

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 677**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
C07D 491/22 (2006.01)
C08G 65/329 (2006.01)
C08G 65/333 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2010 PCT/US2010/057292**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11063158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2010 E 10781794 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2501412**

54 Título: **Forma de sal de un producto conjugado de polímero-fármaco multibrazo**

30 Prioridad:

24.12.2009 US 290072 P
18.11.2009 US 262463 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHONG, ANTHONY, O.;
LEE, SEOJU;
JOSHI, BHALCHANDRA, V.;
BRAY, BRIAN;
NIE, SHAOYONG;
SPENCE, PATRICK;
KOZLOWSKI, ANTONI;
MCMANUS, SAMUEL;
TIPNIS, SACHIN;
LAVATY, GREG;
SWALLOW, DAVID;
SCHAEFER, ANTHONY y
HANDLEY, JOHN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 623 677 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

Forma de sal de un producto conjugado de polímero-fármaco multibrazo.5 **Campo**

Esta descripción se refiere generalmente a formas salinas de productos conjugados de polímero-fármaco solubles en agua, composiciones farmacéuticas de los mismos y métodos para preparar, formular, administrar y usar tales composiciones de sales ácidas mixtas. Esta descripción también se refiere generalmente a métodos de alcoxilación para preparar materiales poliméricos alcoxilados a partir de un oligómero alcoxilado previamente aislado, así como a composiciones que comprenden el material polimérico alcoxilado, métodos para usar el material polimérico alcoxilado y similares.

15 **Antecedentes**

A lo largo de los años, se han propuesto numerosos métodos para mejorar la estabilidad y el suministro de agentes biológicamente activos. Los desafíos asociados con la formulación y suministro de agentes farmacéuticos pueden incluir una baja solubilidad acuosa del agente farmacéutico, toxicidad, baja biodisponibilidad, inestabilidad y degradación in vivo rápida, por nombrar sólo algunos. Aunque se han ideado muchos enfoques para mejorar el suministro de agentes farmacéuticos, ningún enfoque único carece de inconvenientes. Por ejemplo, los enfoques de suministro de fármacos comúnmente empleados dirigidos a resolver o al menos mejorar uno o más de estos problemas incluyen la encapsulación del fármaco, tal como en un liposoma, matriz polimérica o micela unimolecular, unión covalente a un polímero soluble en agua tal como polietilenglicol, el uso de agentes de direccionamiento de genes, la formación de sales y similares.

La unión covalente de un polímero soluble en agua puede mejorar la solubilidad en agua de un agente activo, así como alterar sus propiedades farmacológicas. Ciertos productos conjugados de polímero ilustrativos se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.744.861, entre otros. En otro enfoque, un agente activo que tiene funcionalidades ácidas o alcalinas puede hacerse reaccionar con una base o ácido adecuados y comercializarse en forma de sal. Más de la mitad de todas las moléculas activas se comercializan como sales (Polymorphism in the Pharmaceutical Industry, Hilfiker, R., ed., Wiley-VCH, 2006). Los desafíos con las formas de sal incluyen encontrar una sal óptima, así como controlar el comportamiento del estado sólido durante el procesamiento. Las sales biofarmacéuticas pueden ser amorfas, cristalinas y existen como hidratos, disolventes, diversas formas polimorfas, etc. Curiosamente, rara vez, si es que existen, son formas de sal, y mucho menos formas de sales ácidas mixtas, de productos conjugados de polímeros utilizados en formulaciones de fármacos.

Otro desafío asociado con la preparación de productos conjugados de agente activo de aguas de polímeros solubles en agua es la capacidad para preparar polímeros solubles en agua relativamente puros en un método uniforme y reproducible. Por ejemplo, los derivados de poli(etilenglicol) (PEG) activados con grupos funcionales reactivos son útiles para acoplarse a agentes activos (tales como pequeñas moléculas y proteínas), formando de este modo un producto conjugado entre el PEG y el agente activo. Cuando se conjuga un agente activo con un polímero de poli(etilenglicol) o "PEG", el agente activo conjugado se denomina convencionalmente "PEGilado".

Cuando se compara con la seguridad y la eficacia del agente activo en la forma no conjugada, la versión conjugada presenta propiedades diferentes y a menudo clínicamente beneficiosas. El éxito comercial de los agentes activos PEGilados tales como PEGASYS[®] Interferón alfa-2a PEGilado (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), PEG-INTRON[®] Interferón alfa-2b PEGilado (Schering Corp., Kenilworth, NJ) y NEULASTA[®] El PEG-filgrastim (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) demuestra el grado en que la PEGilación tiene el potencial de mejorar una o más propiedades de un agente activo.

En la preparación de un producto conjugado, típicamente se emplea un reactivo polimérico para permitir un enfoque sintético relativamente directo para la síntesis de productos conjugados. Mediante la combinación de una composición que comprende un reactivo polimérico con una composición que comprende el agente activo, es posible - en las condiciones de reacción apropiadas - llevar a cabo una síntesis de producto conjugado relativamente conveniente.

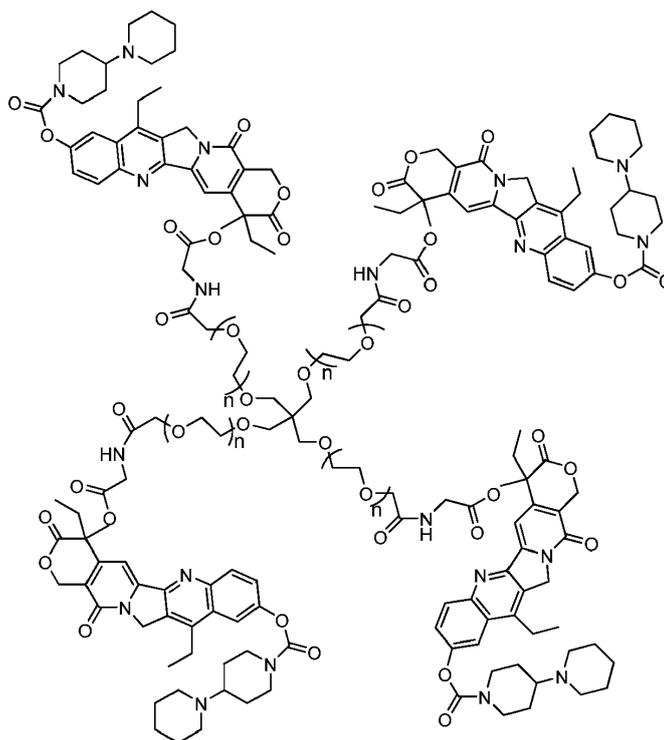
Sin embargo, la preparación del reactivo polimérico adecuado para los requisitos reguladores de los fármacos es a menudo un desafío. Los procedimientos de polimerización convencionales dan como resultado composiciones relativamente impuras y/o de bajo rendimiento. Aunque tales impurezas y rendimientos pueden no ser problemáticos fuera del campo farmacéutico, la seguridad y el coste representan preocupaciones importantes en el contexto de los medicamentos para uso humano. Por lo tanto, los enfoques de polimerización convencionales no son adecuados para la síntesis de reactivos poliméricos destinados a la fabricación de productos conjugados farmacéuticos.

Existe una necesidad en la técnica de métodos alternativos para preparar reactivos poliméricos, particularmente

polímeros de alto peso molecular, con un rendimiento y una pureza relativamente altos. En el caso de los polímeros multibrazo, existe una escasez de polímeros solubles en agua deseables disponibles que tienen propiedades bien controladas y bien definidas con la ausencia de cantidades significativas de impurezas indeseables. De este modo, se puede obtener fácilmente, por ejemplo, un poli(etilenglicol) multibrazo de alto peso molecular, pero los productos conjugados de fármaco fabricados a partir de polímeros comerciales pueden tener cantidades significativas (es decir, >8%) de productos conjugados de polímero-fármaco que tienen impurezas biológicamente activas de peso molecular muy bajo o muy alto. Este grado de impurezas activas en una composición de fármaco puede ser inaceptable y por lo tanto puede hacer que la aprobación de tales fármacos sea difícil pero no imposible.

10 Compendio

En una o más realizaciones de la invención, la presente descripción proporciona una forma de sal hidroháluro de un producto conjugado de polímero-agente activo que corresponde a la estructura (I):



15 (I)

donde n es un número entero que varía de 20 a 500 (p.ej., 40 a aproximadamente 500) y, en términos de una composición que comprende el producto conjugado anterior, mayor de 95 por ciento en moles (y en algunos casos mayor de 96 por ciento en moles, mayor de 97 moles por ciento e incluso mayor de 98 por ciento en moles) de nitrógenos alcalinos de las porciones de irinotecán de todos los productos conjugados contenidos en la composición se protonan en forma de sal hidroháluro (HX), en donde X se selecciona entre fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro.

En una o más realizaciones de la invención, la sal hidroháluro es una sal hidrocioruro.

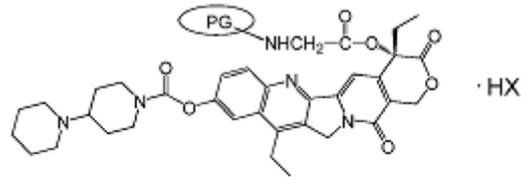
25 En una o más realizaciones de la invención, n de un monómero repetitivo es un número entero que varía de aproximadamente 80 a aproximadamente 150.

En una o más realizaciones de la invención, n para cualquier caso de $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ es de aproximadamente 113.

30 En una o más realizaciones de la invención, la sal hidroháluro es una sal hidrocioruro y el peso molecular medio ponderal del producto conjugado es de aproximadamente 23.000 dalton.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método para preparar una sal hidroháluro de un producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua [tal como el producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua de estructura (I)], comprendiendo el método las etapas de:

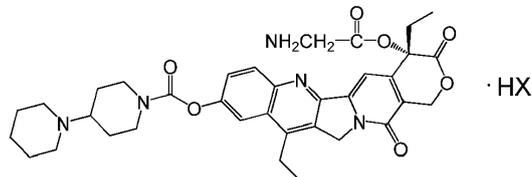
(i) tratar un hidrohalaro de glicina-irinotecán en forma protegida (II),



en donde: **PG** es un grupo protector; y
HX es un hidrohalaro

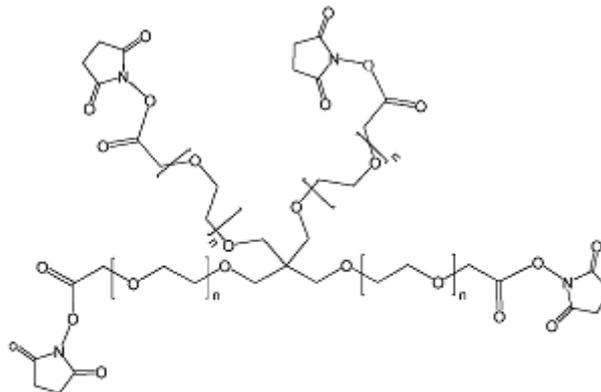
(II)

5 con un exceso molar de ácido hidrohalegenado para eliminar de este modo el grupo protector para formar un hidrohalaro de glicina-irinotecán,



(III)

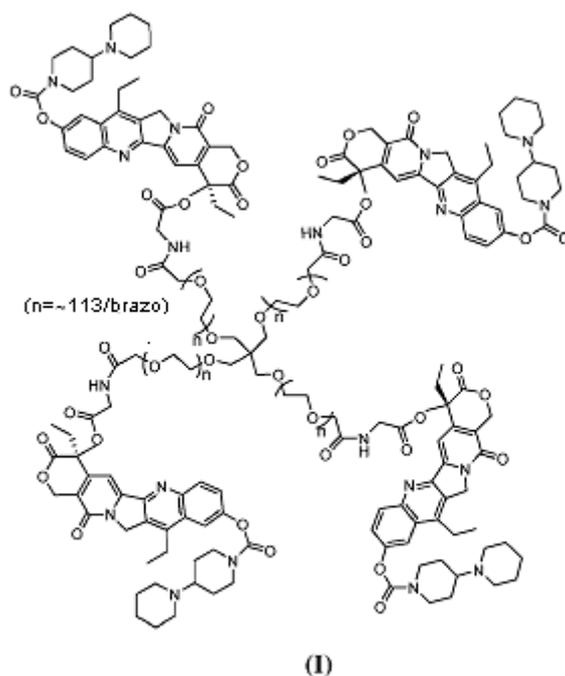
10 (ii) acoplar el hidrohalaro de glicina-irinotecán desprotegido de la etapa (i) con un reactivo polimérico que porta un éster activo tal como un pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetil-succinimida de 4-brazos,



en donde cada n = 40 a 50

(IV)

15 en presencia de una base para formar una sal hidrohalaro de pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos (también denominada sal hidrohalaro de pentaeritritolil-(PEG-1-metilen-2-oxo-vinilamino acetato ligado a irinotecán) de 4 brazos),



y
 (iii) recuperar la sal hidrohhaluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos mediante precipitación.

5 En una o más realizaciones de la invención, un hidrohhaluro pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos recuperado está contenido dentro de una composición en donde más de 95 por ciento en moles (y en algunos casos más de 96 por ciento en moles, más de 97% en moles e incluso más de 98 por ciento en moles) de nitrógenos alcalinos de las porciones de irinotecán de todos los productos conjugados contenidos en la
 10 composición se protonan en forma de sal hidrohhaluro (HX), en donde X se selecciona entre fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro.

15 En una o más realizaciones de la invención, el hidrohhaluro de glicina-irinotecán en forma protegida se trata con un exceso molar de diez veces o más de ácido hidrohhalogenado para eliminar de este modo el grupo protector para formar hidrohhaluro de glicina-irinotecán.

20 En una o más realizaciones de la invención, el hidrohhaluro de glicina-irinotecán en forma protegida se trata con un exceso molar de ácido hidrohhalogenado en un intervalo de diez veces a 25 veces para eliminar de este modo el grupo protector para formar hidrohhaluro de glicina-irinotecán.

25 En una o más realizaciones de la invención, el hidrohhaluro de glicina-irinotecán en forma protegida es hidrocloreuro de terc-butiloxicarbonil(Boc)-glicina-irinotecán, en donde el grupo amino de glicina está protegido con Boc.

30 En una o más realizaciones de la invención, el hidrohhaluro de glicina-irinotecán en la etapa (i) es hidrocloreuro de glicina-irinotecán en forma protegida y el hidrocloreuro de glicina-irinotecán en forma protegida se trata con ácido clorhídrico para eliminar el grupo protector.

35 En una o más realizaciones de la invención, el hidrocloreuro de glicina-irinotecán en forma protegida se trata con una solución de ácido clorhídrico en dioxano.

40 En una o más realizaciones de la invención, un método para preparar una sal hidrohhaluro de un producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua comprende adicionalmente aislar el hidrohhaluro de glicina-irinotecán (p.ej., mediante precipitación, por adición de metil-terc-butiléter, MTBE) antes de la etapa de acoplamiento con un reactivo polimérico.

En una o más realizaciones de la invención, la base utilizada en la etapa de acoplamiento es una amina (p.ej., trimetilamina, trietilamina y dimetilamino-piridina).

En una o más realizaciones de la invención, la etapa de acoplamiento se lleva a cabo en un disolvente clorado.

En una o más realizaciones de la invención, la etapa de recuperar la sal hidroháluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos comprende la adición de metil-terc-butiléter.

5 En una o más realizaciones de la invención, el método para preparar una sal hidroháluro de un producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua comprende además la etapa de (iv) analizar (p.ej., mediante cromatografía iónica) la sal hidroháluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos recuperada para determinar el contenido de haluro, y, en caso de que el contenido de haluro sea menor de 95 por ciento en moles, (V) disolver la sal hidroháluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos recuperada en acetato de etilo y añadir ácido hidrohálgeno adicional para formar de este modo la sal hidroháluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos que tiene un contenido de haluro mayor de 95 por ciento en moles.

15 En una o más realizaciones de la invención, el ácido hidrohálgeno añadido está en forma de una solución en etanol.

20 En una o más realizaciones de la invención, en un método en el que se lleva a cabo la etapa de adición de ácido hidrohálgeno adicional, el método comprende adicionalmente la recuperación del hidroháluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos mediante precipitación (puede efectuarse, por ejemplo, mediante enfriamiento).

25 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una sal hidroháluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos realizando los procedimientos descritos en la presente memoria.

30 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una composición farmacéuticamente aceptable, comprendiendo la composición una sal hidroháluro (p.ej., sal hidrocóloruro) del compuesto correspondiente a la estructura (I), pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una composición, comprendiendo la composición una sal hidrocóloruro de acuerdo con una o más de las realizaciones descritas en la presente memoria, y (ii) tampón de lactato, en forma liofilizada. En una o más realizaciones de la invención, la composición farmacéuticamente aceptable es una composición estéril. En una o más realizaciones de la invención, la composición farmacéuticamente aceptable se proporciona opcionalmente en un recipiente (p.ej., un vial), que contiene opcionalmente el equivalente a una dosis de 100 mg de irinotecán.

40 Una o más realizaciones de la invención son para uso en un método, comprendiendo el método administrar una composición que contiene el producto conjugado descrito en la presente memoria a un individuo que padece uno o más tipos de tumores sólidos cancerosos, en donde la composición que contiene el producto conjugado se disuelve opcionalmente en una solución de dextrosa al 5% p/p. En una o más realizaciones de la invención, la administración se efectúa por infusión intravenosa.

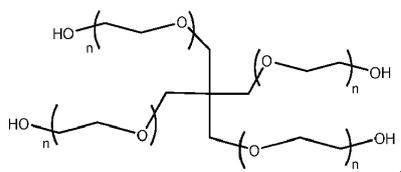
45 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método para tratar un mamífero que padece cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal hidroháluro (tal como una sal hidrocóloruro) de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos. La sal hidroháluro se administra al mamífero de manera eficaz para producir una disminución o inhibición del crecimiento del tumor sólido en el sujeto. En una o más realizaciones de la invención, el tumor sólido canceroso se selecciona del grupo que consiste en colorrectal, ovárico, cervical, de mama y de pulmón de células no pequeñas.

50 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una sal hidroháluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos, en donde la sal es un agente anticanceroso para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

55 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una composición, comprendiendo la composición un producto polimérico alcoxilado preparado mediante un procedimiento que comprende la etapa de alcoxilar en un disolvente adecuado un oligómero alcoxilable previamente aislado para formar un producto polimérico alcoxilado, en donde el oligómero alcoxilable previamente aislado tiene un peso molecular medio ponderal conocido y definido superior a 300 Dalton (p.ej., superior a 500 Dalton).

60 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una composición, comprendiendo la composición un producto polimérico alcoxilado que tiene una pureza superior a 92% en peso y el contenido combinado total de productos y dioles de alto peso molecular es inferior a 8% en peso (p.ej., menos de 2% en peso), según se determina, por ejemplo, mediante análisis de cromatografía de filtración en gel (GFC).

En una o más realizaciones de la invención, el producto polimérico alcoxilado tiene la siguiente estructura:



en donde cada n es un número entero de 20 a 500.

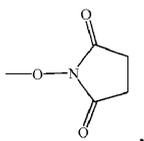
En otra realización de la invención se proporciona una composición que comprende sales hidroclicuro de productos conjugados poliméricos de cuatro brazos, en donde al menos 90% de los productos conjugados de cuatro brazos en la composición:

(i) tienen una estructura abarcada por la fórmula,

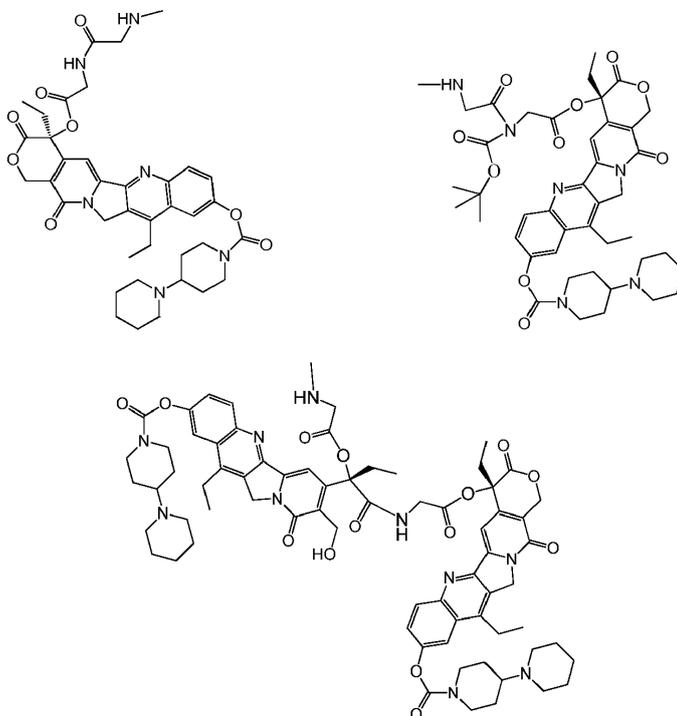


en donde

n, en cada caso, es un número entero que tiene un valor de 5 a 150 (por ejemplo 113), y Term, en cada caso, se selecciona del grupo que consiste en -OH, -OCH₃,



-NH-CH₂-C(O)-OH, -NH-CH₂-C(O)-OCH₃,



y -NH-CH₂-C(O)-O-Irino ("GLY-Irino"), en donde Irino es un radical irinotecán; y

(ii) para cada Term en al menos 90% de los productos conjugados de cuatro brazos en la composición, al menos 90% de los mismos son -NH-CH₂-C(O)-O-Irino, y adicionalmente en donde para cada grupo amino dentro de cada Irino en al menos 90% de los productos conjugados de cuatro brazos en la composición, cada grupo amino estará protonado o no protonado, donde

cualquier grupo amino protonado dado es una sal hidrocioruro.

También se describe un método, comprendiendo el método las etapas de (i) alcoxilar en un disolvente adecuado un oligómero alcoxilable previamente aislado para formar un material polimérico alcoxilado, en donde el oligómero alcoxilable previamente aislado tiene un peso molecular medio ponderal conocido y definido superior a 300 Dalton (p.ej., superior a 500 Dalton), y (ii) opcionalmente, activar adicionalmente el producto polimérico alcoxilado para proporcionar un producto polimérico alcoxilado activado que es útil como (entre otras cosas) un reactivo polimérico para preparar productos conjugados de polímero-fármaco .

También se describe un método, comprendiendo el método la etapa de activación de un producto polimérico alcoxilado obtenido de y/o contenido dentro de una composición que comprende un producto polimérico alcoxilado que tiene una pureza superior a 90% para formar así un producto polimérico alcoxilado activado que es útil como (entre otras cosas) un reactivo polimérico para preparar productos conjugados de polímero-fármaco.

También se describe un procedimiento en donde el procedimiento que comprende la etapa de conjugación de un producto polimérico alcoxilado activado a un agente activo, en donde el producto polimérico alcoxilado activado se preparó mediante un procedimiento que comprende la etapa de activación de un producto polimérico alcoxilado obtenido de y/o contenido en una composición que comprende un producto polimérico alcoxilado que tiene una pureza superior a 90% para formar así un producto polimérico alcoxilado activado.

También se describe una sal mixta de un producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua, habiéndose preparado el producto conjugado acoplado (bajo condiciones de conjugación) un agente activo portador de amina (p.ej., un glicina-irinotecán desprotegido) a un reactivo polimérico (p.ej., una pentaeritrolil-poli(etilenglicol)-carboximetil succinimida de 4 brazos) en presencia de una base para formar un producto conjugado, en donde el producto conjugado está en forma de un producto conjugado de sal mixta (p.ej., el producto conjugado posee átomos de nitrógeno, cada uno de los cuales estará protonado o no protonado, donde cualquier grupo amino protonado dado es una sal de ácido que posea uno de dos aniones diferentes), y adicionalmente en donde, opcionalmente, el reactivo polimérico se prepara a partir de un producto de alcoxilación preparado como se describe en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que ilustra los resultados de los estudios de estabilidad frente al estrés acelerado en tres muestras diferentes de "PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos" (correspondiente al pentaeritrolil-poli(etilenglicol)-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos) teniendo cada una una composición diferente con respecto a las cantidades relativas de ácido trifluoroacético (TFA) y sales hidrocioruro, así como de base libre. Las muestras sometidas a ensayo incluyeron más de 99% de sal de HCl (<1% de base libre, triángulos), 94% de sal total (6% de base libre, cuadrados) y 52% de sal total (48% de base libre, círculos). Las muestras se almacenaron a 25°C y 60% de humedad relativa; la gráfica ilustra la degradación del compuesto a lo largo del tiempo como se describe con detalle en el Ejemplo 3.

La FIG. 2 es un gráfico que ilustra el aumento en el tiempo del irinotecán libre en muestras de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos almacenadas a 40°C y 75% de humedad relativa, teniendo cada una una composición diferente con respecto a las cantidades relativas de ácido trifluoroacético y sales hidrocioruro, así como de base libre. Las muestras sometidas a ensayo corresponden a producto que contiene más de 99% de sal de HCl (<1% de base libre, cuadrados) y producto que contiene 86% de sales totales (14% de base libre, rombos), como se describe en el Ejemplo 3.

La FIG. 3 es un gráfico que ilustra el aumento a lo largo del tiempo de pequeñas especies de PEG (productos de degradación de PEG) en muestras de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos almacenadas a 40°C y 75% de humedad relativa, como se describe con detalle en el Ejemplo 3. Las muestras sometidas a ensayo corresponden a un producto que contiene más de 99% de sal de HCl (<1% de base libre, cuadrados) y producto que contiene 86% de sales totales (14% de base libre, rombos).

La FIG. 4 es una recopilación de superposiciones de cromatogramas que exhiben liberación de irinotecán mediante la hidrólisis de irinotecán mono- (DS-1), di- (DS-2), tri- (DS-3) y tetra-sustituido (DS-4)-PEG-Gly-Irino-20K de 4-brazos como se describe con detalle en el Ejemplo 5.

La FIG. 5 es un gráfico que ilustra los resultados de la hidrólisis de varias especies de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos como se describió anteriormente en tampón acuoso a pH 8,4 en presencia de carboxipeptidasa B porcina en comparación con los datos de modelos cinéticos de hidrólisis como se describe en el Ejemplo 5. Para el modelo cinético, se consideró que la hidrólisis de todas las especies era una cinética de 1^{er} orden. La constante de velocidad de reacción de 1^{er} orden para la desaparición de DS4 (0,36 hr⁻¹) se utilizó para generar todas las curvas.

La FIG. 6 es un gráfico que ilustra la hidrólisis de varias especies de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos como se ha

descrito anteriormente en plasma humano en comparación con los datos de modelos cinéticos de hidrólisis. Los detalles se proporcionan en el Ejemplo 5. Para el modelo cinético, se consideró que la hidrólisis de todas las especies era una cinética de 1^{er} orden. La constante de velocidad de reacción de 1^{er} orden para la desaparición de DS4 (0,26 hr⁻¹) se utilizó para generar todas las curvas.

5 La FIG. 7 es un cromatograma siguiente a la cromatografía de filtración en gel de un material preparado como se describe en el Ejemplo 7.

La FIG. 8 es un cromatograma siguiente a la cromatografía de filtración en gel de un material preparado como se describe en el Ejemplo 8.

10 Descripción detallada

A continuación se describirán más detalladamente varios aspectos de la invención.

15 En el caso de una incoherencia entre las enseñanzas de esta memoria descriptiva y la técnica incorporada la presente memoria, prevalecerá el significado de las enseñanzas de esta memoria descriptiva.

Debe tenerse en cuenta que, tal como se usa en esta memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una", "uno" y "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un "polímero" incluye un único polímero así como dos o más polímeros iguales o diferentes, la referencia a un "producto conjugado" se refiere a un único producto conjugado así como a dos o más de los mismos o diferentes productos conjugados, la referencia a un "excipiente" incluye un único excipiente, así como dos o más de los mismos o diferentes excipientes, y similares.

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

Un "grupo funcional" es un grupo que puede utilizarse, en condiciones normales de síntesis orgánica, para formar un enlace covalente entre la entidad a la que está unido y otra entidad, que típicamente porta un grupo funcional adicional. El grupo funcional incluye generalmente múltiples enlaces y/o heteroátomos. Los grupos funcionales preferidos se describen en la presente memoria.

35 El término "reactivo" 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 no reaccionan o que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción impracticables para reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

40 Un "grupo protector" es un radical que impide 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 se proteja, así como de las condiciones de reacción a emplear y de la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula. Los grupos funcionales que pueden estar protegidos incluyen, a modo de ejemplo, grupos ácido carboxílico, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos carbonilo y similares. Los grupos protectores representativos para ácidos carboxílicos incluyen ésteres (tales como éster *p*-metoxibencílico), amidas e hidrazidas; para grupos amino, carbamatos (tales como terc-butoxicarbonilo) y amidas; para grupos hidroxilo, éteres y ésteres; para grupos tiol, tioéteres y tioésteres; para grupos carbonilo, acetales y cetales; y similares. Tales grupos protectores son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en T.W. Greene y G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, tercera edición, Wiley, Nueva York, 1999, y en P.J. Kocienski, *Protecting Groups*, Tercera Ed., Thieme Chemistry, 2003, y referencias allí citadas.

50 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 entiende que el término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo abarca las formas protegidas del mismo.

55 Se entiende que "PEG" o "poli(etilenglicol)" según se utiliza en la presente memoria, abarca cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEG para uso en la presente invención comprenderán una de las dos estructuras siguientes: $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 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 se han desplazado o no, p.ej., durante una transformación sintética. La variable (n) oscila entre 3 y aproximadamente 3000, y los grupos terminales y la arquitectura del PEG total pueden variar.

60 Un polímero soluble en agua puede portar uno o más "grupos de protección terminal" (en cuyo caso puede indicarse que el polímero soluble en agua está "protegido terminalmente". Con respecto a los grupos de protección terminal, los grupos de protección terminal ilustrativos generalmente contienen carbono e hidrógeno, típicamente comprendidos de 1-20 átomos de carbono y un átomo de oxígeno que está unido covalentemente al grupo. A este respecto, el grupo es típicamente alcoxi (p.ej., metoxi, etoxi y benciloxi) y con respecto al grupo que contiene carbono puede ser opcionalmente saturado o insaturado, así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo y formas

sustituidas de cualquiera de los anteriores.

