

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 570**

51 Int. Cl.:

A61K 47/58	(2007.01) A61K 9/70	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01) A61F 2/00	(2006.01)
A61K 49/12	(2006.01)	
A61P 29/00	(2006.01)	
A61K 9/14	(2006.01)	
A61K 9/20	(2006.01)	
A61K 9/22	(2006.01)	
A61K 9/48	(2006.01)	
A61K 9/52	(2006.01)	
A61K 9/66	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2005 PCT/US2005/010801**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2005 WO05097073**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2005 E 05732710 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 1737428**

54 Título: **Sistemas de suministro macromoleculares para imagenología no invasiva, evaluación y tratamiento de artritis y otras enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

31.03.2004 US 558047 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
615 ARAPEEN DRIVE, SUITE 110
SALT LAKE CITY, UTAH 84108, US**

72 Inventor/es:

**WANG, DONG;
KOPECEK, JINDRICH;
MILLER, SCOTT, C. y
KOPECKOVÁ, PAVLA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 641 570 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

Sistemas de suministro macromoleculares para imagenología no invasiva, evaluación y tratamiento de artritis y otras enfermedades inflamatorias

Campo técnico de la invención

5 Esta invención se refiere a la biotecnología, más particularmente, a sistemas de suministro poliméricos solubles en agua para imagenología no invasiva, la evaluación y el tratamiento de la artritis y otras enfermedades inflamatorias.

Antecedentes de la invención

10 La artritis reumatoide (AR) es la artritis inflamatoria más común, que afecta aproximadamente al 1% de la población general en todo el mundo. En Estados Unidos, alrededor del 4,5% de las personas mayores de 55 años se han visto afectadas (1, 2).

Como enfermedad simétrica, la AR suele implicar las mismas articulaciones en ambos lados del cuerpo. La angiogénesis y las lesiones microvasculares son características comunes de la inflamación de la AR, lo que conduce a una infiltración anormal de la proteína sérica en la sinovia (3-5). También se han observado células linfáticas dañadas o en cantidad reducida en la sinovia de pacientes con AR (6, 7).

15 Aunque se desconoce la causa exacta de la artritis reumatoide, se han desarrollado muchos medicamentos para aliviar sus síntomas y retardar o detener su progresión. Los fármacos más comúnmente utilizados se basan en tres enfoques principales: tratamiento sintomático con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE), corticosteroides y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) (3).

20 Se ha hecho un esfuerzo considerable para identificar y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la AR. Los medicamentos para la AR, tales como el inhibidor específico de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (un FAINE) (8), los bloqueadores del factor de necrosis tumoral (FNT) y los antagonistas del receptor de la interleucina 1 (IL-1Ra) (FARME) han sido utilizados para aplicaciones clínicas (3). Aunque la nueva generación de fármacos antirreumáticos tiene mayor especificidad por su objetivo molecular, la mayoría de ellos no tienen especificidad por el tejido enfermo, lo que conduce a diversos efectos secundarios que limitan su aplicación clínica. Los efectos secundarios bien conocidos de los FAINE incluyen indigestión, sangrado estomacal, daño hepático y renal, zumbido en los oídos (tinnitus), retención de líquidos y presión arterial alta (9). Los efectos secundarios bien conocidos de los corticosteroides incluyen moretones, adelgazamiento de los huesos, cataratas, aumento de peso, redistribución de la grasa, diabetes y presión arterial alta (10). Algunos FARME son inmunosupresores y por lo general conllevan graves efectos secundarios, como una mayor susceptibilidad a la infección (3). El reciente retiro de Vioxx® (inhibidor de la COX-2, Merck) es un buen ejemplo del tremendo impacto que los efectos secundarios pueden tener en un fármaco de otra manera eficaz.

30 La distribución omnipresente *in vivo* de receptores utilizados por la mayoría de los fármacos antirreumáticos es una causa principal de sus efectos secundarios. Los sistemas de administración terapéutica, que podrían proporcionar específicamente fármacos contra la artritis al tejido enfermo de los pacientes con AR, pueden evitar muchos de los efectos secundarios que se manifiestan en otros tejidos mientras que logran una eficacia terapéutica clínica mucho mayor.

35 La aplicación de polímeros solubles en agua como un vehículo para fármacos para la administración eficaz del fármaco a los sitios deseados (terapia macromolecular) ha sido ampliamente estudiada durante las últimas dos décadas en el tratamiento de tumores sólidos (11). Debido a la vasculatura "permeable" y al sistema linfático poco desarrollado, las macromoléculas extravasadas pueden acumularse eficientemente en el tumor sólido. Este fenómeno se denomina "permeabilidad y retención mejorada" (PRM) selectiva del tumor y se ha utilizado con éxito para dirigir los fármacos contra el cáncer a tumores sólidos (12).

40 D. Wang et al. (Inhibition of cathepsin K with lysosomotropic macromolecular inhibitors, *Biochemistry*, vol. 41, no. 28, 16 de julio de 2002, páginas 8849-8859) divulga conjugados de un copolímero de HPMA para un inhibidor de catepsina K para tratar la osteoporosis y la artritis reumatoide.

45 Los estudios que utilizan portadores en micropartículas, tales como liposomas para el suministro de agentes antiartríticos a una articulación con AR, indican algunos resultados prometedores en un modelo animal de artritis (13). Sin embargo, el hepatotropismo del liposoma puede ser problemático debido a la toxicidad secundaria para el hígado. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica por un sistema eficaz de suministro de fármacos destinado a los tejidos apropiados.

50 Descripción de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las materias que no están abarcadas por el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la invención actualmente reivindicada. La invención se refiere a sistemas de suministro poliméricos solubles en agua. En una realización, el sistema de suministro se utiliza para la administración de fármacos a los sitios enfermos para el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias. En otra

realización, el sistema de suministro se utiliza para la administración de agentes de imagenología a los sitios enfermos para imagenología no invasiva y la evaluación de los sitios enfermos de artritis y otras enfermedades inflamatorias.

