades monoméricas (Sigma-Aldrich). El uso de un reaccionante de etilenglicol oligomérico sustituido con halo representa una mejora sobre los métodos existentes, p. ej., empleando el mesilato, ya que el enfoque proporcionado en la presente memoria da como resultado rendimientos mejorados, tiempos de reacción más cortos y condiciones de reacción más suaves debido a la mayor reactividad del haluro, y en particular, el reactivo de oligoetilenglicol sustituido con bromo. Los oligómeros preparados de este modo se purifican típicamente antes de su uso adicional, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes métodos: cromatografía tal como HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en columna, precipitación, o recristalización. La pureza se confirmó a continuación por medio cualquiera de diversas técnicas analíticas, tales como RMN, GPC, y FTIR. Los productos formados de este modo son susceptibles a continuación de uso adicional.

El conector o la conexión pueden ser un solo átomo, tal como un oxígeno o un azufre, dos átomos, o varios átomos. Un conector es típicamente, pero no necesariamente lineal en la naturaleza. El enlace, "X" (en la fórmula O-X-D), es hidrolíticamente estable, y es preferiblemente también enzimáticamente estable. Preferiblemente, la conexión "X" es una que tiene una longitud de cadena de menos de aproximadamente 12 átomos, y preferiblemente menos de aproximadamente 10 átomos, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 8 átomos o incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 5 átomos, con lo cual por longitud se entiende el número de átomos en una sola cadena, sin contar los sustituyentes. Por ejemplo, se considera que una conexión urea tal como ésta, $R_{\text{oligómero}}\text{-NH-(C=O)-NH-R}^{\text{fármaco}}$, tiene una longitud de cadena de 3 átomos (-NH-C(O)-NH-). En realizaciones seleccionadas, la conexión no comprende grupos espaciadores adicionales. Se prefieren conexiones pequeñas y se prestan a la naturaleza de la presente invención, ya que pequeñas conexiones tales como estas son menos propensas a dominar o eclipsar el efecto de una adición de una o un pequeño número de subunidades monoméricas sobre la diferencia en las propiedades de transporte de los productos conjugados de la invención.

En algunos casos, el conector "X" es hidrolíticamente estable y comprende un éter, amida, uretano, amina, tioéter, urea, o un enlace carbono-carbono. Los grupos funcionales tales como los discutidos a continuación, e ilustrados en los ejemplos de trabajo, se utilizan típicamente para la formación de las conexiones. La conexión puede comprender también menos preferiblemente (o ser adyacente a o estar flanqueada por) grupos espaciadores, como se describe más adelante. Los espaciadores son muy útiles en los casos en los que la bioactividad del producto conjugado se reduce significativamente debido a la situación del oligómero en el fármaco original.

Más específicamente, en realizaciones seleccionadas, un conector L, puede ser cualquiera de los siguientes: -O- , -NH- , -S- , -C(O)- , C(O)-NH , NH-C(O)-NH , OC(O)-NH , -C(S)- , $\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-O-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-O-}$, $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$, $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$, $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$, $\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-}$, $\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-}$, $\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-}$, $\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-OC(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-OC(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, un grupo cicloalquilo bivalente, $\text{-N(R}^6\text{)-}$, R^6 es H o un radical orgánico seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

Sin embargo, una serie de átomos no se considera como un enlace cuando la serie de átomos está inmediatamente adyacente a un segmento de oligómero, y la serie de átomos es sin embargo otro monómero de tal manera que el enlace propuesto representaría una mera extensión de la cadena de oligómero.

La conexión "X" entre el oligómero y la molécula pequeña se forma típicamente por reacción de un grupo funcional en un extremo del oligómero con un grupo funcional correspondiente en el fármaco de molécula pequeña. Las reacciones ilustrativas se describen brevemente a continuación. Por ejemplo, un grupo amino en un oligómero, "O",

se puede hacer reaccionar con un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico activado en la molécula pequeña, o viceversa, para producir una conexión amida. Alternativamente, la reacción de una amina en un oligómero con un carbonato activado (por ejemplo carbonato de succinimidilo o de benzotriazol) en el fármaco, o viceversa, forma una conexión carbamato. La reacción de una amina en un oligómero con un isocianato ($\text{RN}=\text{C}=\text{O}$) en un fármaco, o viceversa, forma una conexión urea ($\text{R}-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}'$). Adicionalmente, la reacción de un grupo alcohol (alcóxido) en un oligómero con un haluro de alquilo, o grupo haluro dentro de un fármaco, o viceversa, forma una conexión éter. En otro enfoque de acoplamiento más, una molécula pequeña que tiene una función aldehído se acoplado a un grupo amino oligomérico por medio de aminación reductora, lo que da como resultado la formación de una conexión amina secundaria entre el oligómero y la molécula pequeña.

Un oligómero particularmente preferido es un oligómero que porta un grupo funcional aldehído. En este sentido, el oligómero tendrá la siguiente estructura: $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-(\text{CH}_2)_p-\text{C}(\text{O})\text{H}$, en donde (n) es uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 y (p) es uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Los valores de (n) preferidos incluyen 3, 5 y 7 y los valores de (p) preferidos 2, 3 y 4. Además, el átomo de carbono alfa del radical $\text{C}(\text{O})\text{H}$ puede estar sustituido opcionalmente con alquilo. El reactivo oligomérico se proporciona preferiblemente en forma de una composición monodispersa.

Típicamente, el extremo del oligómero que no porta un grupo funcional se protege terminalmente para que sea no reactivo. Cuando el oligómero incluye un grupo funcional adicional en un extremo distinto del pretendido para la formación de un producto conjugado, ese grupo se selecciona de manera que o bien no sea reactivo en las condiciones de formación del enlace de "X", o bien esté protegido durante el formación de la conexión "X".

Como se indicó anteriormente, el oligómero incluye un grupo funcional para formar un producto conjugado de molécula pequeña que tiene las propiedades descritas en la presente memoria. El grupo funcional comprende típicamente un grupo electrófilo o nucleófilo para la unión covalente a una molécula pequeña, dependiendo del grupo reactivo contenido dentro de o introducido en la molécula pequeña. Los ejemplos de los grupos nucleófilos que pueden estar presentes o en el oligómero o en la molécula pequeña incluyen hidroxilo, amina, hidrazina ($-\text{NHNH}_2$), hidrazida ($-\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2$), y tiol. Los nucleófilos preferidos incluyen amina, hidrazina, hidrazida, tiol y, en particular amina. La mayoría de los fármacos de molécula pequeña para la unión covalente a un oligómero poseerán un grupo hidroxilo, amino, tio, aldehído, cetona, o carboxilo libre.

Los ejemplos de los grupos funcionales electrófilos que pueden estar presentes o en el oligómero o en la molécula pequeña incluyen ácido carboxílico, éster carboxílico, particularmente ésteres de imida, ortoéster, carbonato, isocianato, isotiocianato, aldehído, cetona, tiona, alquenoilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona, maleimida, disulfuro, yodo, epoxi, sulfonato, tiosulfonato, silano, alcoxisilano, y halosilano. Los ejemplos más específicos de estos grupos incluyen éster o carbonato de succinimidilo, éster o carbonato de imidazolilo, éster o carbonato de benzotriazol, vinilsulfona, cloroetilsulfona, vinilpiridina, disulfuro de piridilo, yodoacetamida, glioxal, diona, mesilato, tosilato, y tresilato (2,2,2-trifluoroetanosulfonato).

También se incluyen los análogos de azufre de varios de estos grupos, tales como tiona, hidrato de tiona, tiocetal, etc., así como hidratos o derivados protegidos de cualquiera de los radicales anteriores (p. ej., hidrato de aldehído, hemiacetal, acetal, hidrato de cetona, hemicetal, cetal, tiocetal, tioacetal). Otro reactivo de conjugación útil es 2-tiazolidinotona.

Como se señaló anteriormente, un "derivado activado" de un ácido carboxílico se refiere a un derivado de ácido carboxílico que reacciona fácilmente con nucleófilos, generalmente mucho más fácilmente que el ácido carboxílico derivatizado. Ácidos carboxílicos activados incluyen, por ejemplo, haluros de ácido (tales como cloruros de ácido), anhídridos, carbonatos, y ésteres. Tales ésteres incluyen ésteres de imida, de la forma general $-(\text{CO})\text{ON}[(\text{CO})-]_2$; por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) o ésteres de N-hidroxitfalimidilo. También son preferidos los ésteres de imidazolilo y los ésteres de benzotriazol. Son particularmente preferidos son los ésteres de ácido propiónico o de ácido butanoico activados, como se describe en la Patente de los Estados Unidos del mismo propietario Núm. 5.672.662. Estos incluyen grupos de forma $-(\text{CH}_2)_{2-3}\text{C}(=\text{O})\text{OQ}$, donde Q se selecciona preferiblemente a partir de N-succinimida, N-sulfosuccinimida, N-ftalimida, N-glutarimida, N-tetrahidroftalimida, N-norborneno-2,3-dicarboximida, benzotriazol, 7-azabenzotriazol, e imidazol.

Otros grupos electrófilos preferidos incluyen carbonato de succinimidilo, maleimida, carbonato de benzotriazol, éter de glicidilo, carbonato de imidazolilo, carbonato de p-nitrofenilo, acrilato, tresilato, aldehído, y disulfuro de ortopiridilo. Estos grupos electrófilos están sujetos a reacción con nucleófilos, p. ej., grupos hidroxilo, tio, o amino, para producir diversos tipos de enlaces. Se prefieren las reacciones que favorecen la formación de una conexión hidrolíticamente estable. Por ejemplo, los ácidos carboxílicos y derivados activados de los mismos, que incluyen ortoésteres, ésteres de succinimidilo, ésteres de imidazolilo y ésteres de benzotriazol, reaccionan con los tipos anteriores de nucleófilos para formar ésteres, tioésteres, y amidas, respectivamente, de los cuales las amidas son las más estables hidrolíticamente. Como se mencionó anteriormente, los más preferidos son los productos conjugados que tienen una conexión hidrolíticamente estable entre el oligómero y el fármaco. Los carbonatos, incluyendo carbonatos de succinimidilo, imidazolilo, y benzotriazol, reaccionan con grupos amino para formar carbamatos. Los isocianatos ($\text{R}-$

N=C=O) reaccionan con los grupos hidroxilo o amino para formar, respectivamente, conexiones carbamato (RNH-C(O)-OR') o urea (RNH-C(O)-NHR¹). Los aldehídos, las cetonas, los glioxales, las dionas y sus hidratos o aductos de alcohol (es decir, hidrato de aldehído, hemiacetal, acetal, hidrato de cetona, hemicetal, y cetal) se hacen reaccionar preferiblemente con la amina, seguido de la reducción de la imina resultante, si se desea, para proporcionar un conexión amina (aminación reductora).

Algunos de los grupos funcionales electrófilos incluyen dobles enlaces electrófilos a los que se pueden añadir grupos nucleófilos, tales como tioles, para formar, por ejemplo, enlaces tioéter. Estos grupos incluyen maleimidias, vinilsulfonas, vinilpiridina, acrilatos, metacrilatos, y acrilamidas. Otros grupos comprenden los grupos eliminables que pueden ser desplazados por un nucleófilo, que incluyen cloroetilsulfona, disulfuros de piridilo (que incluyen un enlace S-S escindible), yodoacetamida, mesilato, tosilato, tiosulfonato y tresilato. Los epóxidos reaccionan por apertura de anillo con un nucleófilo, para formar, por ejemplo, un enlace éter o amina. Las reacciones que implican grupos reactivos complementarios tales como los indicados anteriormente en el oligómero y la molécula pequeña se utilizan para preparar los productos conjugados.

Por ejemplo, la preparación de un producto conjugado oligomérico de ácido retinoico ilustrativo se describe en detalle en el Ejemplo 1. Brevemente, la molécula pequeña, ácido retinoico, que contiene un grupo carboxilo reactivo, está acoplado a un etilenglicol oligomérico activado con amino, para proporcionar un producto conjugado que tiene un grupo amida que conecta covalentemente la molécula pequeña al oligómero. Se describe el anclaje covalente de cada uno de un oligómero de PEG de 3 unidades (que significa un polímero de etilenglicol que tiene 3 subunidades monoméricas de etilenglicol), un polímero de PEG de 7 unidades, y un polímero de PEG de 11 unidades al ácido retinoico.

Adicionalmente, la preparación de un oligómero-producto conjugado de naloxona se describe en el Ejemplo 4. En esta síntesis representativa, después de la protección de un grupo hidroxilo aromático, un grupo ceto en la naloxona se reduce al hidroxilo correspondiente, que se acopla a continuación a un haluro de etilenglicol oligomérico para dar como resultado un producto conjugado de molécula pequeña conectado a éter (-O-). Curiosamente, en este ejemplo, la reducción del grupo hidroxilo en la naloxona dio como resultado la formación de dos estereoisómeros que diferían en la orientación del grupo hidroxilo. Los productos conjugados oligoméricos correspondientes se prepararon y separaron, y se mostró que tenían características algo diferentes, que se discutirán con mayor detalle a continuación. Esto representa otra característica de la invención, es decir, la preparación/aislamiento de los isómeros individuales de los productos conjugados de oligómero-molécula pequeña, y usos de los mismos.