- 5 El grupo de protección terminal también puede comprender un marcador detectable. Cuando el polímero tiene un grupo de protección terminal que comprende un marcador detectable, la cantidad o ubicación del polímero y/o el radical (p.ej., el agente activo) al que está unido el polímero se puede determinar utilizando un detector adecuado. Dichos marcadores incluyen, sin limitación, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, radicales utilizados en el marcaje enzimático, agentes colorimétricos (p.ej., colorantes), iones metálicos, radicales radiactivos y similares.
- 10 "Soluble en agua", en el contexto de un polímero de la invención o un "segmento de polímero soluble en agua" es cualquier segmento o polímero que sea soluble en agua en al menos 35% (en peso), preferiblemente más de 70% (en peso) y más preferiblemente más de 95% (en peso) a temperatura ambiente. Típicamente, un polímero o segmento soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de luz, transmitida por la misma solución después de la filtración.
- 15 El término "activado", cuando se utiliza conjugado con un grupo funcional particular, se refiere a un grupo funcional reactivo que reacciona fácilmente con un electrófilo o nucleófilo sobre otra molécula. Esto está en contraste con aquellos grupos que requieren bases fuertes o condiciones de reacción altamente impracticables para reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").
- 20 "Electrófilo" se refiere a un ion o átomo o una colección neutra o iónica de átomos que tienen un centro electrofílico, es decir, un centro que busca electrones o es capaz de reaccionar con un nucleófilo.
- "Nucleófilo" se refiere a un ion o átomo o una colección neutra o iónica de átomos que tienen un centro nucleofílico, es decir, un centro que está buscando un centro electrofílico o capaz de reaccionar con un electrófilo.
- 25 Los términos "protegido" o "grupo protector" o "grupo de protección" se refieren a la presencia de un radical (es decir, el grupo protector) que impide 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 se deba proteger, 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, si los hubiera. Los grupos protectores conocidos en la técnica se pueden encontrar en Greene, T.W., et al., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 3ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1999).
- 30 La "masa molecular" en el contexto de un polímero soluble en agua tal como PEG, se refiere al peso molecular medio ponderal de un polímero, determinado típicamente mediante cromatografía de exclusión por tamaño, técnicas de dispersión de luz o determinación de la viscosidad intrínseca en un disolvente orgánico como 1,2,4-triclorobenceno.
- 35 Los términos "espaciador" y "radical espaciador" se utilizan en la presente memoria para referirse a un átomo o una colección de átomos opcionalmente utilizados para unir radicales de interconexión tales como un extremo de una serie de monómeros y un electrófilo. Los radicales espaciadores de la invención pueden ser hidrolíticamente estables o pueden incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.
- 40 Un enlace "hidrolizable" es un enlace relativamente lábil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) bajo condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Entre los enlaces hidrolíticamente inestables ilustrativos se incluyen éster carboxilato, éster fosfato, anhídridos, acetales, cetales, éteres de aciloxialquilo, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos.
- 45 Un "enlace enzimáticamente degradable" significa un enlace que está sujeto a degradación por una o más enzimas.
- Una conexión o enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico que es sustancialmente estable en agua, es decir, no se somete a hidrólisis bajo condiciones fisiológicas hasta un grado apreciable durante un periodo de tiempo prolongado. Los ejemplos de las conexiones hidrolíticamente estables incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: enlaces carbono-carbono (p.ej., en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos y similares. Generalmente, una conexión hidrolíticamente estable es una que exhibe una velocidad de hidrólisis de menos de aproximadamente 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.
- 55 "Multibrazo" en referencia a la geometría o estructura global de un polímero se refiere a un polímero que tiene 3 o más "brazos" que contienen polímeros conectados a una molécula o estructura "núcleo". Por lo tanto, un polímero multibrazo puede poseer 3 brazos de polímero, 4 brazos de polímero, 5 brazos de polímero, 6 brazos de polímero, 7 brazos de polímero, 8 brazos de polímero o más, dependiendo de su configuración y estructura núcleo. Un tipo particular de polímero multibrazo es un polímero altamente ramificado denominado polímero dendrítico o polímero
- 60

hiperramificado que tiene un núcleo iniciador de al menos 3 ramas, una multiplicidad de ramificación interior de 2 o más, una generación de 2 o más y al menos 25 grupos de superficie dentro de una sola molécula de dendrímero. Para los fines de la presente memoria, se considera que un dendrímero posee una estructura distinta de la de un polímero multibrazo. Es decir, un polímero multibrazo como se menciona en la presente memoria explícitamente excluye dendrímeros. Adicionalmente, un polímero multibrazo según se proporciona en la presente memoria posee un núcleo no entrecruzado.

Un "dendrímero" o "polímero hiperramificado" es un polímero monodisperso de formato globular, en donde todos los enlaces emergen radialmente desde un punto focal o núcleo central con un patrón de ramificación regular y con unidades repetidas que aportan cada una un punto de ramificación. Los dendrímeros son típicamente aunque no necesariamente formados utilizando un proceso de fabricación a escala nanométrica y de varias etapas. Cada etapa da como resultado una nueva "generación" que tiene dos o más veces la complejidad de la generación anterior. Los dendrímeros exhiben ciertas propiedades de estado dendrítico tales como la encapsulación del núcleo, haciéndolos únicos con respecto a otros tipos de polímeros.

"Punto de ramificación" se refiere a un punto de bifurcación que comprende uno o más átomos en los que un polímero se divide o se ramifica desde una estructura lineal en una o más ramificaciones poliméricas adicionales. Un polímero multibrazo puede tener un punto de ramificación o varios puntos de ramificación, siempre que las ramas no sean repeticiones regulares que den como resultado un dendrímero.

"Sustancialmente" o "esencialmente" significan casi total o completamente, por ejemplo, 95% o más de una determinada cantidad.

"Alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada que varía de aproximadamente 1 a 20 átomos de longitud. Dichas cadenas hidrocarbonadas están preferiblemente pero no necesariamente saturadas y pueden ser de cadena ramificada o lineal. Los grupos alquilo ilustrativos incluyen metilo, etilo, isopropilo, n-butilo, n-pentilo, 2-metil-1-butilo, 3-pentilo, 3-metil-3-pentilo y similares.

"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 mediante metilo, etilo, n-butilo, i-butilo y t-butilo.

"Cicloalquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada cíclica saturada, que incluye compuestos cíclicos de tipo puente, fusionados o espiro, preferiblemente compuestos de 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8.

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

El término "sustituido" como en, por ejemplo, "alquilo sustituido", se refiere a un radical (p.ej., un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes que no interfieren, tales como, pero sin limitarse a: cicloalquilo C₃-C₈, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo y similares; halo, por ejemplo, flúor, cloro, bromo y yodo; ciano; alcoxi, fenilo inferior; fenilo sustituido; y similares. Para sustituciones en un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta o para).

"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, etc.), preferiblemente C₁-C₇.

Según se utiliza en la presente memoria, "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbonados ramificados y no ramificados de 1 a 15 átomos de longitud, que contienen al menos un doble enlace, tal como etenilo (vinilo), 2-propen-1-ilo (alilo), isopropenilo, 3-buten-1-ilo y similares.

El término "alquinilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a grupos hidrocarbonados ramificados y no ramificados de 2 a 15 átomos de longitud, que contienen al menos un enlace triple, tal como etinilo, 1-propinilo, 3-butin-1-ilo, 1-octin-1-ilo, etcétera.

El término "arilo" significa un grupo aromático que tiene hasta 14 átomos de carbono. Los grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, bifenilo, fenantrecenilo, naftacenilo y similares.

"Fenilo sustituido" y "arilo sustituido" significan un grupo fenilo y un grupo arilo, respectivamente, sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco (p.ej., 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituyentes) elegidos entre halo (F, Cl, Br, I), hidroxilo, ciano, nitro, alquilo (p.ej., alquilo C₁-C₆), alcoxi (p.ej., alcoxi C₁-C₆), benciloxi, carboxi, arilo, etcétera.

Un ácido inorgánico es un ácido en el que están ausentes átomos de carbono. Los ejemplos incluyen ácidos hidrohalegenados, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares.

"Ácido hidrohalegenado" significa un haluro de hidrógeno tal como ácido fluorhídrico (HF), ácido clorhídrico (HCl), ácido bromhídrico (HBr) y ácido yodhídrico (HI).

5 "Ácido orgánico" significa cualquier compuesto orgánico (es decir, que tiene al menos un átomo de carbono) que posee uno o más grupos carboxi (-COOH). Algunos ejemplos específicos incluyen ácido fórmico, ácido láctico, ácido benzoico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácidos clorofluoroacéticos mixtos, ácido cítrico, ácido oxálico y similares.

10 "Agente activo" tal como se utiliza en la presente memoria incluye cualquier agente, fármaco, compuesto y similares que proporcione algún efecto farmacológico, a menudo beneficioso, que pueda demostrarse *in vivo* o *in vitro*. Según se utiliza en la presente memoria, estos términos incluyen adicionalmente cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produzca un efecto localizado o sistémico en un paciente. Tal como se utiliza en la presente memoria, especialmente en referencia a los enfoques sintéticos descritos en la presente memoria, se pretende que un "agente activo" abarque sus versiones modificadas derivadas o conectoras, de tal manera que, tras la administración *in vivo*, se libere la molécula "bioactiva" parental.

15 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" se refieren a un excipiente que puede incluirse en una composición que comprende un agente activo y que no produce efectos toxicológicos adversos significativos para el 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 agente activo presente en una preparación farmacéutica que se necesita para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o producto conjugado en el torrente sanguíneo o en un tejido o sitio diana en el organismo. La cantidad exacta dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el agente activo particular, los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes pretendida y las consideraciones de los pacientes, y pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica, basándose en la información proporcionada en la presente memoria y disponible en la bibliografía pertinente.

25 "Multi-funcional" en el contexto de un polímero significa un polímero que tiene 3 o más grupos funcionales, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes y están típicamente presentes en los extremos poliméricos. Los polímeros multifuncionales contendrán típicamente aproximadamente de 3 a 100 grupos funcionales, o de 3 a 50 grupos funcionales, o de 3 a 25 grupos funcionales, o de 3 a 15 grupos funcionales, o de 3 a 10 grupos funcionales, es decir, contiene 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos funcionales.

30 "Difuncional" y "bifuncional" se utilizan indistintamente en la presente memoria y significan una entidad tal como un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos en la misma, típicamente en los extremos poliméricos. Cuando los grupos funcionales son iguales, se dice que la entidad es homodifuncional o homobifuncional. Cuando los grupos funcionales son diferentes, se dice que la entidad es heterodifuncional o heterobifuncional.

Un reactivo alcalino o ácido descrito en la presente memoria incluye formas de sales neutras, cargadas y cualquiera de sus formas de sal correspondientes.

35 Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a un vertebrado, preferiblemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, mурidos, roedores, simios, seres humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas. Tales sujetos sufren típicamente o son propensos a una afección que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de un producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua como se describe en la presente memoria.

40 Se entiende que el término "aproximadamente", particularmente en referencia a una cantidad dada, abarca desviaciones de más o menos cinco por ciento.

45 "Tratamiento" y "que trata" una afección concreta incluyen: (1) prevenir tal afección, es decir, hacer que la afección no se desarrolle, o que ocurra con menos intensidad o en menor grado en un sujeto que pueda estar expuesto o predispuesto a la afección, pero que todavía no experimenta o muestra la afección, y (2) inhibir la afección, es decir, detener el desarrollo o revertir la afección.

50 "Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita subsiguientemente puede aparecer, pero no necesariamente, de manera que la descripción incluye casos en los que aparece la circunstancia y casos en los que no.

Una "molécula pequeña" es un compuesto orgánico, inorgánico u organometálico que tiene típicamente un peso molecular inferior a aproximadamente 1000, preferiblemente inferior a aproximadamente 800 dalton. Las moléculas

pequeñas a las que se hace referencia en la presente memoria abarcan oligopéptidos y otras biomoléculas que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1.000.

Un "péptido" es una molécula compuesta de aproximadamente 13 a 50 o más aminoácidos. Un oligopéptido típicamente contiene de aproximadamente 2 a 12 aminoácidos.

5 A menos que se indique explícitamente lo contrario, los términos "sal mixta parcial" y "sal mixta", tal como se utilizan en la presente memoria, se utilizan indistintamente y, en el caso de un producto conjugado polimérico (y composiciones correspondientes que comprenden una pluralidad de tales productos conjugados poliméricos), hacen referencia a productos conjugados y composiciones que comprenden uno o más grupos amino alcalinos (u otros grupos que contienen nitrógeno alcalino), donde (i) cualquiera de los grupos amino alcalinos dados en el producto conjugado o composición de producto conjugado no está protonado o está protonado y (ii) con respecto a cualquier grupo amino alcalino protonado dado, el grupo amino alcalino protonado dado tendrá uno de dos contraiones diferentes. (El término "sal mixta parcial" se refiere a la característica en donde no todos los grupos amino del compuesto o composición están protonados, de ahí que la composición sea una sal "parcial", mientras que "mixta" se refiere a la característica de múltiples contraiones). Una sal mixta según se proporciona en la presente memoria abarca hidratos, solvatos, formas amorfas, formas cristalinas, formas polimorfas, isómeros y similares.

20 Un grupo amina (u otro nitrógeno alcalino) que está en forma de "base libre" es aquel en donde el grupo amina, es decir, una amina primaria, secundaria o terciaria, posee un par de electrones libres. La amina es neutra, es decir, no está cargada.

25 Un grupo amina que está en "forma protonada" existe en forma de amina protonada, de manera que el grupo amino está cargado positivamente. Según se utiliza en la presente memoria, un grupo amina que está protonado también puede estar en forma de una sal de adición de ácido resultante de la reacción de la amina con un ácido tal como un ácido inorgánico o un ácido orgánico.

30 El "porcentaje en moles" de los grupos amino de un agente activo se refiere a la fracción o porcentaje de grupos amino en una molécula de agente activo contenida en un producto conjugado polimérico que está en una forma particular u otra, donde el porcentaje en moles total de grupos amino en el producto conjugado es del 100 por ciento.

Según se utiliza en la presente memoria, "psi" significa libras por pulgada cuadrada.

35 Descripción general - sales hidroháluro, métodos de alcoxilación y composiciones de productos conjugados (y formas de sal hidroháluro de los mismos) preparadas a partir de reactivos poliméricos preparados a partir de productos poliméricos preparados a partir de los métodos de alcoxilación

40 Sales hidroháluro: Como se ha indicado anteriormente, en una o más realizaciones de la invención, se proporciona un producto conjugado de polímero y agente activo soluble en agua, en donde el producto conjugado está en forma de una sal hidroháluro (p.ej., una sal hidroháluro de pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos). Tales productos conjugados representan nuevas formas en estado sólido. Se proporciona un procedimiento para preparar de forma reproducible una composición que contiene producto conjugado de irinotecán, en donde - con respecto a todos los productos conjugados de irinotecán en la composición - se ha descubierto que más de 95 por ciento en moles de todos los átomos de nitrógeno alcalinos de irinotecán están protonados en una forma de sal hidroháluro (HX), y se proporciona en la presente invención. Adicionalmente se ha descubierto que la sal hidroháluro demuestra una estabilidad mejorada frente a la degradación hidrolítica, p.ej., cuando se compara con la forma de base libre del producto conjugado. Véase, p.ej., el Ejemplo 3.

50 A modo de antecedentes, durante la preparación del pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos, como se describe con detalle en el Ejemplo 1, se descubrió que, a pesar del tratamiento con álcali, el producto estaba generalmente formado como una sal de ácido mixta que tiene átomos de nitrógeno alcalinos de irinotecán, p.ej., grupos amino, en forma protonada o no protonada, donde cualquier grupo amino protonado dado era una sal de ácido que poseía uno de dos aniones diferentes (p.ej., trifluoroacetato o cloruro). En un intento de explorar adicionalmente la composición resultante, se ideó un método para preparar una sal hidroháluro sustancialmente pura. Como se ha descrito con anterioridad en lo que antecede, la sal hidroháluro descrita en la presente memoria posee ciertas propiedades notables y ventajosas. Las características estructurales, las propiedades, el método de fabricación y uso, y las características adicionales de la sal hidroháluro de pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos, entre otras características, son descritos en la presente memoria.

60 Brevemente, las características de una sal hidroháluro, p.ej., sal hidrocioruro, de un producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua incluyen típicamente lo siguiente. Hablando en términos generales, el compuesto es un producto conjugado de polímero de poli(etilenglicol) multi-brazo e irinotecán. El irinotecán, como es evidente a partir de su estructura, posee uno o más grupos amina alcalinos (u otros átomos de nitrógeno alcalinos), es decir, que tiene un pK de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 11,5 después de la conjugación con el

núcleo polimérico multibrazo (es decir, el agente activo posee una o más aminas alcalinas u otros grupos que contienen nitrógeno después de la conjugación con el polímero soluble en agua). El producto conjugado resultante es una sal hidroháluro, es decir, donde los átomos de nitrógeno alcalinos son protonados como una sal hidroháluro (HX, donde X se selecciona entre fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro).

5 Según se utiliza en la presente memoria, una sal hidroháluro que tiene más de 95 por ciento en moles de los átomos de nitrógeno alcalinos de irinotecán protonados como hidroháluro se refiere al "producto masivo" en lugar de referirse necesariamente a especies moleculares individuales contenidas en el producto masivo. De este modo, las especies moleculares individuales contenidas dentro de la sal, debido al número de brazos del polímero dentro de la estructura del producto conjugado, pueden contener un número pequeño de grupos amina que están en forma de base libre así como en forma protonada como se ha descrito anteriormente. Además, el núcleo de producto conjugado de PEG-carboximetilo de 4 brazos, en general, puede estar menos que totalmente sustituido con irinotecán unido covalentemente, esta característica se describirá con mayor detalle a continuación.

15 Métodos de alcoxilación: Como también se ha indicado anteriormente, también se describe un método, comprendiendo el método la etapa de alcoxilar en un disolvente adecuado un oligómero alcoxilable previamente aislado para formar un producto polimérico alcoxilado, en donde el oligómero alcoxilable previamente aislado tiene un peso molecular promedio ponderal conocido y definido de más de 300 Dalton (p.ej., superior a 500 Dalton). Entre otras ventajas, los métodos de alcoxilación proporcionados en la presente memoria dan como resultado productos poliméricos que son superiores (p.ej., en términos de consistencia y pureza) a los productos poliméricos preparados por métodos previamente conocidos.

25 Composiciones de productos conjugados (y formas de sal hidroháluro de los mismos) preparadas a partir de reactivos poliméricos preparados a partir de productos poliméricos preparados a partir de los métodos de alcoxilación: Como se ha indicado anteriormente, en una o más realizaciones de la invención, se proporciona una sal hidroháluro de un producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua, en donde el producto conjugado se prepara acoplado (en condiciones de conjugación) un agente activo portador de amina (p.ej., una glicina-irinotecán desprotegida) a un reactivo polimérico (p.ej., pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetilsuccinimida de 4 brazos) en presencia de una base para formar un producto conjugado, en donde el producto conjugado es un producto conjugado de sal hidroháluro (p.ej., el producto conjugado posee átomos de nitrógeno, cada uno de los cuales estará protonado o no protonado, donde cualquier grupo amino protonado dado es una sal hidroháluro), y adicionalmente en donde opcionalmente el reactivo polimérico se prepara a partir de un producto de alcoxilación preparado como se describe en la presente memoria.

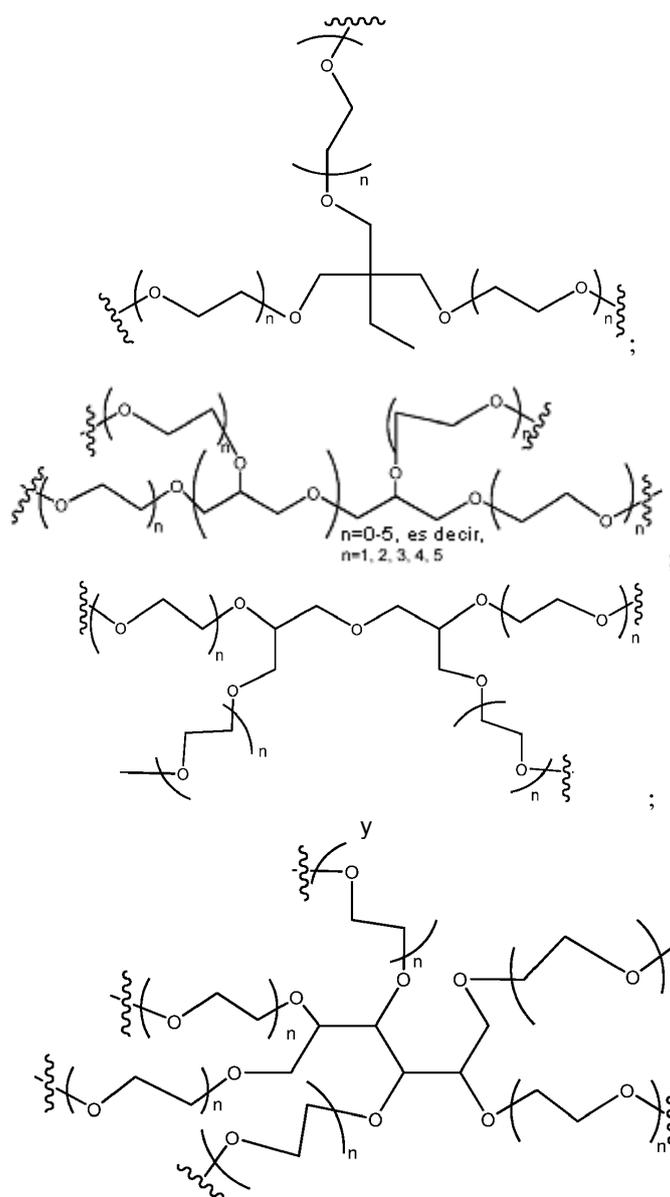
35 Productos conjugados - El polímero en términos generales

Los productos conjugados de polímero-agente activo solubles en agua (independientemente de la forma específica adoptada, p.ej., una forma alcalina, una forma de sal, una sal mixta, etc.) incluyen un polímero soluble en agua. Típicamente, para formar un producto conjugado, un polímero soluble en agua - en forma de un reactivo polimérico - se acopla (bajo condiciones de conjugación) a un agente activo en un electrófilo o nucleófilo contenido dentro del agente activo. Por ejemplo, se puede acoplar un polímero soluble en agua (de nuevo en forma de un reactivo polimérico que porta, p.ej., un éster activado) a un agente activo que posee uno o más grupos amina alcalinos (u otros átomos de nitrógeno alcalinos), es decir, una amina que tiene un pK de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 11,5 (determinado después de la conjugación).

45 El componente polimérico soluble en agua del producto conjugado de acuerdo con las reivindicaciones es polietilenglicol o PEG que comprende la unidad de repetición $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, donde n oscila entre 20 y 500.

50 El polímero soluble en agua puede estar en cualquiera de una serie de geometrías o formas, incluyendo lineal, ramificado, bifurcado. Se describe que el polímero es a menudo lineal o multibrazo. Los polímeros solubles en agua se pueden obtener comercialmente simplemente en forma de polímero soluble en agua. Además, los polímeros solubles en agua se pueden obtener convenientemente en una forma activada como un reactivo polimérico (que opcionalmente puede acoplarse a un agente activo sin modificación o activación adicional). Las descripciones de polímeros y reactivos poliméricos solubles en agua pueden encontrarse en el Catálogo de PEGilación Avanzada de Nektar, 2005-2006, "Polyethylenglicol and Derivatives for Advanced PEGylation" y están disponibles para su adquisición de NOF Corporation y JenKem Technology USA, entre otros.

60 Un polímero ramificado ilustrativo que tiene dos brazos poliméricos en un patrón ramificado es el siguiente, a menudo referido como PEG-2 o mPEG-2:



5

10

En una realización ilustrativa, de acuerdo con la invención, el polímero soluble en agua es un polímero de 4 brazos como se muestra anteriormente, en donde n puede estar comprendido entre aproximadamente 20 y aproximadamente 500, o entre aproximadamente 40 y aproximadamente 500.

15

En los polímeros multibrazo descritos en la presente memoria, cada brazo de polímero tiene típicamente un peso molecular correspondiente a uno de los siguientes: 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000, 12000, 15000, 17500, 18000, 19000, 20000 Dalton o superior. Los pesos moleculares totales para las configuraciones poliméricas multibrazo descritas en la presente memoria (es decir, el peso molecular del polímero multibrazo en su conjunto) corresponden generalmente a uno de los siguientes: 800, 1000, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800, 3200, 3600, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000, 12000, 15000, 16000, 20000, 24000, 25000, 28000, 30000, 32000, 36000, 40000, 45000, 48000, 50000, 60000, 80000 o 100000 o mayor

20

25

El polímero soluble en agua, p.ej., PEG, puede estar unido covalentemente al agente activo a través de un conector intermedio. El conector puede contener cualquier número de átomos. En general, el conector tiene una longitud de átomo que satisface uno o más de los intervalos siguientes: de aproximadamente 1 átomo a aproximadamente 50 átomos; de aproximadamente 1 átomo a aproximadamente 25 átomos; de aproximadamente 3 átomos a aproximadamente 12 átomos; de aproximadamente 6 átomos a aproximadamente 12 átomos; y de aproximadamente 8 átomos a aproximadamente 12 átomos. Cuando se considera la longitud de la cadena de átomos, sólo se consideran los átomos que contribuyen a la distancia total. Por ejemplo, un conector que tiene la

estructura, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ se considera que tiene una longitud de cadena de 11 átomos, ya que no se considera que los sustituyentes contribuyan significativamente a la longitud del conector. Los conectores ilustrativos incluyen compuestos bifuncionales tales como aminoácidos (p.ej., alanina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, metionina, serina, cisteína, sarcosina, valina, lisina y similares). El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural o un aminoácido no natural. Los conectores adecuados también incluyen oligopéptidos.

Las estructuras multibrazo anteriores se dibujan principalmente para ilustrar el núcleo de polímero que tiene cadenas de PEG unidas al mismo y, aunque no se dibujan explícitamente, dependiendo de la naturaleza del agente activo y la química de anclaje empleados, la estructura final puede incluir opcionalmente un grupo etileno adicional, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, anclados a los átomos de oxígeno en el extremo de cada brazo polimérico, y/o pueden contener opcionalmente cualquiera de diversos átomos conectores intermedios para facilitar el anclaje covalente a un agente activo. En una realización particular, cada uno de los brazos de PEG ilustrados anteriormente comprende adicionalmente un grupo carboxi-metilo, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$, anclado covalentemente al átomo de oxígeno terminal.

Nuevo método de alcoxilación para composiciones poliméricas mejoradas

Como se ha indicado anteriormente, se pueden obtener comercialmente polímeros solubles en agua que tienen utilidad en (por ejemplo) la preparación de productos conjugados con agentes activos (así como formas salinas de los mismos). Sin embargo, como se describe adicionalmente en la presente memoria, se describen métodos para preparar polímeros solubles en agua, - cuyos métodos se distinguen de los métodos anteriormente descritos para preparar polímeros solubles en agua - que son particularmente adecuados para preparar productos conjugados con agentes activos (así como sus formas salinas).

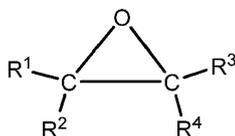
A este respecto, se describe un método, comprendiendo el método la etapa de alcoxilar en un disolvente adecuado un oligómero alcoxilable previamente aislado para formar un producto polimérico alcoxilado, en donde el oligómero alcoxilable previamente aislado tiene un peso molecular medio ponderal conocido y definido de más de 300 Dalton (p.ej., más de 500 Dalton).

La etapa de alcoxilación en el nuevo método de alcoxilación

La etapa de alcoxilación se lleva a cabo utilizando condiciones de alcoxilación, de manera que la adición secuencial de monómeros se efectúa mediante reacciones repetidas de un compuesto de oxirano. Cuando el oligómero alcoxilable tiene inicialmente uno o más grupos funcionales hidroxilo, uno o más de estos grupos hidroxilo en el oligómero alcoxilable se convertirán en un alcóxido reactivo por reacción con una base fuerte. A continuación, un compuesto de oxirano reacciona con un grupo funcional alcoxilable (p.ej., un alcóxido reactivo), con lo que no sólo se añade al alcóxido reactivo, sino que lo hace de una manera que también termina en otro alcóxido reactivo. A continuación, las reacciones repetidas de un compuesto de oxirano en el término del alcóxido reactivo del compuesto de oxirano previamente añadido y reaccionado producen eficazmente una cadena de polímero.

Aunque cada uno de uno o más grupos funcionales alcoxilables es preferiblemente hidroxilo, otros grupos tales como aminas, tioles y el grupo hidroxilo de un ácido carboxílico pueden servir como un grupo funcional alcoxilable aceptable. Además, debido a la acidez de los hidrógenos de los átomos de carbono alfa en los aldehídos, cetonas, nitrilos y amidas, la adición en los átomos de carbono alfa de estos grupos puede servir como un grupo funcional alcoxilable aceptable.

El compuesto de oxirano contiene un grupo oxirano y tiene la siguiente fórmula:



en donde (con respecto a esta estructura):

- R¹ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo (preferiblemente alquilo inferior cuando es alquilo);
- R² se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo (preferiblemente alquilo inferior cuando es alquilo);
- R³ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo (preferiblemente alquilo inferior cuando es alquilo); y
- R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo (preferiblemente alquilo inferior cuando es alquilo).

Con respecto a la anterior fórmula del compuesto de oxirano, se prefiere particularmente que cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ sea H, y se prefiere que sólo uno de R¹, R², R³ y R⁴ sea alquilo (p.ej., metilo y etilo) y los sustituyentes restantes son H. Los compuestos de oxirano ilustrativos son óxido de etileno, óxido de propileno y óxido de 1,2-butileno. La

cantidad de compuesto de oxirano añadida para dar lugar a condiciones de alcoxilación óptimas depende de una serie de factores, incluyendo la cantidad de oligómero alcoxilable de partida, el tamaño deseado del material polimérico alcoxilado resultante y el número de grupos funcionales alcoxilables sobre el oligómero alcoxilable. De este modo, cuando se desea un material polimérico alcoxilado mayor, está presente relativamente más compuesto de oxirano en las condiciones de alcoxilación. Similarmente, si (O_a) representa la cantidad de compuesto de oxirano necesaria para conseguir un tamaño dado de "crecimiento" de polímero en un solo grupo funcional alcoxilable, en ese caso un oligómero alcoxilable que porta dos grupos funcionales alcoxilables requiere $2x(O_a)$, un oligómero alcoxilable que porta tres grupos funcionales alcoxilables requiere $3x(O_a)$, un oligómero alcoxilable que porta cuatro grupos funcionales alcoxilables requiere $4x(O_a)$ y así sucesivamente. En todos los casos, un experto en la técnica puede determinar una cantidad apropiada de compuesto de oxirano requerida para las condiciones de alcoxilación teniendo en cuenta el peso molecular deseado del material polimérico alcoxilado y siguiendo la experimentación rutinaria.

Las condiciones de alcoxilación incluyen la presencia de una base fuerte. El propósito de la base fuerte es desprotonar cada hidrógeno ácido (p.ej., el hidrógeno de un grupo hidroxilo) presente en el oligómero alcoxilable y formar una especie iónica de alcóxido (o una especie iónica para grupos funcionales alcoxilables no hidroxilados). Las bases fuertes preferidas para uso como parte de las condiciones de alcoxilación son: metales alcalinos, tales como potasio metálico, sodio metálico y mezclas de metales alcalinos tales como aleaciones de sodio y potasio; hidróxidos, tales como NaOH y KOH; y alcóxidos (p.ej., presentes después de la adición de un compuesto de oxirano). Pueden utilizarse otras bases fuertes y pueden ser identificadas por un experto en la técnica. Por ejemplo, una base dada puede utilizarse como una base fuerte en la presente memoria si la base fuerte puede formar una especie iónica de alcóxido (o una especie iónica para grupos funcionales alcoxilables no hidroxilados) y también proporcionar un catión que no obstaculiza las especies iónicas de alcóxido, Con el fin de impedir (o impedir eficazmente a través de una reacción lenta y poco lenta) la reacción de la especie iónica de alcóxido con la molécula de oxirano. La base fuerte está presente en una cantidad generalmente pequeña y calculada, cuya cantidad puede caer en uno o más de los intervalos siguientes: de 0,001 a 10,0 por ciento en peso basado en el peso de la mezcla de reacción total; y de 0,01 a aproximadamente 6,0 por ciento en peso basado en el peso de la mezcla de reacción total.