5 En un ejemplo de realización, la invención proporciona sistemas de suministro solubles en agua para el suministro de agentes terapéuticos antiinflamatorios seleccionados del grupo que consiste en proteínas, péptidos, FAINE, FARME, glucocorticoides, metotrexato, sulfasalazina, cloriquina, oro, sal de oro, cobre, sal de cobre, penicilamina, D-penicilamina, ciclosporina, etc., y mezclas de los mismos, tales fármacos son bien conocidos por los expertos en la técnica (37, 38). También se divulga en la presente memoria un sistema de suministro polimérico soluble en agua para el suministro de agentes de imagenología, que son útiles para imagenología no invasiva y para la evaluación de articulaciones artríticas y otros órganos o tejidos enfermos inflamados. Los agentes de imagenología pueden seleccionarse entre cualquiera de los compuestos conocidos, por ejemplo, compuestos útiles para imagenología por RM, PET, CT o escintigrafía gamma, etc. y mezclas de los mismos, tales agentes son bien conocidos por los expertos en la técnica.

15 En otro ejemplo de realización, la invención proporciona un sistema de suministro polimérico soluble en agua para la administración de una combinación de agentes de imagenología y agentes terapéuticos antiinflamatorios. En otro ejemplo de realización, la invención proporciona un sistema de suministro polimérico soluble en agua para uso en un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria y monitoreo del progreso del tratamiento. En otra realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un método de cribado de agentes terapéuticos antiinflamatorios, en el que el agente antiinflamatorio está unido a un sistema de suministro polimérico soluble en agua de la invención y administrado a un sujeto, se monitorea el efecto del agente terapéutico, por ejemplo, utilizando un agente de imagenología, y se identifica un agente terapéutico eficaz. Opcionalmente, se puede coadministrar un agente de imagenología con el fin de monitorear y/o cribar la actividad del agente antiinflamatorio. Opcionalmente, se puede usar una fracción o fracciones de direccionamiento en el método de cribado.

25 En otra realización a modo de ejemplo, la enfermedad inflamatoria es artritis reumatoide, osteoartritis, síndrome de articulación temporomandibular, raíz nerviosa inflamada, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades psoriáticas, asma, colitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, aterosclerosis y/o similar. También se divulgan en la presente memoria sistemas de administración de fármacos que comprenden una cadena principal polimérica soluble en agua, opcionalmente, una fracción o fracciones de direccionamiento, y un agente o agentes terapéuticos y/o un agente de imagenología. El enlace (o enlaces) entre la fracción (o fracciones) de direccionamiento y la cadena principal del polímero es no degradable o degradable en condiciones fisiológicas. El enlace (o enlaces) entre el agente (o agentes) terapéuticos y la cadena principal polimérica es no degradable o degradable bajo condiciones fisiológicas. También se divulgan en la presente memoria sistemas de suministro para agentes de imagenología que comprenden una cadena principal polimérica soluble en agua, opcionalmente, una fracción o fracciones de direccionamiento, y un agente o agentes de imagenología. El enlace (o enlaces) entre la fracción (o fracciones) de direccionamiento y la cadena principal polimérica es no degradable o degradable bajo condiciones fisiológicas. El enlace (o enlaces) entre el agente (o agentes) de imagenología y la cadena principal polimérica es no degradable o degradable bajo condiciones fisiológicas. También se divulga en la presente memoria un método para fabricar una composición farmacéutica y/o un medicamento que comprende uno o más sistemas de administración de la invención para el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis, síndrome de articulación temporomandibular, raíz nerviosa inflamada, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades psoriáticas, asma, colitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, aterosclerosis y/o similares.

40 Como será evidente para una persona experta en la técnica con base en la invención descrita en el presente documento, la invención proporciona la ventaja de incorporar múltiples agentes terapéuticos, fracciones de direccionamiento, marcadores de bioensayos, espaciadores y/o agentes de imagenología que pueden incluir una pluralidad de diferentes especies químicas de uno o más de estos grupos. Por lo tanto, en aún otra realización a modo de ejemplo, los agentes terapéuticos, fracciones de direccionamiento, marcadores de bioensayos, espaciadores y/o agentes de imagenología pueden consistir en cualquier número o combinación de especies diferentes, que tienen los mismos o diferentes efectos.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 ilustra la estructura química de un sistema de suministro polimérico para un agente de contraste de IRM (DOTA-Gd³⁺), abreviado como P-DOTA-Gd³⁺, para la imagenología de articulaciones artríticas y evaluación de la gravedad de la enfermedad.

55 La Figura 2 muestra la histología de las articulaciones del tobillo y rodilla de las ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA) que también se visualizaron por IRM. La Figura 2A es una micrografía de baja potencia de los huesos del tobillo y del pie. La hinchazón y la inflamación extensas son evidentes en los tejidos blandos (*) que rodean los huesos del pie. T = tibia. La Figura 2B muestra la articulación tarsal que ilustra la sinovia inflamada (sinovitis), infiltración inflamatoria extensa (*) y destrucción de cartílagos y huesos. B = hueso, A = cartílagos articulares. La Figura 2C es una micrografía de mayor potencia de la sinovia inflamada. A = cartílago articular. La Figura 2D muestra una destrucción ósea extensa con infiltración inflamatoria (*) en un hueso tarsal (tobillo). Las superficies óseas están revestidas con grandes osteoclastos activos (flechas). La Figura 2E ilustra varios vasos sanguíneos en una región inflamada de la articulación del tobillo que ilustra la reacción inflamatoria alrededor de los vasos. El revestimiento endotelial está engrosado y

vacuolado (flechas). La Figura 2F es una micrografía de baja potencia de la articulación de la rodilla de este mismo animal. La articulación es bastante normal en apariencia, excepto por un pequeño bolsillo de inflamación en el aspecto posterior de la articulación (flecha). Esta misma zona fue contrastada cuando se observó por IRM. T = tibia; F = fémur.