Los conjugados de la invención presentan una velocidad de paso a través de una barrera biológica reducida como se ha descrito anteriormente. Por otra parte, los productos conjugados mantienen al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, o más de la bioactividad del fármaco de molécula pequeña de origen no modificado. Para un fármaco de molécula pequeña dado que tiene más de un sitio reactivo adecuado para la modificación, puede ser necesario llevar a cabo el modelado molecular, o el análisis de la actividad biológica *in vivo* o *in vitro* para evaluar la actividad biológica del producto conjugado resultante y determinar el sitio más adecuado para el anclaje covalente de un oligómero. Véanse, por ejemplo los datos de bioactividad ilustrativos en la Tabla VI para diversos productos conjugados de oligómeros de naloxona y naloxona derivatizada, 6-NH₂-Naloxona y 6-OH-naloxol. En esta investigación, las variables incluyeron el sitio de modificación química en el fármaco de origen, el tipo de conexión covalente, la estereoquímica, y el tamaño del oligómero anclado covalentemente al radical de fármaco. Como se puede observar a partir de los datos, las bioactividades de los productos conjugados oscilaron de aproximadamente 5% a aproximadamente 35% de la bioactividad del fármaco original.

Se ha descubierto que el anclaje covalente estable de oligómeros solubles en agua pequeños a fármacos de molécula pequeña biodisponibles por ruta oral es eficaz para alterar significativamente las propiedades de estas moléculas, haciéndolas así más clínicamente eficaces. Más específicamente, la unión covalente de los oligómeros monodispersos tales como oligo(óxido de etileno) es eficaz para reducir, o en algunos casos, eliminar, el transporte de un fármaco a través de la barrera hematoencefálica, que a continuación se traduce en una reducción significativa en los efectos secundarios relacionados con el sistema nervioso central. La selección de un oligómero dimensionado de manera óptima se lleva a cabo típicamente como sigue.

En primer lugar, se conjuga un oligómero obtenido a partir de un oligómero soluble en agua monodisperso o bimodal a un fármaco de molécula pequeña. Preferiblemente, el fármaco es biodisponible por ruta oral, y por sí mismo, presenta una velocidad de paso a través de la membrana biológica. A continuación, se determina la capacidad del producto conjugado para atravesar la membrana biológica utilizando un modelo apropiado y se compara con la del fármaco de origen no modificado. Si los resultados son favorables, es decir, si, por ejemplo, la velocidad de paso se reduce significativamente, se evalúa adicionalmente la bioactividad del producto conjugado. Un producto conjugado beneficioso de acuerdo con la invención es bioactivo, puesto que el enlace es hidrolíticamente estable y no da como resultado la liberación del fármaco no modificado tras la administración. Por lo tanto, el fármaco en forma de producto conjugado debe ser bioactivo, y preferiblemente, mantiene un grado significativo de bioactividad con

relación al fármaco de origen, es decir, más de aproximadamente 30% de la bioactividad del fármaco de origen, o incluso más preferiblemente, más de aproximadamente 50% de la bioactividad del fármaco de origen.

5 A continuación, las etapas anteriores se repiten utilizando oligómeros del mismo tipo de monómero pero que tienen un número diferente de subunidades.

Debido a que el tracto gastro-intestinal ("TGI") limita el transporte de alimentos y fármacos desde el lumen digestivo a la sangre y a la linfa, el TGI representa otra barrera para la cual se debe someter a ensayo el producto conjugado. La barrera TGI, sin embargo, representa una barrera que no debe bloquear los productos conjugados cuando el producto conjugado se destina a la administración oral para la liberación sistémica. La barrera TGI consiste en capas continuas de células intestinales conectadas por uniones estrechas en los epitelios intestinales.

15 Para cada producto conjugado cuya capacidad para cruzar una membrana biológica se reduce en comparación con el fármaco de molécula pequeña no conjugado, se evalúa a continuación su biodisponibilidad oral. En base a estos resultados, es decir, en base a la adición secuencial de un número creciente de monómeros discretos a una pequeña molécula dada en una posición o localización dada dentro de la molécula pequeña, es posible determinar el tamaño del oligómero más eficaz para proporcionar un producto conjugado que tiene un equilibrio óptimo entre la reducción en el paso a través de la membrana biológica, biodisponibilidad oral, y bioactividad. El pequeño tamaño de los oligómeros hace factibles tales pruebas de detección, y permite adaptar eficazmente las propiedades del producto conjugado resultante. Al realizar pequeños cambios incrementales en el tamaño del oligómero, y utilizar un enfoque de diseño experimental, se puede identificar eficazmente un producto conjugado que tiene un equilibrio favorable de la reducción en la velocidad de paso a través de la membrana biológica, la bioactividad, y la biodisponibilidad oral. En algunos casos, el anclaje de un oligómero tal como el descrito en la presente memoria es eficaz para aumentar realmente la biodisponibilidad oral del fármaco.

25 Por ejemplo, un experto normal en la técnica, utilizando experimentación de rutina, puede determinar un tamaño molecular y conexión más adecuados para mejorar la biodisponibilidad oral preparando en primer lugar una serie de oligómeros con diferentes pesos y grupos funcionales y a continuación obtener los perfiles de aclaramiento necesarios mediante la administración los productos conjugados a un paciente y tomando muestras de sangre y/o de orina periódicas. Una vez que se han obtenido una serie de perfiles de aclaramiento para cada producto conjugado sometido a ensayo, se puede identificar un producto conjugado adecuado.

35 También se pueden utilizar modelos animales (roedores y perros) para estudiar el transporte de fármacos por la ruta oral. Además, los métodos no *in vivo* incluyen tejido extirpado de intestino evertido de roedor y modelos de cultivo de tejido en monocapa de células Caco-2. Estos modelos son útiles para pronosticar la biodisponibilidad oral del fármaco.

40 La presente invención también incluye preparaciones farmacéuticas que comprenden un producto conjugado proporcionado en la presente memoria combinado con un excipiente farmacéutico. Generalmente, el propio producto conjugado estará en una forma sólida (p. ej., un producto precipitado), que se puede combinar con un excipiente farmacéutico adecuado que puede estar en forma sólida o líquida.

45 Los excipientes ilustrativos incluyen los seleccionados del grupo que consiste en carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases, y combinaciones de los mismos.

50 Como excipiente, puede estar presente un hidrato de carbono tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar. Los excipientes de carbohidratos específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol, y similares.

55 El excipiente también puede incluir una sal inorgánica o tampón tal como ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico de sodio, y combinaciones de los mismos.

60 La preparación también puede incluir un agente antimicrobiano para prevenir o desincentivar el crecimiento microbiano. Los ejemplos de los agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de benetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercurio, timerosal, y combinaciones de los mismos.

También puede estar presente en la preparación un antioxidante. Los antioxidantes se utilizan para prevenir la oxidación, evitando de este modo el deterioro del producto conjugado u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para uso en la presente invención incluyen, p. ej., palmitato de ascorbilo, hidroxianisol

butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio, y combinaciones de los mismos.

5 Como excipiente puede estar presente un agente tensioactivo. Los tensioactivos ilustrativos incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80", y Pluronicos tales como F68 y F88 (ambos de los cuales están disponibles de BASF, Mount Olive, Nueva Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, cinc y otros cationes adecuados.

10 Los ácidos o bases pueden estar presentes en forma de un excipiente en la preparación. Los ejemplos de los ácidos que se pueden utilizar incluyen aquellos ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, sulfúrico ácido, ácido fumárico, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de las bases adecuadas incluyen bases seleccionadas del grupo que consiste de hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio, y combinaciones de los mismos.

20 La cantidad del producto conjugado en la composición variará dependiendo de diversos factores, pero óptimamente será una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacena en un recipiente de dosis unitaria. Una dosis terapéuticamente eficaz se puede determinar experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades crecientes del producto conjugado para determinar qué cantidad produce un criterio de valoración clínicamente deseado.

25 La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la actividad del excipiente y de las necesidades concretas de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de experimentación rutinaria, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan de bajas a altas), examinando la estabilidad y otros parámetros, y a continuación determinando el intervalo en el que se alcanza un rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos.

30 Generalmente, sin embargo, el excipiente estará presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso, preferiblemente de aproximadamente 5% a 98% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 15 a 95% en peso del excipiente, siendo las concentraciones más preferidas de menos de 30% en peso.

40 Estos excipientes farmacéuticos anteriores junto con otros excipientes se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19^a ed, Williams & Williams, (1995), "Physician's Desk Reference", 52^a ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), y Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3^a Edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar cualquier número de formas. Las preparaciones ilustrativas están lo más preferiblemente en una forma adecuada para administración oral tal como un comprimido, comprimido oblongo, cápsula, cápsula de gel, trocisco, dispersión, suspensión, solución, elixir, jarabe, gragea, parche transdérmico, aerosol, supositorio, y polvo,

50 Se prefieren las formas de dosificación orales para aquellos productos conjugados que son activos por ruta oral, y se incluyen comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas, cápsulas de gel, suspensiones, soluciones, elixires, y jarabes, y también pueden comprender una pluralidad de gránulos, cuentas, polvos o bolitas que están opcionalmente encapsulados. Tales formas de dosificación se preparan utilizando métodos convencionales conocidos por aquellos en el campo de la formulación farmacéutica y descritos en los textos pertinentes.

55 Los comprimidos y comprimidos oblongos, por ejemplo, se pueden fabricar utilizando procedimientos y equipos de procesamiento de comprimidos convencionales. Se prefieren las técnicas de compresión y granulación directa en la preparación de comprimidos o comprimidos oblongos que contienen los productos conjugados descritos en la presente memoria. Además del producto conjugado, los comprimidos y cápsulas contendrán generalmente materiales portadores inactivos, farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes, lubricantes, disgregantes, cargas, estabilizadores, agentes tensioactivos, agentes colorantes, y similares. Los aglutinantes se utilizan para conferir cualidades cohesivas a un comprimido, y por lo tanto asegurar que el comprimido permanece intacto. Los materiales aglutinantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidón (incluyendo almidón de maíz y almidón pregelatinizado), gelatina, azúcares (incluyendo sacarosa, glucosa, dextrosa y lactosa), polietilenglicol, ceras, y gomas naturales y sintéticas, p. ej., acacia, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, polímeros celulósicos (incluyendo hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, y similares), y goma Vee. Los lubricantes se utilizan para facilitar la fabricación de comprimidos,

- 5 promoviendo el flujo de polvo y previniendo el taponado de las partículas (es decir, rotura de partículas) cuando se alivia la presión. Los lubricantes útiles son estearato de magnesio, estearato de calcio, y ácido esteárico. Los disgregantes se utilizan para facilitar la disgregación del comprimido, y son generalmente almidones, arcillas, celulosas, alginas, gomas o polímeros entrecruzados. Las cargas incluyen, p. ej., materiales tales como dióxido de silicio, dióxido de titanio, alúmina, talco, caolín, celulosa en polvo, y celulosa microcristalina, así como materiales solubles tales como manitol, urea, sacarosa, lactosa, dextrosa, cloruro de sodio, y sorbitol. Los estabilizadores, como es bien conocido en la técnica, se utilizan para inhibir o retardar las reacciones de descomposición de fármacos que incluyen, a modo de ejemplo, reacciones oxidativas.
- 10 Las cápsulas también formas de dosificación oral preferidas, en cuyo caso la composición que contiene el producto conjugado se puede encapsular en forma de un líquido o gel (p. ej., en el caso de una cápsula de gel) o sólida (incluyendo partículas tales como gránulos, cuentas, polvos o bolitas). Las cápsulas adecuadas incluyen cápsulas duras y blandas, y por lo general están elaboradas de gelatina, almidón, o un material celulósico. Las cápsulas de gelatina dura de dos piezas están preferiblemente selladas, por ejemplo con bandas de gelatina o similares.
- 15 Se incluyen formulaciones parenterales en forma sustancialmente seca (típicamente en forma de un producto liofilizado o precipitado, que puede estar en forma de polvo o torta), así como formulaciones preparadas para su inyección, que son típicamente líquidas y requieren la etapa de reconstituir la forma seca de formulación parenteral. Los ejemplos de los diluyentes adecuados para la reconstitución de composiciones sólidas antes de su inyección
- 20 incluyen agua bacteriostática para inyectables, dextrosa al 5% en agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada, y combinaciones de los mismos.
- 25 En algunos casos, las composiciones destinadas a la administración parenteral pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones o emulsiones no acuosas, siendo cada una típicamente estéril. Los ejemplos de los disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo.
- 30 Las formulaciones parenterales descritas en la presente memoria también pueden contener coadyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes, y dispersantes. Las formulaciones se vuelven estériles mediante la incorporación de un agente esterilizante, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, irradiación, o calor.
- 35 El producto conjugado también se puede administrar a través de la piel utilizando un parche transdérmico convencional u otro sistema de liberación transdérmica, en donde el producto conjugado está contenido dentro de una estructura laminada que sirve como un dispositivo de liberación de fármaco que se fija a la piel. En una estructura de este tipo, el producto conjugado está contenida en una capa, o "reservorio", subyacente a una capa de soporte superior. La estructura laminada puede contener un reservorio único, o puede contener múltiples reservorios.
- 40 La invención también proporciona un método para administrar un producto conjugado como se proporciona en la presente memoria a un paciente que sufre una afección que es sensible al tratamiento con el producto conjugado. El método comprende administrar, generalmente de forma oral, una cantidad terapéuticamente eficaz del producto conjugado (proporcionado preferiblemente como parte de una preparación farmacéutica). También se contemplan otros modos de administración, tales como pulmonar, nasal, bucal, rectal, sublingual, transdérmica, y parenteral.
- 45 según se utiliza en la presente memoria, el término "parenteral" incluye inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intracardíaca, intratecal, e intramuscular.
- 50 En los casos en los que se utiliza la administración parenteral, puede ser necesario emplear oligómeros algo más grandes que los descritas anteriormente, con pesos moleculares que oscilan de aproximadamente 500 a 30K daltons (p. ej., que tienen pesos moleculares de aproximadamente 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 5000, 7500, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000 o incluso más).
- 55 El método de administración se puede utilizar para tratar cualquier afección que pueda remediarse o evitarse mediante la administración del producto conjugado concreto. Los expertos normales en la técnica aprecian que afecciones se pueden tratar con eficacia con un producto conjugado específico. La dosis real que se va a administrar variará dependiendo de la edad, el peso y estado general del sujeto, así como la gravedad de la afección a tratar, el criterio del profesional de la salud, y el producto conjugado que se administra. Las cantidades terapéuticamente eficaces son conocidas por los expertos en la técnica y/o se describen en los textos de referencia y la bibliografía pertinentes. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará de aproximadamente 0,001 mg a 100 mg,
- 60 preferiblemente en dosis de 0,01 mg/día a 75 mg/día, y más preferiblemente en dosis de 0,10 mg/día a 50 mg/día.
- La dosificación unitaria de cualquier producto conjugado dado (de nuevo, proporcionado preferiblemente como parte de una preparación farmacéutica) puede administrarse en una variedad de programas de dosificación dependiendo del criterio del médico, las necesidades del paciente, etcétera. El esquema de dosificación específico será conocido

por los expertos normales en la técnica o se puede determinar experimentalmente utilizando métodos rutinarios. Los esquemas de dosificación ilustrativos incluyen, sin limitación, la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se ha alcanzado el criterio de valoración clínico, se detiene la dosificación de la composición.