Las condiciones de alcoxilación incluyen una temperatura adecuada para que ocurra la alcoxilación. Entre las temperaturas ilustrativas que pueden ser adecuadas para la alcoxilación se incluyen aquellas que caen en uno o más de los siguientes intervalos: de 10°C a 260°C; de 20°C a 240°C; de 30°C a 220°C; de 40°C a 200°C; de 50°C a 200°C; de 80°C a 140°C; y de 100°C a 120°C.

Las condiciones de alcoxilación incluyen una presión adecuada para que ocurra la alcoxilación. Entre las presiones ilustrativas que pueden ser adecuadas para la alcoxilación se incluyen aquellas que caen en uno o más de los intervalos siguientes: de 0,69 bar a 69,0 bar (10 psi a 1000 psi); de 1,03 bar a 34,5 bar (15 psi a 500 psi); de 1,38 bares a 17,2 bar (20 psi a 250 psi); de 1,72 bar a 6,90 bar (25 psi a 100 psi). Además, la presión de alcoxilación puede ser aproximadamente la presión atmosférica al nivel del mar (p.ej., 1013,25 bar (14696 libras por pulgada cuadrada) +/- 10%).

En algunos casos, las condiciones de alcoxilación incluyen la adición del compuesto de oxirano en forma líquida. En algunos casos, las condiciones de alcoxilación incluyen la adición del compuesto de oxirano en forma de vapor.

Las condiciones de alcoxilación pueden incluir el uso de un disolvente adecuado. De manera óptima, el sistema en donde se producen las condiciones de alcoxilación no incluirá ningún componente (incluyendo cualquier disolvente) que pueda ser desprotonado (o permanezca sustancialmente protonado bajo las condiciones de pH, temperatura etcétera bajo las cuales se producirán las condiciones de alcoxilación). Los disolventes adecuados para la alcoxilación incluyen disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consiste en tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), tolueno, benceno, xilenos, mesitileno, tetracloroetileno, anisol, dimetilacetamida y mezclas de los anteriores. Los disolventes menos ideales (pero aún no obstante contemplados) para uso como parte de las condiciones de alcoxilación son acetonitrilo, fenilacetanitrilo y acetato de etilo; en algunos casos, las condiciones de alcoxilación no incluirán como disolvente ninguno de acetonitrilo, fenilacetanitrilo y acetato de etilo.

En una o más realizaciones de la invención, cuando las condiciones de alcoxilación se llevan a cabo en la fase líquida, las condiciones de alcoxilación se llevan a cabo de tal manera que tanto el oligómero alcoxilable como el material polimérico alcoxilado deseado formado a partir de la alcoxilación del oligómero alcoxilable no sólo tienen solubilidades similares, (y, preferiblemente, sustancialmente la misma solubilidad) en el disolvente adecuado utilizado, pero también son ambos sustancialmente solubles en el disolvente adecuado. Por ejemplo, en una o más realizaciones, el oligómero alcoxilable será sustancialmente soluble en el disolvente utilizado en las condiciones de alcoxilación y el material polimérico alcoxilado resultante también será sustancialmente soluble en las condiciones de alcoxilación.

En una o más realizaciones, esta solubilidad sustancialmente igual del oligómero alcoxilado y el material polimérico

alcoxilado en un disolvente adecuado está en contraste con la solubilidad de una molécula precursora (utilizada, p.ej., en la preparación del oligómero alcoxilado previamente aislado) en el disolvente adecuado, en donde la molécula precursora puede tener una solubilidad inferior (e incluso sustancialmente inferior) en el disolvente adecuado que el oligómero alcoxilado y/o el material polimérico alcoxilado. A modo de ejemplo solamente, el oligómero alcoxilado y el material polimérico alcoxilado tendrán ambos un núcleo de pentaeritritol y ambos serán sustancialmente solubles en tolueno, pero el propio pentaeritritol tiene solubilidad limitada en tolueno.

Se prefiere particularmente que el disolvente empleado en las condiciones de alcoxilación sea tolueno. La cantidad de tolueno utilizada para la reacción es mayor de 25% en peso y menor de 75% en peso de la mezcla de reacción, basándose en el peso de la mezcla de reacción después de la adición completa del compuesto de oxirano. Un experto en la técnica puede calcular la cantidad de partida del disolvente tomando en consideración el peso molecular deseado del polímero, el número de sitios para los cuales tendrá lugar la alcoxilación, el peso del oligómero alcoxilable utilizado, etcétera.

Se prefiere que la cantidad de tolueno se mida de manera que la cantidad sea suficiente para las condiciones de alcoxilación proporcionando el material polimérico alcoxilado deseado.

Además, se prefiere particularmente que las condiciones de alcoxilación no tengan sustancialmente agua presente. Por lo tanto, se prefiere que las condiciones de alcoxilación tengan un contenido de agua inferior a 100 ppm, más preferiblemente 50 ppm, todavía más preferiblemente 20 ppm, mucho más preferiblemente menos de 14 ppm, e incluso aún más preferiblemente menos de 8 ppm.

Las condiciones de alcoxilación tienen lugar en un recipiente de reacción adecuado, típicamente un recipiente de reactor de acero inoxidable.

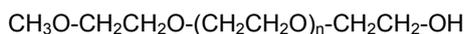
En una o más realizaciones, son aceptables el oligómero alcoxilable y/o molécula precursora que carecen de un grupo isocianato unido a un carbono que porta un hidrógeno alfa. En una o más realizaciones, el oligómero alcoxilable previamente preparado y/o molécula precursora carece de un grupo isocianato.

El oligómero alcoxilable en el nuevo método de alcoxilación

El oligómero alcoxilable utilizado en el nuevo método de alcoxilación debe tener al menos un grupo funcional alcoxilable. Sin embargo, el oligómero alcoxilable puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más grupos funcionales alcoxilables, con una preferencia por un oligómero alcoxilable que tenga de uno a seis grupos funcionales alcoxilables.

Como se ha indicado anteriormente, cada grupo funcional alcoxilable dentro del oligómero alcoxilable puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, ácido carboxílico, amina, tiol, aldehído, cetona y nitrilo. En aquellos casos en los que hay más de un grupo funcional alcoxilable dentro del oligómero alcoxilable, es típico que cada grupo funcional alcoxilable sea el mismo (p.ej., cada grupo funcional alcoxilable dentro del oligómero alcoxilable sea hidroxilo), aunque también se contemplan ejemplos de diferentes grupos funcionales alcoxilables dentro del mismo oligómero alcoxilable. Cuando el grupo funcional alcoxilable es hidroxilo, se prefiere que el hidroxilo sea un hidroxilo primario.

El oligómero alcoxilable puede adoptar cualquiera de una serie de geometrías posibles. Por ejemplo, el oligómero alcoxilable puede ser lineal. En un ejemplo de un oligómero alcoxilable lineal, un extremo del oligómero lineal alcoxilable es un grupo funcional relativamente inerte (p.ej., un grupo con protección terminal) y el otro extremo es un grupo funcional alcoxilable (p.ej., hidroxilo). Un oligómero alcoxilable ilustrativo de esta estructura es metoxi-PEG-OH, o mPEG abreviado, en el que un extremo es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo. La estructura de mPEG se da a continuación.

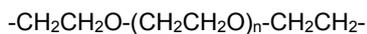


(en donde, para la estructura inmediatamente anterior solamente, n es un número entero de 13 a 100).

Otro ejemplo de una geometría lineal que puede adoptar el oligómero alcoxilable es un polímero orgánico lineal que porta grupos funcionales alcoxilables (iguales o diferentes) en cada extremo. Un oligómero alcoxilable ilustrativo de esta estructura es el alfa, omega-dihidroxiolipoli(etilenglicol), o



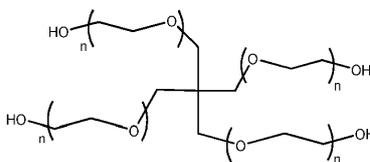
(en donde, solo para la estructura inmediatamente precedente, n es un número entero de 13 a 100), que se puede representar de forma abreviada como HO-PEG-OH donde se entiende que el símbolo -PEG representa la siguiente unidad estructural:



(en donde, para la estructura inmediatamente anterior solamente, n es un número entero de 13 a 100).

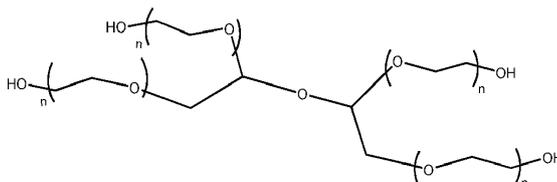
5 Otra geometría que puede tener el oligómero alcoxilable es una estructura "multibrazo" o ramificada. Con respecto a tales estructuras ramificadas, uno o más átomos en el oligómero alcoxilable sirven como un "átomo de punto de ramificación", a través del cual están conectados dos, tres, cuatro o más (pero típicamente dos, tres o cuatro) conjuntos distintos de monómeros repetidos o "brazos" (ya sea directamente ya sea través de uno o más átomos).
 10 Como mínimo, una estructura "multibrazo" como la utilizada en la presente memoria tiene tres o más ramificaciones distintas, pero puede tener hasta cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más brazos, con 4 a 8 estructuras multibrazo preferidas (tales como una estructura de 4 brazos, una estructura de 5 brazos, una estructura de 6 brazos y una estructura de 8 brazos).

15 A continuación se proporcionan estructuras multibrazo ilustrativas para el oligómero alcoxilable:



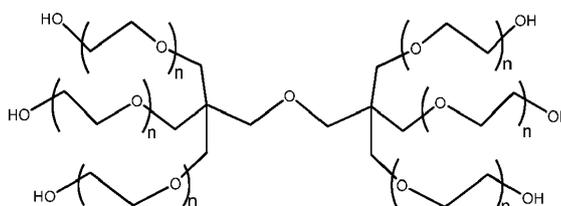
en donde (para la estructura inmediatamente anterior solamente) el valor medio de n es de 1 a 50, p.ej., de 10 a 50, (o definido de otro modo de tal manera que el peso molecular de la estructura sea de 300 Dalton a 9.000 Dalton (p.ej., de aproximadamente 500 Dalton a 5.000 Dalton);

20



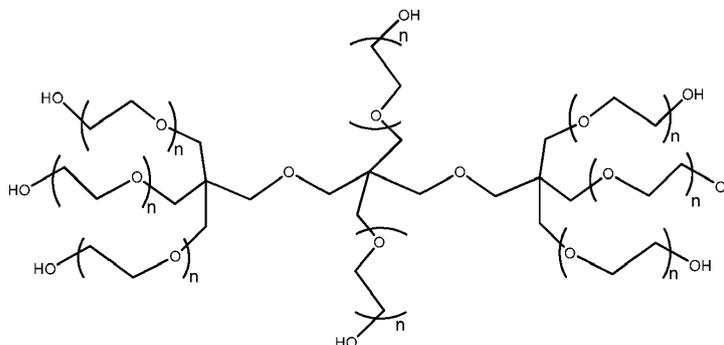
en donde (para la estructura inmediatamente anterior solamente) el valor medio de n es de 2 a 50, p.ej., de 10 a 50 (o definido de otro modo de tal manera que el peso molecular de la estructura sea de 300 Dalton a 9.000 Dalton (p.ej., de aproximadamente 500 Dalton a 5.000 Dalton);

25



en donde (para la estructura inmediatamente anterior solamente) el valor medio de n es de 2 a 35, p.ej., de 8 a aproximadamente 40 (o definido de otro modo de tal manera que el peso molecular de la estructura sea de 750 Dalton a 9.500 Dalton (p.ej., de 500 Dalton a 5.000 Dalton); y

30



en donde (para la estructura inmediatamente anterior solamente) el valor medio de n es 2 a 35, p.ej., de 5 a 35, (o definido de otra manera de manera tal que el peso molecular de la estructura sea de 1.000 Dalton a 13.000 Dalton (p.ej., de 500 Dalton a 5.000 Dalton).

35

Para cada una de las cuatro estructuras inmediatamente anteriores, se prefiere que el valor de n, en cada caso, sea sustancialmente el mismo. Por lo tanto, se prefiere que cuando se consideran todos los valores de n para un oligómero alcoxilable dado, todos los valores de n para ese oligómero alcoxilable estén dentro de tres desviaciones típicas, más preferiblemente dentro de dos desviaciones típicas y aún más preferiblemente dentro de una desviación típica.

En términos del peso molecular del oligómero alcoxilable, el oligómero alcoxilable tendrá un peso molecular medio ponderal conocido y definido. Para su uso en la presente memoria, sólo se puede conocer y definir un peso molecular medio ponderal para un oligómero alcoxilable cuando el oligómero alcoxilable está aislado del medio sintético a partir del cual fue generado. Los pesos moleculares medios ponderales ilustrativos para el oligómero alcoxilable caerán en uno o más de los siguientes intervalos: mayor de 300 Dalton; mayor que 500 Dalton; de 300 Dalton a 15.000 Dalton; de 500 Dalton a 5.000 Dalton; de 300 Dalton a 10.000 Dalton; de 500 Dalton a 4.000 Dalton; de 300 Dalton a 5.000 Dalton; de 500 Dalton a 3.000 Dalton; de 300 Dalton a 2.000 Dalton; de 500 Dalton a 2.000 Dalton; de 300 Dalton a 1.000 Dalton; de 500 Dalton a 1.000 Dalton; de 1.000 Dalton a 10.000 Dalton; de 1.000 Dalton a 5.000 Dalton; de 1.000 Dalton a 4.000 Dalton; de 1.000 Dalton a 3.000 Dalton; de 1.000 Dalton a 2.000 Dalton; de 1.500 Dalton a 15.000 Dalton; de 1.500 Dalton a 5.000 Dalton; de 1.500 Dalton a 10.000 Dalton; de 1.500 Dalton a 4.000 Dalton; de 1.500 Dalton a 3.000 Dalton; de 1.500 Dalton a 2.000 Dalton; de 2.000 Dalton a 5.000 Dalton; de 2.000 Dalton a 4.000 Dalton; y de 2.000 Dalton a 3.000 Dalton.

Preferiblemente, el oligómero alcoxilable se aísla previamente. Por aislamiento previo se entiende que el oligómero alcoxilable existe fuera y separado del medio sintético a partir del cual se generó (más típicamente fuera de las condiciones de alcoxilación utilizadas para preparar el oligómero alcoxilable) y puede almacenarse opcionalmente durante un periodo de tiempo relativamente largo u opcionalmente puede almacenarse durante un tiempo más corto sin cambiar sustancialmente para su uso posterior. De este modo, un oligómero alcoxilable se aísla previamente si, p.ej., está alojado en un entorno inerte. A este respecto, un oligómero alcoxilado previamente aislado puede alojarse en un recipiente que carece sustancialmente (p.ej., menos del 0,1% en peso) de un compuesto de oxirano. Asimismo, un oligómero alcoxilable previamente aislado no cambia su peso molecular más de 10% en el transcurso de 15 días. Por lo tanto, en una o más realizaciones de la invención, el concepto de "previamente aislado" contrasta (por ejemplo) con una situación en donde se permite que una reacción de alcoxilación continua e ininterrumpida prosiga desde la molécula precursora, en una estructura que corresponda con un oligómero alcoxilable, a una estructura que corresponda a un material polimérico alcoxilado; el concepto de "aislado previamente" requiere que el oligómero alcoxilable exista aparte de las condiciones a partir de las cuales se formó. Conforme a lo dispuesto en la presente invención, sin embargo, el oligómero alcoxilable previamente aislado se someterá a una etapa de alcoxilación una vez que se añada, como etapa separada, en las condiciones de alcoxilación.

Fuentes del Oligómero Alcoxilable en el Nuevo Método de Alcoxilación

El oligómero alcoxilable se puede obtener por medios sintéticos. A este respecto, el oligómero alcoxilable se prepara por medio de (a) alcoxilación de una molécula precursora que tiene un peso molecular de menos de 300 Dalton (p.ej., menos de 500 Dalton) para formar una mezcla de reacción que comprende un oligómero o prepolímero alcoxilable, y (b) aislamiento del oligómero alcoxilable de la mezcla de reacción. La etapa de alcoxilación de la molécula precursora sigue en gran medida las condiciones y requerimientos de la etapa de alcoxilación previamente discutida. La etapa de aislamiento del oligómero alcoxilable se puede llevar a cabo utilizando cualquier etapa conocida en la técnica, pero puede incluir permitir que todo el compuesto de oxirano sea consumido en la reacción, realizar activamente una etapa de enfriamiento rápido, separar la mezcla de reacción final mediante enfoques conocidos en la técnica (incluyendo, por ejemplo, la destilación de todos los materiales volátiles, la eliminación del subproducto de reacción sólido por filtración o el lavado y la aplicación de medios cromatográficos).

Además, el oligómero alcoxilable se puede obtener a partir de fuentes comerciales. Las fuentes comerciales ilustrativas incluyen NOF Corporation (Tokio Japón) que proporciona oligómeros alcoxilables bajo los nombres poli(etilenglicol) SUNBRIGHT DKH[®], glicerina SUNBRIGHT[®] GL, éter de tri-poli(etilenglicol), pentaeritritol SUNBRIGHT PTE[®], éter de tetra-poli(etilenglicol), diglicerina SUNBRIGHT[®] DG, éter de tetra-poli(etilenglicol), y hexaglicerina SUNBRIGHT HGEO[®], éter de octa-poli(etilenglicol). Los oligómeros alcoxilables preferidos incluyen aquellos que tienen las estructuras de pentaeritritol SUNBRIGHT PTE[®]-2000, éter de tetra-poli(etilenglicol) (que tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 2.000 Dalton) y di-glicerina SUNBRIGHT[®]DG-2000, éter de tetra-poli(etilenglicol) (que tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 2.000 Dalton).

Las moléculas precursoras pueden ser cualquier molécula pequeña (p.ej., un peso molecular menor que el peso molecular medio ponderal del oligómero alcoxilable) que tenga uno o más grupos funcionales alcoxilables.

Las moléculas precursoras ilustrativas incluyen polioles, que son moléculas pequeñas (típicamente de un peso molecular de menos de 300 Dalton, p.ej., menos de 500 Dalton) que tienen una pluralidad de grupos hidroxilo disponibles. Dependiendo del número deseado de brazos poliméricos en el oligómero o prepolímero alcoxilable, el polioli que sirve como molécula precursora comprenderá típicamente de 3 a aproximadamente 25 grupos hidroxilo, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 22 grupos hidroxilo, lo más preferiblemente de

aproximadamente 4 a aproximadamente 12 grupos hidroxilo. Los polioles preferidos incluyen oligómeros o polímeros de glicerol tales como hexaglicerol, pentaeritritol y oligómeros o polímeros de los mismos (p.ej., dipentaeritritol, tripentaeritritol, tetrapentaeritritol y formas etoxiladas de pentaeritritol), y alcoholes derivados de azúcares tales como sorbitol, arabanitol y manitol. Además, muchos polioles comercialmente disponibles, tales como diversos isómeros de inositol (es decir, 1,2,3,4,5,6-hexahidroxociclohexano), 2,2-bis(hidroximetil)-1-butanol, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS), 2-[bis(2-hidroxietil)amino]-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, {[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]amino}acético (Tricina), 2-[(3-[[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]amino]propil)amino]-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, ácido 2-[[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]amino]etanosulfónico (TES), ácido 4-[[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]amino]-1-butanosulfónico, e hidrocloreto de 2-[bis(2-hidroxietil)amino]-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol pueden servir como una molécula precursora aceptable. En aquellos casos en los que la molécula precursora tiene uno o varios grupos ionizables que interfieren en la etapa de alcoxilación, dichos grupos ionizables deben ser protegidos o modificados antes de llevar a cabo la etapa de alcoxilación.

Las moléculas precursoras ilustrativas preferidas incluyen aquellas moléculas precursoras seleccionadas del grupo que consiste en glicerol, diglicerol, triglicerol, hexaglicerol, manitol, sorbitol, pentaeritritol, dipentaeritritol y tripentaeritritol.

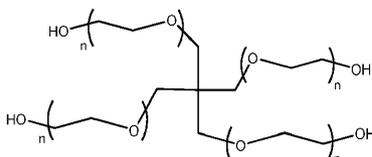
En una o más realizaciones de la invención, se prefiere que ni el oligómero alcoxilable previamente aislado ni el producto polimérico alcoxilado tengan un grupo funcional alcoxilable (p.ej., un grupo hidroxilo) de la molécula precursora.

Materiales poliméricos alcoxilados generados por el nuevo método de alcoxilación

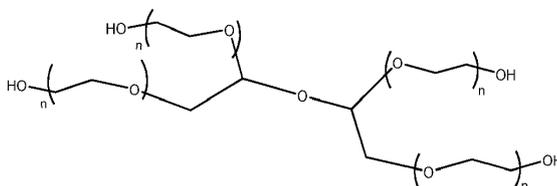
El material polimérico alcoxilado preparado con los métodos descritos en la presente memoria tendrá una arquitectura alcalina que corresponda a la estructura del oligómero alcoxilable (es decir, un oligómero alcoxilable lineal da como resultado un material polimérico alcoxilado lineal, un oligómero alcoxilable de cuatro brazos da como resultado un polímero alcoxilado de cuatro brazos, etc.). Como consecuencia, el material polimérico alcoxilado adoptará cualquiera de una serie de posibles geometrías, incluyendo lineal, ramificada y multibrazo.

Con respecto a las estructuras ramificadas, un material polimérico alcoxilado ramificado tendrá tres o más ramificaciones distintas, pero puede tener hasta cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más ramificaciones, prefiriéndose estructuras ramificadas de 4 a 8 ramificaciones (tal como una estructura ramificada de 4 brazos, una estructura ramificada de 5 brazos, una estructura ramificada de 6 brazos y una estructura ramificada de 8 brazos).

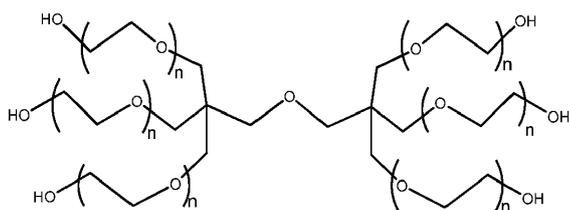
A continuación se proporcionan estructuras ramificadas ilustrativas para el material polimérico alcoxilado:



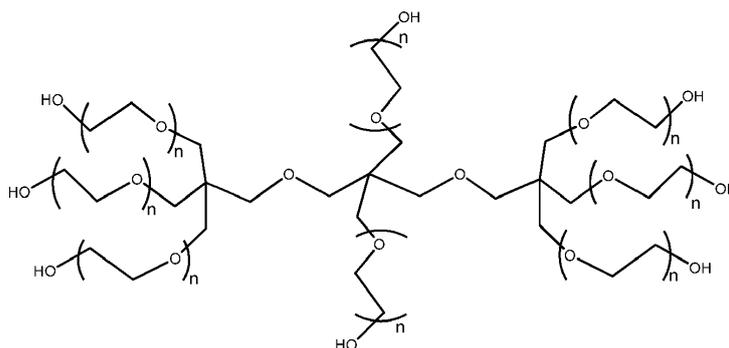
en donde (para la estructura inmediatamente anterior solamente) el valor medio de n satisface uno o más de los intervalos siguientes: de 10 a 1.000; de 10 a 500; de 10 a 250; de 50 a 1000; de 50 a 250; y de 50 a 120 (o definido de otro modo de manera que el peso molecular de la estructura sea de 2.000 Dalton a 180.000 Dalton, p.ej., de 2.000 Dalton a 120.000 Dalton);



en donde (para la estructura inmediatamente anterior solamente) el valor medio de n satisface uno o más de los intervalos siguientes: de 10 a 1.000; de 10 a 500; de 10 a 250; de 50 a 1.000; de 50 a 250; y de 50 a 120 (o definido de otro modo de manera que el peso molecular de la estructura sea de 2.000 Dalton a 180.000 Dalton, p.ej., de 2.000 Dalton a 120.000 Dalton);



5 en donde (para la estructura inmediatamente anterior solamente) el valor medio de n satisface uno o más de los intervalos siguientes: de 10 a 750; de 40 a 750; de 50 a 250; y de 50 a 120 (o definido de otro modo de manera que el peso molecular de la estructura sea de 3.000 Dalton a 200.000 Dalton, p.ej., de 12.000 Dalton a 200.000 Dalton); y



10 en donde (para la estructura inmediatamente anterior solamente) el valor medio de n satisface uno o más de los intervalos siguientes: de 10 a 600 y de 35 a 600 (o definido de otro modo de tal manera que el peso molecular de la estructura sea de 4.000 Dalton a 215.000 Dalton, p.ej., de 12.000 Dalton a 215.000 Dalton).

15 Para cada una de las cuatro estructuras proporcionadas inmediatamente, se prefiere que el valor de n , en cada caso, sea sustancialmente el mismo. Por lo tanto, se prefiere que cuando se consideren todos los valores de n para un material polimérico alcoxilado dado, todos los valores de n para dicho oligómero o prepolímero alcoxilable de material polimérico alcoxilado estén dentro de tres desviaciones típicas, más preferiblemente dentro de dos desviaciones típicas y todavía más preferiblemente dentro de una desviación típica.

20 En cuanto al peso molecular del material polimérico alcoxilado, el material polimérico alcoxilado tendrá un peso molecular promedio en número conocido y definido. Para su uso en la presente memoria, sólo se puede conocer y definir un peso molecular promedio en número para el material que está aislado del medio sintético a partir del cual se generó.

25 El peso molecular total del producto polimérico alcoxilado puede ser un peso molecular adecuado para el propósito previsto. Un peso molecular aceptable para cualquier propósito dado se puede determinar mediante ensayo y error a través de experimentación rutinaria. Los pesos moleculares ilustrativos para el producto polimérico alcoxilado, tendrán un peso molecular promedio en número que caerá dentro de uno o más de los siguientes intervalos: de 2.000 Dalton a 215.000 Dalton; de 5.000 Dalton a 215.000 Dalton; de 5.000 Dalton a 150.000 Dalton; de 5.000 Dalton a 100.000 Dalton; de 5.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 6.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 7.500 Dalton a 80.000 Dalton; de 9.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 10.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 12.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 15.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 20.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 25.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 30.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 40.000 Dalton a 80.000 Dalton; de 6.000 Dalton a 60.000 Dalton; de 7.500 Dalton a 60.000 Dalton; de 9.000 Dalton a 60.000 Dalton; de 10.000 Dalton a 60.000 Dalton; de 12.000 Dalton a 60.000 Dalton; de 15.000 Dalton a 60.000 Dalton; de 20.000 Dalton a 60.000 Dalton; de 25.000 Dalton a 60.000 Dalton; de 30.000 Dalton a 60.000; de 6.000 Dalton a 40.000 Dalton; de 9.000 Dalton a 40.000 Dalton; de 10.000 Dalton a 40.000 Dalton; de 15.000 Dalton a 40.000 Dalton; de 19.000 Dalton a 40.000 Dalton; de 15.000 Dalton a 25.000 Dalton; y de 18.000 Dalton a 22.000 Dalton.

40 Para cualquier material polimérico alcoxilado dado, se puede llevar a cabo una etapa opcional para transformar adicionalmente el material polimérico alcoxilado de manera que porte un grupo reactivo específico para formar un reactivo polimérico. Por lo tanto, utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, el material polimérico alcoxilado puede ser funcionalizado para incluir un grupo reactivo (p.ej., ácido carboxílico, éster activo, amina, tiol, maleimida, aldehído, cetona, etc.).

45 Al llevar a cabo una etapa opcional para transformar adicionalmente el producto polimérico alcoxilado de manera

que porte un grupo reactivo específico, tal etapa opcional se lleva a cabo en un disolvente adecuado. Un experto en la técnica puede determinar si cualquier disolvente específico es apropiado para cualquier etapa de reacción dada. A menudo, sin embargo, el disolvente es preferiblemente un disolvente no polar o un disolvente polar. Los ejemplos no limitantes de los disolventes no polares incluyen benceno, xilenos y tolueno. Los disolventes polares ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, dioxano, tetrahidrofurano (THF), alcohol *t*-butílico, DMSO (dimetilsulfóxido), HMPA (hexametilfosforamida), DMF (dimetilformamida), DMA (dimetilacetamida) y NMP (N-metilpirrolidinona).

Otras composiciones del material polimérico alcoxilado

También se describen en la presente memoria composiciones que comprenden el material polimérico alcoxilado, que incluyen no sólo cualquier composición que comprende el material polimérico alcoxilado, sino también composiciones en las que el material polimérico alcoxilado se transforma adicionalmente, p.ej., en un reactivo polimérico, así como composiciones de productos conjugados formados por acoplamiento de tales reactivos poliméricos con un agente activo. Entre otras cosas, un beneficio del método descrito en la presente memoria es la capacidad de conseguir composiciones que contienen material polimérico alcoxilado de alta pureza. Las composiciones se pueden caracterizar por tener: un contenido sustancialmente bajo tanto de impurezas de alto peso molecular (p.ej., especies que contienen polímero que tienen un peso molecular mayor que el peso molecular del material polimérico alcoxilado deseado) como de impurezas de diol de bajo peso molecular (es decir, HO-PEG-OH), ya sea el tipo de impureza (y preferiblemente ambos tipos de impurezas) que suman menos de 8% en peso y más preferiblemente menos de 2% en peso. Además o alternativamente, las composiciones también se pueden caracterizar por tener una pureza de material polimérico alcoxilado (así como composiciones que comprenden reactivos poliméricos formados a partir del material polimérico alcoxilado, y composiciones de productos conjugados formados a partir de la conjugación de tales reactivos poliméricos y un agente activo) mayor de 92% en peso, más preferiblemente mayor de 97% en peso. La cromatografía de penetración en gel (GPC) y la cromatografía de filtración en gel (GFC) se pueden usar para caracterizar el material polimérico alcoxilado. Estos métodos cromatográficos permiten la separación de la composición en sus componentes de acuerdo con el peso molecular. Las trazas de GFC ilustrativas de los productos descritos en el Ejemplo 7 y el Ejemplo 8 se proporcionan como **FIG. 7** y **FIG. 8**, respectivamente.

Usos ilustrativos de los materiales poliméricos alcoxilados y composiciones formadas a partir de ellos

El material polimérico alcoxilado descrito en la presente memoria, así como los productos poliméricos alcoxilados que han sido modificados adicionalmente para portar un grupo reactivo específico (denominados en lo sucesivo "reactivo polimérico") son útiles para la conjugación, p.ej., de agentes activos. Los grupos preferidos de los agentes biológicamente activos adecuados para la reacción con los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria son grupos electrófilos y nucleófilos. Los grupos ilustrativos incluyen aminas primarias, ácidos carboxílicos, alcoholes, tioles, hidracinas e hidrazidas. Tales grupos adecuados para reaccionar con los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria son conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, también se proporciona un método para preparar un producto conjugado que comprende la etapa de poner en contacto, en condiciones de conjugación, un agente activo con un reactivo polimérico descrito en la presente memoria.