5 La Figura 3 muestra las imágenes de RM de los animales tomadas en diferentes puntos de tiempo. Las imágenes adquiridas fueron procesadas posteriormente utilizando el algoritmo de proyección de máxima intensidad (PMI). La Figura 3A muestra la línea base de rata con AIA; la Figura 3B muestra una rata con AIA, 5 minutos después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; la Figura 3C muestra una rata con AIA, 1 hora después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; la Figura 3D muestra una rata con AIA, 2 horas después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; Figura 3E muestra una rata con AIA, 3 horas después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; Figura 3F muestra una rata con AIA, 8 horas después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; La Figura 3G muestra una rata con AIA, 32 horas después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; Figura 3H muestra una rata con AIA, 48 horas después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; La Figura 3I. Rata sana, línea base; La Figura 3J muestra una rata sana, 5 minutos después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; Figura 3K. Rata sana, 1 hora después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; Figura 3L muestra una rata sana, 2 horas después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; Figura 3M. Rata sana, 8 horas después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; La Figura 3N muestra una rata sana, 48 horas después de la inyección de P-DOTA-Gd³⁺; La Figura 3O muestra una rata con AIA, 5 minutos después de la inyección de OM-NISCAN; La Figura 3P muestra una rata con AIA, 2 horas después de la inyección de OM-NISCAN; Figura 3Q muestra una rata con AIA, 8 horas después de la inyección de OM-NISCAN; La Figura 3R muestra una rata con AIA, 32 horas después de la inyección de OM-NISCAN; La Figura 3S muestra una rata con AIA, 48 horas después de la inyección de OM-NISCAN; La Figura 3T muestra una rata sana, 5 minutos después de la inyección de OM-NISCAN; La Figura 3U muestra una rata sana, 1 hora después de la inyección de OM-NISCAN; La Figura 3V muestra una rata sana, 2 horas después de la inyección de OM-NISCAN; La Figura 3W muestra una rata sana, 8 horas después de la inyección de OM-NISCAN; La Figura 3X muestra una rata sana, 48 horas después de la inyección de OM-NISCAN.

25 La Figura 4 ilustra una Imagenología de RM en un solo plano de las ratas con AIA inyectadas con P-DOTA-Gd³⁺. La Figura 4A muestra una imagen de RM de línea base de una rata con AIA; La Figura 4B muestra una imagen de RM del tobillo y la pata izquierda de una rata con AIA, 2 horas después de la inyección; La Figura 4C muestra una imagen de RM del tobillo y la pata izquierdo de una rata con AIA, 8 horas después de la inyección; La Figura 4D muestra una imagen de MR de la articulación de la rodilla izquierda de una rata con AIA, 8 horas después de la inyección.

30 La Figura 5 ilustra la estructura general del sistema de suministro polimérico soluble en agua. El porcentaje en moles promedio de las fracciones de direccionamiento (T) por cadena polimérica puede variar desde 0% hasta aproximadamente 50%, preferiblemente desde 0% hasta 30%; el porcentaje en moles promedio de los agentes terapéuticos o agentes de imagenología (D) o mezcla de ambos por cadena polimérica puede variar desde 1% hasta aproximadamente 90%; el porcentaje en moles promedio del marcador de bioensayo (L) por cadena polimérica puede variar entre 0% y aproximadamente 50%. El espaciador S₁ comprende una unión de hidrazona. El espaciador S₂ puede ser de uniones o enlaces covalentes o físicos, tales como péptidos u otras estructuras químicas complejas, que pueden o no pueden escindirse por estímulo, tales como cambio de pH, actividad enzimática específica (por ejemplo, catepsina K, MMP, etc.), presencia o ausencia de oxígeno, etc., bajo condiciones fisiológicas. El espaciador S₃ ilustra una unión o enlace covalente o físico no degradable, bajo condiciones fisiológicas. El entrecruzamiento biodegradable opcional (C) pueden ser uniones o enlaces covalentes o físicos, tales como péptidos u otras estructuras químicas complejas, que pueden escindirse por estímulo, tales como un cambio de pH, actividad enzimática específica (por ejemplo, catepsina K, MMP, etc.), presencia o ausencia de oxígeno, etc., bajo condiciones fisiológicas.

45 La Figura 6 ilustra la estructura química de sistema de suministro de fármaco polimérico a modo de ejemplo, con dexametasona como ejemplo de un agente terapéutico, para el tratamiento de la artritis. El profármaco polimérico se abrevia como P-Dex.

La Figura 7 muestra el efecto terapéutico superior de P-Dex sobre fosfato sódico de dexametasona (Dex) en la reducción del tamaño de las articulaciones artríticas inflamadas durante el tratamiento.

50 La Figura 8 muestra el efecto terapéutico superior de P-Dex sobre el fosfato sódico de dexametasona (Dex) en la densidad mineral ósea (DMO) de las articulaciones artríticas inflamadas durante el tratamiento. Los resultados se obtuvieron por absorciometría dual de rayos X (DEXA).

La Figura 9 muestra el efecto terapéutico superior de P-Dex sobre el fosfato sódico de dexametasona (Dex) en la reducción de la erosión de la superficie ósea de las articulaciones artríticas inflamadas durante el tratamiento. Los resultados se obtuvieron mediante histomorfometría utilizando un sistema de análisis de imágenes Bioquant.

55 La Figura 10 muestra el efecto terapéutico superior de P-Dex sobre el fosfato sódico de dexametasona (Dex) por observación histológica de las articulaciones artríticas inflamadas durante el tratamiento.

Mejor modo o modos para llevar a cabo la invención

A lo largo de la descripción de la invención y las reivindicaciones, y siguiendo la convención, el "singular" incluye al "plural"; por ejemplo, un agente terapéutico y/o una fracción de direccionamiento, significa al menos un de tales agentes

terapéuticos o fracciones de direccionamiento, a menos que se indique lo contrario.

Para demostrar el principio de la invención, se usaron técnicas convencionales de examen visual con colorante azul Evans (EB) e imagenología de resonancia magnética (IRM) para seguir el destino *in vivo* de las macromoléculas en un modelo de rata establecido con AIA. Además, el examen histológico confirmó la presencia de la enfermedad en ubicaciones anatómicas específicas donde el sistema de suministro macromolecular se identifica con la técnica de IRM.