Una de las ventajas de la administración de los productos conjugados de la presente invención es que se puede lograr una reducción en el metabolismo de primer paso con respecto al fármaco original. Véanse, p. ej., los resultados de apoyo en el Ejemplo 8. Tal resultado es ventajoso para muchos medicamentos administrados por ruta oral que se metabolizan sustancialmente mediante el paso a través del intestino. De este modo, el aclaramiento del producto conjugado se puede modular seleccionando el tamaño molecular del oligómero, la conexión, y la posición de anclaje covalente que proporciona las propiedades de aclaramiento deseadas. Un experto normal en la técnica puede determinar el tamaño molecular ideal del oligómero basándose en las enseñanzas de la presente memoria. Las reducciones preferidas en el metabolismo de primer paso para un producto conjugado en comparación con la molécula de fármaco pequeña no conjugada correspondiente incluyen: al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%; al menos aproximadamente 40%; al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80% y al menos aproximadamente 90%.

Por lo tanto, se describe un método para reducir el metabolismo de un agente activo. El método comprende las etapas de: proporcionar productos conjugados monodispersos, cada producto conjugado compuesto por un radical derivado de un fármaco de molécula pequeña unido covalentemente por un enlace estable a un oligómero soluble en agua, en donde dicho producto conjugado presenta una tasa metabólica reducida en comparación con la tasa metabólica del fármaco de molécula pequeña no anclado al oligómero a soluble en agua, y administrar el producto conjugado a un paciente. Típicamente, la administración se lleva a cabo a través de un tipo de administración seleccionado del grupo que consiste en administración oral, administración transdérmica, administración bucal, administración transmucosal, administración vaginal, administración rectal, administración parenteral, y la administración pulmonar.

Aunque es útil en la reducción de muchos tipos de metabolismo (incluyendo tanto el metabolismo de Fase I y de Fase II), los productos conjugados son particularmente útiles cuando el fármaco de molécula pequeña es metabolizado por una enzima hepática (p. ej., una o más de las isoformas del citocromo P450) y/o por una o más enzimas intestinales.

Sección experimental

Todos los reactivos químicos a los que se hace referencia en los ejemplos adjuntos son asequibles comercialmente a menos que se indique lo contrario. La preparación de polímeros de PEG de varias unidades unimoleculares ilustrativos se describe en el Ejemplo 9. Todos los metiléteres de oligo(etilenglicol) empleados en los ejemplos de más abajo fueron monodispersos y cromatográficamente puros, según se determinó mediante cromatografía de fase inversa.

Todos los datos de RMN H^1 (resonancia magnética nuclear) fueron generados por medio de un espectrómetro de RMN a 300 MHz fabricado por Bruker. A continuación se presenta una lista de ciertos compuestos, así como la fuente de los compuestos.

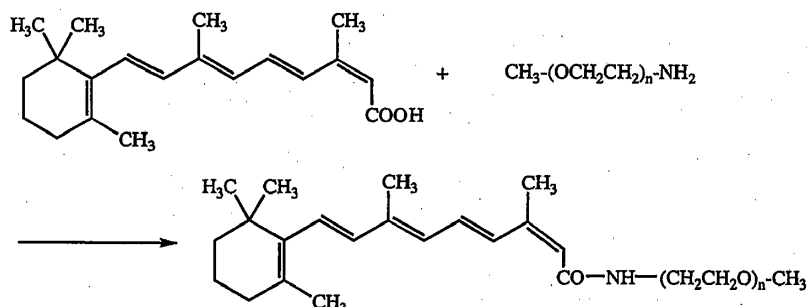
2-bromoetil metil éter, 92%, Aldrich;
 1-bromo-2-(2-metoxietoxi)etano, 90%, Aldrich;
 $CH_3(OCH_2CH_2)_3Br$ se preparó a partir $CH_3(OCH_2CH_2)_3OH$;
 Tri(etilenglicol) monometil éter, 95%, Aldrich;
 Di(etilenglicol), 99%, Aldrich;
 Tri(etilenglicol), 99%, Aldrich;
 Tetra(etilenglicol), 99%, Aldrich;
 Penta(etilenglicol), 98%, Aldrich;
 Hexa(etilenglicol), 97%, Aldrich;
 Hidruro de sodio, polvo seco 95%, Aldrich;
 Cloruro de metanosulfonilo, 99%, de ACE;
 Bromuro de tetrabutilamonio, Sigma

En los ejemplos siguientes, solo los ejemplos 4-10 se refieren a la presente invención.

Ejemplo 1

Síntesis de $CH_3(OCH_2CH_2)_3-NH-13-cis-retinamida$ (PEG₃-13-cis-RA)

Se preparó PEG₃-13-cis-RA. La visión general de la síntesis se proporciona a continuación.



- 5 Se disolvieron 0,1085 gramos de $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ (0,6656 moles), 0,044 gramos de 1-hidroxibenciltriazol ("HOBT", 0,3328 mmoles), y 0,200 g de ácido 13-cis-retinoico ("13-cis-RA", 0,6656 mmoles) en 10 mL de benceno. A esta solución se le añadieron 0,192 gramos de 1,3-diciclohexilcarbodiimida ("DCC", 0,9318 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria. El producto bruto se secó adicionalmente a vacío, se disolvió en 20 mL de diclorometano, y la fase orgánica se lavó dos veces con 15 mL de agua desionizada. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria. Al producto recuperado se le añadieron 2 gotas de diclorometano que contenían 50 ppm de hidroxitolueno butilado y el producto se secó a vacío. Rendimiento 0,335 g. RMN H^1 (DMSO): δ 1,02 (singlete, 2 CH_3), 1,67 (singlete, CH_3), 3,5 (multiplete ancho, PEG), 6,20 (m, 3H).

15 Ejemplo 2

Síntesis de $\text{CH}_3\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_7\text{-NH-13-cis-retinamida}$ (PEG₇-13-cis-RA)

- 20 Se disolvieron 0,2257 gramos de $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_7\text{-NH}_2$ (0,6656 mmoles), 0,044 gramos de 1-hidroxibenciltriazol (0,3328 mmoles), y 0,200 gramos de ácido 13-cis-retinoico (0,6656 mmoles) en 10 mL de benceno. A esta solución se le añadieron 0,192 g de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (0,9318 mmoles) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante la noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria, y el producto se secó a vacío. El producto se disolvió en 20 mL de diclorometano y la solución se lavó dos veces con 15 mL de agua desionizada. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria. Al producto recuperado se le añadieron 2 gotas de diclorometano que contenía 50 ppm de hidroxitolueno butilado, y el producto se secó a vacío. Rendimiento 0,426 g. RMN H^1 (DMSO): δ 1,01 (s, 2 CH_3), 1,68 (s, CH_3), 3,5 (m ancho, PEG), 6,20 (m, 3H).

- 30 Se preparó $\text{CH}_3\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_5\text{-NH-13-cis-retinamida}$ ("PEG₅-13-cis-RA") de forma similar utilizando este procedimiento excepto que se utilizó $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_5\text{-NH}_2$ ("MPEG₅-NH₂") en lugar de $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_7\text{-NH}_2$.

Ejemplo 3

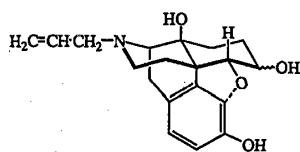
Síntesis de $\text{CH}_3\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_{11}\text{-NH-13-cis-retinamida}$ (PEG₁₁-13-cis-RA)

- 35 Se disolvieron 0,349 gramos de $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{11}\text{-NH}_2$ (0,6789 mmoles), 0,044 gramos de 1-hidroxibenciltriazol (0,3328 mmoles), y 0,204 gramos de ácido 13-cis-retinoico (0,6789 mmoles) en 10 mL de benceno. A esta solución se le añadieron 0,192 g de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (0,9318 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación mediante evaporación rotatoria. El producto se secó a vacío y se disolvió en 20 mL de diclorometano. La solución se lavó dos veces con 15 mL de agua desionizada y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . La solución se filtró y el disolvente se separó por destilación mediante evaporación rotatoria. Al producto recuperado se le añadieron 2 gotas de diclorometano que contenía 50 ppm de hidroxitolueno butilado, y el producto se secó a vacío. Rendimiento 0,541 g. RMN H^1 (DMSO): δ 1,01 (s, 2 CH_3), 1,68 (s, CH_3), 3,5 (m ancho, PEG), 6,20 (m, 3H).

45 Ejemplo 4

Síntesis de PEG₃-3-naloxol

- 50 La estructura del naloxol, un fármaco de molécula pequeña ilustrativo, se muestra a continuación.



Naloxol

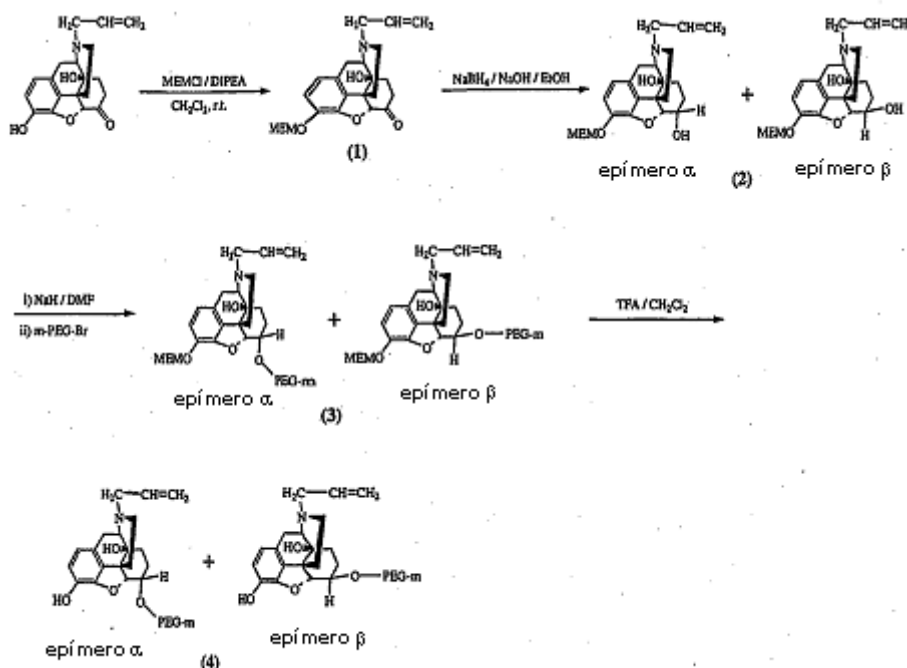
Se preparó esta molécula (que tiene un grupo hidroxilo protegido) como parte de un esquema sintético más grande tal como se describe en el Ejemplo 5.

5

Ejemplo 5

Síntesis de α,β -6-CH₃-(OCH₂CH₂)₁-Naloxol (α,β -PEG₁-Nal)

10 Se preparó α,β -PEG₁-Naloxol. La visión general de la síntesis se proporciona a continuación.



5.A. Síntesis de 3-MEM-naloxona

15 Se añadió diisopropiletilamina (390 mg, 3,0 mmoles) a una solución de naloxona HCl · 2H₂O (200 mg, 0,50 mmoles) en CH₂Cl₂ (10 ml) con agitación. Después se añadió cloruro de metoxietilo ("MEMCl", 250 mg, 2,0 mmoles) gota a gota a la solución anterior. La solución se agitó a la temperatura ambiente en N₂ durante la noche.

20 El producto en bruto se analizó por HPLC, que indicó que la 3-MEM-O-naloxona (1) se había formado con un rendimiento del 97%. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria para producir un aceite pegajoso.