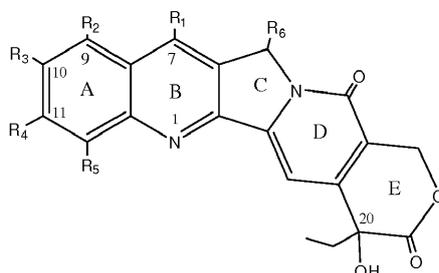
Las condiciones de conjugación adecuadas son las condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración de reactivo, grupo o grupos funcionales reactivos, grupos funcionales disponibles sobre el agente activo, disolvente y similares suficientes para efectuar la conjugación entre un reactivo polimérico y un agente activo. Como es sabido en la técnica, las condiciones específicas dependen, entre otras cosas, del agente activo, del tipo de conjugación deseada, de la presencia de otros materiales en la mezcla de reacción, etcétera. Las condiciones suficientes para efectuar la conjugación en cualquier caso particular pueden ser determinadas por un experto en la técnica tras una lectura de la descripción de la presente memoria, referencia a la bibliografía pertinente, y/o a través de experimentación rutinaria.

Por ejemplo, cuando el reactivo polimérico contiene un éster activo de N-hidroxisuccinimida (p.ej., succinato de succinimidilo, propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo), y el agente activo contiene un grupo amina, la conjugación puede efectuarse a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,5 a temperatura ambiente. Además, cuando el reactivo polimérico contiene un grupo reactivo de vinilsulfona o un grupo maleimida y el agente farmacológicamente activo contiene un grupo sulfhidrilo, la conjugación se puede efectuar a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,5 a temperatura ambiente. Además, cuando el grupo reactivo asociado con el reactivo polimérico es un aldehído o una cetona y el agente farmacológicamente activo contiene una amina primaria, la conjugación se puede efectuar mediante aminación reductora en donde la amina primaria del agente farmacológicamente activo reacciona con el aldehído o la cetona del polímero. Teniendo lugar a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9,5, la aminación reductora da como resultado inicialmente un producto conjugado en donde el agente farmacológicamente activo y el polímero están conectados mediante un enlace imina. El tratamiento subsiguiente del producto conjugado que contiene el enlace imina con un agente reductor adecuado tal como NaCNBH₃ reduce la imina a una amina secundaria. Para obtener información adicional sobre estas y otras reacciones de conjugación, se hace referencia a Hermanson "Bioconjugate Techniques", Academic Press, 1996.

- Las condiciones de conjugación ilustrativas incluyen llevar a cabo la reacción de conjugación a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 y, p.ej., a un pH de aproximadamente 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10,0. Se deja que la reacción continúe de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 72 horas, preferiblemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas, y más preferiblemente de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas. La temperatura a la cual puede tener lugar la conjugación se encuentra típicamente, aunque no necesariamente, en el intervalo de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40° C, y es a menudo a temperatura ambiente o a una temperatura inferior. Las reacciones de conjugación se llevan a cabo a menudo utilizando una solución de tampón fosfato, acetato de sodio o sistema similar.
- Con respecto a la concentración de reactivo, se combina típicamente un exceso del reactivo polimérico con el agente activo. En algunos casos, sin embargo, se prefiere tener cantidades estequiométricas de grupos reactivos sobre el reactivo polimérico con respecto a los grupos reactivos del agente activo. Así, p.ej., un mol de un reactivo polimérico que porta cuatro grupos reactivos se combina con cuatro moles de agente activo. Las razones ilustrativas de los grupos reactivos del reactivo polimérico con respecto al agente activo incluyen razones molares de aproximadamente 1:1 (grupo reactivo del reactivo polimérico:agente activo), 1:0,1, 1:0,5, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8 o 1:10. Se deja que la reacción de conjugación continúe hasta que prácticamente no se produzca ninguna conjugación adicional, lo que generalmente se puede determinar controlando el progreso de la reacción a lo largo del tiempo.
- El progreso de la reacción se puede controlar retirando alícuotas de la mezcla de reacción en diversos puntos temporales y analizando la mezcla de reacción por métodos cromatográficos, SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF, RMN, IR o cualquier otro método analítico adecuado. Una vez que se alcanza una meseta con respecto a la cantidad de producto conjugado formado o la cantidad de reactivo polimérico no conjugado que queda, se supone que la reacción se ha completado. Típicamente, la reacción de conjugación lleva desde minutos hasta varias horas (p.ej., de 5 minutos a 24 horas o más). La mezcla de producto resultante está preferiblemente, pero no necesariamente purificada, para separar el exceso de agente activo, base fuerte, agentes de condensación y subproductos de reacción y disolventes. Los productos conjugados resultantes se pueden caracterizar a continuación adicionalmente utilizando métodos analíticos tales como métodos cromatográficos, métodos espectroscópicos, MALDI, electroforesis capilar y/o electroforesis en gel. Los productos conjugados de polímero agente activo se pueden purificar para obtener/aislar diferentes especies conjugadas.
- Con respecto a un agente activo, el material polimérico alcoxilado y un reactivo polimérico preparado a partir del material polimérico alcoxilado se pueden combinar en condiciones de conjugación adecuadas para dar como resultado un producto conjugado. A este respecto, como se describe en general en la presente memoria, los agentes activos pueden ser un agente activo seleccionado del grupo que consiste en un fármaco de molécula pequeña, un oligopéptido, un péptido y una proteína. El agente activo para su uso en la presente memoria puede incluir pero no se limita a los siguientes: adriamicina, ácido γ -aminobutírico (GABA), amiodarona, amitriptilina, azitromicina, benzfetamina, bromofeniramina, cabinoxamina, calcitonina clorambucilo, cloroprocaína, cloroquina, clorfenamicina, clorpromazina, cinarizina, claritromicina, clomifeno, ciclobenzaprina, ciclopentolato, ciclofosfamida, dacarbazina, daunomicina, demeclociclina, dibucaína, diciclomina, dietilproprión, diltiazem, dimenhidrinato, difenhidramina, disopiramida, doxepina, doxiciclina, doxilamina, dipiridamol, EDTA, eritromicina, flurazepam, violeta de genciana, hidroxicloproquina, imipramina, insulina, metotrexato, metoclopramida, minociclina, naftifina, nicardipina, nizatidina, orfenadrina, oxibutina, oxitetraciclina, fenoxibenzamina, fentolamina, procainamida, procaína, promazina, prometazina, proparacaína, propoxicaína, propoxifeno, ranitidina, tamoxifeno, terbinafina, tetracaína, tetraciclina, tramadol, triflupromazina, trimeprazina, trimetilbenzamida, trimipramina, trilpelamina, troleandomicina, tiramina, uracilo mostaza, verapamilo y vasopresina.
- Otros agentes activos incluyen los seleccionados del grupo que consiste en acravistina, amoxapina, astemizol, atropina, azitromicina, benzapril, benztropina, beperiden, bupracaína, buprenorfina, buspirona, butorfanol, cafeína, camptotecina y moléculas pertenecientes a la familia de la camptotecina, ceftriaxona, clorpromazina, ciprofloxacina, cladamina, clemastina, clindamicina, clofazamina, clozapina, cocaína, codeína, ciproheptadina, desipramina, dihidroergotamina, difenidol, difenoxilato, dipiridamol, docetaxel, doxapram, ergotamina, famciclovir, fentanilo, flavoxato, fludarabina, flufenazina, fluvastina, ganciclovir, granisteron, guanetidina, haloperidol, homatropina, hidrocodona, hidromorfona, hidroxizina, hiosciamina, imipramina, itraconazol, keterolaco, cetozonazol, levocarbastina, levorфона, lincomicina, lomefloxacina, loperamida, losartán, loxapina, mazindol, meclizina, meperidina, mepivacaína, mesoridazina, metdilazina, metenamina, metimazol, metotrimeperazina, metisergida, metronidazol, minoxidilo, mitomicina c, molindona, morfina, nafzodona, nalbufina, ácido naldixico, nalmefeno, naloxona, naltrexona, nafazolina, nedocromilo, nicotina, norfloxacina, ofloxacina, ondansteron, oxicondona, oximorfona, paclitaxel, pentazocina, pentoxifilina, perfenazina, fisostigmina, pilocarpina, pimozida, pramoxina, prazosina, proclorperazina, promazina, prometazina, quinidina, quinina, alcaloides de rauwolfia, riboflavina, rifabutina, risperidona, rocuroonio, escopalamina, sufentanilo, tacrina, terazosina, terconazol, terfenadina, tiordazina, tiotixeno, ticlodipina, timolol, tolazamida, tolmetina, trazodona, trietilperazina, trifluopromazina, trihexilfenidilo, trimeprazina, trimipramina, tubocurarina, vecuronio, vidarabina, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

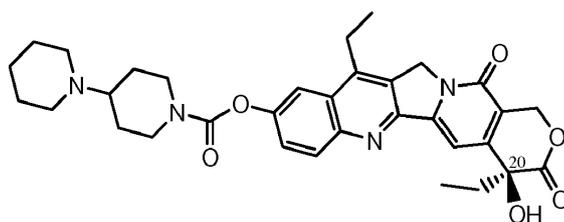
Otros agentes activos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en acetazolamida, acravistina, aciclovir, fosfato de adenosina, alopurinal, alprazolam, amoxapina, amrinona, apraclonidina, azatadina, aztreonam, bisacodilo, bleomicina, bromofeniramina, buspirona, butoconazol, camptotecina y moléculas dentro de la familia de la camptotecina, carbinoxamina, cefamandol, cefazol, cefixima, cefmetazol, cefonicid, cefoperazona, cefotaxima, cefotetan, cefpodoxima, ceftriaxona, cefapirina, cloroquina, clorfeniramina, cimetidina, cladarabina, clotrimazol, cloxacilina, didanosina, dipiridamol, doxazosina, doxilamina, econazol, enoxacina, estazolam, etionamida, famciclovir, famotidina, fluconazol, fludarabina, ácido fólico, ganciclovir, hidroxiclороquina, iodoquinol, isoniazida, itraconazol, ketoconazol, lamotrigina, lansoprazol, lorcetadina, losartan, mebendazol, mercaptopurina, metotrexato, metronidazol, miconazol, midazolam, minoxidil, nafzodona, ácido naldíxico, niacina, nicotina, nizatidina, omeprazol, oxaprozina, oxiconazol, papaverina, pentostatina, fenazopiridina, pilocarpina, piroxicam, prazosina, primaquina, pirazinamida, pirimetamina, piroxidina, quinidina, quinina, ribaverina, rifampina, sulfadiazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfasoxazol, terazosina, tiabendazol, tiamina, tioguanina, timolol, trazodona, triamptereo, triazolam, trimetadiona, trimetoprim, trimetrexato, triplenamina, tropicamida, y vidarabina.

15 Otros agentes activos adicionales incluyen los que pertenecen a la familia de las moléculas de camptotecina. Por ejemplo, el agente activo puede poseer la estructura general:



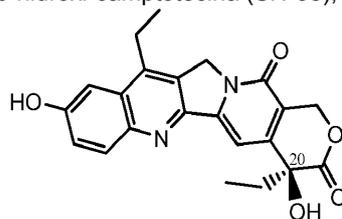
20 en donde R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno; halo; acilo; alquilo (p.ej., alquilo C₁-C₆); alquilo sustituido; alcoxi (p.ej., alcoxi C₁-C₆); alcoxi sustituido; alquenoilo; alquinoilo; cicloalquilo; hidroxilo; ciano; nitro; azido; amido; hidrazina; aminado; amino sustituido (p.ej., monoalquilamino y dialquilamino); hidroxicarbonilo; alcocarbonilo; alquilcarbonilo; alquilcarbonilamino; carbamoilo; arilsulfonilo; alquilsulfonilo; -C(R₇)=N-(O)-R₈ en donde R₇ es H, alquilo, alquenoilo, cicloalquilo o arilo, i es 0 ó 1 y R₈ es H, alquilo, alquenoilo, cicloalquilo o heterociclo; y R₉C(O)O- en donde R₉ es halógeno, amino, amino sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, o R₁₀-O-(CH₂)_m- donde m es un número entero de 1 a 10 y R₁₀ es alquilo, fenilo, fenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido; o R₂ junto con R₃ o R₃ junto con R₄ forman metilendioxi sustituido o no sustituido, etilendioxi, o etilenoxi; R₆ es H u OR', en donde R' es alquilo, alquenoilo, cicloalquilo, haloalquilo o hidroxialquilo. Aunque no se muestran, los análogos que tienen un grupo hidroxilo correspondiente a una posición distinta de la posición 20 (p.ej., la posición 10 u 11, etcétera) en la estructura inmediatamente anterior están incluidos dentro de posibles agentes activos.

El agente activo de acuerdo con la invención es el irinotecán.



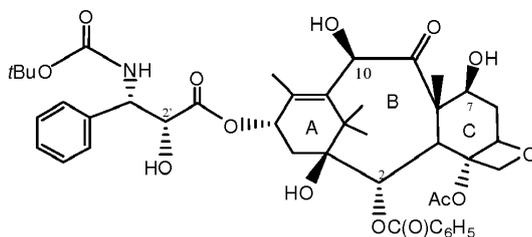
35 **Irinotecán**

Otro agente activo ilustrativo es la 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38), cuya estructura se muestra a continuación.



40 7-etil-10-hidroxi-camptotecina

Sin embargo, otra clase de agentes activos incluyen los que pertenecen a la familia de moléculas de los taxanos. Un agente activo ilustrativo de esta clase de moléculas es el docetaxel, en donde el H del grupo 2'-hidroxilo está implicado en la formación del producto conjugado polimérico multibrazo preferido:



5

Los reactivos poliméricos descritos en la presente memoria pueden unirse, covalentemente o no covalentemente, a varias entidades que incluyen películas, superficies de separación química y purificación, soportes sólidos, superficies metálicas tales como oro, titanio, tantalio, niobio, aluminio, acero y sus óxidos, óxido de silicio, macromoléculas (p.ej., proteínas, polipéptidos, etc.) y moléculas pequeñas. Adicionalmente, los reactivos poliméricos también se pueden utilizar en sensores bioquímicos, interruptores bioelectrónicos y computas. Los reactivos poliméricos también se pueden emplear como portadores para la síntesis de péptidos, para la preparación de superficies recubiertas de polímero e injertos de polímero, para preparar productos conjugados de polímero-ligando para la separación por afinidad, para preparar hidrogeles entrecruzados o no entrecruzados y para preparar aductos polímero-cofactor para biorreactores.

15

Opcionalmente, el producto conjugado se puede proporcionar como una composición farmacéutica para uso veterinario y para uso médico humano. Tales composiciones farmacéuticas se preparan combinando el producto conjugado con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico.

20

Los excipientes farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen, sin limitación, los seleccionados del grupo que consiste en carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, álcalis y combinaciones de los mismos.

25

Puede estar presente como excipiente un carbohidrato tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar. Los excipientes específicos de carbohidratos 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, melazitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol y similares.

30

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

35

La composición también puede incluir un agente antimicrobiano para prevenir o disuadir el crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos adecuados para una o más realizaciones de la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timerosal y combinaciones de los mismos.

40

Un antioxidante también puede estar presente en la composición. Los antioxidantes se utilizan para prevenir la oxidación, evitando así el deterioro del producto conjugado u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para su uso en una o más realizaciones de la presente invención incluyen, p.ej., palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito sódico, formaldehído sulfoxilato sódico, metabisulfito sódico y combinaciones de los mismos.

45

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

50

Los ácidos o bases pueden estar presentes como un excipiente en la composición. Los ejemplos no limitantes de ácidos que se pueden utilizar incluyen los 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 sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido de sodio, acetato

55

de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato sódico, fosfato potásico, citrato sódico, formiato sódico, sulfato sódico, sulfato potásico, fumarato potásico y combinaciones de los mismos.

5 La cantidad del producto conjugado (es decir, el producto conjugado formado entre el agente activo y el reactivo polimérico) en la composición, variará dependiendo de numerosos actores, pero será óptimamente una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacene en un recipiente de dosis unitaria (p.ej., un vial). Además, la preparación farmacéutica se puede alojar en una jeringa. Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser determinada experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades crecientes del producto conjugado con el fin de determinar qué cantidad produce un criterio de valoración clínicamente deseado.

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

20 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 aproximadamente 98% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 95% en peso del excipiente, siendo lo más preferido concentraciones menores de 30% en peso.

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

30 Las composiciones farmacéuticamente aceptables abarcan todos los tipos de formulaciones y en particular las que son adecuadas para inyección, p.ej., polvos o productos liofilizados que pueden ser reconstituidos, así como líquidos. Los ejemplos de diluyentes adecuados para reconstituir composiciones sólidas antes de la inyección 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. Con respecto a las composiciones farmacéuticas líquidas, se prevén soluciones y suspensiones.

35 Las composiciones de una o más realizaciones de la presente invención se administran típicamente, aunque no necesariamente, mediante inyección y por lo tanto son soluciones o suspensiones generalmente líquidas inmediatamente antes de la administración. La preparación farmacéutica también puede adoptar otras formas tales como jarabes, cremas, ungüentos, comprimidos, polvos y similares. También se incluyen otros modos de administración, tales como pulmonar, rectal, transdérmico, transmucosal, oral, intratecal, subcutáneo, intraarterial, etcétera.

45 Se describe también un método para administrar un producto conjugado de acuerdo con la invención tal como se proporciona en la presente memoria a un paciente que padece una afección que responde al tratamiento con el producto conjugado. El método comprende administrar a un paciente, generalmente mediante inyección, una cantidad terapéuticamente eficaz del producto conjugado (preferiblemente proporcionado como parte de una composición farmacéutica). Como se ha descrito anteriormente, los productos conjugados se pueden administrar inyectados parenteralmente mediante inyección intravenosa. Los tipos de formulación adecuados para administración parenteral incluyen soluciones listas para inyección, polvos secos para combinación con un disolvente antes de su uso, suspensiones listas para inyección, composiciones secas insolubles para combinación con un vehículo antes de su uso y emulsiones y productos concentrados líquidos para dilución previa a la administración, entre otros.

55 El método de administración se puede utilizar para tratar cualquier afección que se pueda remediar o prevenir mediante la administración del producto conjugado. Los expertos en la técnica aprecian qué afecciones puede tratar eficazmente un producto conjugado específico. Ventajosamente, el producto conjugado se puede administrar al paciente antes, simultáneamente, o después de la administración de otro agente activo.

60 La dosis real que se vaya a administrar variará dependiendo de la edad, el peso y el estado general del sujeto, así como de la gravedad de la afección que se esté tratando, del juicio del profesional de la salud y del producto conjugado que esté siendo administrado. Las cantidades terapéuticamente eficaces son conocidas por los expertos en la técnica y/o se describen en los textos de referencia y bibliografía pertinentes. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará entre aproximadamente 0,001 mg y 100 mg, 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. Una dosis dada se puede administrar periódicamente hasta que, por ejemplo, los síntomas disminuyen y/o se eliminan por completo.

La dosis unitaria de cualquier producto conjugado dado (de nuevo, preferiblemente proporcionada como parte de una preparación farmacéutica) se puede administrar en una variedad de programas de dosificación dependiendo del juicio del médico clínico, las necesidades del paciente, etcétera. El programa de dosificación específico será conocido por los expertos en la técnica o se puede determinar experimentalmente utilizando métodos rutinarios. Los esquemas de dosificación ilustrativos incluyen, sin limitación, la administración una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana, una vez por semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se ha alcanzado el objetivo clínico, se detiene la dosificación de la composición.

Una ventaja de la administración de ciertos productos conjugados descritos en la presente memoria es que las porciones individuales de polímero soluble en agua se pueden escindir cuando se incluye un enlace degradable hidrolíticamente entre el residuo del radical de agente activo y el polímero soluble en agua. Tal resultado es ventajoso cuando el aclaramiento desde el organismo es potencialmente un problema debido al tamaño del polímero. De manera óptima, la escisión de cada porción polimérica soluble en agua se facilita mediante el uso de enlaces fisiológicamente escindibles y/o enzimáticamente degradables tales como enlaces que contienen amida, carbonato o éster. De esta manera, se puede modular el aclaramiento del producto conjugado (mediante escisión de porciones de polímero soluble en agua individuales) seleccionando el tamaño molecular del polímero y el grupo funcional tipo que proporcionaría las propiedades de aclaramiento deseadas. Un experto en la técnica puede determinar el tamaño molecular adecuado del polímero así como el grupo funcional escindible. Por ejemplo, un experto normal en la técnica, utilizando la experimentación rutinaria, puede determinar un tamaño molecular apropiado y un grupo funcional escindible preparando primero una variedad de derivados poliméricos con diferentes pesos poliméricos y grupos funcionales escindibles y obteniendo a continuación el perfil de aclaramiento (p.ej., a través de una toma de muestras periódica de sangre o de orina) administrando el derivado polimérico a un paciente y tomando muestras periódicas de sangre y/o orina. Una vez que se ha obtenido una serie de perfiles de separación para cada producto conjugado ensayado, se puede identificar un producto conjugado adecuado.

Salas hidroháluro - Consideraciones sobre el agente activo, "D"

Las composiciones de sales hidroháluro descritas en la presente memoria comprenden un producto conjugado de polímero-agente activo soluble en agua, preferiblemente un producto conjugado bioactivo polimérico multibrazo. Los polímeros solubles en agua ilustrativos se han descrito anteriormente. Volviendo ahora al agente activo, el agente activo es un fármaco de molécula pequeña, un oligopéptido, un péptido o una proteína. El agente activo, cuando se conjuga con el polímero soluble en agua, contiene al menos un átomo de nitrógeno alcalino tal como un grupo amina (es decir, una amina u otro grupo que contiene nitrógeno alcalino que no está conjugado con el polímero soluble en agua). En la sal hidroháluro, los átomos de nitrógeno alcalinos están en forma protonada como la sal hidroháluro, es decir, cuando al menos 90 por ciento en moles, o al lo menos 91 por ciento en moles, o al menos 92 por ciento en moles, o al menos 93 por ciento en moles, o al menos 94 por ciento en moles, o al menos 95 por ciento en moles, más preferiblemente más de 95 por ciento en moles de los átomos de nitrógeno alcalinos del fármaco dentro del producto conjugado están protonados en forma de HX.

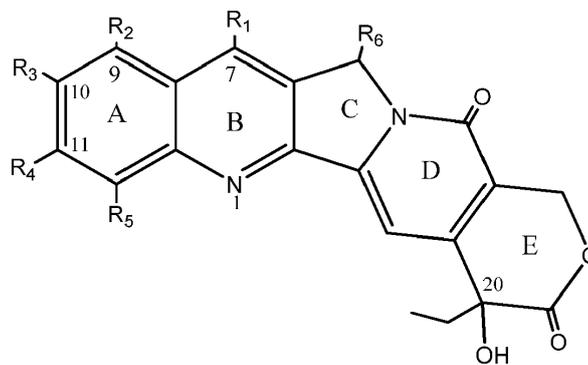
Los agentes activos que contienen al menos un grupo amina o un átomo de nitrógeno alcalino adecuados para proporcionar una sal de ácido mixta como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, ácido γ -aminobutírico (GABA), amiodarona, amitriptilina, azitromicina, benzfetamina, bromofeniramina, cabinoxamina, calcitonina, clorambucilo, cloroprocaína, cloroquina, clorfeniramina, clorpromazina, cinarizina, claritromicina, clomifeno, ciclobenzaprina, ciclopentolato, ciclofosfamida, dacarbazina, daunomicina, demeclociclina, dibucaína, diciclomina, dietilpropión, diltiazem, dimenhidrinato, difenhidramina, disopiramida, doxepina, doxiciclina, doxilamina, dipiridamo, EDTA, eritromicina, flurazepam, violeta de genciana, hidroxicloquina, imipramina, insulina, metotrexato, metoclopramida, minociclina, naftifina, nifedipina, nizatidina, orfenadrina, oxibutinina, oxitetraciclina, fenoxibenzamina, fentolamina, procaína, procarbamida, procaína, promazina, prometazina, proparacaína, propoxicaína, propoxifeno, ranitidina, tamoxifeno, terbinafina, tetracaína, tetraciclina, tramadol, triflupromazina, trimeprazina, trimetilbenzamida, trimipramina, trilpelenamina, troleandomicina, tiramina, uracilo mostaza, verapamilo y vasopresina.

Los agentes activos adicionales incluyen los que comprenden uno o más heterociclos que contienen nitrógeno, tales como acravistina, amoxapina, astemizol, atropina, azitromicina, benzapril, benzotropina, biperideno, bupracaina, buprenorfina, buspirona, butorfanol, cafeína, camptotecina y moléculas pertenecientes a la familia de la camptotecina, ceftriaxona, clorpromazina, ciprofloxacina, cladribina, clemastina, clindamicina, clofazamina, clozapina, cocaína, codeína, ciproheptadina, desipramina, dihidroergotamina, difenidol, difenoxilato, dipiridamol, doxapram, ergotamina, famciclovir, fentanilo, flavoxato, fludarabina, flufenazina, fluvastina, ganciclovir, granisteron, guanetidina, haloperidol, homatropina, hidrocodona, hidromorfona, hidroxizina, hiosciamina, imipramina, itraconazol, keterolaco, cetozonazol, levocarbastina, levorfonina, lincomicina, lomefloxacina, loperamida, losartán, loxapina, mazindol, medizina, meperidina, mepivacaína, mesoridazina, metdilazina, metenamina, metimazol, metotrimeperazina, metisergida, metronidazol, minoxidilo, mitomicina c, molindona, morfina, nafzodona, nalbufina, ácido naldixico, nalmefero, naloxona, naltrexona, nafazolina, nedocromilo, nicotina, norfloxacina, ofloxacina, ondasteron, oxiconona, oximorfona, pentazocina, pentoxifilina, perfenazina, fisostigmina, pilocarpina, pimozida,

pramoxina, prazosina, proclorperazina, promazina, prometazina, quinidina, quinina, alcaloides de rauwolfia, riboflavina, rifabutina, risperidona, rocuronio, escopalamina, sufentanilo, tacrina, terazosina, terconazol, terfenadina, tiordazina, tiotixeno, ticlodipina, timolol, tolazamida, tolmetina, trazodona, trietilperazina, trifluopromazina, trihexilfenidilo, trimeprazina, trimipramina, tubocurarina, vecuronio, vidarabina, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

Los agentes activos adicionales incluyen aquellos que comprenden un nitrógeno de anillo aromático tal como acetazolamida, acravistina, aciclovir, adenosina fosfato, alopurinol, alprazolam, amoxapina, amrinona, apraclonidina, azatadina, aztreonam, bisacodilo, bleomicina, bromofeniramina, buspirona, butoconazol, camptotecina y moléculas de la familia de la camptotecina, carbinoxamina, cefamandol, cefazol, cefixima, cefmetazol, cefonicida, cefoperazona, cefotaxima, cefotetan, cefpodoxima, ceftriaxona, cefapirina, cloroquina, clorfeniramina, cimetidina, cladarabina, clotrimazol, cloxacilina, didanosina, dipiridamol, doxazosina, doxilamina, econazol, enoxacina, estazolam, etionamida, famciclovir, famotidina, fluconazol, fludarabina, ácido fólico, ganciclovir, hidroxiclороquina, iodoquinol, isoniazida, itraconazol, cetoconazol, lamotrigina, lansoprazol, lorcetadina, losartán, mebendazol, mercaptopurina, metotrexato, metronidazol, miconazol, midazolam, minoxidilo, nafzodona, ácido naldíxico, niacina, nicotina, nizatidina, omeprazol, oxaprozina, oxiconazol, papaverina, pentostatina, fenazopiridina, pilocarpina, piroxicam, prazosina, primaquina, pirazinamida, pirimetamina, piroxidina, quinidina, quinina, ribaverina, rifampina, sulfadiazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfasoxazol, terazosina, tiabendazol, tiamina, tioguanina, timolol, trazodona, triamptereño, triazolam, trimetadiona, trimetoprim, trimetrexato, triplenamina, tropicamida, y vidarabina.

Un agente activo preferido es uno que pertenece a la familia de las moléculas de camptotecina. Por ejemplo, el agente activo puede poseer la estructura general:

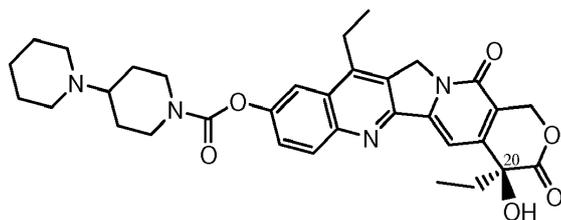


II

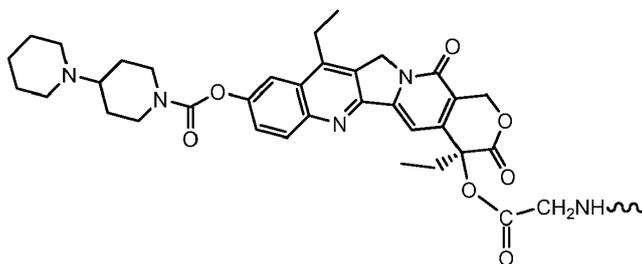
en donde R₁-R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; halo; acilo; alquilo (p.ej., alquilo C₁-C₆); alquilo sustituido; alcoxi (p.ej., alcoxi C₁-C₆); alcoxi sustituido; alquenilo; alquinilo; cicloalquilo; hidroxilo; ciano; nitro; azido; amido; hidrazina; amino; amino sustituido (p.ej., monoalquilamino y dialquilamino); hidroxicarbonilo; alcocarbonilo; alquilcarbonilo; alquilcarbonilamino; carbamoilo; arilsulfonilo; alquilsulfonilo; -C(R₇)=N(O)-R₈ en donde R₇ es H, alquilo, alquenilo, cicloalquilo o arilo, i es 0 ó 1 y R₈ es H, alquilo, alquenilo, cicloalquilo o heterociclo; y R₉C(O)- en donde R₉ es halógeno, amino, amino sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, o R₁₀-O-(CH₂)_m- donde m es un número entero de 1 a 10 y R₁₀ es alquilo, fenilo, fenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido; o R₂ junto con R₃ o R₃ junto con R₄ forman metilendioxi sustituido o no sustituido, etilendioxi, o etilenoxi; R₆ es H u OR', en donde R' es alquilo, alquenilo, cicloalquilo, haloalquilo o hidroxialquilo.

En referencia a la estructura anterior, aunque no se muestra, se prefieren análogos que tienen un grupo hidroxilo en una posición distinta de la posición 20 (p.ej., la posición 10, u 11, etc.).

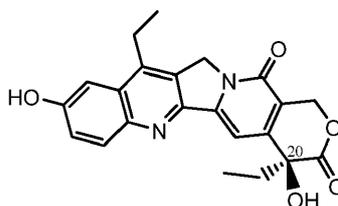
En una realización particular, de acuerdo con la invención, el agente activo es irinotecán (estructura mostrada inmediatamente más abajo),



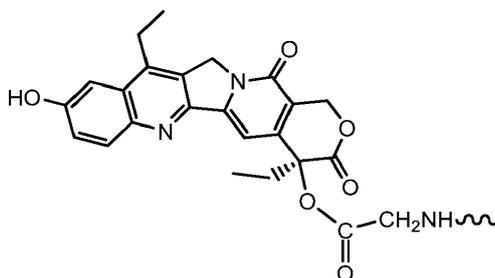
En otra realización, el agente activo es irinotecán que tiene un conector de glicina en la posición del hidroxilo 20 (estructura mostrada inmediatamente más abajo),



5 En otra realización particular más, el agente activo es 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38), un metabolito de irinotecán, cuya estructura se muestra a continuación.