EB es un agente de uso común para evaluar la permeabilidad e integridad vascular (23). Se trata de un colorante con cargas múltiples y estructuras aromáticas, que forma un complejo fuerte con la albúmina de plasma. La inyección del colorante se ha utilizado con éxito para establecer el concepto de terapia macromolecular para el tratamiento de tumores sólidos (24). En este experimento, se utilizó la técnica del tinte EB en ratas con AIA para evaluar visualmente la acumulación de albúmina en las articulaciones inflamadas. La pata trasera de las ratas con AIA, donde era evidente la inflamación más grave, incorporaba fácilmente el tinte comparado con el observado en las ratas sanas. Esta observación confirmó que había realmente una concentración mucho mayor de albúmina en plasma en las articulaciones inflamadas del modelo de rata con AIA.

Aunque los resultados con EB son significativos, se observa que el colorante no se une covalentemente a la albúmina y algunas transferencias de colorante no específicamente a otros tejidos. Por ejemplo, una ligera mancha azul era evidente en algunos órganos, incluyendo el hígado y el corazón.

La imagenología de resonancia magnética (IRM) es un método no invasivo de mapeo de la estructura interna del cuerpo. Emplea radiación de radiofrecuencia (RF) en presencia de campos magnéticos cuidadosamente controlados con el fin de producir imágenes transversales de alta calidad del cuerpo en cualquier plano. Representa la distribución de núcleos de hidrógeno y parámetros relacionados con su movimiento en agua y lípidos. La introducción de agentes de contraste paramagnéticos acortaría T_1 (el tiempo de relajación longitudinal) de los núcleos de hidrógeno en los tejidos, lo que a su vez aumentará la intensidad de la señal RM de la misma (14). Por lo tanto, para apoyar aún más los resultados, se utilizó la resonancia magnética (IRM) para rastrear las macromoléculas marcadas con DOTA-Gd³⁺ inyectadas en ratas con AIA.

Se entiende bien que la obtención de una mayor intensidad de la señal de contraste de RM en las imágenes de RM representa la existencia de una mayor concentración de agentes de contraste paramagnéticos en el tejido. El análisis de las imágenes de RM mejoradas del agente de contraste macromolecular de las ratas proporciona información importante sobre el perfil farmacocinético y biodistribución de los sistemas de suministro poliméricos solubles en agua descritos en esta invención. Además, tales agentes de imagenología aumentarán también la sensibilidad y resolución anatómica de las imágenes resultantes de un sujeto (preferiblemente un mamífero, tal como un ser humano), un animal (incluyendo un modelo animal para una enfermedad particular, perro, gato, caballo o ganado), o parte (por ejemplo, un tejido o estructura) del sujeto o animal.

La conjugación de un agente de contraste paramagnético de bajo peso molecular, complejo DOTA-Gd³⁺ con el copolímero de HPMA permitió el monitoreo no invasivo del destino del polímero inyectado en ratas con un escáner de RM. Este enfoque de etiquetado del polímero con un agente de contraste de IRM es similar a marcar los polímeros con fluorocromos para permitir la localización en órganos, tejidos y células. Alternativamente, este enfoque de imagenología también puede usarse con otros agentes de imagenología para PET, CT y escintigrafía gamma con fines de imagenología no invasiva, evaluación de tejidos y órganos enfermos y detección de objetivos moleculares en los tejidos u órganos de interés, etc.

Por lo tanto, se ha sintetizado un agente de contraste de imagenología de resonancia magnética macromolecular (IRM) con base en un copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) para ilustrar la invención. Después de la administración sistemática del agente de contraste en un modelo de rata de artritis inducida por adyuvante (AIA), se tomaron imágenes de RM mejoradas de contraste, que muestran la distribución del polímero en diferentes puntos de tiempo. La correlación de los resultados de RM con resultados visuales e histopatológicos adicionales de las ratas con AIA, demuestra la deposición preferente y retención de macromoléculas en las articulaciones inflamadas. Por lo tanto, se demuestra la eficacia del uso de la terapia macromolecular para el tratamiento de la artritis reumatoide. Además, estos resultados demuestran la viabilidad de utilizar agentes de imagenología macromoleculares para imagenología y evaluación de articulaciones artríticas.

La invención incluye sistemas de suministro poliméricos para la administración de fármacos antiinflamatorios.

Los sistemas de suministro poliméricos pueden comprender además un agente de imagenología para el suministro de agentes de imagenología, tales como compuestos químicos usados como agentes potenciadores en IRM (por ejemplo, DOTA-Gd³⁺, DTPA-Gd³⁺, etc.), PET (por ejemplo, compuestos marcados o complejados con ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ⁸²Rb, etc., tal como ¹⁸F-FDG), CT (por ejemplo, un compuesto que contiene yodo o bario, tal como ácido 2,3,5-triiodobenzoico) e imagenología de escintigrafía gamma (por ejemplo, compuestos complejados con ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹¹³In y ¹⁵³Sm, etc.).

Procedimiento de IRM

Las imágenes de RM de los animales se adquirieron en un sistema de obtención de imágenes Signa LX de 1,5 T

(General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI), usando una bobina de arreglo en fase. Las imágenes se adquirieron utilizando una secuencia de FSPGR preparada para IR tridimensional de una sola losa en el plano coronal. Los parámetros de imagenología más comunes fueron TR = 13,4 ms, TE = 2,2 ms, TI = 300 ms, ángulo de giro de 25°, matriz de adquisición en un plano 512 x 256, campo de visión (FOV) de 20 x 10 cm², 64 porciones por losa, porciones de 1,0 mm de espesor con interpolación de 2X a 0,5 mm.

Síntesis de poli(HPMA-co-APMA-co-MA-FITC).

Se disolvieron HPMA (1 g, 7 mmol), APMA (0,14 g, 0,78 mmol), MA-FITC (0,043 g, 7,8 mmol), AIBN (0,057 g, 0,35 mmol) y MPA (0,001 mL, 1 mmol) en metanol (10 mL), se colocaron en una ampolla y se purgó con N₂ durante 5 minutos. La ampolla se selló a la llama y se mantuvo a 50°C durante 24 horas. El polímero se aisló por precipitación de la solución resultante en acetona y se precipitó nuevamente dos veces. Después de secar el polímero en un desecador (sobre NaOH), se determinó el rendimiento final como 0,9 g. El contenido de grupos amino libres en el copolímero se determinó como 7,7 x 10⁻⁴ mol/g usando el ensayo de ninhidrina (18).