5.B. Síntesis de una mezcla de epímeros α y β de 3-MEM-naloxol (2)

25 Se añadieron 3 mL de NaOH 0,2 N a una solución de 3-MEM-naloxona (1) (obtenida a partir del apartado 5.A anterior, y utilizada sin purificación adicional) en 5 mL de etanol. A esto se le añadió una solución de NaBH₄ (76 mg, 2,0 mmoles) en agua (1 ml) gota a gota. La solución resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 5 horas. El etanol se eliminó por medio de evaporación rotatoria seguido de la adición de una solución de HCl 0,1 N para destruir el exceso de NaBH₄ y ajustar el pH a un valor de 1. La solución se lavó con CHCl₃ para eliminar el exceso de cloruro de metoxietilo y sus derivados (3 × 50 ml), seguido de la adición de K₂CO₃ para elevar el pH de la solución a 8,0. Después, el producto se extrajo con CHCl₃ (3 × 50 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó por evaporación para dar un sólido pegajoso incoloro (192 mg, 0,46 mmoles, rendimiento aislado 92% basado en naloxona · HCl · 2H₂O).

30

La HPLC indicó que el producto era una mezcla de epímeros α y β de 3-MEM-naloxol (2).

5.C. Síntesis de una mezcla de epímeros α y β de 6-CH₃-OCH₂CH₂-O-3-MEM-naloxol (3a).

5 Se añadió NaH (60% en aceite mineral, 55 mg, 1,38 mmoles) a una solución de 6-hidroxil-3-MEM-naloxol (2) (192 mg, 0,46 mmoles) en dimetilformamida ("DMF", 6 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en N₂ durante 15 minutos, seguido de la adición de 2-bromoetil metil éter (320 mg, 2,30 mmoles) en DMF (1 ml). Después, la solución se agitó a temperatura ambiente en N₂ durante 3 horas.

10 El análisis por HPLC reveló la formación de una mezcla de 6-CH₃-OCH₂CH₂-O-3-MEM-naloxol (3) α y β con un rendimiento de aproximadamente 88%. La DMF se eliminó por una evaporación giratoria para producir un sólido de color blanco pegajoso. El producto se usó para la transformación posterior sin purificación adicional.

5.D. Síntesis de una mezcla de epímeros α y β de 6-CH₃-OCH₂CH₂-Naloxol (4)

15 Se disolvió 6-CH₃-OCH₂CH₂-O-3-MEM-naloxol (3) α y β bruto en 5 mL de CH₂Cl₂ para formar una solución turbia, a la que se añadieron 5 mL de ácido trifluoroacético ("TFA"). La solución resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 4 horas. Se determinó que la reacción se había completado basándose en un análisis de HPLC. El CH₂Cl₂ se eliminó mediante un evaporador rotatorio, seguido de la adición de 10 mL de agua. A esta solución se le añadió suficiente K₂CO₃ para destruir el exceso de TFA y para ajustar el pH a 8. Después, la solución se extrajo con CHCl₃ (3 x 50 ml), y los extractos se combinaron y se extrajeron adicionalmente con una solución de HCl 0,1 N (3 x 50 ml). El pH de la fase acuosa recuperada se ajustó a un pH de 8 mediante la adición de K₂CO₃, seguido de una extracción adicional con CHCl₃ (3 x 50 ml). La capa orgánica combinada se secó a continuación con Na₂SO₄. Los disolventes se eliminaron para dar un sólido pegajoso incoloro.

25 El sólido se purificó haciéndolo pasar dos veces a través de una columna de gel de sílice (2 cm x 30 cm) utilizando CHCl₃/CH₃OH (30:1) como eluyente para producir un sólido pegajoso. Se determinó por medio de RMN-H¹ que el producto purificado era una mezcla de epímeros α y β de 6-CH₃-OCH₂CH₂-Naloxol (4) que contenía aprox. 30% de epímero α y aprox. 70% de epímero β [100 mg, 0,26 mmoles, rendimiento aislado 56% basado en 6-hidroxilo-3-MEM-naloxol (2)].

30 RMN H¹ (δ , ppm, CDCl₃): 6,50-6,73 (2H, multiplete, protón aromático de naloxol), 5,78 (1H, multiplete, protón olefínico de naloxona), 5,17 (2 H, multiplete, protones olefínicos de naloxol), 4,73 (1 H, doblete, protones C₅ de naloxol α), 4,57 (1 H, doblete, protones C₅ de naloxol β), 3,91 (1H, multiplete, protones C₆ de naloxol α), 3,51-3,75 (4 H, multiplete, PEG), 3,39 (3 H, singlete, protones metoxi de PEG, epímero α), 3,36 (3 H, singlete, protones metoxi de PEG, epímero β), 3,23 (1 H, multiplete, protones C₆ de naloxol β), 1,46-3,22 (14 H, multiplete, protones de naloxol).

Ejemplo 6Síntesis de 6-CH₃-(OCH₂CH₂)₃-Naloxol (α , β -PEG₃-Nal)

40 6.A. Síntesis de una mezcla α y β de epímeros de 6-CH₃-(OCH₂CH₂)₃-O-3-MEM-naloxol

45 Se añadió NaH (60% en aceite mineral, 38 mg, 0,94 mmoles) a una solución de 3-MEM-naloxol [98 mg, 0,24 mmoles, del Ejemplo 5 y mostrado como (2) en el esquema del mismo] en dimetilformamida ("DMF", 8 ml). La solución se agitó a la temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂ durante 15 minutos, a la que se añadió una solución de CH₃-(OCH₂CH₂)₃Br (320 mg, 1,41 mmoles) en DMF (1 ml). A continuación, la solución resultante se calentó en N₂ en un baño de aceite durante 2 horas.

50 El análisis por HPLC reveló que el producto deseado, una mezcla de 6-CH₃-(OCH₂CH₂)₃-O-3-MEM-naloxol α y β se formó con un rendimiento de aproximadamente 95%. La DMF se eliminó por medio de un evaporador giratorio para producir un sólido de color blanco pegajoso. El producto bruto se usó sin purificación adicional.

6.B. Síntesis de una mezcla α y β de epímeros de 6-CH₃-(OCH₂CH₂)₃-O-naloxol (α , β -PEG₃-Nal)

55 La mezcla de 6-CH₃-(OCH₂CH₂)₃-O-3-MEM-naloxol α y β bruta del apartado 6.A. anterior se disolvió en 3 mL de CH₂Cl₂ para formar una solución turbia, a la que se añadieron 4 mL de ácido trifluoroacético ("TFA"). La solución resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 4 horas. El análisis por medio de HPLC demostró que la reacción se había completado. El disolvente, CH₂Cl₂, se eliminó por medio de un evaporador rotatorio. A la solución restante se le añadieron 5 mL de agua, seguido de la adición de K₂CO₃ para destruir el exceso de TFA y ajustar el pH a 8. Después, la solución se extrajo con CHCl₃ (3 x 50 ml). Los extractos de CHCl₃ se combinaron y se extrajeron con una solución de HCl 0,1 N (3 x 50 ml). La fase acuosa restante se ajustó de nuevo a pH 8 mediante la adición de K₂CO₃. Seguido de extracción con CHCl₃ (3 x 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron a continuación sobre Na₂SO₄. Después de la eliminación de los disolventes, se obtuvo un sólido pegajoso incoloro.

60

El sólido se purificó haciéndolo pasar a través de una columna de gel de sílice (2 cm x 30 cm) dos veces utilizando $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (30:1) como eluyente. El producto purificado, una mezcla de los epímeros α y β de 6- CH_3 -(OCH_2CH_2) $_3$ -O-naloxol que contenía cantidades iguales de los epímeros α y β , se caracterizó por medio de RMN. (46 mg, 0,097 mmoles, 41 % rendimiento aislado basado en 6-hidroxil-3-MEM-O-naloxona). RMN ^1H (δ , ppm, CDCl_3): 6,49-6,72 (2 H, multiplete, protón aromático de naloxol), 5,79 (1 H, multiplete, protón olefínico de naloxol), 5,17 (2 H, multiplete, protones olefínicos de naloxol), 4,71 (1 H, doblete, protón C_5 de α naloxol), 4,52 (1 H, doblete, protón C_5 de β naloxol), 3,89 (1 H, multiplete, protón C_6 de α naloxol), 3,56-3,80 (12 H, multiplete, PEG), 3,39 (3 H, singlete, protones metoxi de PEG, epímero α), 3,38 (3 H, singlete, protones metoxi de PEG, epímero β), 3,22 (1 H, multiplete, protón C_6 de β naloxol), 1,14-3,12 (14 H, multiplete, protones de naloxol).

6.C. Separación de α -6- CH_3 -(OCH_2CH_2) $_3$ -O-naloxol y β -6- CH_3 -(OCH_2CH_2) $_3$ -O-naloxol

Se disolvieron aproximadamente 80 mg de una mezcla bruta de epímeros α y β de PEG $_3$ -Nal en un mínimo de CHCl_3 y se cargaron en una columna de gel de sílice (2 cm x 30 cm) preparada utilizando CHCl_3 . La columna se hizo eluir cuidadosamente con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (60:1). La primera especie en eluir fue α -PEG $_3$ -Nal puro (26 mg, rendimiento aislado 33%), seguida de β -PEG $_3$ -Nal pura (30 mg, rendimiento aislado 38%). Ambos compuestos eran sólidos pegajosos incoloros. α -PEG $_3$ -Nal, RMN- ^1H (δ , ppm, CDCl_3): 6,49-6,73 (2 H, dos dobletes, protón aromático de naloxol), 5,79 (1 H, multiplete, protón olefínico de naloxol), 5,17 (2 H, triplete, protones olefínicos de naloxol), 4,71 (1 H, doblete, protón C_5 de naloxol), 3,81 (1 H, multiplete, protón C_6 de naloxol), 3,57-3,80 (12 H, multiplete, PEG), 3,40 (3 H, singlete, protones metoxi de PEG), 1,13-3,12 (14 H, multiplete, protones de naloxona). β -PEG $_3$ -Nal, RMN ^1H (δ , ppm, CDCl_3): 6,54-6,72 (2 H, dos dobletes, protón aromático de naloxol), 5,77 (1 H, multiplete, protón olefínico de naloxol), 5,15 (2 H, triplete, protones olefínicos de naloxol), 4,51 (1 H, doblete, protón C_5 de naloxol), 3,58-3,78 (12 H, multiplete, PEG), 3,39 (3 H, singlete, protones metoxi de PEG), 3,20 (1 H, multiplete, protón C_6 de naloxol), 1,30-3,12 (13 H, multiplete, protones de naloxol).

De un modo similar se prepararon α,β -6- CH_3 -(OCH_2CH_2) $_5$ -O-naloxol (" α,β -PEG $_5$ -Nal") y α,β -6- CH_3 -(OCH_2CH_2) $_7$ -O-naloxol (" α,β -PEG $_7$ -Nal"), y sus isómeros individuales se separaron y aislaron.

Ejemplo 7

Biodisponibilidad oral de polímero de PEG de varias unidades de ácido cis-retinoico y naloxol

Se obtuvieron ratas Sprague Dawley® hembra (150-200 g) de Harlan Labs. Se canularon en la vena yugular externa y se permitió que se aclimataran durante al menos 72 horas antes del inicio del estudio. Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche (día -1), pero se les proporcionó agua ad libitum.

En la mañana de la administración de la dosis (día 0), cada rata se pesó y las cánulas se lavaron con heparina (1000 U/mL). Con la ayuda de un tubo de alimentación, se administraron a los animales oralmente (alimentación forzada) dosis con formulaciones acuosas que contenían el fármaco PEGilado o libre. La dosis se determinó basándose en mg/kg de peso corporal. El volumen total de la dosis no excedió de 10 mL/kg. A intervalos de tiempo específicos (1, 2 y 4 horas), las muestras de sangre (aproximadamente 1,0 mL) se retiraron a través de la cánula, se colocaron en tubos de centrifuga de 1,5 mL que contenían 14 μL de heparina, se mezclaron y se centrifugaron para separar el plasma. Las muestras de plasma se congelaron ($< -70^\circ\text{C}$) hasta su análisis. Las muestras de plasma se purificaron mediante una técnica de precipitación y el analito se extrajo y se analizó utilizando un método de cromatografía líquida de alta resolución (LC) con un detector selectivo de masa (MSD). Las muestras de patrón se prepararon de la misma manera para crear una curva patrón, a partir de la cual se pudo extrapolar la concentración de muestras desconocidas (véanse los resultados de la Tabla II). Cuando fue apropiado, se utilizó un patrón interno en el análisis.

Las propiedades seleccionadas de los compuestos sometidos a ensayo (tales como el peso molecular y la solubilidad) se resumen en la Tabla I. La actividad de unión a la enzima *in-vitro* de algunos de los compuestos sometidos a ensayo también es referida como valor de CI_{50} en la Tabla 1.