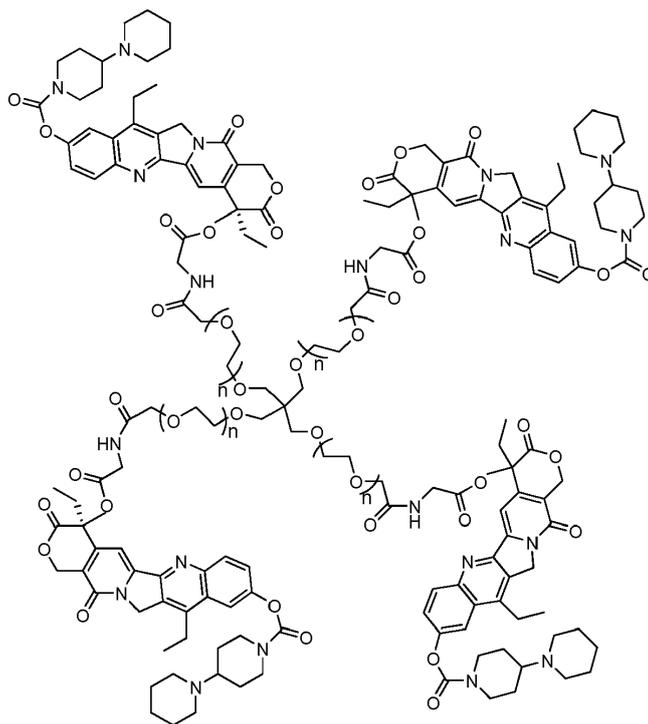
10 En la realización anterior, la unión covalente del agente activo, SN-38, al núcleo polimérico multibrazo se produce de manera similar en la posición del hidroxilo 20, opcionalmente a través de un conector intermedio tal como glicina, como se muestra a continuación.



15 Hidrohaluros - Consideraciones sobre los productos conjugados

20 Los productos conjugados ilustrativos de un polímero soluble en agua y un agente activo pueden poseer cualquiera de una serie de características estructurales como se ha descrito anteriormente. Es decir, el producto conjugado puede poseer una estructura lineal, es decir, tener una o dos moléculas de agente activo unidas covalentemente a las mismas, típicamente en el extremo o los extremos del polímero, respectivamente. Alternativamente, el producto conjugado puede poseer una estructura bifurcada, ramificada o multibrazo. Preferiblemente, el producto conjugado es un producto conjugado polimérico multibrazo.

25 Una estructura de producto conjugado polimérico multibrazo de acuerdo con la invención corresponde a la siguiente:



La estructura anterior se denomina en la presente memoria en forma abreviada "PEG-Gly-Irino de 4 brazos" (pentaeritritolil-PEG-carboximetilglicina irinotecán de 4 brazos); un nombre más completo corresponde a "pentaeritritolil-(PEG-1-metilen-2-oxo-vinilamino-acetato ligado a irinotecan) de 4-brazos". Los grupos amino y/o nitrógeno alcalinos en la porción de agente activo del producto conjugado se han mostrado anteriormente en forma neutra solamente, entendiéndose que el producto conjugado posee las características de una sal hidrohalaro (HX) como se describe en detalle en la presente memoria. Como se puede observar por la estructura anterior, el reactivo de pentaeritritolil PEG de 4 brazos modificado con carboximetilo posee un conector de glicina intermedio entre la porción de polímero y el agente activo, el irinotecán.

Típicamente, aunque no necesariamente, el número de brazos poliméricos corresponderá al número de moléculas de agente activo unidas covalentemente al núcleo polimérico soluble en agua. Es decir, en el caso de un reactivo polimérico que tiene un cierto número de brazos poliméricos (p.ej., que corresponden a la variable "q"), que tienen cada uno un grupo funcional reactivo (p.ej., carboxi, éster activado tal como éster succinimidílico, carbonato de benzotriazolilo, etc.) en su extremo, el número optimizado de agentes activos (tales como irinotecán) que se puede unir covalentemente al mismo en el producto conjugado correspondiente es lo más deseablemente "q". Es decir, se considera que el producto conjugado optimizado tiene un valor de carga de fármaco de 1,00 (q) (o 100%). En una realización preferida, el producto polimérico multibrazo se caracteriza por un grado de carga de fármaco de 0,90 (q) (o 90%) o mayor. Las cargas de fármaco preferidas satisfacen uno o más de los siguientes: 0,92 (q) o mayor; 0,93 (q) o mayor; 0,94 (q) o mayor; 0,95 (q) o mayor; 0,96 (q) o mayor; 0,97 (q) o mayor; 0,98 (q) o mayor; y 0,99 (q) o mayor. Lo más preferiblemente, la carga de fármaco para un producto conjugado polimérico multibrazo es de cien por cien. Una composición que comprende una sal hidrohalaro de producto conjugado polimérico soluble en agua multi-brazo puede comprender una mezcla de productos conjugados moleculares que tienen un agente activo unido al núcleo polimérico, teniendo dos moléculas de agente activo unidas al núcleo polimérico, teniendo tres agentes activos unidos al núcleo polimérico, y así sucesivamente, hasta e incluyendo un producto conjugado que tiene "q" agentes activos unidos al núcleo polimérico. La composición resultante tendrá un valor global de carga de fármaco, promediada sobre la especie de producto conjugado contenida en la composición. Idealmente, la composición comprenderá una mayoría, por ejemplo más de 50%, pero más preferiblemente más de 60%, todavía más preferiblemente más de 70%, aún más preferiblemente más de 80%, y lo más preferiblemente más de 90%) de productos conjugados poliméricos completamente cargados de fármaco (es decir, que tienen "q" moléculas de agente activo para "q" ramificaciones, una única molécula de agente activo para cada brazo).

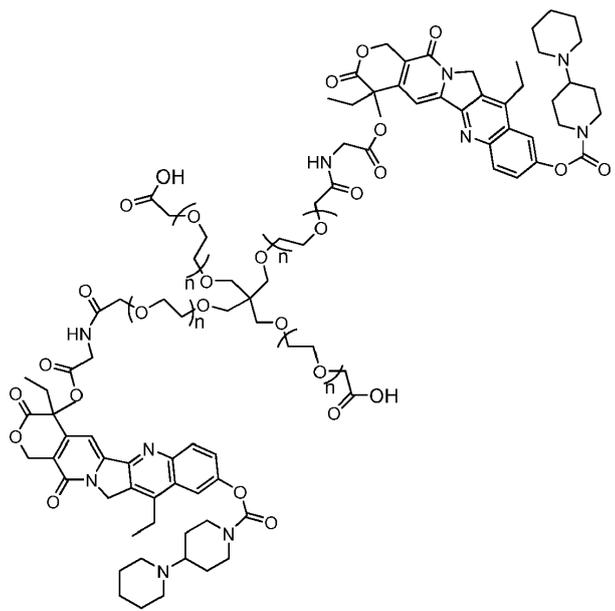
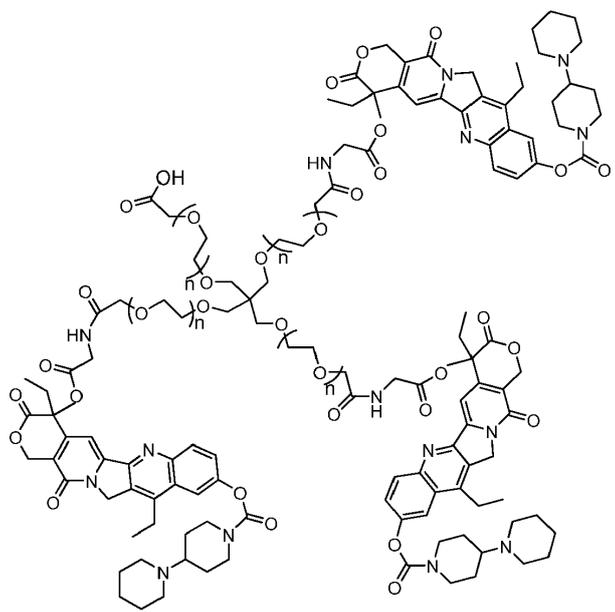
Como ejemplo, en un caso en el que el producto conjugado polimérico multibrazo contiene cuatro brazos poliméricos, el valor idealizado del número de moléculas de fármaco unidas covalentemente por polímero multiramificado es cuatro, y - con respecto a la descripción del promedio en el contexto de una composición de tales productos conjugados - habrá un valor (es decir, porcentaje) de moléculas de fármaco cargadas en el polímero multibrazo que oscilará de aproximadamente 90% a aproximadamente 100% del valor idealizado. Es decir, el número promedio de moléculas de fármaco unidas covalentemente a un polímero de cuatro brazos dado (como

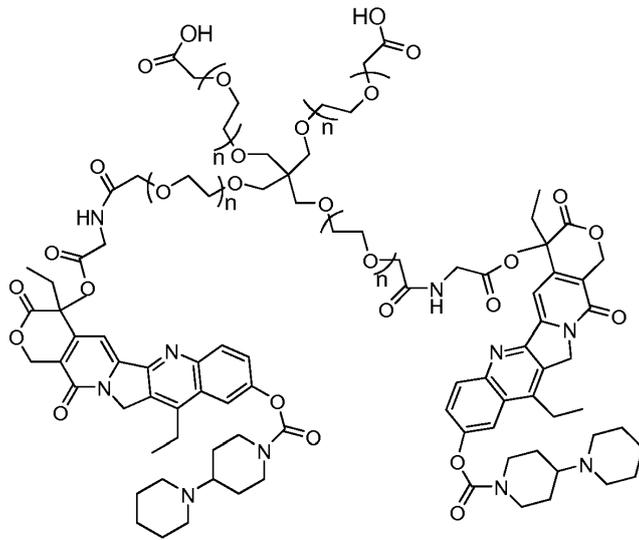
parte de una composición de polímero de cuatro brazos) es típicamente de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% , 96%, 97%, 98%, 99% y 100% del valor completamente cargado. Esto corresponde a un número promedio de D por producto conjugado polimérico multibrazo que oscila entre aproximadamente 3,60 y 4,0.

5 En otra realización más, para una composición de producto conjugado de polímero multibrazo, p.ej., cuando el número de brazos poliméricos oscila entre aproximadamente 3 y aproximadamente 8, la mayoría (p.ej., más de 50%, pero más preferiblemente más de 60%, aún más preferiblemente más de 70%, aún más preferiblemente más de 80%, y lo más preferiblemente más de 90%) de especies presentes en la composición son aquellas que tienen un número idealizado de moléculas de fármaco unidas al núcleo polimérico ("q") o aquellas que tienen una combinación
10 de moléculas de fármaco ("q") y ("q-1") unidas al núcleo polimérico.

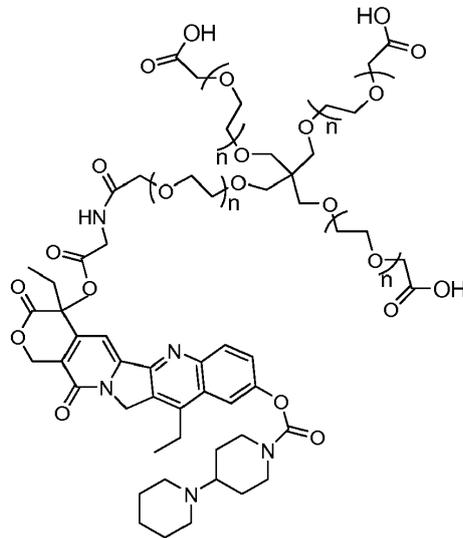
De acuerdo con lo anterior, la sal hidroháluro (y las composiciones que la contienen) pueden comprender una o más de las siguientes estructuras, además de la estructura completamente cargada de fármaco (p.ej., que tiene una molécula de irinotecán modificada con glicina unida covalentemente a cada uno de los cuatro brazos de polímero):

15

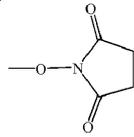




y

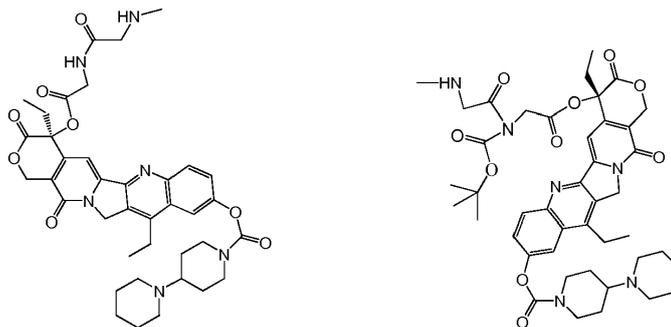


- 5 Para un extremo de brazo polimérico dado mostrado anteriormente que tiene un ácido carboxílico (y por lo tanto no está unido covalentemente a un agente activo, p.ej., irinotecán), otros terminales posibles que se extienden desde el brazo del PEG-CM de 4 brazos ("CM" = $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$) incluyen $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$,

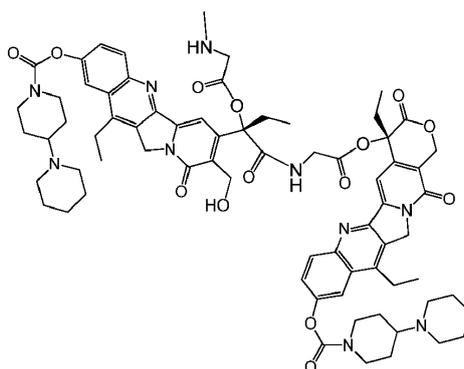


$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$, $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OCH}_3$,

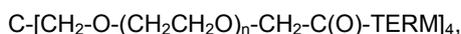
10



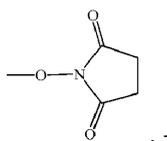
y



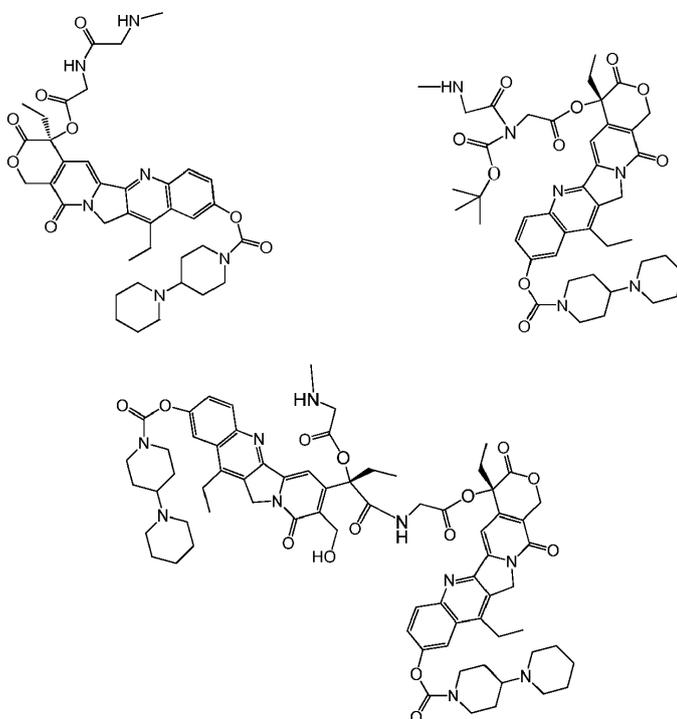
5 Por ejemplo, se proporciona en la presente memoria de acuerdo con la invención una composición que comprende una pluralidad de productos conjugados de pentaeritritolil-tetrapolietilenglicol-carboximetilo de 4 brazos, en donde al menos 90% de los productos conjugados en la composición (i) tienen una estructura abarcada por la fórmula:



10 en donde n, en cada caso, es un número entero que tiene un valor de 5 a aproximadamente 150, y TERM, en cada caso, se selecciona del grupo que consiste en -OH, -OCH₃,



15 NH-CH₂-C(O)-OH, -NH-CH₂-C(O)-OCH₃,



20 y -NH-CH₂-C(O)-O-Irino ("GLY-Irino"), en donde Irino es un residuo de irinotecán; y

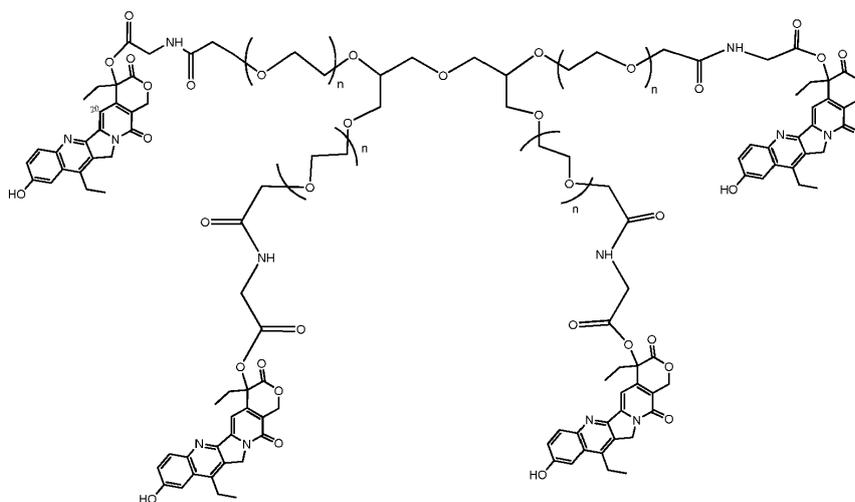
(ii) para cada Term en al menos 90% de los productos conjugados de cuatro brazos en la composición, al menos 90% de los mismos son -NH-CH₂-C(O)-O-Irino, y (iii) de los al menos 90% de radicales -NH-CH₂C(O)-O-Irinotecan en la composición, al menos 90 por ciento en moles de los átomos de nitrógeno alcalinos de irinotecán están protonados en forma de hidroháluro tal como la sal hidrocloreuro. Preferiblemente, de los al menos 90% de radicales -NH-CH₂(O)-O-Irinotecan en la composición, al menos 91 por ciento en moles, o al

menos 92 por ciento en moles, o al menos 93 por ciento en moles, o al menos 94 por ciento en moles o al menos 95 por ciento en moles o más de 95 por ciento en moles de los átomos de nitrógeno alcalinos del irinotecán están protonados en forma de hidrohalaro, en donde el contenido de hidrohalaros se puede determinar mediante cromatografía iónica.

Las composiciones de producto conjugado polimérico multibrazo proporcionadas en la presente memoria están destinadas a abarcar todas y cada una de las formas estereoisoméricas de los productos conjugados comprendidos en tales composiciones. En una realización particular del producto conjugado, la estereoquímica en el C-20 del irinotecán, cuando está en forma conjugada tal como en las composiciones de PEG-Gly-Irino de 4 brazos, permanece intacta, es decir, el C-20 conserva su configuración (S) cuando está en su forma conjugada. Véase, p.ej., el Ejemplo 4.

Una estructura multibrazo preferida es un PEG de pentaeritritolilo de 4 brazos modificados con carboximetilo que tiene un conector de glicina intermedio entre la porción de polímero en cada brazo y el agente activo (porción de polímero y conector mostrada anteriormente), donde el agente activo es 7-etil-10-hidroxi-camptotecina. De nuevo, en la presente memoria se incluyen realizaciones en las que el polímero multibrazo está (i) completamente cargado, así como tiene (ii) tres moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unidas covalentemente al mismo, (iii) dos moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unidas covalentemente al mismo, y (iv) una molécula de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unida covalentemente al núcleo polimérico de cuatro brazos. Las cargas típicas de fármaco son las descritas previamente.

Otra estructura de producto conjugado multibrazo representativa es un dímero de glicerol (3,3'-oxidipropano-1,2-diol) PEG de 4 brazos modificados con carboximetilo que tiene moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38) unidas covalentemente al núcleo polimérico. Las realizaciones en las que el núcleo de polímero multibrazo está completamente cargado con fármaco (es decir, que tiene cuatro moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unidas covalentemente al mismo), o no está completamente cargado (es decir, tiene uno, dos o tres moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unidas covalentemente al mismo) se incluyen en la presente memoria. El producto conjugado que tiene fármaco (es decir, 7-etil-10-hidroxi-camptotecina) unido covalentemente a cada brazo polimérico se muestra a continuación.

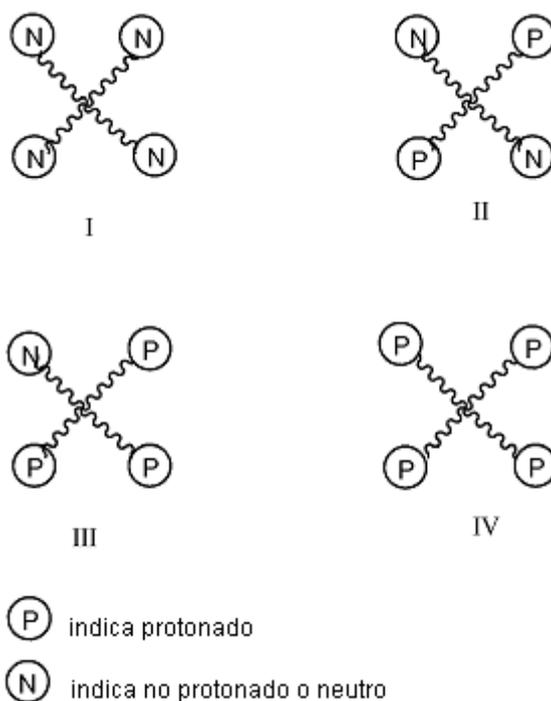


En otra realización ilustrativa más, el producto conjugado es una estructura multibrazo que comprende un dímero de glicerol (3,3'-oxidipropano-1,2-diol) PEG de 4 brazos modificados con carboximetilo que tiene moléculas de irinotecán unidas covalentemente al núcleo polimérico. Las realizaciones en las que el núcleo polimérico multibrazo está completamente cargado con fármaco (es decir, que tiene cuatro moléculas de irinotecán unidas covalentemente a la misma), o es menos que completamente cargado (es decir, que tiene una, dos o tres moléculas de irinotecán unidas covalentemente) se incluyen en esta descripción.

40 Parámetros de las sales hidrohalaro

Las presentes composiciones son sales hidrohalaro, típicamente sales hidrocioruro. Es decir, se proporcionan productos conjugados como los descritos anteriormente en una composición de manera que al menos 90% de los átomos de nitrógeno alcalinos en el producto conjugado (así como en la composición en masa) están presentes en forma protonada (es decir, en forma de la sal hidrohalaro). Las composiciones de sales hidrohalaro se preparan de forma estable y reproducible.

Una sal hidrohhaluro como se proporciona en la presente memoria se caracteriza en términos de sus propiedades a granel o macropropiedades. Es decir, los átomos de nitrógeno alcalinos (es decir, los grupos amino) en el producto conjugado existen en forma casi totalmente protonada. Aunque las presentes composiciones se caracterizan basándose en propiedades de volumen, diferentes especies moleculares individuales están típicamente contenidas dentro de la composición en masa. Tomando como ejemplo el producto conjugado de polímero de 4 brazos descrito en el Ejemplo 6, el hidrocioruro de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, el producto salino contiene cualquiera de una serie de especies moleculares individuales, aunque al menos 90% en total están protonadas en forma de sal hidrohhaluro. Una especie molecular es aquella en la que cada brazo polimérico contiene una molécula de irinotecán que está en forma neutra, es decir, su grupo amino no está protonado. Véase la estructura I a continuación. Otra especie molecular es aquella en la que cada brazo polimérico contiene una molécula de irinotecán en forma protonada. Véase la estructura IV a continuación. Otra especie molecular adicional es aquella en la que tres de los brazos poliméricos contienen una molécula de irinotecán que está en forma protonada y un brazo polimérico contiene una molécula de irinotecán en forma neutra (estructura III). En otra especie molecular, dos de los cuatro brazos poliméricos contienen una molécula de irinotecán en forma neutra (es decir, su grupo amino no está protonado), y dos de los cuatro brazos poliméricos contienen una molécula de irinotecán que está en forma protonada (estructura II).



Como se demuestra en el Ejemplo 1, ciertos productos conjugados de profármaco y polímero pueden obtenerse en forma de sales ácidas mixtas de ácido clorhídrico y ácido trifluoroacético. En el Ejemplo 1, se introduce ácido clorhídrico mediante el uso de una forma de sal de ácido de la molécula de agente activo para formar el producto conjugado de polímero resultante, mientras que el ácido trifluoroacético se introduce en la mezcla de reacción en una etapa de desprotección. Después de la unión covalente del agente activo (o agente activo modificado como se ilustra en el Ejemplo 1) al reactivo polimérico soluble en agua, y tratamiento con álcali, incluso en casos en los que se llevan a cabo etapas de purificación adicionales, el producto conjugado resultante se obtiene en forma de una sal de ácido mixta.

Los productos conjugados de la sal de ácido mixta contienen generalmente proporciones y intervalos definidos de cada componente (es decir, base libre, sal de ácido inorgánico, sal de ácido orgánico). Se observó una correlación positiva entre el aumento de la estabilidad frente a la hidrólisis y el aumento del porcentaje en moles de sal en el producto conjugado final. Basándose en las pendientes de los gráficos, se puede determinar que a medida que aumenta el contenido de base libre, la estabilidad del producto disminuye.

La **FIG. 2** ilustra además que la estabilidad (o resistencia) frente a la degradación hidrolítica es mayor para productos conjugados que poseen un mayor grado de grupos amina protonados (es decir, sal de ácido). Por ejemplo, se observó que el producto conjugado que contenía 14 por ciento en moles o más de base libre era notablemente menos estable frente a la hidrólisis que el correspondiente producto rico en sales ácidas.

Adicionalmente, como se ilustra en la **FIG. 3**, el producto rico en la sal hidrocioruro parece ser algo más susceptible

a la escisión de la cadena principal de poli(etilenglicol) bajo condiciones de estrés acelerado que la forma de sal mixta que contiene una cantidad medible de base libre, aunque el tamponamiento en la composición final puede ser eficaz para mejorar esta característica o tendencia.

- 5 Estos resultados colectivos indican las ventajas inesperadas de una sal hidroháluro de un producto conjugado de poli(etilenglicol)-agente activo (tal como PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos) sobre la base libre sola.

Sales hidroháluro - Métodos de formación

10 Al formar y caracterizar la sal de ácido mixta, se ideó un método para sintetizar una sal hidroháluro completa, es decir, una que tenía al menos 90% de átomos de nitrógeno alcalinos de irinotecán protonados en forma de sal hidroháluro como se proporciona con detalle en el Ejemplo 6. Una sal de ácido de un producto conjugado de polímero soluble en agua se puede preparar a partir de materiales de partida comercialmente disponibles en vista de las pautas presentadas en la presente memoria, junto con lo que se conoce en la técnica de síntesis química.

15 Los reactivos poliméricos solubles en agua lineales, ramificados y multibrazo se encuentran disponibles a partir de una serie de fuentes comerciales como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los reactivos PEG, tal como un polímero PEG reactivo multibrazo se pueden preparar sintéticamente como se describe en la presente memoria. Véase, p.ej., el Ejemplo 7 de la presente memoria.

20 La sal de ácido se puede formar utilizando técnicas de acoplamiento químico conocidas para la unión covalente de polímeros activados, tales como un PEG activado, a un agente biológicamente activo (véase, p.ej., POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, American Chemical Society, Washington, DC (1997); y Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Núms. 2009/0074704 y 2006/0239960).

25 La selección de grupos funcionales, conectores, grupos protectores y similares adecuados para conseguir una sal de ácido mixta de acuerdo con la invención, dependerá, en parte, de los grupos funcionales del agente activo y del material de partida polimérico y será evidente para un experto en la técnica, basándose en el contenido de la presente descripción. En vista de ciertas características de la sal de ácido, el método comprende proporcionar un agente activo que contiene amina (u otro nitrógeno alcalino) en forma de una sal de adición de ácido inorgánico y una etapa de tratamiento con ácido inorgánico. La referencia a un "agente activo" en el contexto del método sintético pretende abarcar un agente activo opcionalmente modificado para que posea un conector unido covalentemente al mismo, para facilitar la unión al polímero soluble en agua.

35 Generalmente, el método comprende las etapas de (i) desproteger una sal de ácido inorgánico (hidrohálgeno) de un agente activo que contiene amina (u otro nitrógeno alcalino) en forma protegida (p.ej., hidroháluro de glicina-irinotecán en forma protegida) por tratamiento con un exceso molar de ácido hidrohálgeno para eliminar de este modo el grupo protector para formar una sal de ácido desprotegida tal como hidroháluro de glicina-irinotecán, (ii) acoplar la sal de ácido inorgánico desprotegida de la etapa (i) con un reactivo polimérico soluble en agua tal como pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetil-succinimida de 4 brazos (o un éster activado químicamente equivalente o similar), en presencia de una base para formar un producto conjugado de polímero-agente activo tal como hidroháluro de pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetil-glicina de 4 brazos (también denominado sal hidroháluro de pentaeritritolil-(acetato de PEG-1-metilen-2-oxo-vinilamino) ligado a irinotecán de 4 brazos, y (iii) recuperar el producto conjugado de polímero-agente activo, sal hidroháluro de pentaeritritolil- poli(etilenglicol)-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos, por precipitación.

45 La composición de producto conjugado de polímero-agente reactivo resultante se caracteriza por tener al menos 90% en moles de los grupos amino alcalinos del agente activo del producto conjugado, p.ej., grupos amino alcalinos de irinotecán, protonados en forma de sal hidroháluro. Generalmente, el porcentaje en moles de grupos hidroháluro en el producto se determina mediante cromatografía iónica.

50 Al pasar ahora a una de las clases preferidas de agentes activos, las camptotecinas, puesto que el grupo 20-hidroxilo de los compuestos dentro de la familia de la camptotecina está estéricamente impedido, es difícil conseguir una reacción de conjugación de una sola etapa con rendimientos significativos. Como resultado, un método preferido consiste en hacer reaccionar el grupo 20-hidroxilo del material de partida bioactivo, p.ej., hidrocloreto de irinotecán, con un conector o radical espaciador corto que porta un grupo funcional adecuado para la reacción con un polímero soluble en agua. Semejante enfoque es aplicable a muchas moléculas pequeñas, particularmente aquellas que tienen un sitio de unión covalente que es inaccesible a un polímero reactivo entrante. Los conectores preferidos para la reacción con un grupo hidroxilo para formar un enlace éster incluyen t-BOC-glicina u otros aminoácidos tales como alanina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina y valina que tienen un grupo amino protegido y un grupo de ácido carboxílico disponible (véase, Zalipsky et al., "Attachment of Drugs to Polyethylene Glycols", Eur. Polym. J., Vol. 19, Núm. 12, págs. 1177-1183 (1983)). También se pueden usar otros radicales espaciadores o conectores que tienen un grupo ácido carboxílico disponible u otro grupo funcional reactivo con un grupo hidroxilo y que tienen un grupo amino protegido en lugar de los aminoácidos descritos anteriormente.

Los grupos protectores lábiles típicos, p.ej., para proteger el grupo amino de la glicina, incluyen t-BOC y FMOC (9-fluorenilmetiloxycarbonilo). El t-BOC es estable a temperatura ambiente y se elimina fácilmente con disoluciones diluidas de ácido trifluoroacético y diclorometano. También se puede eliminar por tratamiento con ácido, tal como un ácido hidrohalegenado inorgánico. FMOC es un grupo protector lábil alcalino que se elimina fácilmente mediante soluciones concentradas de aminas (normalmente piperidina en N-metilpirrolidona al 20-55%).