Síntesis de P-DOTA

Se mezclaron poli(HPMA-co-APMA-co-MA-FITC) (170 mg, [NH₂] = 1,33 x 10⁻⁴ mol), éster DOTA-NHS (100 mg, 2 x 10⁻⁴ mol) y diisopropiltilamina (DIPEA, 160 mL, 9,33 x 10⁴ mol, destilada a partir de ninhidrina) en DMF (1,5 mL, destilado a partir de P₂O₅) y se agitó durante la noche. El conjugado se precipitó en éter y se secó al vacío. El producto se purificó adicionalmente en una columna LH-20, se dializó (el tamaño de corte del peso molecular es de 6-8 kDa) y se liofilizó para obtener 190 mg de producto final. El grupo NH₂ libre de residuos se determinó con ensayo de ninhidrina y el contenido de DOTA en el producto se calculó como 7,5 x 10⁻⁴ mol/g.

20 Síntesis y purificación del agente de contraste macromolecular IRM P-DOTA-Gd³⁺

Se disolvieron P-DOTA (100 mg, [DOTA] = 6,9 x 10⁻⁵ mol) y GdCl₃•6H₂O (38 mg, 1,04 x 10⁻⁴ mol) en 2 mL de H₂O desionizada. El pH de la solución se mantuvo a 5,0-5,5 durante la noche por adición gradual de solución de NaOH (1 N). Se añadió entonces sal disódica de EDTA (38 mg, 1,04 x 10⁻⁴ mol) a la solución para quelar el exceso de Gd³⁺. Después de agitar durante 30 minutos, la solución lechosa se purificó con una columna Sefadex G-25 para separar el Gd³⁺ quelado con EDTA y otros compuestos de bajo peso molecular que no reaccionaron del conjugado polimérico. El conjugado se liofilizó para producir 115 mg de P-DOTA-Gd³⁺. El contenido de gadolinio se determinó mediante espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) como 0,52 mmol/g. El Pm del agente de contraste polimérico de IRM se determinó mediante FPLC como 55 kDa con una polidispersidad de 1,43. La relaxividad T₁ del conjugado se determinó como 10,4 mM⁻¹ s⁻¹ por Gd³⁺ complejoado usando una técnica de Look-Locker corregida por homogeneidad B1 en el escáner GE NV/Cvi de 1,5T con el sistema operativo LX 8.4 a temperatura ambiente (19°C). La estructura química del agente de contraste macromolecular de IRM se muestra en la Figura 1.

Síntesis de P-Dex

Se disolvieron HPMA (1 g, 0,00698 mol), MA-GG-OH (0,156 g, 0,00078 mol), MA-FITC (0,02 g, 0,00004 mol) y AIBN (0,007 mg, 0,000043 mol) en una mezcla DMSO (1 mL) y MeOH (8 mL). La solución se transfirió a una ampolla y se purgó con N₂ durante 5 minutos. Después se polimerizó a 50°C durante 24 horas. El polímero se volvió a precipitar dos veces para producir aproximadamente 1 g de copolímero. Se activó adicionalmente con un gran exceso de hidroxí succinimida (HOSu) y después se hizo reaccionar con hidracina. Después de la nueva precipitación, se conjugó dexametasona con el copolímero en presencia de 1 gota de ácido acético en DMF. El conjugado se purificó con una columna LH-20 y se liofilizó para obtener el conjugado final (estructura mostrada en la Figura 6) con un contenido de dexametasona de 49 mg/g (de conjugado).

Modelo de rata de artritis inducida por adyuvante

Se obtuvieron ratas Lewis macho (175-200 g) de Charles River Laboratories (Portage, MI) y se dejaron aclimatar durante al menos una semana. Para inducir artritis, se mezclaron Mycobacterium tuberculosis H37Ra (1 mg) y LA (5 mg) en aceite de parafina (100 µL), se sonicó y se inyectó s.c. en la base de la cola de la rata (20). Las ratas fueron luego asignadas al azar en 3 ratas/grupo. La progresión de la inflamación de la articulación fue seguida por la medición del diámetro de la articulación del tobillo con un calibrador. Se dio especial cuidado a las ratas a medida que se desarrollaba la inflamación para asegurar la disponibilidad y el acceso al agua y los alimentos. Los agentes de contraste de IRM utilizados para el estudio se inyectaron directamente en la vena yugular mientras el animal se anestesiaba con Ketamina y Xilazina.

50 Visualización de la acumulación de albúmina en plasma en articulaciones con AR

Se inyectó colorante azul Evans (EB, 10 mg/kg en solución salina) en ratas sanas y con AIA a través de la vena de la cola. La extravasación y acumulación de colorante en las áreas de inflamación de las articulaciones podría observarse visualmente como aspecto del pigmento azul. Se tomaron fotografías del tobillo y las patas antes y 8 horas después de la inyección.

55 Histología

5 En la necropsia, se removieron y fijaron los órganos principales y extremidades con formalina regulada con fosfato al 10% durante 24 horas. Los órganos fueron entonces deshidratados y embebidos en parafina para análisis histopatológicos de rutina. Las extremidades se deshidrataron gradualmente en concentraciones ascendentes de etanol y se embebieron en poli(metacrilato de metilo). Se cortaron secciones de toda la articulación, incluyendo el hueso no descalcificado, con una sierra de baja velocidad usando hojas de diamante. Las secciones se montaron sobre portaobjetos de plástico, se molieron hasta aproximadamente 50 µm de grosor y se tiñeron superficialmente usando tinción de Giemsa modificada para secciones plásticas (21). Las articulaciones (rodilla, tobillo, tarsos y metatarsos) de los mismos animales que fueron visualizados por RM fueron evaluadas para determinar la presencia de inflamación y daño tisular usando las secciones histológicas. Se utilizó un sistema de histomorfometría Bio-quant para medir la superficie de erosión ósea.