Tabla 1

| Propiedades seleccionadas de los compuestos sometidos a ensayo | | | |
|--|----------------|-------------------------------|------------------------|
| Fármaco | Peso molecular | Solubilidad (μM) | CI_{50} (nM)* |
| Ácido 13-cis-retinoico (fármaco de origen) | 300,45 | 0,47 | - |
| PEG $_3$ -13-cis-RA | 445,64 | 3,13 | - |
| PEG $_5$ -13-cis-RA | 549,45 | Soluble | - |
| PEG $_7$ -13-cis-RA | 621,45 | 58,3 | - |
| PEG $_{11}$ -13-cis-RA | 797,45 | Soluble | - |

| Propiedades seleccionadas de los compuestos sometidos a ensayo | | | |
|--|----------------|--------------------------------|------------------------|
| Fármaco | Peso molecular | Solubilidad (μM) | Cl ₅₀ (nM)* |
| Naloxona "Nal" (fármaco de origen) | 327,37 | soluble en forma de sal de HCl | 6,8 |
| Isómero α de PEG ₃ -Nal | 475,6 | Soluble | 7,3 |
| Isómero β de PEG ₃ -Nal | 475,6 | Soluble | 31,7 |
| Isómero α de PEG ₅ -Nal | 563,0 | Soluble | 31,5 |
| Isómero β de PEG ₅ -Nal | 563,0 | Soluble | 43,3 |
| Isómero α de PEG ₇ -Nal | 652,0 | Soluble | 40,6 |
| Isómero β de PEG ₇ -Nal | 652,0 | Soluble | 93,9 |
| Isómero α de PEG ₉ -Nal | 740,0 | Soluble | 64,4 |
| Isómero β de PEG ₉ -Nal | 740,0 | Soluble | 205,0 |
| Hidroxicina "Hyd" (fármaco de origen) | 374,91 | soluble en forma de sal de HCl | 48,8 |
| PEG ₁ -Hyd | 433,0 | Soluble | 70,3 |
| PEG ₃ -Hyd | 521,0 | Soluble | 105,0 |
| PEG ₅ -Hyd | 609,0 | Soluble | 76,7 |
| Cetirizina "Cet" (fármaco de origen) | 388,89 | soluble en forma de sal de HCl | 77,1 |
| PEG ₁ -Cet | 446,0 | Soluble | 61,0 |
| PEG ₃ -Cet | 534,0 | Soluble | 86,4 |
| PEG ₅ -Cet | 622,0 | Soluble | 128,0 |

* Actividad de unión a opioides Mu para la serie de compuestos de naloxona
Actividad de unión a Histamina H-1 para las series de compuestos de hidroxicina y cetiricina

Se calcularon las biodisponibilidades orales de la serie de compuestos del ácido retinoico y los resultados se proporcionan en la Tabla II. Todos los datos se normalizaron a una dosis de 6 mg/kg. En la Fig. 1 se proporcionan los perfiles de concentración en plasma frente al tiempo para estos compuestos.

5

Tabla II

| Biodisponibilidades orales de la serie de compuestos del ácido retinoico | | | |
|--|--|-------------------|-----------|
| Fármaco | Concentración media en plasma (ng/mL) \pm DT | | N (ratas) |
| | 1 hr | 2 hr | |
| Ácido 13-cis-retinoico | 43,3 \pm 24,0 | 23,3 \pm 14,8 | 3 |
| PEG ₃ -13-cis-RA | 131,8 \pm 55,0 | 158,0 \pm 133,0 | 7 |
| PEG ₅ -13-cis-RA | 77,7 \pm 31,6 | 61,6 \pm 57,1 | 4 |
| PEG ₇ -13-cis-RA | 44,0 \pm 13,0 | 38,7 \pm 4,2 | 3 |
| PEG ₁₁ -13-cis-RA | 21,8 \pm 7,1 | 58,2 \pm 43,5 | 4 |

Se calculó la biodisponibilidad oral de cada isómero en la serie de compuestos de naloxona y se proporciona en la Tabla III. La dosis de naloxona oral fue de 5 o 10 mg/kg y las dosis para los compuestos PEGilados se normalizaron a una dosis de 1 mg/kg. En la FIG. 2 se proporcionan los perfiles de concentración en plasma frente al tiempo para estos compuestos.

10

Tabla III

| Biodisponibilidades orales de la serie de compuestos de Naloxona | | | |
|--|--|-------------------|-----------|
| Fármaco | Concentración media en plasma (ng/mL) \pm DT | | N (ratas) |
| | 1 hr | 2 hr | |
| Naloxona | 3,67 \pm 1,05 | 3,11 \pm 0,46 | 4 |
| α -PEG ₃ -Nal | 37,28 \pm 4,99 | 14,92 \pm 5,27 | 5 |
| β -PEG ₃ -Nal | 53,79 \pm 5,19 | 22,47 \pm 8,78 | 5 |
| α -PEG ₅ -Nal | 27,37 \pm 10,82 | 15,38 \pm 6,65 | 6 |
| β -PEG ₅ -Nal | 69,34 \pm 15,03 | 36,92 \pm 15,84 | 5 |
| α -PEG ₇ -Nal | 40,08 \pm 16,61 | 39,51 \pm 9,57 | 4 |
| β -PEG ₇ -Nal | 50,41 \pm 36,44 | 50,08 \pm 25,28 | 4 |

5 Los resultados anteriores demuestran que la PEGilación de compuestos lipófilos, pequeños como el ácido retinoico y la naloxona (la forma de base libre) incrementa su solubilidad y biodisponibilidad oral. Por otra parte, el anclaje de los PEG oligoméricos también incrementa el peso molecular del compuesto parental (mayor de aproximadamente 500 Daltons), que a su vez puede restringir la penetración oral de los compuestos altamente solubles en agua, concretamente con una longitud creciente del polímero de PEG de varias unidades, como se observa por ejemplo con PEG₇-13-cis-RA y PEG₁₁-13-cis-RA.

10 Ejemplo 8

Transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE) de polímeros de PEG de varias unidades de ácido cis-retinoico y naloxona

15 Según se utiliza para estos experimentos, la técnica de perfusión del cerebro *in situ* empleó el cerebro intacto de rata para (i) determinar la penetración de fármaco a través de la BHE en condiciones fisiológicas normales, y (ii) para estudiar los mecanismos de transporte tales como la difusión pasiva frente al transporte mediado por portadores.

20 La perfusión se llevó a cabo utilizando el método del único momento. En resumen, el fluido de perfusión (perfusato) que contenía los uno o varios compuestos de ensayo se infundió en las ratas a través de la arteria carótida externa izquierda a una velocidad constante por medio de una bomba de infusión (20 mL/min). La velocidad de flujo de la infusión se ajustó para sustituir completamente el flujo de fluido al cerebro a la presión fisiológica normal (80-120 mm Hg). La duración de la perfusión fue de 30 segundos. Inmediatamente después de la perfusión, se perfundió la vasculatura del cerebro durante 30 segundos más con perfusato sin fármaco para eliminar el fármaco residual. La bomba se desconectó y el cerebro se retiró inmediatamente del cráneo. Las muestras de la parte izquierda del cerebro de cada rata se pesaron primero y a continuación se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Polytron. Se añadieron cuatro (4) mL de metanol del 20% a cada cerebro de rata para la homogeneización. Después de la homogeneización, se midió el volumen total de producto homogeneizado y se registró.

30 Se diluyó una cantidad medida del producto homogeneizado con disolvente orgánico y a continuación se centrifugó. El sobrenadante se separó, se evaporó en una corriente de nitrógeno y se reconstituyó y se analizó mediante LC/MS/MS. La cuantificación de las concentraciones de fármaco en el producto homogeneizado de cerebro se llevó a cabo frente a curvas de calibración generadas añadiendo los fármacos en el producto homogeneizado de cerebro blanco (esto es, libre de fármaco). El análisis de las concentraciones de fármaco en los productos homogeneizados de cerebro se llevó a cabo por triplicado, y los valores se utilizaron para calcular la tasa de absorción por el cerebro en pmoles por gramo de cerebro de rata por segundo de perfusión.

40 Cada solución de perfusión contenía atenolol (concentración diana, 50 μ M), antipirina (concentración diana, 5 μ M) y un compuesto de ensayo (ácido 13-cis-retinoico, ácido PEG_n-13-cis-retinoico, naloxona o PEG_n-Nal) a una concentración diana de 20 μ M.

45 La absorción en la BHE de cada compuesto sometido a ensayo se calculó, se normalizó, y se registró en la Tabla IV. Todos los datos se normalizaron a una solución de dosificación 5 μ M a una velocidad de perfusión de 20 mL/min durante 30 seg.

Tabla IV

| Absorción en la barrera hematoencefálica (BHE) para los compuestos sometidos a ensayo | | |
|---|--|-----------|
| Fármaco | Tasa de absorción normalizada en cerebro en pmoles/gm de cerebro/seg (Media \pm DT) | N (ratas) |
| Atenolol (patrón bajo) | 0,7 \pm 0,9 | 4 |
| Antipirina (patrón elevado) | 17,4 \pm 5,7 | 4 |
| Ácido 13-cis-retinoico | 102,54 \pm 37,31 | 4 |
| PEG ₃ -13-cis-RA | 79,65 \pm 20,91 | 4 |
| PEG ₅ -13-cis-RA | 58,49 \pm 13,44 | 3 |
| PEG ₇ -13-cis-RA | 24,15 \pm 1,49 | 3 |
| PEG ₁₁ -13-cis-RA | 17,77 \pm 1,68 | 3 |
| Naloxona | 15,64 \pm 3,54 | 3 |
| PEG ₃ -Nal | 4,67 \pm 3,57 | 3 |
| PEG ₅ -Nal | 0,96 \pm 0,36 | 3 |
| PEG ₇ -Nal (isómero α) | 0,94 \pm 0,32 | 3 |
| PEG ₇ -Nal (isómero β) | 0,70 \pm 0,19 | 3 |
| Hidroxicina | 355,89 \pm 59,02 | 3 |
| PEG ₅ -Hid | 131,60 \pm 15,84 | 3 |
| PEG ₇ -Hid | 12,01 \pm 2,97 | 3 |
| Cetirizina | 1,37 \pm 0,37 | 3 |
| PEG ₅ -Cet | 4,32 \pm 0,26 | 3 |
| PEG ₇ -Cet | 1,13 \pm 0,05 | 3 |

Los resultados anteriores demuestran que la PEGilación de un compuesto lipófilo tal como el ácido 13-cis-retinoico puede reducir significativamente su tasa de absorción en el cerebro ("BUR"), p. ej., por un factor de cuatro en el caso del PEG₇-13-cis-RA, y por un factor de cinco en el caso del PEG₁₁-13-cis-RA en comparación con el compuesto de origen "ácido 13-cis-retinoico". En el caso de la naloxona, se observó una reducción de BUR de 16 veces para PEG₅-Nal y PEG₇-Nal. Con respecto a la hidroxizina, la BUR se redujo cerca de 29 veces cuando se administró en forma de PEG₇-Hid. El transporte mínimo relativo de la cetirizina través de la barrera hematoencefálica no fue alterado significativamente cuando se administró en forma de PEG₇-Cet.

Por lo tanto, en general, se descubrió sorprendentemente que uniendo pequeños polímeros solubles en agua a fármacos de molécula pequeña como éstos, se puede optimizar el perfil de administración de un fármaco mediante la modificación de su capacidad para atravesar las membranas biológicas, como las membranas asociadas con el tracto gastro-intestinal barrera, la barrera hematoencefálica, la barrera de la placenta, y similares. Más importante, se descubrió que, en el caso de fármacos administrados por ruta oral, la unión de uno o más pequeños polímeros solubles en agua es eficaz para reducir significativamente la tasa de transporte de tales drogas a través de una barrera biológica, tal como la barrera hematoencefálica. Idealmente, el transporte de tales fármacos modificados a través del tracto gastro-intestinal no se ve afectado negativamente en un grado significativo, de tal manera que mientras que el transporte a través de la barrera biológica, tal como la barrera hematoencefálica, está obstaculizado de manera significativa, la biodisponibilidad oral del fármaco modificado se mantiene en un nivel clínicamente eficaz.

Los datos generados en los Ejemplos 7 y 8 se representaron gráficamente con el fin de comparar el efecto del tamaño de PEG sobre la biodisponibilidad oral relativa y el transporte a través de la BHE del ácido 13-cis-retinoico y la naloxona, respectivamente. Veánse las Figuras 3-7. En la figura 3, se examina el efecto de fijación de cada uno de un PEG de 3 unidades, un PEG de 5 unidades, un PEG de 7 unidades y un PEG de 11 unidades al ácido 13-cis-retinoico sobre su biodisponibilidad oral. En la figura 4, se examina el efecto de la unión covalente de estos diversos polímeros de PEG sobre el transporte a través de la barrera hematoencefálica del ácido 13-cis-retinoico. En la figura

5, se examina el efecto de la unión covalente de cada uno de los polímeros de PEG de 3 unidades, PEG de 5 unidades y PEG de 7 unidades sobre la biodisponibilidad oral de naloxona. La figura 6 demuestra el efecto de la unión covalente de tales polímeros de PEG sobre el transporte a través de la barrera hematoencefálica de la naloxona. La figura 7 demuestra que los compuestos de PEG_n-Nal tenían una biodisponibilidad oral más alta que la naloxona. Como puede verse a partir de estas figuras, a medida que el tamaño de los oligómeros de PEG aumenta, la tasa de absorción en la BEH disminuye significativamente, mientras que la biodisponibilidad oral aumenta en relación con la de la molécula de origen.

La diferencia en la biodisponibilidad oral entre los isómeros α y β de la naloxona puede ser debida a las diferencias en sus propiedades fisicoquímicas. Un isómero parece ser ligeramente más lipófilo que el otro isómero, y por lo tanto da como resultado una pequeña diferencia en la biodisponibilidad oral.