En el Ejemplo 6, dirigido a la preparación de hidrocloreuro de PEG20K-irinotecán de 4 brazos, el grupo carboxilo de la glicina N-protegida reacciona con el grupo 20-hidroxilo del hidrocloreuro de irinotecán (u otra camptotecina adecuada, tal como 7-etil-10-hidroxi-camptotecina o cualquier otro agente activo) en presencia de un agente de acoplamiento (p.ej., dicitlohexilcarbodiimida (DCC)) y un catalizador alcalino (p.ej., dimetilaminopiridina (DMAP) u otra base adecuada), para proporcionar un agente activo modificado con un conector N-protegido, p.ej., hidrocloreuro de t-Boc-glicina-irinotecán. Aunque se ejemplifica el hidrocloreuro, se pueden utilizar otras sales de ácidos inorgánicos. Preferiblemente, cada etapa de reacción se lleva a cabo bajo una atmósfera inerte y seca.

En una etapa subsiguiente, el grupo protector de amino, t-BOC (N-terc-butoxicarbonilo), se elimina por tratamiento con ácido clorhídrico (u otro ácido hidrohalegenado) en condiciones de reacción adecuadas. Esto difiere de la preparación de la sal de ácido mixta, donde el t-BOC se separa por tratamiento con ácido trifluoroacético como en el Ejemplo 1. El intermedio desprotegido resultante es un agente activo modificado con un conector, p.ej., hidrocloreuro de 20-glicina-irinotecán. Las condiciones de reacción ilustrativas se describen en el Ejemplo 6 y se pueden optimizar adicionalmente mediante optimización de rutina por un experto en la técnica. Generalmente se utiliza un exceso molar de ácido para eliminar el grupo protector. Preferiblemente, la glicina-irinotecán protegida se trata con un exceso molar de diez veces o más de ácido hidrohalegenado para eliminar el grupo protector. En algunos casos, se puede emplear un exceso molar de 10 veces a 25 veces. La sal de fármaco desprotegida resultante se recupera típicamente de la mezcla de reacción, p.ej., por precipitación. Como ejemplo, se puede emplear la adición de metil-terc-butyl éter (MTBE) para precipitar el intermedio. El producto intermedio se aísla a continuación, p.ej., mediante filtración y se seca.

El agente activo desprotegido (opcionalmente modificado con conector), p.ej., 20-glicina-irinotecán HCl, se acopla a continuación a un reactivo polimérico deseado, p.ej., pentaeritritolil-PEG-succinimida de 4 brazos (o cualquier otro equivalente de éster activado similarmente, cuya naturaleza se haya descrito anteriormente) en presencia de una base (p.ej., DMAP, trimetilamina, trietilamina, etc.), para formar el producto conjugado deseado. La etapa de conjugación se puede llevar a cabo en presencia de un exceso de álcali, p.ej., un exceso molar de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 3,0 veces. Los rendimientos de reacción para la reacción de acoplamiento son típicamente altos, superiores a aproximadamente 90%.

El producto conjugado de la sal de ácido se recupera, p.ej., por precipitación con éter (p.ej., metil-terc-butyl-éter, dietiléter) u otro disolvente adecuado. Con el fin de asegurar la formación de la sal hidrohaleuro completa (es decir, al menos 90 por ciento en moles de sal hidrohaleuro), el producto bruto se analiza, p.ej., mediante cromatografía iónica, para determinar el contenido de haluro. En el caso de que el contenido de hidrohaleuro sea menor que el deseado, p.ej., inferior a 90 por ciento en moles, o inferior a 91, 92, 93, 94 o 95 por ciento en moles, el producto conjugado de la sal de ácido se disuelve a continuación en un disolvente adecuado tal como acetato de etilo o similares, y se trata con ácido hidrohalegenado adicional. El producto se recupera después como se ha descrito anteriormente.

La sal de ácido producto se puede purificar adicionalmente por cualquier método adecuado. Los métodos de purificación y aislamiento incluyen precipitación seguida por filtración y secado, así como cromatografía. Los métodos cromatográficos adecuados incluyen cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía instantánea Biotage. Otro método de purificación es la recristalización. Por ejemplo, la sal de ácido parcial se disuelve en un sistema disolvente sencillo o mixto adecuado (p.ej., isopropanol/metanol), y a continuación se deja cristalizar. La recristalización se puede llevar a cabo varias veces, y los cristales también se pueden lavar con un disolvente adecuado en el que son insolubles o sólo ligeramente solubles (p.ej., metil-terc-butyl éter o metil-terc-butyl éter/metanol). El producto purificado puede ser opcionalmente secado al aire o a vacío.

Preferiblemente, el producto de sal de ácido se almacena en condiciones adecuadas para proteger el producto de la exposición a uno o más de oxígeno, humedad y luz. Se puede emplear cualquiera de una serie de condiciones de almacenamiento o protocolos de envasado para proteger adecuadamente el producto de sal de ácido durante el almacenamiento. En una realización, el producto se envasa bajo una atmósfera inerte (p.ej., argón o nitrógeno) colocándolo en una o más bolsas de polietileno y se coloca en una bolsa termosellable de poliéster revestida de aluminio.

Se proporcionan porcentajes en moles representativos de sal de ácido clorhídrico en el Ejemplo 6. Como se describe en la presente memoria, se preparó sal hidrocloreuro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos como la sal hidrocloreuro completa, es decir, que contenía casi 99 por ciento en moles de cloruro. Sales hidrohaleuro - Composiciones farmacéuticas que contienen productos conjugados de sal hidrohaleuro

La sal de ácido puede estar en forma de una formulación o composición farmacéutica para uso veterinario o médico en seres humanos. Una formulación ilustrativa comprenderá típicamente la sal de ácido combinada con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico, estabilizante o similar. El portador o los portadores deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de que sean compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no son indebidamente perjudiciales para el receptor/paciente. La sal de ácido hidrohalegenado está opcionalmente contenida de forma masiva o de dosis unitaria en un recipiente o receptáculo que incluye un envase que protege el producto de la exposición a la humedad y el oxígeno.

La composición farmacéutica puede incluir excipientes/aditivos poliméricos o portadores, p.ej., polivinilpirrolidonas, celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa, Ficoles (un azúcar polimérico), hidroxietilalmidón (HES), dextratos (p.ej., ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y sulfobutil-éter- β -ciclodextrina), polietilenglicoles y pectina. Las composiciones pueden incluir además diluyentes, tampones, aglutinantes, disgregantes, espesantes, lubricantes, conservantes (incluyendo antioxidantes), agentes aromatizantes, agentes enmascaradores del sabor, sales inorgánicas (p.ej., cloruro de sodio), agentes antimicrobianos (p.ej., cloruro de benzalconio), edulcorantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (p.ej., polisorbatos tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80" y plurónicos tales como F68 y F88, disponibles de BASF), ésteres de sorbitán, lípidos (p.ej., fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, ácidos grasos y ésteres grasos, esteroides (p.ej., colesterol)), y agentes quelantes (p.ej., EDTA, cinc y otros cationes adecuados). Otros excipientes farmacéuticos y/o aditivos adecuados para su uso en las composiciones de acuerdo con la invención se enumeran en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), y en "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), y en "Handbook of Pharmaceutical Excipients", Tercera Ed., Ed. A.H. Kibbe, Pharmaceutical Press, 2000.

La sal de ácido se puede formular en una composición adecuada para la administración oral, rectal, tópica, nasal, oftálmica o parenteral (incluyendo intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o intramuscular). La composición de sal de ácido se puede presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se puede preparar por medio de cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar la sal de ácido con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios.

En una realización particular, la sal de ácido, p.ej., hidrohaleuro de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos se proporciona en forma liofilizada en un vial estéril de un solo uso para su uso como inyectable. En una realización, la cantidad de producto conjugado contenida en el vial de un solo uso es el equivalente a una dosis de 100 mg de irinotecán. Más particularmente, la composición liofilizada incluye la sal hidrohaleuro de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos combinada con tampón de lactato a pH 3,5. Es decir, la composición liofilizada se prepara combinando el hidrohaleuro de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, p.ej., en una cantidad equivalente a una dosis de 100 mg de irinotecán, con aproximadamente 90 mg de ácido láctico y el pH de la solución se ajusta a 3,5 por adición de ácido o base. La solución resultante se liofiliza a continuación en condiciones estériles, y el polvo resultante se almacena a -20°C antes de su uso. Antes de la infusión intravenosa, la composición liofilizada se combina con una solución de dextrosa, p.ej., una solución al 5% (p/p) de dextrosa.

La cantidad de sal de ácido (es decir, agente activo) en la formulación variará dependiendo del agente activo específico empleado, de su actividad, del peso molecular del producto conjugado, y de otros factores tales como la forma de dosificación, la población de pacientes diana y otras consideraciones, y será generalmente determinado fácilmente por un experto en la técnica. La cantidad de producto conjugado en la formulación será la cantidad necesaria para suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, p.ej., un agente anticanceroso alcaloide tal como irinotecán o SN-38, a un paciente que lo necesite para lograr al menos uno de los efectos terapéuticos asociados con el compuesto, p.ej., para el tratamiento del cáncer. En la práctica, esto variará ampliamente dependiendo del producto conjugado particular, de su actividad, de la gravedad de la afección a tratar, de la población de pacientes, de la estabilidad de la formulación y similares. Las composiciones contendrán generalmente de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 99% en peso de producto conjugado, típicamente de aproximadamente 2% a aproximadamente 95% en peso de producto conjugado, y más típicamente de aproximadamente 5% a 85% en peso de producto conjugado, y dependerá también de las cantidades relativas de excipientes/aditivos contenidos en la composición. Más específicamente, la composición contendrá típicamente al menos aproximadamente uno de los siguientes porcentajes de producto conjugado: 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o más en peso.

Las composiciones adecuadas para la administración oral se pueden proporcionar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, sellos, comprimidos, pastillas y similares, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del producto conjugado en forma de polvo o gránulos; o una suspensión en un licor acuoso o un líquido no acuoso tal como un jarabe, un elixir, una emulsión, un líquido ("draught") y similares.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del producto conjugado de profármaco, que se puede formular para que isotónica con la sangre del receptor.

Las formulaciones de pulverización nasal comprenden soluciones acuosas purificadas del producto conjugado de polímero multibrazo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Tales formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y un estado isotónico compatibles con las membranas mucosas nasales.

- 5 Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar en forma de un supositorio con un portador adecuado tal como manteca de cacao, o grasas hidrogenadas o ácidos carboxílicos grasos hidrogenados.

Las formulaciones oftálmicas se preparan por un método similar a la pulverización nasal, excepto que el pH y los factores isotónicos se ajustan preferiblemente para que coincidan con los del ojo.

- 10 Las formulaciones tópicas comprenden el producto conjugado polimérico multibrazo disuelto o suspendido en uno o más medios tales como aceite mineral, petróleo, alcoholes polihidroxilados u otras bases utilizadas para formulaciones tópicas. Puede ser deseable la adición de otros ingredientes accesorios como se ha indicado anteriormente.

- 15 También se proporcionan formulaciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración en forma de un aerosol, p.ej., por inhalación. Estas formulaciones comprenden una solución o suspensión del producto conjugado polimérico multibrazo deseado o una sal del mismo. La formulación deseada se puede colocar en una cámara pequeña y nebulizada. La nebulización se puede realizar por medio de aire comprimido o por energía ultrasónica para formar una pluralidad de gotitas de líquido o partículas sólidas que comprenden los productos conjugados o sales de los mismos.

Sales hidroháluro - Métodos de uso de los productos conjugados de sal hidroháluro

- 25 La sal de ácido descrita en la presente memoria se puede utilizar para tratar o prevenir cualquier afección que responda al agente activo no modificado en cualquier animal, particularmente en mamíferos, incluyendo seres humanos. Una sal de ácido representativa, el hidrocloreto de pentaeritrolil-PEG-glicina-irinotecán de 4 brazos, que comprende el agente anticanceroso, irinotecán, es particularmente útil en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

- 30 El producto conjugado de sal de ácido, en particular, aquellos en los que el fármaco de molécula pequeña es un agente anticanceroso tal como el compuesto de camptotecina irinotecan o 7-etil-10-hidroxi-camptotecina, es útil en el tratamiento de tumores de tipo sólido tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de estómago, melanoma maligno, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, cáncer cervical, cáncer de seno maxilar, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, enfermedad de Hodgkin, cáncer adrenocortical y similares. Otros cánceres tratables con la sal de ácido incluyen linfomas, leucemias, rabdomiosarcoma, neuroblastoma y similares. Como se ha indicado anteriormente, el producto conjugado objeto es particularmente eficaz en el direccionamiento y la acumulación en tumores sólidos. El producto conjugado es también útil en el tratamiento del VIH y otros virus.

- 40 También se ha demostrado que los productos conjugados representativos tales como el pentaeritrolil-PEG-glicina-irinotecán de 4 brazos, son particularmente ventajosos cuando se utilizan para tratar a pacientes que tienen cánceres que han mostrado ser refractarios al tratamiento con uno o más agentes anticancerosos.

- 45 Los métodos de tratamiento comprenden la administración a un mamífero que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o formulación de sal de ácido como se describe en la presente memoria.

- 50 Otros métodos incluyen el tratamiento de (i) cáncer de mama metastásico resistente a terapias basadas en antraciclina y/o taxano, (ii) cáncer de ovario resistente al platino, (iii) cáncer de cuello uterino metastásico y (iv) cáncer colorrectal en pacientes con estado mutado del gen K-Ras, mediante la administración de una composición de sal de ácido como se describe en la presente memoria.

- 55 En el tratamiento del cáncer de mama metastásico, se administra una sal de ácido de un producto conjugado tal como pentaeritrolil-PEG-glicina-irinotecan de 4 brazos como se proporciona en la presente memoria a un paciente con cáncer de mama metastásico localmente avanzado en una cantidad terapéuticamente eficaz, donde el paciente ha tenido no más de dos tratamientos previos (sin éxito) con quimioterapéuticos basados en antraciclina y/o taxano.

- 60 Para el tratamiento del cáncer de ovario resistente al platino, se administra a un paciente con cáncer de ovario localmente avanzado o metastásico una composición según se proporciona en la presente memoria, en una cantidad terapéuticamente eficaz, donde el paciente ha mostrado una progresión tumoral durante la terapia basada en platino, con un intervalo libre de progresión de menos de seis meses.

En otro enfoque más, se administra una sal de ácido hidrohálgeno (p.ej., tal como la del Ejemplo 6) a un sujeto con cáncer colorrectal localmente avanzado, donde el tumor o los tumores colorrectales tienen una mutación del

oncogén K-Ras (tipos mutantes de K-Ras) de manera que el tumor no responde a los inhibidores de EGFR, tales como cetuximab. Los sujetos son aquellos en los que ha fracasado una terapia previa que contenía 5-FU, y asimismo no han recibido terapia con irinotecán previamente.

5 Una cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz de cualquier sal de ácido específica variará de un producto conjugado a otro producto conjugado, de un paciente a otro paciente y dependerá de factores tales como la afección del paciente, la actividad del agente activo particular empleado, el tipo de cáncer y la ruta de suministro.

10 Para agentes activos de tipo camptotecina tales como irinotecán o 7-etil-10-hidroxi-camptotecina, se prefieren dosis de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg de camptotecina/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 60 mg/kg. Cuando se administra conjuntamente con otros agentes farmacéuticamente activos, puede ser terapéuticamente eficaz incluso menos cantidad de la sal de ácido. Para la administración de una sal de ácido de irinotecán como se ilustra en la presente memoria, la cantidad de dosificación de irinotecán oscilará típicamente entre aproximadamente 50 mg/m² y aproximadamente 350 mg/m².

15 Los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria incluyen también la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o formulación de sal de ácido como se describe en la presente memoria (p.ej., cuando el agente activo es una molécula de tipo camptotecina) junto con un segundo agente anticanceroso. Preferentemente, tales productos conjugados basados en camptotecina en forma de una sal de ácido, se administran combinados con 5-fluorouracilo y ácido folínico como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.403.569.

20 Las composiciones de sal de ácido hidrohlogenado se pueden administrar una o varias veces al día, preferiblemente una vez al día o menos. La duración del tratamiento puede ser una vez al día durante un período de dos a tres semanas y puede continuar durante un período de meses o incluso años. La dosis diaria se puede administrar ya sea por una dosis única en forma de una unidad de dosificación individual o varias unidades de dosificación más pequeñas ya sea por administración múltiple de dosis subdivididas a ciertos intervalos.

25 Experimentación

30 La práctica de la invención empleará, a menos que se indique de otro modo, mecanismos convencionales de síntesis orgánica y similares, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales mecanismos se describen completamente en la bibliografía. Los reactivos y materiales están comercialmente disponibles a menos que se indique específicamente lo contrario. Véanse, p.ej., M. B. Smith y J. March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 6^a Ed. (Nueva York: Wiley-Interscience, 2007), *supra*, y *Comprehensive Organic Functional Group Transformations II*, Volúmenes 1-7, Segunda Ed.: *A Comprehensive Review of the Synthetic Literature 1995-2003 (Organic Chemistry Series)*, Eds. Katritzky, A.R., et al., Elsevier Science.

35 En los ejemplos siguientes, se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (p.ej., cantidades, temperaturas, etc.) pero se deben explicar algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, la temperatura está en grados C y la presión es o está próxima a la presión atmosférica al nivel del mar.

40 Los siguientes ejemplos ilustran ciertos aspectos y ventajas de la presente invención. Los compuestos y composiciones no incluidos en el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la invención y se citan como ejemplos de referencia.

45 Abreviaturas

50	Ar	argón
	CM	carboximetilo o carboximetileno (-CH ₂ COOH)
	DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
	DCM	diclorometano
	DMAP	4-(N,N-dimetilamino)piridina
55	GLY	glicina
	HCl	ácido clorhídrico
	RP-HCL	cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa
	IPA	alcohol isopropílico
	IRT	irinotecán
60	IPC	cromatografía de pares de iones
	MeOH	metanol
	MTBE	metil-terc-butil éter
	PM	peso molecular
	RMN	resonancia magnética nuclear

PEG	polietilenglicol
RT	temperatura ambiente
SCM	succinimidilcarboximetilo (-CH ₂ -COO-N-succinidilo)
5 TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano

Materiales y métodos

Se obtuvo PEG_{20K}-OH de 4 brazos basado en pentaeritritilo de NOF Corporation (Japón). PEG_{20K}-OH de 4 brazos posee la estructura: C-(CH₂O-(CH₂CH₂O)_nH)₄, en donde cada n es aproximadamente 113.

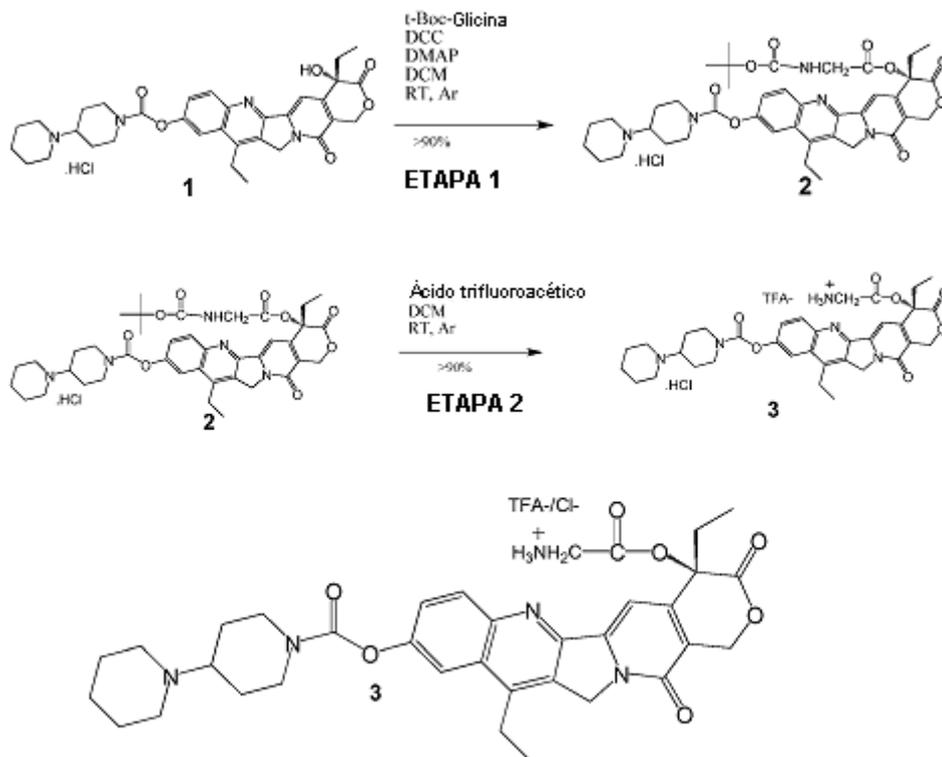
Los proveedores adicionales de PEG_{20K}-OH de 4 brazos basado en pentaeritritilo (también denominado simplemente PEG-OH de 4 brazos) incluyen Creative PEGWorks (Winston-Salem, NC), que también ofrece la versión funcionalizada con succinidilo y JenKem Technology USA (Allen, Texas).

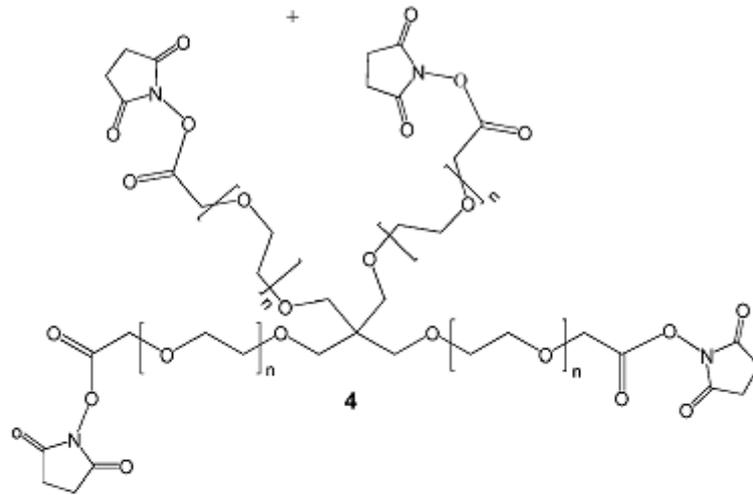
Todos los datos de RMN H¹ se generaron mediante un espectrómetro de RMN de 300 ó 400 MHz fabricado por Bruker.

Ejemplo 1

Preparación de sal mixta de ácido trifluoroacético.hidrocloruro de pentaeritritolil-(PEG-1-metilen-2-oxo-vinilamino acetato ligado a irinotecan)-20K "PEG-Gly-irino-20K de 4 brazos"

Esquema de reacción:



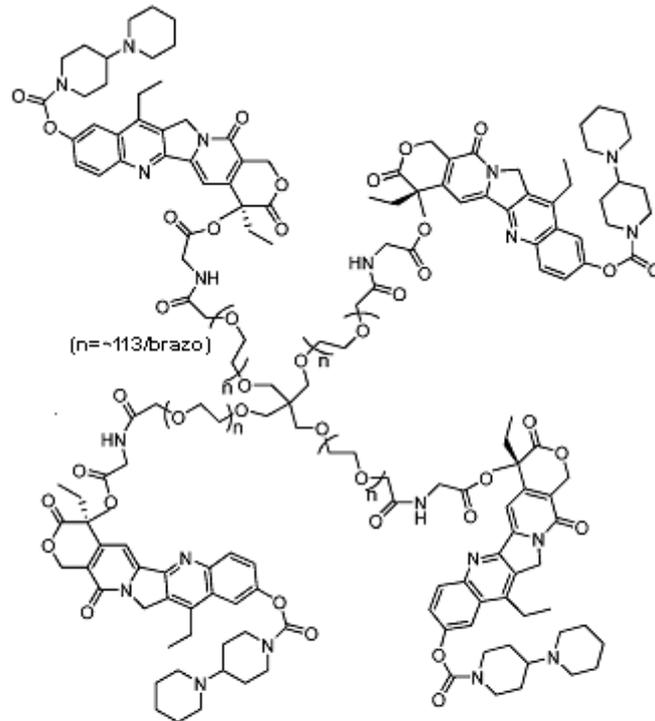


TEA
DCM/DMF
RT, Ar

Producto aislado de MeOH/IPA (x3)

>90%

ETAPA 3



TFA/HCl

5

Este ejemplo describe la síntesis de una sal mixta de ácido TFA.HCl de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos.

Todos los disolventes utilizados en la síntesis eran anhidros.

5 Etapa 1. Conjugación de t-boc-glicina a Irinotecan • sal HCl (rendimiento > 95%)

Se cargaron Irinotecan • HCl • trihidrato (1 mol o 677 g) y DMF (10 L) en un destilador a 60°C. Después de la disolución del Irinotecan • HCl • trihidrato en DMF, se aplicó lentamente vacío completo con el fin de eliminar el agua del Irinotecan • HCl • trihidrato por destilación azeotrópica a 60°C. Tras la formación de sólidos a partir de la DMF residual, se cargó heptano (hasta 60 L) en el destilador para eliminar la DMF residual a 40 - 50°C. Tras la eliminación del heptano mediante inspección visual, se detuvo la destilación azeotrópica y se dejó enfriar el sólido (irinotecan • HCl) a $17 \pm 2^\circ\text{C}$. Para la reacción de acoplamiento, se cargaron t-boc-glicina (1,2 moles), 4-DMAP (0,1 moles) disueltos en DCM (1 L) y DCM (19 L) en el destilador. Una vez que la mezcla estuvo visualmente bien dispersada, se añadió DCC en estado fundido (1,5 moles) y se dejó que la reacción prosiguiera. La reacción se llevó a cabo bajo una capa de argón o nitrógeno, con suficiente mezclado y a una temperatura del recipiente de $17 \pm 2^\circ\text{C}$.

Después de un tiempo de reacción de 2-4 horas, se retiró una muestra para medir el porcentaje de área del pico de irinotecán residual (IRT) mediante cromatografía. Se determinó que el irinotecán residual estaba presente en una cantidad no superior al 5%. La DCU formada durante la reacción de acoplamiento se separó por filtración y se lavó con DCM. Los productos filtrados resultantes que contenían t-boc-glicina-irinotecan • sal HCl bruto se combinaron y se concentraron por debajo de 45°C a vacío para eliminar el DCM. Cuando se eliminó aproximadamente 75% de su volumen inicial por destilación, se añadió a continuación IPA al producto concentrado para alcanzar el volumen inicial, y la mezcla se destiló adicionalmente hasta que el volumen de producto condensado alcanzó aproximadamente 25% de su volumen inicial. La solución clara resultante se enfrió a temperatura ambiente, seguido de su adición a heptano con mezclado. La mezcla se mezcló durante 0,5 a 1 hora adicional, tiempo durante el cual se formó un precipitado. El precipitado se drenó y se filtró para obtener una torta húmeda, y después se lavó con heptano (hasta 6 L). La torta húmeda se secó a vacío para proporcionar polvo de t-boc-glicina-irinotecán para su uso en la Etapa 2. Rendimiento > 95%.

30 Etapa 2. Desprotección de t-boc-glicina-irinotecan

Se disolvió t-boc-glicina-irinotecan (1 mol) de la Etapa 1 en DCM con agitación para formar una solución visualmente homogénea. A esta solución se le añadió TFA (15,8 moles) durante un periodo de 5 a 10 minutos y la solución resultante se agitó durante aproximadamente 2 horas. El material de partida residual se midió por RP-HPLC y se determinó que era menor que aproximadamente 5%. A continuación se añadió acetonitrilo a la solución de reacción para formar una solución visualmente homogénea a RT. Esta solución se añadió después a MTBE (46,8 kg) que se agitó suficientemente a 35°C para favorecer la cristalización. Opcionalmente para reducir el uso de MTBE, el DCM en la solución de reacción se reemplazó por acetonitrilo por destilación de 15 a 40°C . Después del intercambio de disolvente, la solución que contenía el producto se añadió a aproximadamente 50% menos de volumen de MTBE (23 kg) que se agitó suficientemente a la temperatura de cristalización (35°C). El mezclado continuó durante media hora a una hora. El sólido resultante se filtró y la torta se lavó con MTBE.

La torta húmeda se secó a vacío para producir el polvo de sal de glicina-irinotecán para su uso en la Etapa 3. El contenido de trifluoroacetato y cloruro del producto se determinó mediante cromatografía iónica con un detector de conductividad. (Rendimiento > 95%).

Etapa 3. PEGilación de glicina-irinotecán utilizando PEG-CM-SCM de 4 brazos

Se añadió el polvo de sal de glicina-irinotecan • sal de TFA/HCl de la Etapa 2 a un recipiente de reacción al que se había añadido DCM (aprox. 23 L). La mezcla se agitó durante aproximadamente 10 a 30 minutos para permitir que la glicina-irinotecan • sal de TFA/HCl se dispersara en DCM. A continuación se añadió lentamente trietilamina (aprox. 1,05 moles (HCl + TFA) moles en polvo de glicina-irinotecan sal de TFA/HCl), a una velocidad que mantuvo la temperatura del recipiente a 24°C o menos. La mezcla resultante se agitó durante 10 a 30 minutos para permitir la disolución de la base libre de GLY-IRT (irinotecán modificado con glicina).

Aproximadamente 80% de la cantidad total (6,4 kg) de PEG-SCM-20kD de 4 brazos se añadió al recipiente de reacción en el transcurso de hasta 30 minutos. Después de la disolución del reactivo PEG, se controló el progreso de la reacción por IPC. (En el caso de que la cantidad de GLY-IRT no conjugado fuera mayor de 5% cuando la reacción parecía haber alcanzado una meseta, se añadió 20% restante de PEG SCM de 4 brazos al recipiente de reacción y se controló el progreso de la reacción hasta que se observó un valor constante de GLY - IRT sin reaccionar).

El producto bruto se precipitó añadiendo la solución de reacción en MTBE (113,6 L) agitada a temperatura ambiente durante un periodo de 1-1,5 horas, seguido de agitación. La mezcla resultante se transfirió a un secador de filtro con

un agitador para eliminar las aguas madre. El precipitado (producto bruto) se secó parcialmente a vacío a aproximadamente 10 a 25°C con una agitación intermitente mínima.

5 El producto bruto se colocó después en un recipiente de reacción, al que se había añadido IPA (72 L) y MeOH (8 L), seguido de agitación durante 30 minutos. Se aplicó calor para lograr una disolución visualmente completa (una solución clara) a 50°C de temperatura del recipiente, seguido de agitación durante 30 a 60 minutos. La solución se enfrió después a 37°C, se mantuvo durante varias horas, seguido de enfriamiento a 20°C. La mezcla se transfirió a un secador de filtro agitado y se filtró para eliminar las aguas madre para formar una torta sobre un filtro. La torta se lavó con MTBE al 70% en IPA y MeOH al 30% y se secó parcialmente a vacío. Este procedimiento se repitió dos veces más, con la excepción de que, antes de enfriar, la solución clara de IPA/MeOH que contenía PEG-Gly-IRT de 4 brazos se filtró utilizando un filtro en línea (1 µm) a 50°C para eliminar cualquier partícula potencial en la última (3ª) cristalización.

15 Se tomaron tres muestras representativas de la torta húmeda lavada y se midieron los niveles de NHS mediante RMN. La torta húmeda se secó a vacío.

El producto ("API") se envasó en bolsas dobles selladas bajo una atmósfera inerte y se almacenó a -20°C sin exposición a la luz. El rendimiento del producto fue de aproximadamente 95%.