Densidad mineral del hueso

15 La densidad mineral ósea (DMO) de los huesos en las articulaciones artríticas se midió mediante absorciometría de rayos X periférica dual (pDXA, Norland Medical Systems) adaptada para animales pequeños. Para esto se utilizaron los miembros posteriores intactos y la región de exploración incluyó los huesos del tobillo y del pie. El coeficiente de variación entre las mediciones fue inferior al 1%.

Examen visual e histológico de ratas con AIA

20 El desarrollo de artritis inducida por el adyuvante en las ratas está bien descrito en la bibliografía (20), y se resume brevemente aquí. Después de la inyección del coadyuvante, los cambios comienzan a hacerse evidentes aproximadamente 9 días después. Esto incluye una cierta inflamación alrededor de los ojos y genitales externos agrandados y blandos. La inflamación y la hinchazón de las articulaciones de los tobillos de las extremidades delantera y trasera se hacen evidentes unos 12 días después de la inyección del adyuvante.

25 En la necropsia a los 15 días después de la inyección del adyuvante, se puede observar la inflamación del peritoneo (peritonitis). Ocasionalmente, la inflamación del tracto gastrointestinal (GI) y la retención de líquidos en la cavidad peritoneal también son detectables. En forma general, la mayoría de los órganos vitales parecen ser normales, excepto que el bazo suele agrandarse con evidencia visual de inflamación.

30 Sin embargo, en el examen histopatológico, todos los órganos examinados mostraron signos de inflamación crónica. El tejido testicular muestra inflamación en las membranas alrededor del testículo, con pequeños granulomas en el epidídimo que son detectados. El tejido pericárdico demuestra inflamación crónica, que fácilmente podría permitir la acumulación de líquido en el tejido pericárdico. El tejido renal incluye áreas multifocales de formación de granulomas en el tejido cortical con cierta inflamación sobre la cápsula, particularmente a lo largo de posibles cambios en la superficie serosa. El tejido esplénico muestra áreas multifocales de necrosis rodeadas de neutrófilos y células epitelioideas. Las células plasmáticas y los linfocitos están respondiendo alrededor de este proceso, lo que indica una respuesta inflamatoria bastante severa en todo el tejido esplénico.

35 Las imágenes histológicas de las patas traseras de las ratas con AIA se presentan en la Figura 2. A menor aumento, es evidente el hinchamiento de la región de la articulación del tobillo y las patas de las ratas con AIA (Figura 2A). Es evidente una inflamación extensa, sinovitis, destrucción de hueso y cartílago (Figuras 2B a 2D). Se observan células inflamatorias alrededor de los vasos más grandes (Figura 2E). Por el contrario, las articulaciones de la rodilla de las ratas con AIA son típicamente menos afectadas por el proceso inflamatorio (Figura 2F).

Examen visual de las ratas con AIA después de la inyección azul de Evans

40 Para este experimento, se inyectó EB a las ratas 15 días después de la inyección del adyuvante. En este momento, hay una fuerte reacción inflamatoria evidente en las articulaciones del tobillo. Después de la inyección de EB, hubo una acumulación gradual de color azul en la pata trasera inflamada y patas delanteras de las ratas con AIA con alta densidad del color situado alrededor del tarso y el carpo. Algunas manchas azules profundas también se observaron en algunos dígitos de la pata. Las fotografías tomadas antes y después de la inyección del colorante EB confirman que las áreas con acumulación de colorante corresponden a aquellas con inflamación marcada. En las ratas de control sanas que recibieron EB, el colorante no se localizó en las áreas de las articulaciones como se observó en las ratas con AIA.

Imagenología de RM

50 La imagenología de ratas con AIA con P-DOTA-Gd³⁺ como agente de contraste. Inmediatamente antes de la inyección del agente de contraste P-DOTA-Gd³⁺, se realizó una IRM de línea de base. A los animales se les inyectó entonces el agente de contraste y se realizaron exploraciones de IRM a diferentes intervalos de tiempo. Las imágenes adquiridas fueron procesadas posteriormente utilizando el algoritmo de proyección de máxima intensidad (PMI). Las imágenes de PMI resultantes de los animales se representan cronológicamente en la Figura 3.

55 Como se muestra en la imagen de línea de base (Figura 3A) antes de la inyección de contraste, el intestino y el estómago del animal son claramente visibles probablemente debido a la retención de líquido. También se observan varias manchas irregulares en el abdomen inferior, que se pueden atribuir sitio o sitios de inyección i.p. de agentes anestésicos. Un área en el escroto, adyacente a los testículos en la región anatómica del epidídimo y tejido asociado,

también muestra una señal de RM difusa, tal vez debido a su contenido graso o acumulación de líquido. La mancha brillante en la región ciática derecha puede representar la retención de líquidos en un ganglio linfático inconsistente llamado 1c. El foramen Isquiático, que también es evidente en algunas de las imágenes posteriores de este animal. No se observó señal significativa de RM en las extremidades posteriores. Sin embargo, las articulaciones del tobillo se agrandaron claramente en la imagen latente cuando se compararon con imágenes similares de los controles.

A los cinco minutos después de la inyección del agente de contraste macromolecular, había una señal de RM sustancial en los riñones (Figura 3B). Un examen detallado de las imágenes bidimensionales de un solo plano indica que en este momento la mayor parte del agente de contraste está en la corteza renal con poco en la médula. Debido al aumento general del contraste de la imagen después de la inyección, la vejiga se hizo evidente como una imagen negativa (oscura) como la estructura de forma ovalada en el área abdominal inferior izquierda. También se observa un aumento del contraste en el hígado, el bazo y la médula ósea. Los vasos sanguíneos principales están claramente definidos, mientras que los vasos menores no son tan evidentes, probablemente debido a la limitada resolución de imágenes (aproximadamente 0,5 mm) con el escáner de IRM de 1,5 T. Sin embargo, los vasos parecen más grandes, tal vez dilatados, que los observados en los controles sanos. A excepción de cierta absorción en la médula ósea, poca señal de contraste significativa era evidente en este momento en la región inflamada del tobillo.