Ejemplo 9

Metabolismo *in vitro* de PEG-naloxol

Se desarrolló un método *in vitro* para estudiar efecto de la PEGilación sobre el metabolismo de Fase II (glucuronidación) de la naloxona. El procedimiento requiere la preparación de una solución de sistema de regeneración de NADPH (NRS). La solución de NRS se prepara disolviendo bicarbonato de sodio (22,5 mg) en 1 mL de agua desionizada. A esta solución se añadieron sal de sodio de fosfato de dinucleótido de β -nicotinamida y adenina NADP (1,6 mg), glucosa-6-fosfato (7,85 mg), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (3 μ l), sal trisódica de ácido uridin-5-difosfoglucurónico o UDPGA (2,17 mg), sal de litio de adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato o PAPS (0,52 mg), y solución de cloruro de magnesio 1 M (10 μ l). Después de que los sólidos se disolvieran totalmente, la solución se almacenó en un baño con hielo.

Se prepararon soluciones de partida 30 mM de los objetos de ensayo disolviendo cantidades pesadas de naloxona HCl, 6-mPEG₃-O-naloxona, α -6-mPEG₅-O-naloxona, y α -MPEG7-O-naloxona en 1 mL de agua desionizada.

Se sacaron microsomas de rata Sprague Dawley macho (0,5 mL a una concentración de 20 mg/mL; M00001 de In-vitro Technologies, Baltimore, MD) del congelador y se descongelaron en un baño de hielo. Se diluyeron cuarenta μ L de los microsomas de hígado a 100 μ L con 60 μ L de agua desionizada en un vial de prueba. Al vial de ensayo, se le añadieron tampón Tris, pH 7,4 (640 μ L) y una solución de partida del objeto de ensayo (10 μ L) para tener un volumen de 750 μ L.

Cada vial de ensayo y la solución de NRS se colocaron por separado en un baño de agua a 37°C durante 5 minutos. La solución de NRS (250 μ L) se añadió a cada vial de ensayo. El temporizador de reacción se inició en la adición de NRS al primer vial de ensayo. Cada muestra (200 μ L) se recogió y después se añadió ácido perclórico (20 μ L) para terminar la reacción. Las muestras se recogieron en los siguientes momentos: 0-2, 20, 40 y 60 minutos. Todos los viales de ensayo terminados se almacenaron en un baño de hielo.

Se añadió acetonitrilo (100 μ L) a cada vial de ensayo, que después se centrifugó a 3000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante (230 μ L) se retiró y después se analizaron 10 μ L de la solución de ensayo mediante el método LC/MS. La concentración del objeto de ensayo de cada muestra se midió y se registró en cada momento.

La Tabla V muestra el porcentaje de sustancia activa restante después de la incubación con los microsomas hepáticos.

Tabla V

| Porcentaje de sustancia activa restante después de la incubación con microsomas hepáticos | | | | | |
|---|----------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Tiempo (min) | Naloxona | α -PEG ₃ -Nal | β -PEG ₃ -Nal | α -PEG ₅ -Nal | α -PEG ₇ -Nal |
| 0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| 20 | 47,1 | 64,8 | 83,9 | 84,1 | 87,4 |
| 40 | 27,6 | 51,7 | 75,2 | 75,6 | 81,6 |
| 60 | 15,6 | 45,7 | 69,6 | 69,2 | 76,9 |

En vista de los resultados de la Tabla V, es posible concluir que la PEGilación con un oligómero disminuye la tasa de glucuronidación para una molécula pequeña tal como el naloxol. Además, a medida que la medida de la cadena del oligómero de PEG aumenta, la tasa de glucuronidación disminuye. Por añadidura, la comparación de los α -isómeros y β -isómeros de PEG₃-naloxol, muestra que el isómero β es un mal sustrato para las isoenzimas del citocromo P450 en los microsomas de hígado de rata aislados. Esta observación confirma los datos *in-vivo* ilustrados en la FIG. 7.

En cuanto a los datos de las FIG. 8 y 9, parece que la unión de pequeños polímeros de PEG puede ser eficaz en la disminución de la tasa metabólica de los fármacos (como se indica por la formación de glucurónido en el caso de naloxona). Los niveles más altos de isómero β en la sangre cuando se compara con el isómero α son probablemente debidos a una prevención significativa del efecto del primer paso, es decir, una prevención significativa del grado del metabolismo del primer paso (FIG. 7), resultante de la unión covalente de la molécula de PEG oligomérica. La molécula de PEG puede crear un impedimento estérico y/o efectos hidrófilos o hidrófobos, que, cuando el PEG está unido a la forma de isómero β , altera la afinidad del producto conjugado del isómero β a las isoenzimas del citocromo P450 en un grado mayor que cuando el PEG está unido a la forma de isómero α . Los niveles de metabolito de isómero β son más bajos cuando se comparan con el metabolito de isómero α y naloxona no PEGilada.

Ejemplo 10

Actividad de los diversos antagonistas opioides sobre los receptores opioides μ

En una serie separada de experimentos, se determinó la bioactividad de la naloxona, otros antagonistas opioides, y diversos productos conjugados sobre los receptores opioides μ *in vitro*. Los resultados se resumen en la Tabla VI.

Tabla VI

| Actividad de la naloxona y PEG _n -6-naloxol producto conjugados en μ -opioides Receptores <i>in vitro</i> . | | |
|--|----------------|-----------------------|
| Compuesto | Peso molecular | CE ₅₀ (NM) |
| Naloxona | 327.4 | 6,8 |
| 3-PEG ₃ -O-naloxona | 474 | 2910,0 |
| 6-NH ₂ -naloxona | 601 | 29,2 |
| PEG ₅₅₀ -6-NH-naloxona (PEG ₁₃ amida) | 951 | 210,0 |
| α -6-naloxol | 329 | 2,0 |
| β -6-naloxol | 329 | 10,8 |
| α -PEG ₃ -Nal | 475.6 | 7,3 |
| β -PEG ₃ -Nal | 475.6 | 31,7 |
| α -PEG ₅ -Nal | 563 | 31,5 |
| β -PEG ₅ -6-Nal | 563 | 43,3 |
| α -PEG ₇ -6-Nal | 652 | 40,6 |
| β -PEG ₇ -6-Nal | 652 | 93,9 |

En la tabla anterior, para cada compuesto, la bioactividad se proporciona como una medida de la bioactividad relativa de cada uno de los diversos productos conjugados de PEG en comparación con el fármaco parental. La CE₅₀ es la concentración de agonista que provoca una respuesta a mitad de camino entre la línea base y la respuesta máxima en una curva de dosis-respuesta convencional. Como se puede observar a partir de los datos anteriores, cada uno de los productos conjugados PEG_n-Nal es bioactivo, y de hecho, todos los productos conjugados de 6-naloxona o naloxol mantienen un grado de bioactividad de por lo menos 5% o más que la del fármaco parental, con bioactividades que varían de aproximadamente 5% a aproximadamente 35% de la bioactividad del compuesto parental no modificado. En términos de actividad biológica, la PEG₅₅₀-6-NH-naloxona posee aproximadamente 13% de la bioactividad del compuesto parental (6-NH₂-Naloxona), α -PEG₃-Nal posee aproximadamente 30% de la bioactividad del compuesto parental (α -6-OH-naloxol), y β -PEG₃-Nal posee aproximadamente 35% de la bioactividad del compuesto parental (α -6-OH-naloxol).

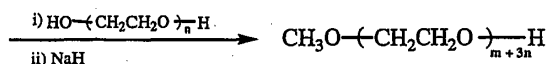
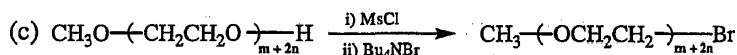
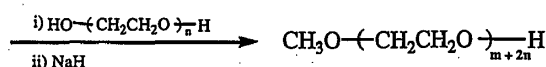
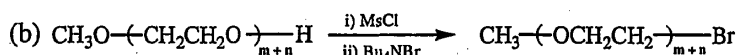
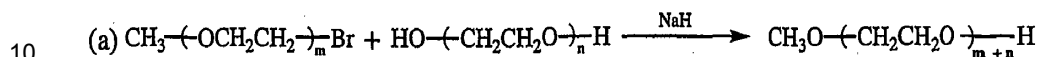
Ejemplo 11

Método para elaborar éteres metílicos de oligo(etilenglicol) de peso sustancialmente unimolecular y sus derivados

Los PEG unimoleculares (monodispersos) de la presente invención se prepararon como se indica en detalle a continuación. Estos PEG unimoleculares fueron particularmente ventajosos al proporcionar los agentes activos modificados de la presente invención, y al conferir la modificación deseada de las propiedades de transporte de barrera de los agentes activos sujeto.

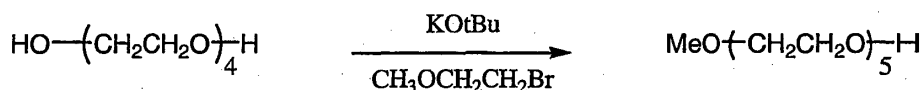
5 El método ilustrado a continuación representa otro aspecto de la presente invención, es decir, un método para la preparación de éteres metílicos de oligo(óxido de etileno) monodispersos a partir de oligo(etilenglicoles) monodispersos de bajo peso molecular utilizando oligo(óxido de etileno) derivatizado con halo (p. ej., derivatizado con bromo). También se proporciona en la presente memoria, en otro aspecto de la invención, un método de acoplamiento de éter metílico de oligo(óxido de etileno) (a partir de una composición de peso unimolecular) a un agente activo utilizando un éter metílico de (óxido de etileno) derivatizado con halo.

Esquemáticamente, la reacción se puede representar de la siguiente manera:



(m = 1, 2, 3; n = 2, 3, 4, 5, 6)

15 10.A. Síntesis de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{H}$ con $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$



25 Se disolvió tetra (etilenglicol) (55 mmoles, 10,7 g) en 100 mL de tetrahidrofurano ("THF") y a esta solución se le añadió KOTBu (55 mL, 1,0 M en THF) a la temperatura ambiente. La solución resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de la adición gota a gota de $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ (55 mmoles, 5,17 mL en 50 mL de THF). La reacción se agitó a la temperatura ambiente durante la noche, seguido de extracción con H_2O (300 mL)/ CH_2Cl_2 (3 x 300 mL). Los extractos orgánicos se combinaron y después se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de separar por filtración el agente de secado sólido y eliminar el disolvente por evaporación, el residuo bruto recuperado se purificó por cromatografía en columna utilizando una columna de gel de sílice (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 60:1 ~ 40:1) para dar monometil éter de penta(etilenglicol) puro (rendimiento 35%). RMN ^1H (CDCl_3) Δ 3,75-3,42 (m, 20 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,39 (s, 3H, MeO).

30 10.B. Síntesis de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7\text{H}$ utilizando $\text{MeOCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$

35 A una solución de hexa(etilenglicol) (10 g, 35 mmoles) y 2-bromoetil metil éter (4,9 g, 35 mmoles) en THF (100 ml) se le añadió lentamente hidruro de sodio (2,55 g, 106 mmoles). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante dos horas. La HPLC indicó que se había formado mPEG₇-OH con un rendimiento de aproximadamente 54%. A continuación, la reacción se detuvo mediante la adición de ácido clorhídrico diluido para destruir el exceso de hidruro de sodio. Todos los disolventes se eliminaron utilizando un evaporador rotatorio para dar un líquido pegajoso de color marrón. Se obtuvo mPEG₇-OH puro en forma de un líquido incoloro (4,9 g, rendimiento aislado 41%) utilizando una HPLC semi-preparativa (20 cm x 4 cm, columna C18, acetonitrilo y agua como fases móviles). RMN- ^1H (CDCl_3): 2,57 ppm (tripleto, 1 H, OH); 3,38 ppm (singleto, 3 H, CH_3O); 3,62 ppm (multiplete, 30 H, OCH_2CH_2).

40 10.C. Síntesis de $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{Br}$

45 Se añadió trietilamina (5,7 ml, 40 mmoles) a $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{OH}$ (5,0 g, 20 mmoles) con agitación. La solución se enfrió en un baño de hielo bajo N_2 , y se añadieron 2,5 mL de cloruro de metanosulfonilo (32 mmoles) gota a gota a lo largo de 30 minutos. La solución se agitó a continuación durante la noche a la temperatura ambiente. Se añadió agua (40 ml) a la mezcla de reacción y la solución se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 150 ml) y la fase orgánica se lavó con

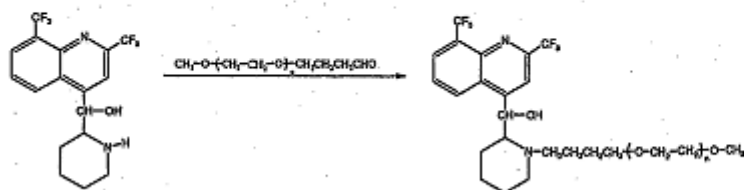
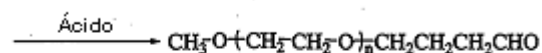
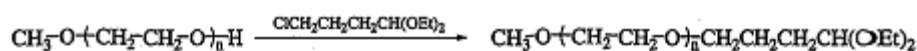
HCl 0,1 N (3 × 80 ml) y agua (2 × 80 ml). Después de secar con Na₂SO₄ y eliminar el disolvente, se obtuvo un líquido de color marrón claro. El producto y el Bu₄NBR (12,80 g, 39,7 mmoles) se disolvieron en CH₃CN (50 ml), y la solución resultante se agitó en N₂ a 50°C durante 15 horas. Después de enfriar a la temperatura ambiente, se eliminó el CH₃CN por evaporación rotatoria para dar un líquido de color rojo, que se disolvió en 150 mL de agua y se extrajo con EtOAc (2 × 200 ml). La fase orgánica se combinó, se lavó con agua, y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la eliminación del disolvente, se obtuvo un líquido de color rojo (4,83 g, 77,4%). RMN-H¹ (300 Hz, CDCl₃): Δ 3,82 (t, 2H), 3,67 (m, 14H), 3,51 (m, 2H), 3,40 (s, 3H).