20 Ejemplo 2

Caracterización del "PEG-Gly-Irino-20k de 4 brazos" producto del Ejemplo 1 en forma de sal mixta

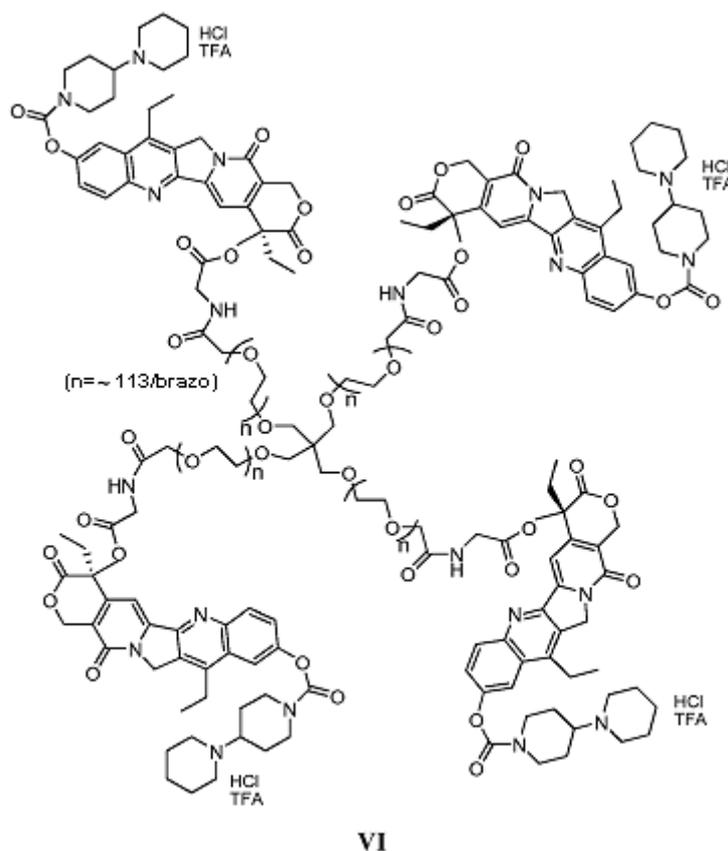
25 El producto del Ejemplo 1 se analizó mediante cromatografía iónica (análisis CI). Véase la Tabla 1 a continuación para los resultados analíticos de la CI para varios lotes de producto de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos.

Tabla 1

Tanto por ciento en moles de Irinotecan unido a PEG			
LOTE Núm.	Sal de TFA	Sal de HCl	Base libre
010	59	36	5 (bajo)
020	64 (alto)	30	6
030	27 (bajo)	24	49 (alto)
040	53	26	21
050	54	26	20
060	57	28	15
070	53	33	14
080	53	27	20
090	44	19	36
100	33	41	26
Promedio de los últimos 7 lotes	50	29	22

30 Basándose en los resultados de la CI proporcionados en la Tabla 1, se puede observar que el producto formado en el Ejemplo 1, PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, es una sal mixta parcial de aproximadamente 50 por ciento en moles de sal de TFA, 30 por ciento en moles de sal de HCl y 20 por ciento en moles de base libre, basándose en las moléculas de irinotecan conjugadas en el producto. La mezcla de sales se observó incluso después de repetidas (1-3) recristalizaciones del producto. En los diversos lotes de producto analizados anteriormente, se puede observar que aproximadamente 35 - 65 por ciento en moles de las moléculas de irinotecán en la composición están protonadas en forma de sal de TFA, aproximadamente 25-40 por ciento en moles de las moléculas de irinotecán en la composición están protonadas en forma de la sal de HCl, mientras que el 5-35 por ciento en moles restante del irinotecán no está protonado (es decir, en forma de base libre).

40 La estructura generalizada del producto se muestra a continuación, donde los radicales de irinotecan se muestran en forma de base libre, y en asociación con HCl y TFA - como una indicación de la naturaleza de sal mixta del producto.



Ejemplo 3

Estudios de estabilidad de frente al estrés de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos

Se realizaron estudios de estabilidad acelerada en un intento de evaluar la composición del producto PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos. Se examinaron composiciones que contenían cantidades variables de irinotecán protonado, así como diferentes cantidades de sal de TFA frente a la de HCl.

Estudios de la estabilidad frente al estrés

El producto formado en el Ejemplo 1, PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, compuesto 5, (aproximadamente 1-2 g) se pesó en bolsas de PEG PE 'Whirl Top' y se colocó en otra bolsa 'Whirl Top' para simular las condiciones de embalaje de API. En un estudio (los resultados se muestran en la **FIG. 1**), las muestras se colocaron en una cámara ambiental a 25°C/HR de 60% durante 4 semanas. En otro estudio, las muestras se colocaron en una cámara ambiental a 40°C/75% de HR durante varios meses (los resultados se muestran en la **FIG. 2 y la FIG. 3**). Se tomaron muestras y se analizaron periódicamente durante el transcurso de los estudios.

Resultados

Los resultados de los estudios se muestran en las **FIG. 1, FIG. 2 y FIG. 3**. En la **FIG. 1**, se representan gráficamente los porcentajes del área pico de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos para muestras almacenadas a 25°C y 60% de humedad relativa en función del tiempo. Los datos indicados corresponden a muestras que consisten en >99% de sal de HCl (<1% de base libre, triángulos), 94% de sal total (6% de base libre, cuadrados) y 52% de sal total (48% de base libre, círculos). Las pendientes de las gráficas indican que a medida que el contenido de base libre aumenta, la estabilidad del producto disminuye. Bajo las condiciones de estrés empleadas (es decir, 25°C hasta durante 28 días), la caída en el área del pico de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos se correspondía bien con el aumento del irinotecán libre, indicando que el modo de descomposición es principalmente a través de hidrólisis del enlace éster para liberar el irinotecán. Basándose en los resultados observados, parece que una mayor cantidad de base libre en el producto conduce a una disminución de la estabilidad hacia la hidrólisis. Así, el producto que contiene un mayor grado de irinotecán protonado parece tener una mayor estabilidad frente a la hidrólisis que el producto que contiene menos irinotecán protonado (basándose en el porcentaje en moles).

La **FIG. 2** y la **FIG. 3** muestran otra serie de datos obtenidos de la muestra que contienen > 99% de sal de HCl (<1% de base libre, cuadrados) y una muestra que consiste en 86% de sales totales (14% de base libre, rombos) que se almacenaron a 40°C y 75% de humedad relativa. La **FIG. 2** muestra el incremento en el irinotecán libre durante 3 meses para ambas muestras. Estos datos son coherentes con los datos del estudio descrito anteriormente (resumido en la **FIG. 1**), que muestra que el producto con un contenido de base libre más alto es menos estable con respecto a la hidrólisis. La **FIG. 3** Muestra el aumento de especies PEG más pequeñas para las mismas muestras durante 3 meses. El aumento en especies de PEG más pequeñas es indicativo de la descomposición de la cadena principal de PEG para proporcionar múltiples especies de PEG. Los datos indican que el producto correspondiente a la sal de HCl es más propenso a la descomposición de la cadena principal de PEG que la muestra de sal mixta que contiene 14% de base libre en condiciones de estabilidad acelerada. Por lo tanto, aunque no se pretende limitarse a la teoría, parece que mientras que la sal mixta parcial puede degradarse principalmente por liberación hidrolítica de fármaco, la sal hidrocioruro parece degradarse por un mecanismo diferente, es decir, degradación de la cadena principal polimérica. Sin embargo, el grado de degradación de la cadena principal se puede minimizar, p.ej., controlando las condiciones de almacenamiento.

En resumen, los dos modos de descomposición observados muestran tendencias opuestas con respecto al contenido de sal/base libre. Aunque la sal hidrocioruro demostró un mayor grado de degradación de la cadena principal en pruebas de estabilidad acelerada (posiblemente debido a la acidez de la formulación), se demostró que la sal hidrocioruro tiene una mayor estabilidad hidrolítica que la base libre o la sal TFA-hidrocioruro mixta.

Ejemplo 4

Estudio de quiralidad

Se determinó la quiralidad del carbono-20 del irinotecán en PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos.

Como se detalla en la documentación del proveedor, el material de partida de hidrocioruro de irinotecán es ópticamente activo, con C-20 en su configuración (S). La posición C-20 en el irinotecán porta un alcohol terciario, que no es fácilmente ionizable, por lo que no se espera que este sitio se racemice excepto en condiciones extremas (fuertemente ácidas). Para confirmar la quiralidad en el C-20 del PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, se utilizó un método de HPLC quiral para analizar el irinotecán liberado del producto mediante hidrólisis química.

Basándose en los cromatogramas resultantes, no se detectó enantiómero (R) para las muestras de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos. Tras la hidrólisis, se confirmó que el irinotecán liberado del producto conjugado estaba en configuración (S).

Ejemplo 5

Estudio de hidrólisis

Todas las especies de irinotecán PEGilado se consideran parte del PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos (independientemente de la forma en particular, base libre, sal de TFA.cloruro mixta, o sal cloruro); cada especie se hidroliza de manera limpia para producir irinotecán con una pureza >99%. Además, las principales especies DS4 cargadas de fármaco (irinotecán unido covalentemente a cada uno de los cuatro brazos poliméricos) y la especie parcialmente sustituida - DS3 (irinotecán unido covalentemente a tres brazos poliméricos), DS2 (irinotecán unido covalentemente a dos de los brazos poliméricos) y la especie DS 1 (irinotecán unido covalentemente a un solo brazo polimérico) - se hidrolizan a la misma velocidad para liberar el fármaco libre, irinotecán.

Se realizaron experimentos para determinar el destino de las especies de PEG que contenían irinotecán en la sal TFA.cloruro mixta de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos bajo transesterificación (K_2CO_3 en CH_3OH , 20°C) e hidrólisis acuosa (pH 10, 20°C). La reacción de transesterificación se completó en >99% después de 45 minutos. La reacción de hidrólisis acuosa se completó en >99% en 24 horas. Para ambos tipos de reacción, se realizaron reacciones de control utilizando irinotecán en condiciones idénticas y se observaron algunos picos de artefacto. Después del ajuste para los picos de artefacto, en ambos casos, los irinotecanos producidos tenían purezas cromatográficas >99%.

Basándose en estos resultados, se concluyó que esencialmente todas las especies PEGiladas en el PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos tales como sal hidrocioruro liberan irinotecán. Las superposiciones de las HPLC tomadas en el tiempo a partir de la reacción de hidrólisis acuosa muestran la conversión de DS4 a DS3 a DS2 a DS1 a irinotecán. Todas estas especies se hidrolizan para liberar irinotecán como se ilustra en la **FIG. 4** que demuestra la liberación de irinotecán mediante hidrólisis de especies de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos mono-, di-, tri- y tetra-sustituidas.

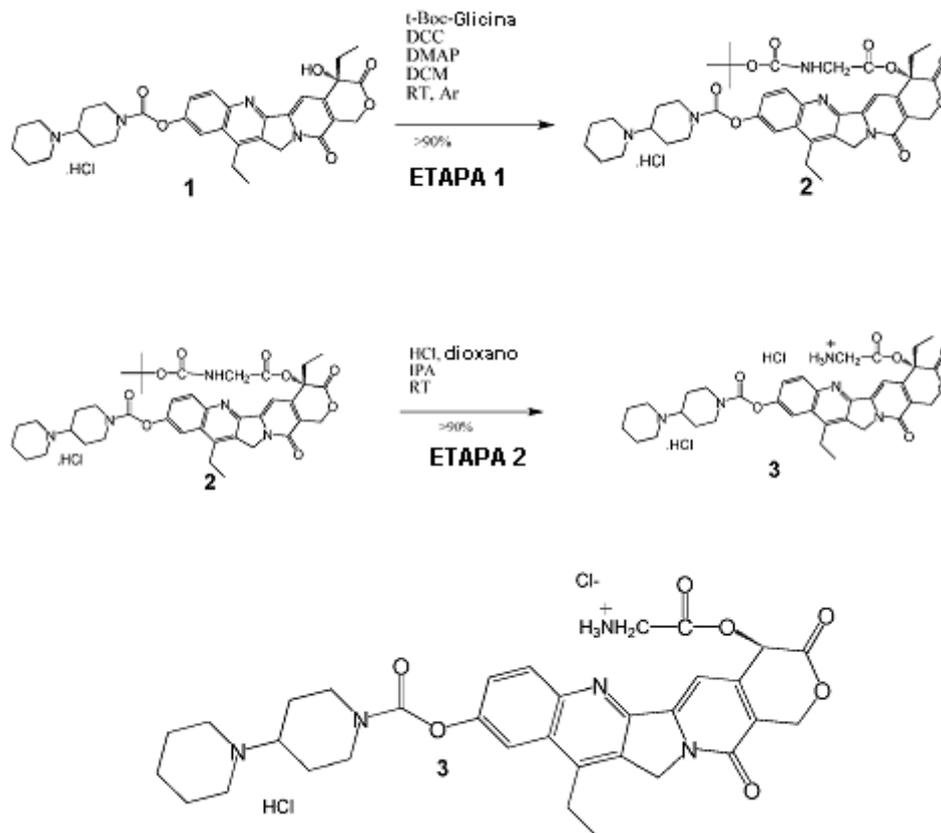
Se llevaron a cabo experimentos adicionales para medir las tasas de hidrólisis para el componente principal de PEG-Gly-Irino-20K, de 4 brazos, DS4, y sus intermedios sustituidos en menor grado, DS3, DS2 y DS1 en tampón acuoso (pH 8,4) en presencia de carboxipeptidasa B porcina y en plasma humano. La hidrólisis en tampón acuoso (pH 8,4)

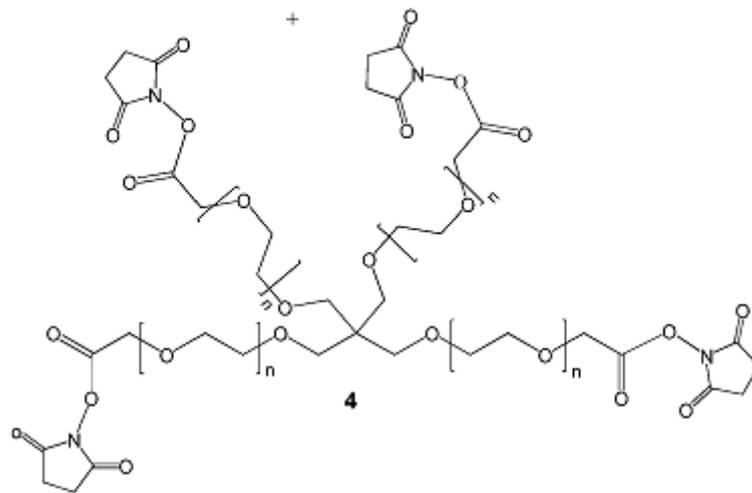
en presencia de carboxipeptidasa B porcina fue un intento de realizar una hidrólisis basada en enzimas. El experimento de control a pH 8,4 sin la enzima demostró más tarde que la hidrólisis estaba dirigida por el pH, y por lo tanto era principalmente una hidrólisis química. Los datos fueron, sin embargo, valiosos para la comparación con los datos obtenidos de la hidrólisis realizada en plasma humano. Estos experimentos mostraron que las tasas de hidrólisis de los diversos componentes no son significativamente diferentes y se comparan favorablemente con las predicciones teóricas. Experimentos adicionales midieron las tasas de hidrólisis de los componentes principales (DS4, DS3, DS2 y DS1) de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos en plasma humano. Estos experimentos también muestran que los diversos componentes se hidrolizan a la misma velocidad y se comparan favorablemente con las predicciones teóricas.

La FIG. 5 y la FIG. 6 presentan gráficas que muestran las tasas de hidrólisis teóricas frente a los datos experimentales para la hidrólisis química (en presencia de enzima) y la hidrólisis de plasma, respectivamente. En ambos casos, las predicciones teóricas se basan en tasas idénticas para la hidrólisis de cada especie para producir el siguiente homólogo más bajo más irinotecán libre (es decir, DS4> DS3> DS2> DS1).

Ejemplo 6

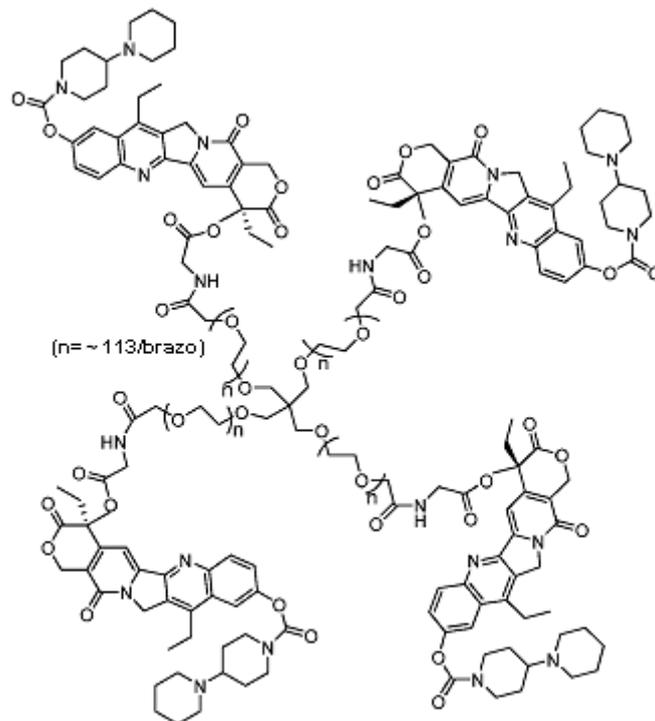
Preparación de pentaeritritolil-(PEG-1-metilen-2-oxo-vinilamino acetato ligado a irinotecán)-20K de 4 brazos "PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos"





ETAPA 3
TEA
DCM
RT, Ar

Producto aislado
con MTBE



> 95% en moles de HCl

5 Etapa 1. Síntesis de hidrocloreto de Boc-Glicina-irinotecán (Gly-IRT HCl)

Parte 1: Secado de hidrocloreto de irinotecán trihidratado (IRT.HCL.3H2O)

Se cargó IRT·HCl·3H₂O (45,05 g, 66,52 mmoles) en un reactor. Se cargó N,N-dimetilformamida (DMF) anhidra (666 mL, 14,7 mL/g de IRT·HCl·3H₂O, DMF contenido de agua de no superior a 300 ppm) en el reactor. Con agitación lenta, el reactor se calentó a 60°C (temperatura de la camisa). Después de que el irinotecan (IRT) se disolvió completamente (5-10 minutos) se aplicó lentamente vacío para alcanzar 5-10 mbar y la DMF se separó por destilación. Cuando el volumen de producto destilado condensado (DMF) alcanzó 85-90% de la carga inicial de DMF, se liberó el vacío. Se introdujo heptano (1330 mL, 30,0 mL/g de IRT·HCl·3H₂O, contenido de agua no superior a 50 ppm) en el reactor y la temperatura de la camisa se redujo a 50°C. El heptano se destiló a vacío (100-150 mbar) hasta que el volumen del producto destilado fue de aproximadamente 90% de la carga inicial de heptano. Se llevaron a cabo dos ciclos más de destilación de heptano (2 x 1330 mL de cargas de heptanos y destilaciones). Se retiró una muestra de fase disolvente del reactor y se analizó para determinar el contenido de DMF utilizando cromatografía de gases para asegurar que el contenido en DMF de la muestra no fuera mayor de 3% p/p. (En el caso de que la DMF residual sea >3,0% p/p, se lleva a cabo un cuarto ciclo de destilación azeotrópica). La suspensión resultante se utilizó para la reacción de acoplamiento.

15 Parte 2: Reacción de acoplamiento

Se cargó diclorometano (1330 mL, 29,5 mL DCM/g IRT·HCl·3H₂O) en el reactor donde se estaba agitando la suspensión de IRT·HCl seco (1,0 equiv) en heptanos residuales (razón de masa aproximada de heptano residual con respecto a IRT HCl era 3). El contenido de la reacción se agitó durante 15 - 30 minutos, y la temperatura del baño se mantuvo a 17°C. Se cargaron Boc-glicina (14,0 g, 79,91 mmoles, 1,2 equiv.) y DMAP (0,81 g, 6,63 mmoles, 0,1 equiv.), en forma sólida, en el reactor. Se preparó una disolución en DCM de DCC (1,5 equiv en 40 mL de diclorometano) y se añadió durante 15 - 30 minutos, y la mezcla de reacción resultante se agitó a 17°C (temperatura del baño) durante 2-3 horas. La reacción se controló por HPLC para determinar que se había completado. Se cargó una solución de enfriamiento rápido previamente elaborada en la mezcla de reacción para sofocar cualquier DCC restante. Brevemente, la solución de enfriamiento rápido previamente elaborada es una solución mezclada con anterioridad de TFA e IPA en diclorometano, preparada mezclando TFA (1,53 mL, 0,034 mL/g de IRT·HCl·3H₂O) e IPA (3,05 mL, 0,068 mL/g de IRT·HCl·3H₂O) en DCM (15,3 mL, 0,34 mL/g de IRT·HCl·3H₂O) y se añadió al reactor V1 durante 5 - 10 minutos cuando la conversión era de al menos 97%. El contenido se agitó durante 30-60 minutos adicionales para permitir el enfriamiento rápido. La mezcla de reacción que contenía DCU se filtró a través de un filtro de 1 micrómetro en otro reactor. El producto filtrado de reacción se destiló a 1/3 de volumen a vacío a 35°C. Se añadió alcohol isopropílico (IPA) (490,5 mL, 10,9 mL/g de IRT·HCl·3H₂O) a la mezcla concentrada y la mezcla se agitó durante 30 - 60 min a 50°C (temperatura de la camisa). La solución homogénea resultante se concentró por destilación a vacío hasta aproximadamente el 85% del volumen de carga de IPA inicial y el producto concentrado resultante se enfrió a 20°C (temperatura de la camisa). La mezcla de reacción en IPA se transfirió durante 60 - 80 minutos a heptano (1750 mL, 38,8 ml de heptano/g de IRT·HCl·3H₂O) a 20°C. La suspensión resultante que contenía Boc-gly-IRT HCl precipitado se agitó durante 60-90 minutos adicionales y el producto se recogió por filtración. El matraz de reacción se enjuagó con heptano (2 x 490 mL, 20,0 mL de heptano/g de IRT·HCl·3H₂O) y la torta producto se lavó enjuagando. La torta húmeda se secó de 20°C a 25°C a vacío durante un mínimo de 12 horas. Rendimiento: 57,13 g (110%, alto debido a disolventes residuales).

40 Etapa 2. Síntesis de hidrocloreuro de Glicina-Irinotecán (Gly-IRT HCl)

Un matraz de fondo redondo de 100 ml se cargó con BOC-Gly-IRT (2,34 g, 0,003 moles) e IPA (12 ml), a lo cual se añadió HCl (12 ml, 4 M, en dioxano, 0,045 moles durante un periodo de 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 6 horas (y se controló mediante HPLC para determinar que se había completado la reacción), seguido por la adición de acetnitrilo seco (12 mL). La mezcla de reacción resultante se añadió lentamente (5 minutos) a una solución en agitación de MTBE (140 mL). El sólido así obtenido se filtró y se secó a vacío para dar sal HCl de Gly-IRT en forma de un polvo de color amarillo. Rendimiento: 2,17 g.

50 Etapa 3. Síntesis de hidrocloreuro de PEG20K-glicina Irinotecan de 4 brazos

Se cargó Gly-IRT HCl (5,04 g, 14,61% en peso de HCl) en un reactor de 100 mL y se enjuagó con argón. La temperatura de la camisa se ajustó a 20°C. Se añadieron DCM (100 mL) y TEA (4 mL). La solución se agitó durante 10 minutos.

Se añadió una carga inicial de PEG20K-SCM de 4 brazos (26,5 g) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Se tomó una muestra y se analizó por medio de HPLC. Los datos de HPLC mostraron un 6,1% restante de Gly-IRT.HCl. Se añadió una segunda carga de PEG20K-SCM de 4 brazos (1,68 g) a la mezcla de reacción y la solución se agitó durante aproximadamente 2 horas. Se tomó una muestra para análisis por HPLC. Los datos de análisis de HPLC mostraron 1,2% restante de Gly-IRT HCl.

Después, la solución de reacción se añadió lentamente a MTBE (800 mL) para precipitar el producto. El producto precipitado se agitó durante 30 minutos y se recogió por filtración. La torta húmeda se lavó dos veces con MTBE (200 mL). El producto se secó a vacío. El intermedio de hidrocloreuro de PEG20K-irinotecán de 4 brazos bruto se analizó mediante cromatografía iónica para determinar el contenido de cloruro.

La Tabla 2 resume el análisis de contenido de sal del intermedio de hidrocioruro de PEG20K-irinotecán de 4 brazos resultante (cromatografía CI).

Tabla 2

Cloruro	Contenido de IRT	Cloruro
% en peso	% en peso	% en moles
0,493%	9,8%	83,3%

5

Ajuste de la sal y aislamiento del acetato de etilo:

El intermedio hidrocioruro de PEG20K-irinotecan de 4 brazos bruto (29,1 g, 83,3% en moles CI) se disolvió en 600 mL de acetato de etilo a 35°C. La solución se agitó durante 15 minutos tras la disolución visible de los sólidos. Se cargó una solución 0,1 N de HCl en etanol (8,5 mL) a la solución y se agitó durante 30 minutos. El matraz se sumergió en un baño de hielo con agitación fuerte. Los sólidos visibles precipitaron de la solución después de 10 minutos. La mezcla se agitó durante un total de 60 minutos en el baño. El producto precipitado se recogió por filtración en una frita de vidrio mediante la aplicación de un ligero vacío. La torta húmeda se lavó con una solución de MeOH al 30%/MTBE al 70% (400 mL). El producto se colocó a vacío para secar. Rendimiento: 28,3 g

15

El contenido de cloruro del producto final (determinado mediante cromatografía iónica) fue el siguiente:

Contenido IRT % en peso	Cloruro % en moles
9,8%	98,8%

Se determinó mediante cromatografía iónica que otro lote preparado por el procedimiento anterior poseía 103,8% en moles de cloruro (es decir, estaba completamente en forma de la sal hidrocioruro). Cuando se almacenó y evaluó durante un período de 4 semanas a 40°C, el total de las especies relacionadas producto cambió de 98,7% a 97,0%, mientras que el irinotecán libre cambió de 0,4% a 1,25%, lo que indica la estabilidad de la sal hidrocioruro (es decir, la resistencia) con respecto a la degradación hidrolítica. En estas mismas condiciones, la escisión de la cadena principal de polietilenglicol se detectó después de 4 semanas, pero no se pudo medir.

25 Ejemplo 7

Preparación de PEG-20K de 4 brazo basado en pentaeritritol a una escala de 1,9 KG

Materiales y métodos. Se debe utilizar una calidad muy alta de óxido de etileno que tenga el menor contenido de agua disponible, ya que el contenido de agua conduce a impurezas poliméricas de diol. PRECAUCIÓN: El óxido de etileno es un compuesto muy reactivo que puede reaccionar explosivamente con la humedad, por lo que se deben evitar cuidadosamente fugas en la reacción y el aparato de transferencia. Además, se debe tener cuidado en las operaciones para situar al personal de trabajo detrás de escudos protectores o en búnkers.

Se sometió a reflujo tolueno anhidro (4 L) durante dos horas en un reactor de presión de acero inoxidable con camisa de 7,56 litros. A continuación, una parte del disolvente (3 L) se separó por destilación a presión atmosférica. El tolueno residual se descargó después y el reactor se secó durante la noche haciendo pasar vapor a través de la camisa del reactor y aplicando una presión reducida de 3 - 5 mm Hg. A continuación, el reactor se enfrió a temperatura ambiente, se llenó con tolueno anhidro (4 L) y se añadió PEG-2K de 4 brazos basado en pentaeritritol (pentaeritritol SUNBRIGHT PTE®-2000, peso molecular de aproximadamente 2.000 dalton, NOF Corporation, 200 g, 0,100 moles). El disolvente se separó por destilación a presión reducida, y después el reactor se enfrió a 30°C en atmósfera de nitrógeno seco. Se añadieron al reactor un litro de tolueno secado en tamices moleculares (contenido de agua ~ 5 ppm) y una aleación líquida de sodio-potasio (Na 22%, K 78%, 1,2 g). El reactor se calentó a 110°C y se añadió continuamente óxido de etileno (1.800 g) durante tres horas manteniendo la temperatura de reacción entre 110 y 120°C. A continuación, el contenido del reactor se calentó durante dos horas a ~ 100°C, y después se bajó la temperatura a ~ 70°C. El exceso de óxido de etileno y tolueno se separó por destilación a presión reducida. Después de la destilación, el contenido del reactor permaneció bajo presión reducida y se realizó un burbujeo de nitrógeno para eliminar las trazas de óxido de etileno. Se añadió ácido fosfórico (IN) para neutralizar el residuo alcalino y el producto se secó a presión reducida. Finalmente se drenó el producto del reactor y se filtró proporcionando, después de enfriar, 1.900 g de sólido blanco. Se aplicó cromatografía de filtración en gel (GFC) para caracterizar el producto polimérico alcoxilado, PEG-20K de 4 brazos basado en pentaeritritol. Este método analítico proporcionó un cromatograma de la composición con separación de los componentes de acuerdo con el peso molecular. Se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con columna Shodex KW-803 GFC (300 x 8 mm) y detector de refractómetro diferencial. El flujo de la fase móvil (NaNO₃ 0,1 M) fue de 0,5 mL/min. El cromatograma GFC se muestra en la **FIG. 7**.

El análisis de GFC mostró que el producto PEG-20K de 4 brazos contenía lo siguiente: Producto de elevado PM

0,42%, PEG-20K de 4 brazos 99,14%, HO-PEG(10K)-OH 0,44%.

Ejemplo 9

5 Análisis de PEG-20K de 4 brazos disponible en el mercado

NOF Corporation es un líder actual en el suministro de PEG comerciales. De este modo, se obtuvo un PEG-20K de 4 brazos basado en pentaeritritol fresco disponible en el mercado (SUNBRIGHT PTE®-20.000, peso molecular de aproximadamente 20.000 Dalton, NOF Corporation) y se analizó utilizando Cromatografía de Filtración en Gel (GFC). Se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con columna Shodex KW-803 GFC (300 x 8 mm) y detector de refractómetro diferencial. El flujo de la fase móvil (NaNO₃ 0,1 M) fue de 0,5 mL/min. El cromatograma GFC se muestra en la **FIG. 8**.

El análisis de GFC mostró que este producto PEG-20K de 4 brazos comercial contenía: Productos de elevado PM 3,93%, PEG-20K de 4 brazos 88,56%, HO-PEG(10K)-OH 3,93%, HO-PEG(5K)-OH 3,58%.