En las imágenes de RM (Figura 3C) de las ratas con AIA adquiridas 1 hora después de la inyección, la señal en la corteza de los riñones se redujo considerablemente en comparación con el tiempo anterior (5 minutos). Sin embargo, ahora la mayor parte del contraste parece concentrarse en la médula renal y la pelvis. Ambos uréteres contienen material de contraste y una señal sustancial es ahora evidente en la vejiga urinaria. Parece haber una ligera disminución de la señal de contraste de RM en el hígado, el bazo y la vasculatura sanguínea. Curiosamente, varios "puntos calientes" comienzan a aparecer alrededor del tarso, donde la inflamación más severa ocurre en este modelo animal.

A partir de las imágenes de RM adquiridas 2 horas (Figura 3D) y 3 horas (Figura 3E) después de la inyección del agente de contraste macromolecular, se observó una reducción gradual de la señal de contraste de RM en el riñón (corteza y médula), hígado, bazo y vasculatura. Hubo, sin embargo, una acumulación del material de contraste en la vejiga urinaria. Los "puntos calientes" detectados alrededor del tarso en el escaneo de 1 hora continúan expandiéndose y aumentando en contraste en las imágenes de 2 horas (Figura 4-B) y de 3 horas.

Cuando las ratas fueron escaneadas nuevamente 8 horas después de la inyección, las imágenes de RM (Figura 3F) adquiridas muestran una señal de RM muy reducida en todos los órganos vitales y vasos sanguíneos con una vejiga esencialmente indetectable, a pesar de que la señal corporal general permanece ligeramente mayor que la de las imágenes de línea de base. Sorprendentemente, sin embargo, la señal de contraste de MR se incrementa sustancialmente en la articulación del tobillo y la región del metatarso (Figura 4C). Los "puntos calientes" iniciales desaparecen y la señal de contraste de RM se distribuye más uniformemente alrededor del tejido de la articulación. También se observa alguna señal de contraste en las articulaciones posteriores de la rodilla, pero con una intensidad y tamaño mucho menor (Figura 4D).

Posteriormente, se volvieron a escanear los animales a las 32 horas y 48 horas después de la inyección, respectivamente (Figuras 3G y 3H). El aumento de contraste global de la señal de RM siguió disminuyendo respecto a lo observado en las imágenes de 8 horas. Sin embargo, la disminución del contraste de la imagen en el tejido de la articulación del tobillo parece ser mucho más lenta que la observada en otros tejidos y órganos. Incluso después de 48 horas, el efecto potenciador de los agentes de contraste macromoleculares inyectados sigue siendo visible en el tobillo trasero y en el tejido de la pata.

Formación de imágenes de ratas sanas con P-DOTA-Gd³⁺ como agente de contraste. En las imágenes de RM (Figura 3J) tomadas 5 minutos después de la inyección del agente de contraste macromolecular, los riñones de los animales sanos mostraron una señal de contraste extremadamente fuerte. Las imágenes bidimensionales en un solo plano indican que el contraste de RM reside tanto en la corteza como en la médula. Los dos uréteres laterales son parcialmente visibles. La vejiga urinaria se llena con una cantidad significativa de medio de contraste. El hígado, el bazo y la médula ósea fueron visibles en la imagen cuando se compararon con la imagen basal. Se destacaron también los vasos sanguíneos principales, incluyendo la aorta abdominal y la vena cava inferior. La disposición y apariencia de estos vasos parece ser normal. No se detectó señal de contraste fuera de los grandes vasos en las patas traseras.

En las imágenes de RM tomadas a 1 hora (Figura 3K) y a las 2 horas (Figura 3L) después de la inyección, queda poco medio de contraste en la corteza del riñón y la médula, pero quedó alguna señal de contraste en la pelvis renal y la vejiga. La mejora del contraste de la vasculatura se redujo ligeramente en comparación con la observada a los 5 minutos después de la inyección. A las 8 horas (Figura 3M) después de la inyección, el medio de contraste se eliminó completamente del tracto urinario. En este momento, algunos de los grandes vasos eran todavía evidentes, aunque menos que en instantes anteriores. Las imágenes tomadas a las 48 horas (Figura 3N) después de la inyección replican las imágenes de la línea base sin mejora de contraste detectable. Como era de esperar, todas las imágenes de RM tomadas en diferentes momentos después de la inyección no mostraron aumento de contraste en las articulaciones de las extremidades posteriores del animal.

Imagenología de ratas sanas y con AIA con OMNISCAN como agente de contraste.

Las imágenes adquiridas con la mejora de RM de un agente de contraste paramagnético de bajo peso molecular OMNISCAN (complejo de gadolinio de bismetilamida del ácido dietilentriamina pentaacético) se obtuvieron de forma similar a las inyectadas con P-DOTA-Gd³⁺.

5 A partir de la secuencia de imágenes presentada en la Figura 3 (3O a 3X), se observó un aumento de contraste de tejido muy rápido a los 5 minutos después de la inyección tanto en ratas sanas como con AIA (Figuras 3O y 3T). Sin embargo, la mejora del contraste disminuyó rápidamente, acompañada por una rápida depuración renal del medio de contraste. A las 8 horas (Figuras 3Q y 3W), desapareció básicamente la mejora. Curiosamente, las imágenes de 5 minutos (Figura 3O) de las ratas con AIA revelan una mejora significativa del contraste en las articulaciones inflamadas del tobillo, que se habían eliminado en el escaneo de 2 horas (Figura 3P). Sin embargo, no se encontró tal observación
10 en las ratas sanas. Básicamente, no se observó ningún aumento del contraste de la vasculatura sanguínea en todas las imágenes MR mejoradas con OMNISCAN.

15 Como se muestra en la Figura 3, todos los órganos vitales en las ratas con AIA mostraron una mayor absorción de P-DOTA-Gd³⁺ que las ratas sanas. Además, la eliminación del agente de contraste en estos órganos fue más lento que en las ratas sanas, especialmente en los riñones. Estas observaciones son consistentes con los hallazgos histológicos que todos los órganos en ratas con AIA, incluyendo corazón, hígado, pulmón, riñón y bazo tenían alguna inflamación crónica granulomatosa. La vasculatura de estos tejidos inflamados suele ser más porosa, lo que permite un mayor extravasado de macromoléculas al tejido intersticial. Estos pueden conducir a disfunción de órganos, tal como la demora en la depuración renal del agente de contraste polimérico en comparación con las ratas sanas. Sin embargo, la mayor eliminación de P-DOTA-Gd³⁺ de estos órganos se completó en pocas horas (<8 h) en las ratas con AIA. En
20 comparación con las ratas normales, los vasos sanguíneos principales parecen estar dilatados en las ratas con AIA. Esta observación puede deberse al nivel de prostaglandinas sobrerregulado en este modelo de inflamación sistemática (26). También puede ayudar a explicar la extravasación polimérica más rápida observada.