Ejemplo 11

Síntesis de MPEG3 N-mefloquina

A una solución en metanol (5 ml) de sal HCl de mefloquina (200 mg, 0,48 mmoles) y mPEG₃-butilaldehído (280 mg, 1,20 mmoles) se le añadió una solución acuosa (1 mL) de cianoborohidruro de sodio (60 mg, 0,96 mmoles). La solución resultante se calentó en atmósfera de nitrógeno con agitación en un baño de aceite a 50°C durante 16 horas. La HPLC demostró que la reacción se había completado. Todos los disolventes se eliminaron a continuación por un evaporador rotatorio para dar un producto bruto. Después purificar mediante HPLC preparativa de fase inversa, se obtuvo el producto conjugado de mPEG-3-N-mefloquina puro en forma de un líquido incoloro pegajoso (160 mg, 0,27 mmoles, rendimiento aislado 56%). RMN-H¹ (CDCl₃, ppm): 8,15 (multiplete, 3 H, anillo aromático); 7,73 (tripleto, 1 H, anillo aromático); 5,86 (doblete, 1 H, CH); 3,67 (multiplete, 14 H, cadena principal de PEG); 3,52 (singlete, 3H, PEG--OCH₃); 3,18 (multiplete, 2H, PEG-CH₂); 0,52 a 2,74 (multiplete, 13H, PEG y protones de ciclohexilo).

Esquemáticamente, la reacción se puede representar de la siguiente manera:



REIVINDICACIONES

1. Una composición monodispersa que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en
 5 6-CH₃-(OCH₂CH₂)₅-O-naloxol;
 6-CH₃-(OCH₂CH₂)₆-O-naloxol, y
 6-CH₃-(OCH₂CH₂)₇-O-naloxol;
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto es un isómero α-6, un isómero β-6 o una
 mezcla de isómeros α-6 y β-6.
- 10 2. La composición monodispersa de la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste
 en
 α,β-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₅-O-naloxol;
 α,β-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₆-O-naloxol, y
 α,β-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₇-O-naloxol;
 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. La composición monodispersa de la reivindicación 2, en donde el compuesto es α,β-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₇-O-naloxol
 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 4. La composición monodispersa de la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste
 en
 α-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₅-O-naloxol;
 α-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₆-O-naloxol, y
 α-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₇-O-naloxol;
 25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
5. La composición monodispersa de la reivindicación 4, en donde el compuesto es α-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₇-O-naloxol o
 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 6. La composición monodispersa de la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste
 en
 β-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₅-O-naloxol;
 β-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₆-O-naloxol, y
 β-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₇-O-naloxol;
 35 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
7. La composición monodispersa de la reivindicación 6, en donde el compuesto es β-6-CH₃-(OCH₂CH₂)₇-O-naloxol o
 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 40 8. Una composición farmacéutica que comprende una composición monodispersa de una cualquiera de las
 reivindicaciones 1-7, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Biodisponibilidad oral relativa de 13-cis-RA y PEG_n-13-cis-RA en ratas,
 (±ETM barras, Dosis = 6 mg/kg)

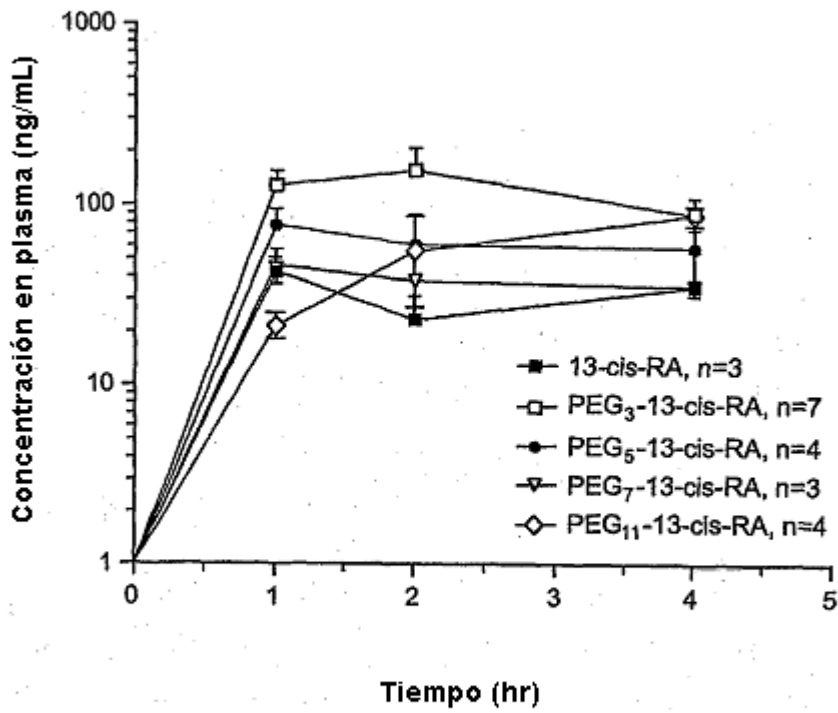


FIG. 1

Biodisponibilidad oral de naloxona e isómeros α y β de PEG-Nal en Ratas
 (n=4, ETM, dosis normalizada a 1 mg/kg)

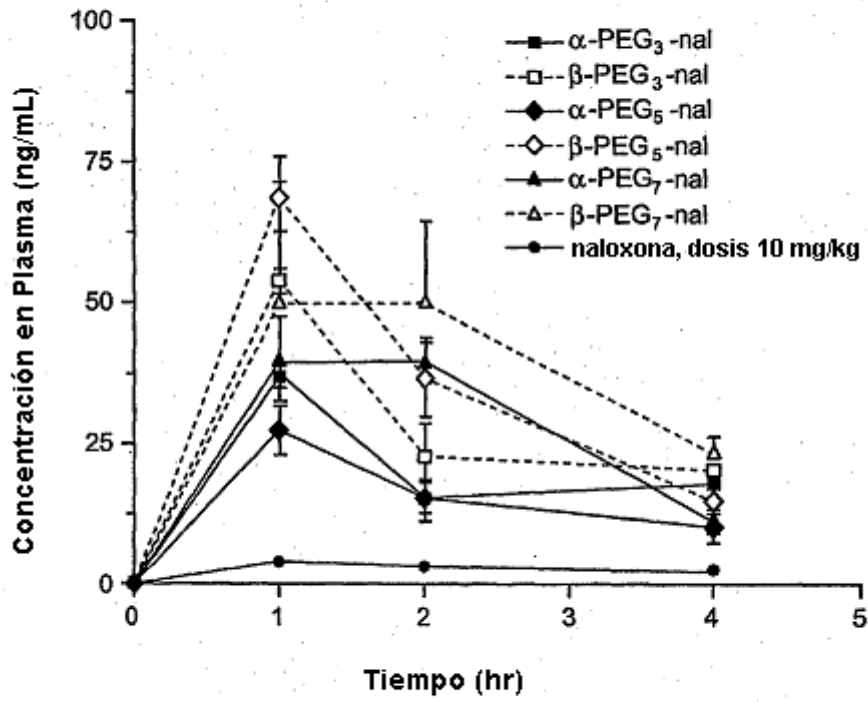
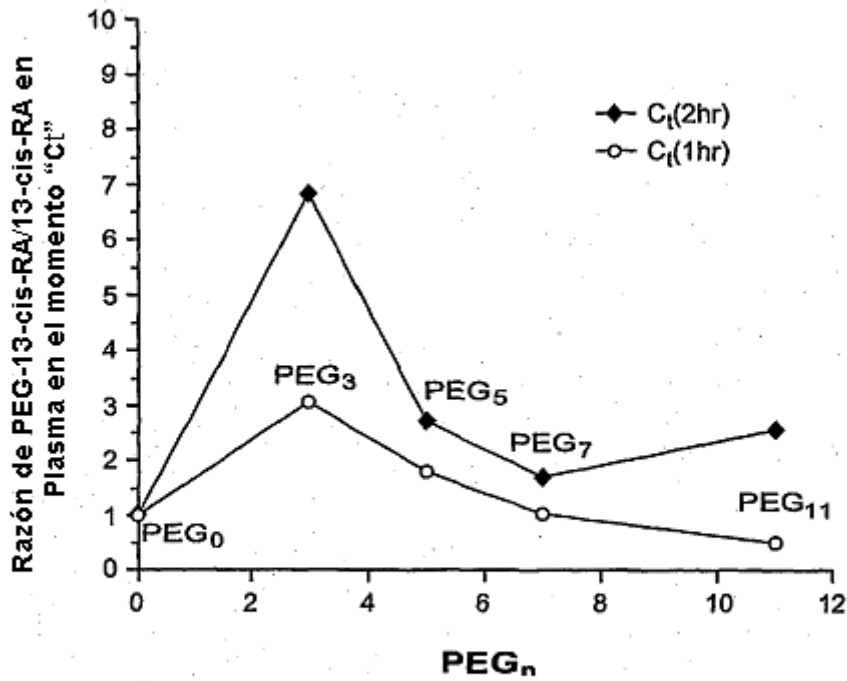


FIG. 2

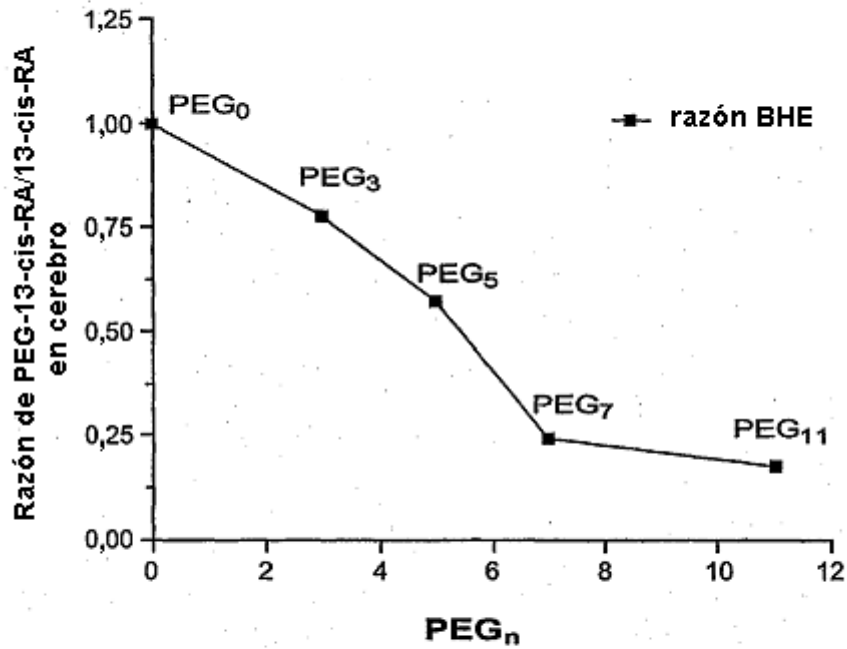
Efecto de la longitud de la cadena de PEG sobre el transporte intestinal de PEG-13-cis-RA y 13-cis-RA en ratas Sprague-Dawley



Nota: Concentración en plasma en ng/mL

FIG. 3

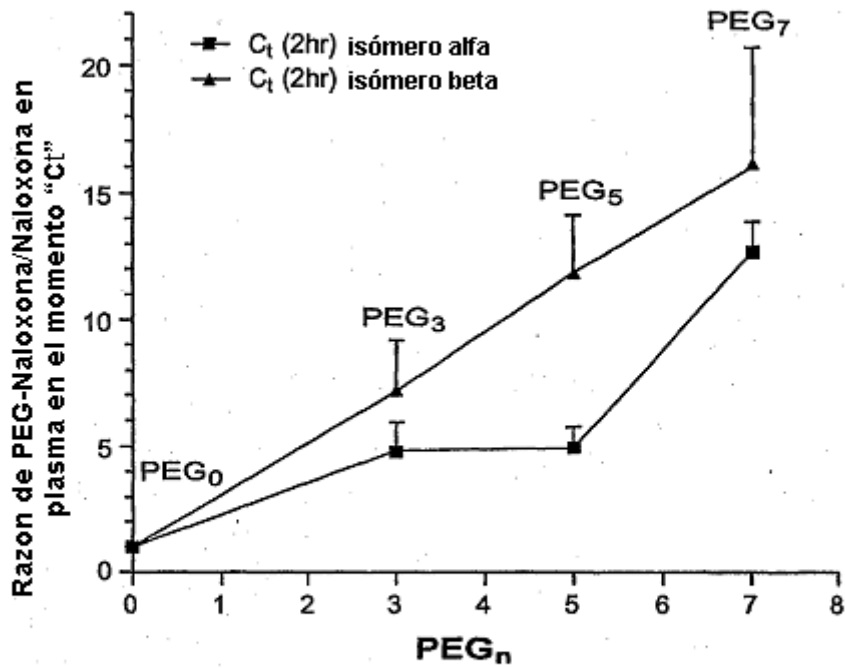
Efecto de la longitud de la cadena de PEG sobre el transporte a través de la BHE de PEG-13-cis-RA y 13-cis-RA en ratas Sprague-Dawley