Ejemplo 10

20 Preparación de oligómero alcoxilable: PEG-2K DE 4 brazos basado en pentaeritritol a una escala de 15 kg

Se lavó dos veces un reactor de presión de acero inoxidable con camisa de 75,6 L con 95 kg de agua desionizada a 95°C. El agua de lavado se retiró y el reactor se secó durante la noche haciendo pasar vapor a través de la camisa del reactor y aplicando presión reducida (3 - 5 mm Hg). El reactor se llenó con 25 kg de tolueno anhidro y una parte del disolvente se separó por destilación a presión reducida. El tolueno residual se descargó después y el reactor se mantuvo a presión reducida. A continuación, el reactor se enfrió a temperatura ambiente, se llenó con tolueno anhidro (15 L) y se añadió pentaeritritol (1,020 g). Se separó por destilación una parte del disolvente (~8 L) a presión reducida y después se enfrió el reactor a 30°C en atmósfera de nitrógeno seco. Se añadió al reactor una aleación líquida de sodio-potasio (Na 22%, K 78%, 2,2 g). Se añadió continuamente óxido de etileno anhidro (14,080 g) durante tres horas manteniendo la temperatura de reacción a 150-155°C. A continuación, el contenido del reactor se calentó durante 30 minutos a ~ 150°C, y después la temperatura se bajó a ~ 70°C. El exceso de óxido de etileno y tolueno se separó por destilación a presión reducida. Después de la destilación, el contenido del reactor permaneció a presión reducida y se realizó un burbujeo de nitrógeno para eliminar las trazas de óxido de etileno. Finalmente se drenó el producto del reactor proporcionando 14.200 g de líquido viscoso. Se aplicó cromatografía de filtración en gel (GFC) para caracterizar el producto, PEG-2K de 4 brazos basado en pentaeritritol. Este método analítico proporcionó un cromatograma de la composición con separación de los componentes de acuerdo con el peso molecular. Se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con columna Shodex KW-803 GFC (300 x 8 mm) y detector de refractómetro diferencial. El flujo de la fase móvil (NaNO₃ 0,1 M) fue de 0,5 mL/min.

El análisis de GFC mostró que el producto PEG-2K de 4 brazos era ~100% puro con impurezas de peso molecular bajo o alto por debajo de los límites detectables.

Ejemplo 11

45 Preparación de PEG-20K de 4 brazos basado en pentaeritritol a escala de 20 kg

Se lavó dos veces un reactor de presión de acero inoxidable con camisa de 75,6 L con 95 kg de agua desionizada a 95°C. Se descargó el agua y el reactor se secó durante la noche haciendo pasar vapor a través de la camisa del reactor y aplicando una presión reducida de 3 - 5 mm Hg. El reactor se llenó con 25 kg de tolueno y una parte del disolvente se separó por destilación a presión reducida. El tolueno residual se descargó a continuación y el reactor se mantuvo a presión reducida. A continuación, se enfrió el reactor a temperatura ambiente, se llenó con tolueno anhidro (21 L) y se añadió el oligómero alcoxilable previamente aislado: PEG-2K de 4 brazos basado en pentaeritritol del Ejemplo 10 (2,064 g). Se separó por destilación una parte del disolvente (16 L) a presión reducida y después se enfrió el reactor a 30°C en atmósfera de nitrógeno seco. Se añadieron cuatro litros de tolueno secado en tamices moleculares (contenido de agua ~ 5 ppm) y aleación líquida de sodio-potasio (Na 22%, K 78%; 1,7 g), y el reactor se calentó a 110°C. Después se añadió continuamente óxido de etileno (19.300 g) durante cinco horas manteniendo la temperatura de reacción a 145-150°C. A continuación, el contenido del reactor se calentó durante 30 minutos a ~140°C, y después se bajó la temperatura a ~100°C. Se añadió ácido acético glacial (100 g) para neutralizar el catalizador. El exceso de óxido de etileno y tolueno se separó por destilación a presión reducida. Después de la destilación, el contenido del reactor permaneció a presión reducida y se realizó un burbujeo de nitrógeno para eliminar las trazas de óxido de etileno. Finalmente se drenó el producto del reactor proporcionando 20.100 g de sólido de color blanco. Se aplicó cromatografía de filtración en gel (GFC) para caracterizar el producto polimérico alcoxilado, PEG-20K de 4 brazos basado en pentaeritritol. Este método analítico proporcionó un cromatograma de la composición con separación de los componentes de acuerdo con el peso molecular. Se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con columna Shodex KW-803 GFC (300 x 8 mm) y detector de

ES 2 623 677 T3

refractómetro diferencial. El flujo de la fase móvil (NaNO_3 0,1 M) fue de 0,5 mL/min.

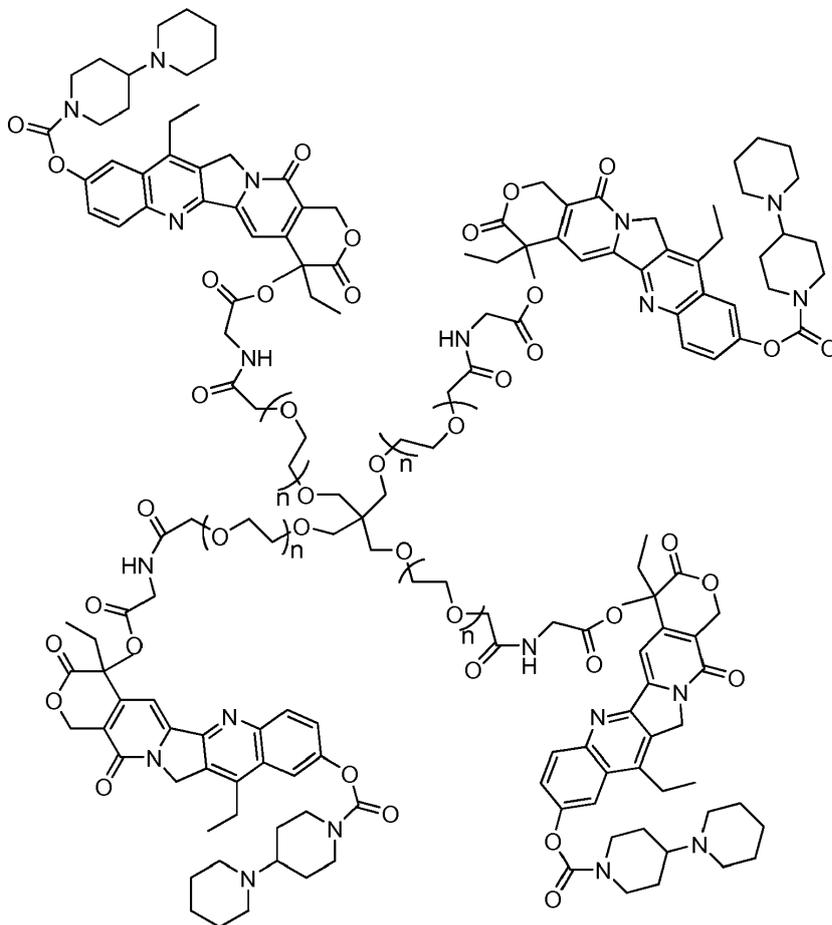
El análisis de GFC mostró que el producto PEG-20K de 4 brazos contenía lo siguiente: Producto de elevado PM 0,75%, PEG-20K de 4 brazos 97,92%, HO-PEG(10K)-OH 1,08%, HO-PEG(5K)-OH 0,48% .

5

REIVINDICACIONES

1. Una forma de sal hidrohialuro de un producto conjugado de polímero-agente activo que corresponde a la estructura (I):

5



(I)

en donde cada n es un número entero que varía de 20 a 500 y más de 95 por ciento en moles de los átomos de nitrógeno alcalinos del irinotecán están protonados en forma de sal hidrohialuro (HX), donde X se selecciona entre fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro.

10

2. La sal hidrohialuro de la reivindicación 1, en donde más de 96 por ciento en moles, más de 97 por ciento en moles o más de 98 por ciento en moles de los átomos de nitrógeno alcalinos del irinotecán están protonados en forma de sal hidrohialuro.

15

3. La sal hidrohialuro de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la sal hidrohialuro es una sal hidrocioruro.

20

4. La sal hidrocioruro de la reivindicación 3, en donde el peso molecular medio ponderal del producto conjugado es de 23.000 dalton.

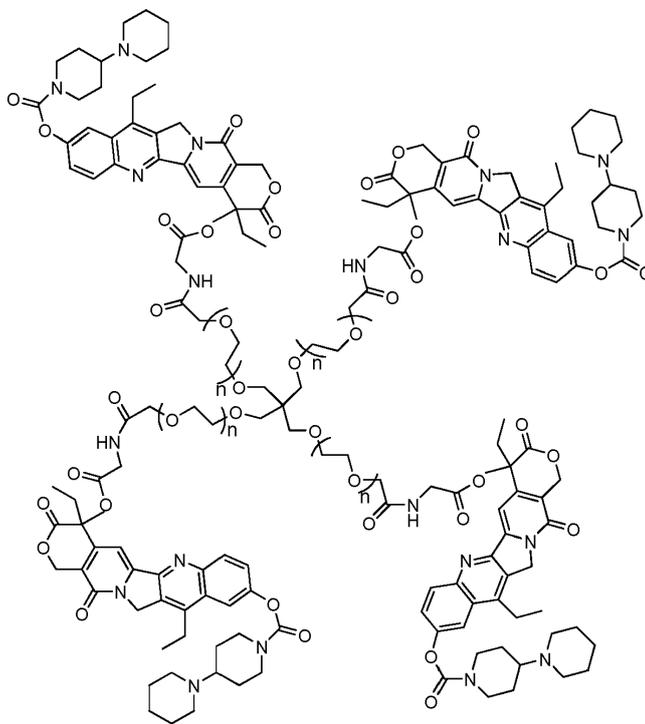
5. La sal hidrocioruro de la reivindicación 3, en donde n es un número entero que varía de 80 a 150.

25

6. La sal hidrocioruro de la reivindicación 5, en donde n tiene un valor promedio en cada brazo de 113.

7. Un método para preparar una composición que comprende una sal hidrohialuro de un producto conjugado de

polímero-agente activo que corresponde a la estructura (I), en donde n es un número entero que oscila entre 20 y 500, comprendiendo el método:

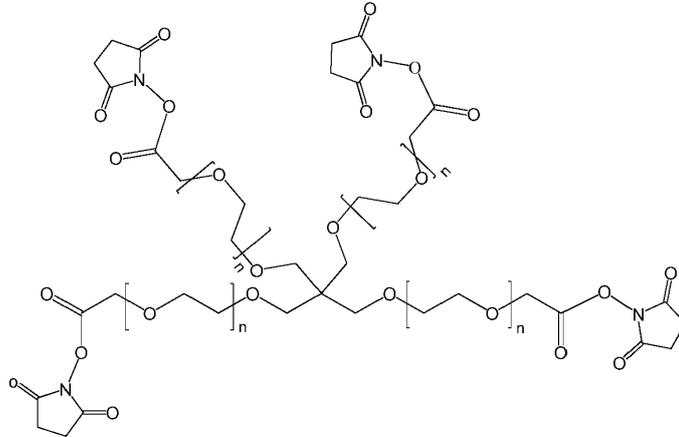


(I)

- 5
- (i) tratar el hidrohloruro de glicina-irinotecán, donde el grupo amino de glicina está en forma protegida, con un exceso molar de ácido hidrohlogenado para eliminar de este modo el grupo protector para formar hidrohloruro de glicina-irinotecán desprotegido,
- 10 (ii) acoplar el hidrohloruro de glicina-irinotecán desprotegido de la etapa (i) con un reactivo polimérico que porta un éster activo en presencia de una base para formar sal hidrohloruro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos y
- (iii) recuperar la sal hidrohloruro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos por medio de precipitación.
- 15 8. El método de la reivindicación 7, donde el hidrohloruro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos recuperado posee más de 95 por ciento en moles, más de 96, más de 97 por ciento en moles o más que 98 por ciento en moles de átomos de nitrógeno alcalino de irinotecán en forma de sal hidrohloruro (HX).
- 20 9. El método de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente (iv) analizar la sal hidrohloruro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos recuperada para determinar el contenido de haluro y, en el caso de que el contenido de haluro sea inferior a 95 por ciento en moles (v) disolver la sal hidrohloruro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos recuperada en acetato de etilo, y añadir ácido hidrohlogenado adicional.
- 25 10. El método de la reivindicación 9, en donde el análisis es mediante cromatografía iónica (CI).
11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el ácido hidrohlogenado se añade en forma de una solución de etanol.
- 30 12. El método de la reivindicación 11, en donde después de añadir ácido hidrohlogenado adicional en la etapa (v), la sal hidrohloruro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos se recupera por medio de precipitación, opcionalmente efectuada por enfriamiento.
- 35 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde el hidrohloruro de glicina-irinotecán en forma protegida se trata con un exceso molar de diez veces o más de ácido hidrohlogenado para eliminar de este modo el grupo protector para formar hidrohloruro de glicina-irinotecán.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el hidrohhaluro de glicina-irinotecán en forma protegida se trata con un exceso molar de ácido hidrohalogenado en un intervalo de diez veces a 25 veces para eliminar de este modo el grupo protector para formar hidrohhaluro de glicina-irinotecán.
- 5 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-14, en donde el hidrohhaluro de glicina-irinotecán en forma protegida es hidrocioruro de terc-butiloxicarbonil(Boc)-glicina-irinotecán, donde el grupo amino de la glicina está protegido con Boc.
- 10 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-15, en donde el hidrohhaluro de glicina-irinotecán en la etapa (i) es hidrocioruro de glicina-irinotecán en forma protegida, y el hidrocioruro de glicina-irinotecán en forma protegida se trata con ácido clorhídrico para eliminar el grupo protector, opcionalmente con una solución de ácido clorhídrico en dioxano.
- 15 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-16, en donde la etapa (i) comprende adicionalmente aislar el hidrohhaluro de glicina-irinotecán antes de la etapa (ii), opcionalmente por medio de precipitación.
18. El método de la reivindicación 17, donde el hidrohhaluro de glicina-irinotecán se precipita mediante la adición de metil-terc-butiléter (MTBE).
- 20 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-18, donde la base en la etapa (ii) es una amina.
20. El método de la reivindicación 19, donde la amina se selecciona entre trimetilamina, trietilamina y dimetilamino-piridina.
- 25 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-20, donde la etapa (ii) se lleva a cabo en un disolvente clorado.
22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-21, donde la precipitación en la etapa (iii) comprende la adición de metil-terc-butil éter.
- 30 23. Una composición que comprende una sal hidrohhaluro de pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil-glicina-irinotecán de 4 brazos preparada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-22.
- 35 24. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende la sal hidrohhaluro de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 23 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
25. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 24, que comprende un tampón de lactato, en forma liofilizada, opcionalmente contenido en un vial de un solo uso.
- 40 26. Una composición estéril de la reivindicación 25, en donde la cantidad de sal hidrohhaluro contenida en el vial es el equivalente de una dosis de 100 mg de irinotecán.
- 45 27. El uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de uno o más tipos de tumores sólidos cancerosos cuando se disuelve en una solución de dextrosa al 5% p/p y se administra por infusión intravenosa.
- 50 28. La composición de la reivindicación 24 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto de mamífero que se ha diagnosticado que tiene uno o más tumores sólidos cancerosos mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéuticamente aceptable a un sujeto a lo largo de una duración de tiempo eficaz para producir una inhibición del crecimiento del tumor sólido en el sujeto.
29. La composición para su uso de la reivindicación 28, en donde el tumor sólido canceroso se selecciona del grupo que consiste en colorrectal, ovárico, cervical, de mama y de pulmón de células no pequeñas.
- 55 30. El uso de una composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 24 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 60 31. El método de la reivindicación 7, en donde el reactivo polimérico que porta un éster activo se puede obtener a partir de un método que comprende: alcoxilar en un disolvente adecuado un oligómero alcoxilable previamente aislado para formar un material polimérico alcoxilado, en donde el oligómero alcoxilable previamente aislado tiene un peso molecular medio ponderal conocido y definido superior a 300 Dalton; modificar el material polimérico alcoxilado, en una o más etapas, para que porte un éster activo, formando de este modo un reactivo polimérico que porta un éster activo.

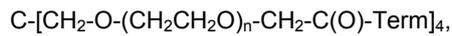
32. El método de la reivindicación 31, en donde el reactivo polimérico que porta un éster activo tiene la siguiente estructura:



5 en donde cada n es de 40 a 500.

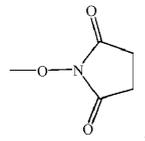
33. Una composición que comprende sales hidrocloreto de productos conjugados poliméricos de cuatro brazos, en donde al menos el 90% de los productos conjugados de cuatro brazos en la composición:

(i) tiene una estructura abarcada por la fórmula,

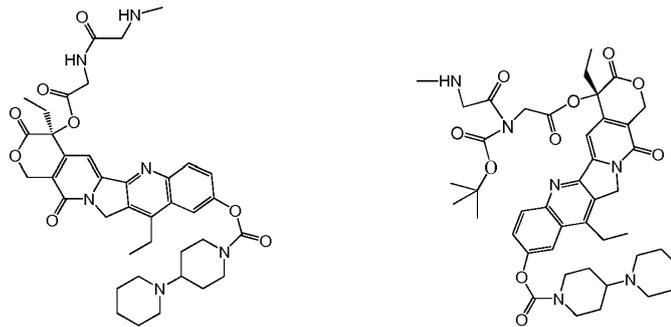


en donde

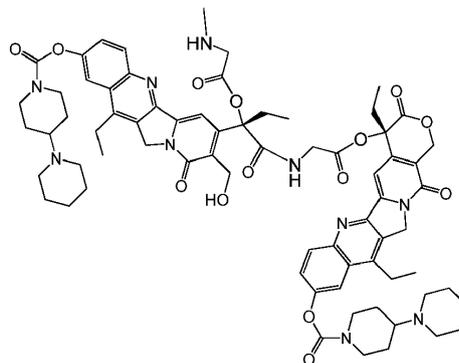
n, en cada caso, es un número entero que tiene un valor de 5 a 150 (p.ej., 113), y Term, en cada caso, se selecciona del grupo que consiste en -OH, -OCH₃,



-NH-CH₂-C(O)-OH, -NH-CH₂-C(O)-OCH₃,



20



y -NH-CH₂-C(O)-O-Irino ("GLY-Irino"), en donde Irino es un residuo de irinotecán; y
(ii) para cada Term en al menos 90% de los productos conjugados de cuatro brazos en la composición, al menos 90% de los mismos son -NH-CH₂-C(O)-O- Irino, y
5 adicionalmente en donde para cada grupo amino dentro de cada Irino en el al menos 90% de los productos conjugados de cuatro brazos en la composición, cada grupo amino estará protonado o no protonado, donde cualquier grupo amino protonado dado es una sal hidrocioruro.

10

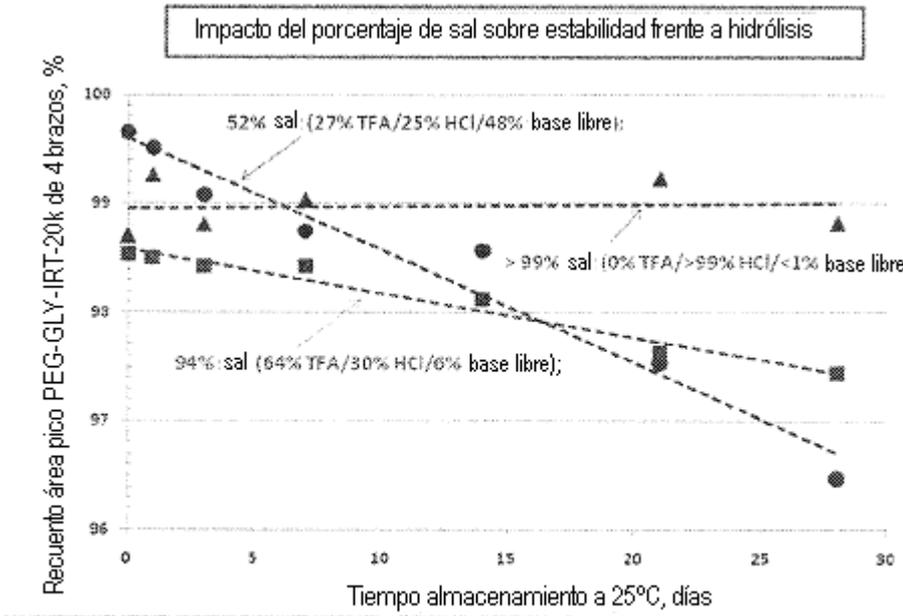


FIG. 1

Estabilidad de especies de sal de PEG-Gly-Irino-20k de 4 brazos

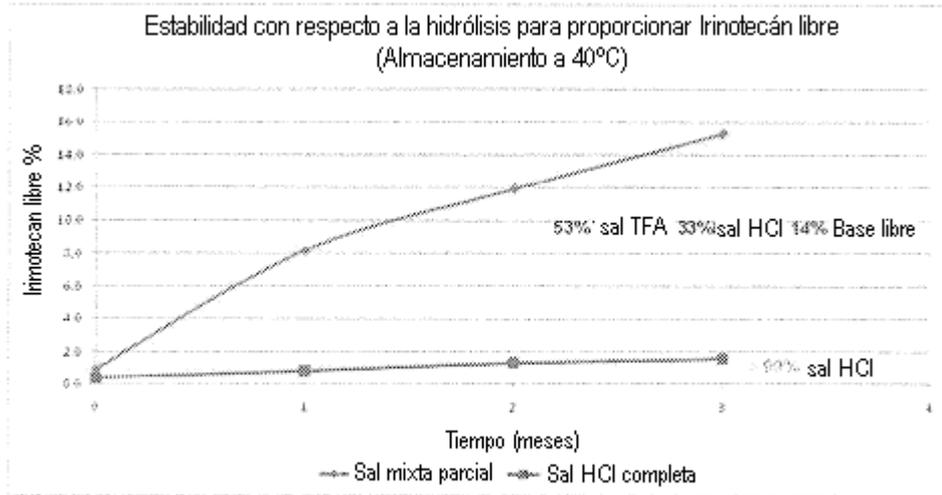


FIG. 2

Estabilidad de especies de sal de PEG-Gly-Irino-20k de 4 brazos

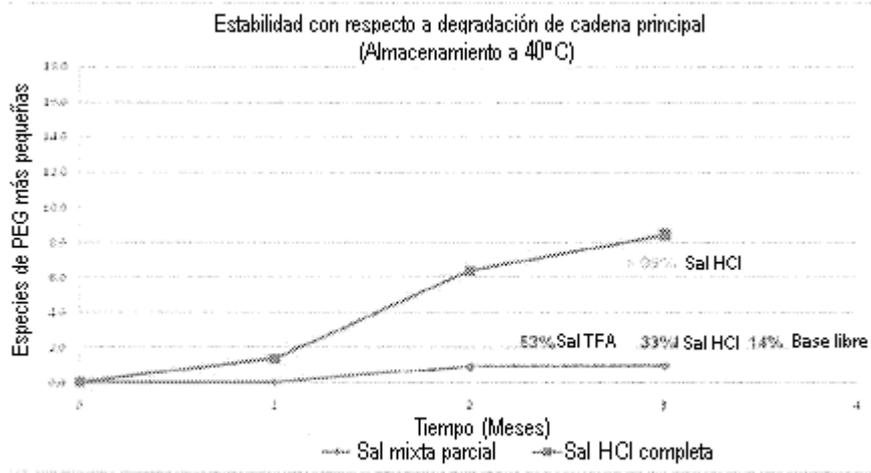


FIG. 3

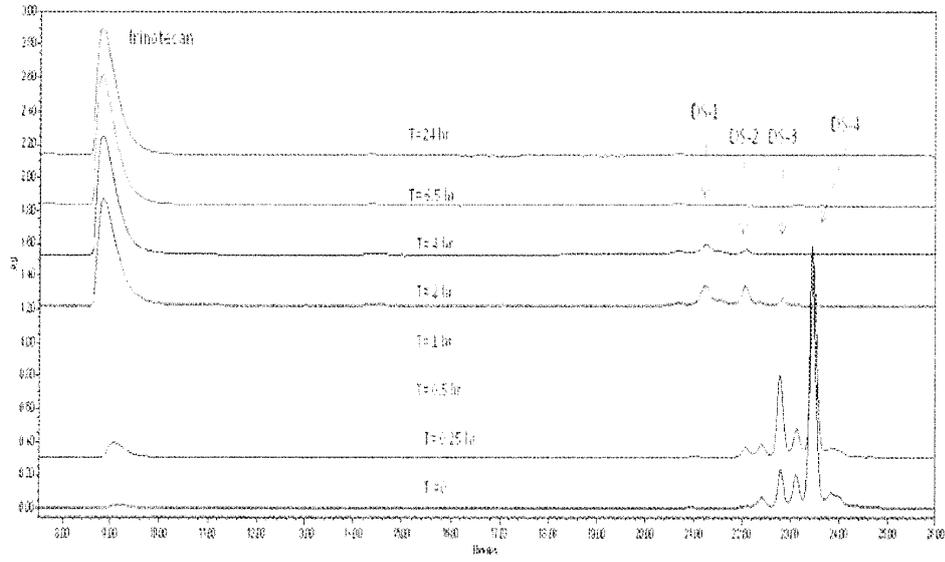


FIG. 4

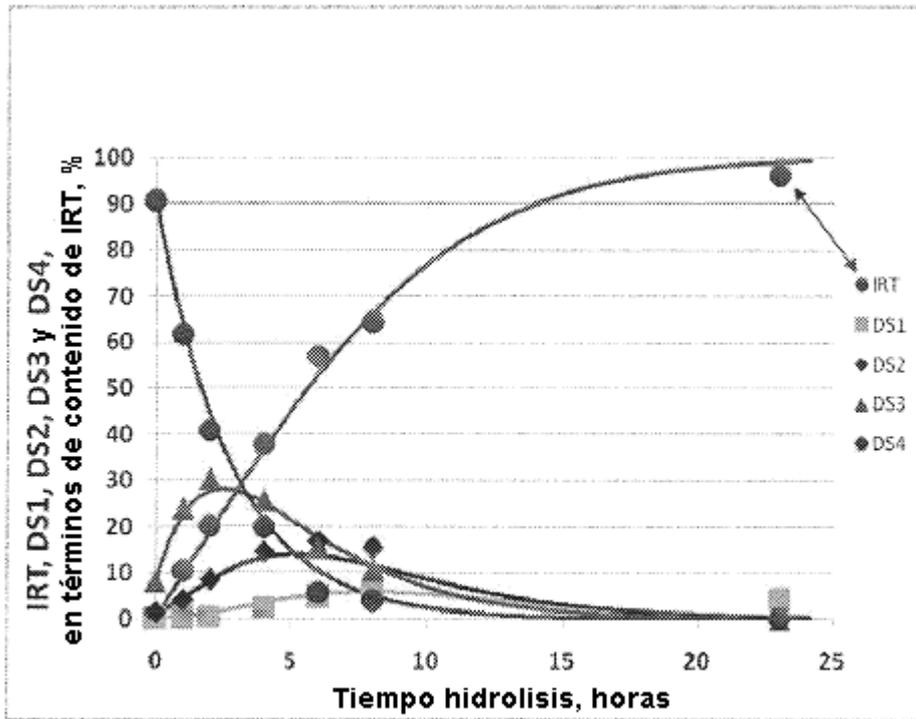


FIG. 5

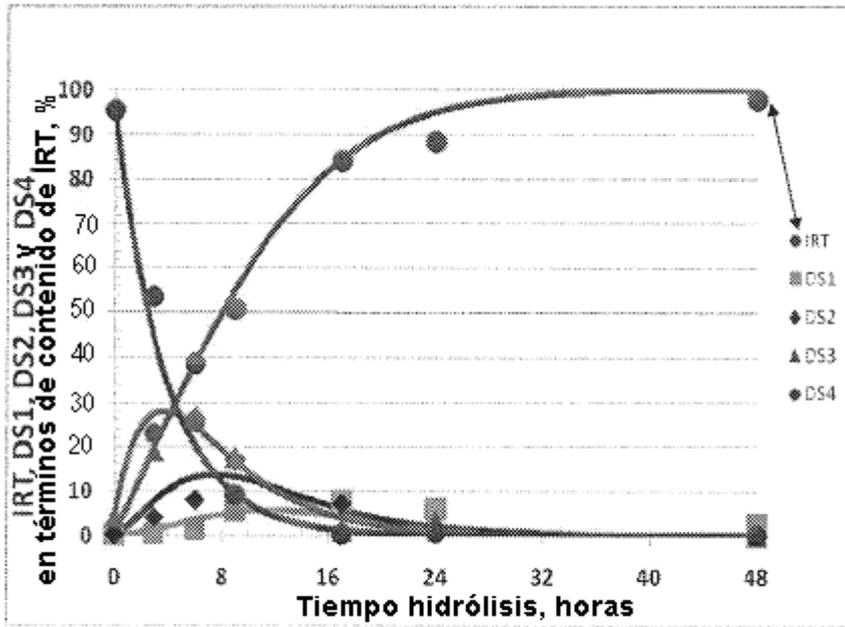
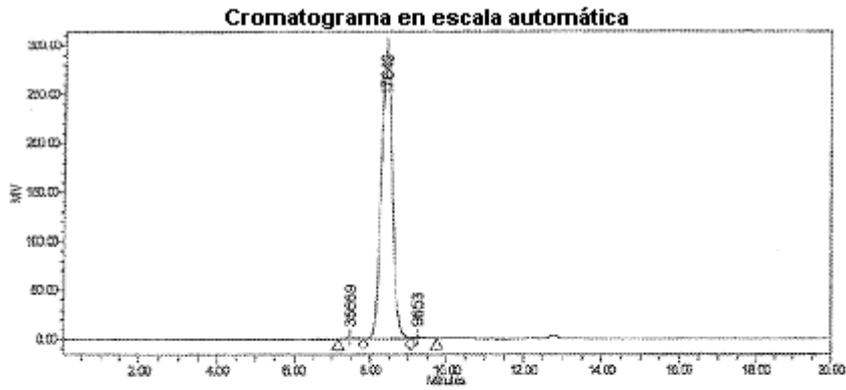
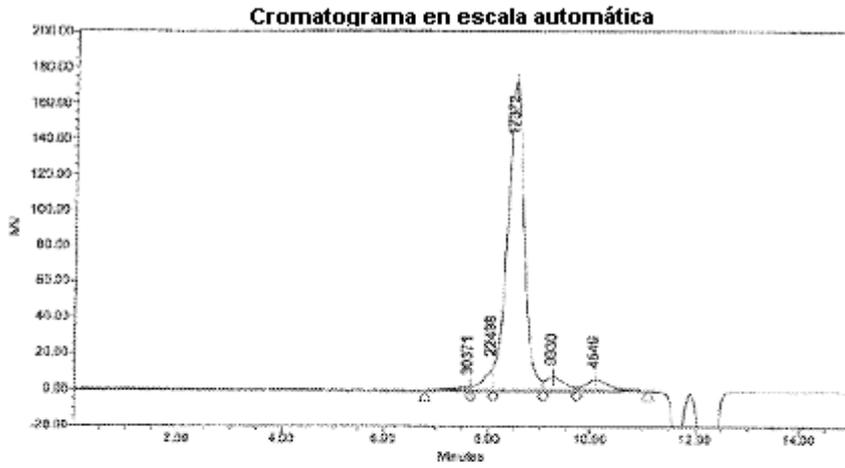


FIG. 6



	% Area	Tiempo retención	Mp	
1	0,42	7,465	35,669	Producto elevado PM
3	99,14	8,404	17,643	PEG-20K 4 BRAZOS
4	0,44	9,251	9,653	HO-PEG(10K)-OH

FIG. 7



	% Area	Tiempo retención	Mp	
1	0,60	7,650	30,371	Producto elevado PM
2	3,33	8,100	22,498	Producto elevado PM
3	88,56	8,495	17,372	PEG-20K 4 BRAZOS
4	3,93	9,273	9,930	HO-PEG(10K)-OH
5	3,58	10,106	4,549	HO-PEG(5K)-OH

FIG. 8