Nota: Tasa de perfusión a través de la Barrera HematoEncefálica en pmol/gm/seg

FIG. 4

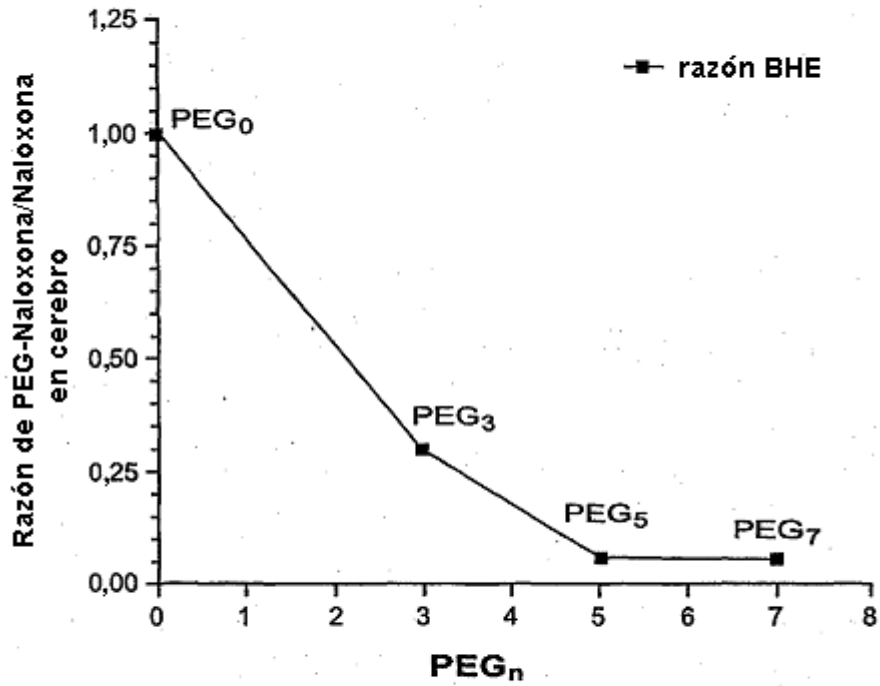
Efecto de la longitud de la cadena de PEG sobre el transporte a través de la BHE de PEG-Nal y Naloxona en ratas Sprague-Dawley



Nota: Concentración en plasma en ng/mL

FIG. 5

Efecto de la longitud de la cadena de PEG sobre el transporte a través de la BHE de PEG-Nal y Naloxona en ratas Sprague-Dawley



Nota: Tasa de perfusión a través de la Barera Hemato-Encefálica en pmol/gm/seg

FIG. 6

Farmacocinética de Naloxona y PEG-Naloxol
 en ratas después de alimentación forzada oral
 (5 mg/kg, n = 3, ETM)

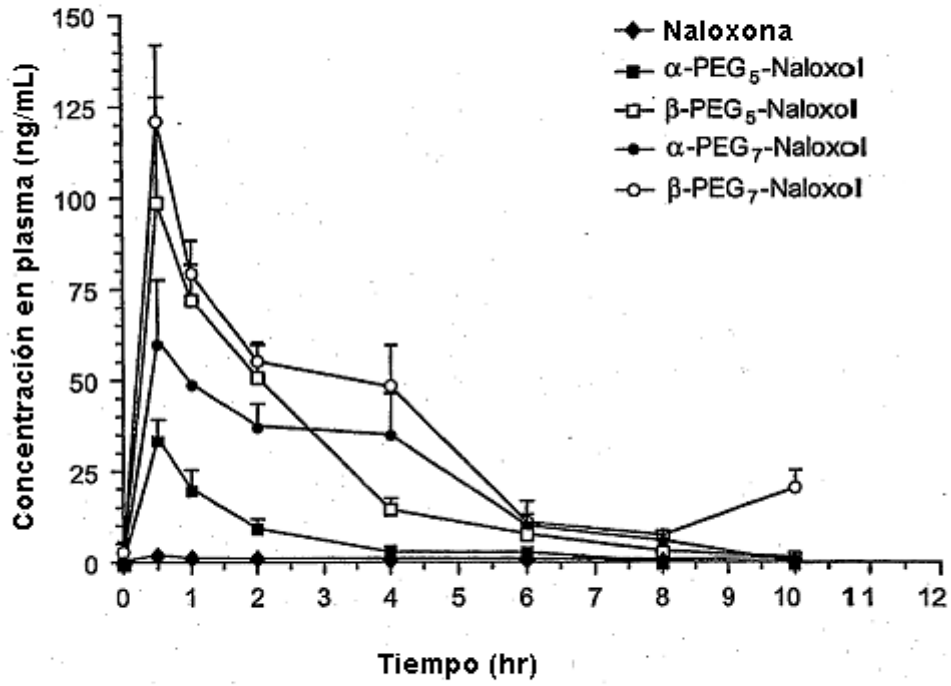
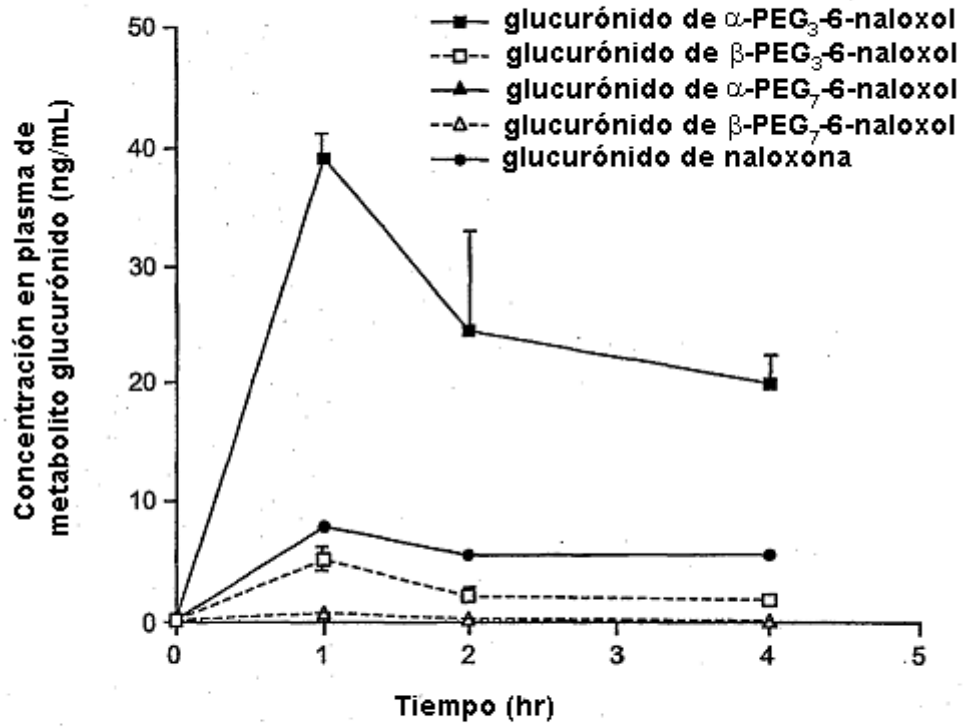


FIG. 7

**Metabolismo de naloxona y PEG-6-naloxol
en ratas después de la liberación oral
(n = 4, ETM, dosis normalizada a 1 mg/kg)**



Metabolitos detectados en plasma por LC/MS,
en forma de aducto de Na⁺

FIG. 8

Niveles de glucurónido en plasma de rata después de la liberación oral de Naloxona y PEG-Naloxol (n = 3, ETM)

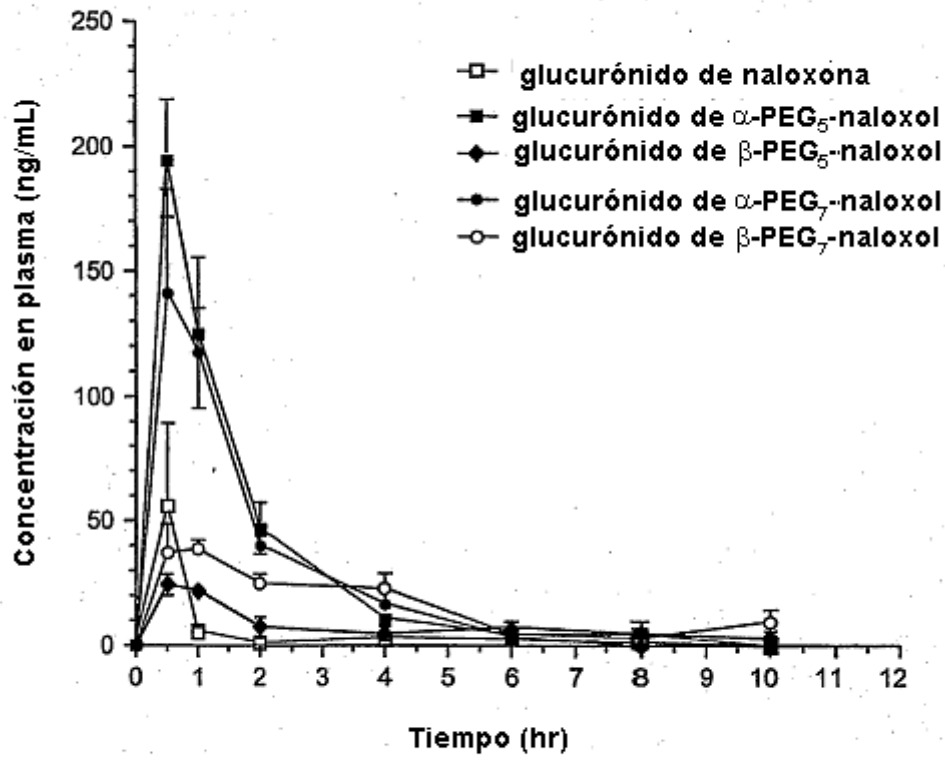


FIG. 9

MPEG350, Mn 465,31, Mw 483,75, pd 1,04

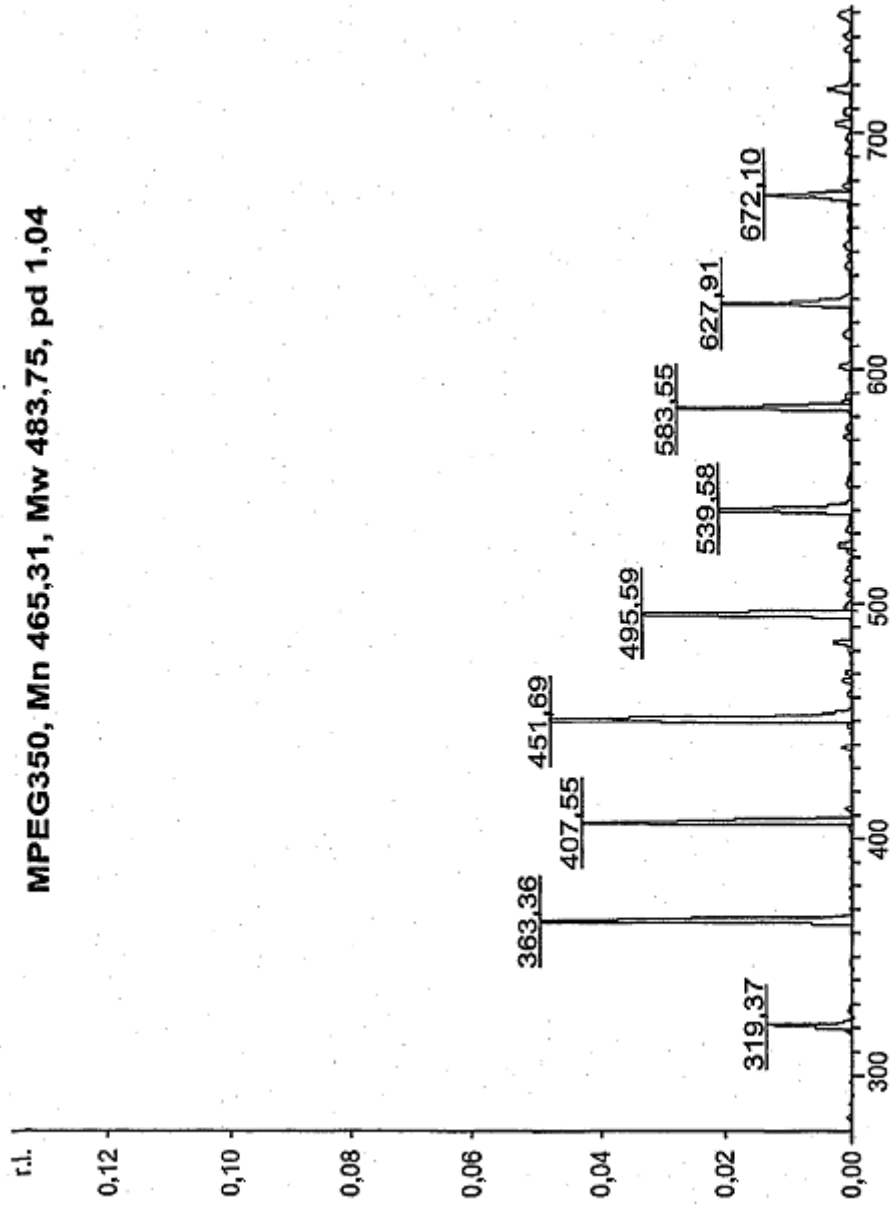


FIG. 10