25 Sin embargo, interesantemente, la extravasación en las articulaciones inflamadas del tobillo se retrasó durante un corto tiempo (1 ~ 2 h) en el modelo AIA (Figuras 3A-3H). Los "puntos calientes" de alta señal de contraste de RM aparecieron más tarde alrededor del tarso indicando altas concentraciones locales de P-DOTA-Gd³⁺. Estos "puntos calientes" también revelan la ubicación de posibles daños locales en y alrededor de la articulación. El polímero continúa extravasándose, difundiéndose, acumulándose en las articulaciones del tobillo y las mayores concentraciones se observaron en las imágenes 8 horas después de la inyección (imágenes de RM ampliadas en un solo plano, Figura 4). Debido a que algunas concentraciones aumentadas de polímero se observaron todavía en la articulación a las 32 horas
30 después de la inyección, parece que la eliminación del polímero desde la articulación es relativamente lenta. Mediante la correlación de la acumulación de polímeros, tal como se detecta por IRM, con la histología de los mismos tejidos (Figuras 2A, 2B y 2D), es evidente que la acumulación del polímero se correlaciona con el grado de inflamación. Como se observó en las imágenes de RM de 8 horas, la acumulación de P-DOTA-Gd³⁺ en las articulaciones de la rodilla fue mucho menor que la observada en las articulaciones del tobillo (Figura 4D). Este hallazgo coincide muy bien con las cantidades y el grado de severidad de la inflamación observada histológicamente en las articulaciones (Figura 2F). En
35 contraste con la observación en ratas con AIA, no se observó extravasación de P-DOTA-Gd³⁺ a las articulaciones de tobillo o rodilla en las ratas de control sanas.

40 Los datos sugieren un perfil farmacocinético con un mecanismo de eliminación renal y una redistribución del copolímero de HPMA (marcado con DOTA-Gd³⁺) de los órganos principales y el compartimento de circulación sanguínea en las articulaciones inflamatorias artríticas. Comparado con el animal normal, el resultado de las imágenes de RM del modelo AIA demuestra claramente un efecto muy selectivo de direccionamiento y acumulación de polímeros en las articulaciones artríticas con un intervalo de tiempo de aproximadamente 1 a 2 días después de una sola inyección en bolo. Dado que la mayoría de los fármacos antiartríticos actuales no se dirigen específicamente a las articulaciones
45 artríticas y a los tejidos dañados, junto con una baja eficacia, el objetivo observado y la acumulación de los sistemas de suministro poliméricos a las articulaciones artríticas demuestran la gran eficacia y numerosas aplicaciones potenciales de esta invención para la administración y tratamiento de fármacos, por ejemplo, de artritis reumatoide.

50 Igualmente, la obtención de imágenes y la evaluación de los tejidos u órganos inflamatorios, tales como las articulaciones artríticas, con un agente de contraste macromolecular de IRM, también proporciona resultados de imagenología mucho mejores, como se muestra en las Figuras 3F y 4C, cuando se compara con el agente de contraste de IRM de bajo peso molecular, tal como OMNISCAN (Figura 3O). La invención permite un margen de tiempo mayor para un proceso de imagenología más largo y/o más detallado y/o sofisticado, que no puede ser realizado óptimamente, con los agentes actuales de imagenología de bajo peso molecular, tales como OMNISCAN. Se pueden revelar más detalles anatómicos con estos agentes de imagenología, que pueden tener muchas aplicaciones, tales como evaluación
55 preclínica de los efectos terapéuticos de los fármacos antiartríticos experimentales en un modelo animal y la evaluación clínica de la respuesta del paciente al tratamiento. Pueden obtenerse beneficios similares cuando se usa la invención con agentes de imagenología de PET, CT o escintigrafía gamma. Cuando se conjugan agentes de imagenología de RM, PET, CT o escintigrafía gamma con los sistemas de suministro poliméricos descritos en esta invención, serán capaces de proporcionar potentes herramientas de imagenología moleculares para la comprensión de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide.

60 Aunque la permeabilidad mejorada de la vasculatura en las articulaciones artríticas puede ser comparable a las encontradas en el tumor sólido, la retención del polímero en el tejido articular puede variar de acuerdo con la etapa de la

5 enfermedad. Se aplica un mecanismo rápido de escisión de fármaco para asegurar la liberación efectiva del fármaco desde el portador macromolecular. Una persona con conocimientos ordinarios en la técnica reconocerá que algunas características patológicas de las articulaciones artríticas pueden ser explotadas para esto. Por ejemplo, la liberación del fármaco del polímero puede ser facilitada por cosas tales como las muy altas actividades enzimáticas extracelulares (por ejemplo, catépsina K, MMP, etc.) (28), pH bajo, hipoxia o temperatura elevada (29). Igualmente, se pueden usar también medidas que aumenten la retención de los polímeros extravasados en las articulaciones de acuerdo con la invención (por ejemplo, los conjugados de fármaco polimérico). La incorporación de fracciones de direccionamiento, que se unirían al cartilago cargado negativamente (30), a la superficie del hueso recién erosionada (21) o a los factores reumáticos enriquecidos en las articulaciones con AR, también se pueden usar para aumentar la captación y retención del polímero en el tejido de la articulación. También se cree que, aumentando el peso molecular del portador polimérico, se puede lograr una mayor retención del polímero en la articulación con AR. Se pueden usar fármacos antiartríticos, tales como glucocorticoides, en el sistema de suministro de fármacos de la invención.

15 Como se reconocerá por un experto ordinario en la técnica, los fármacos antiinflamatorios, fármacos antiartríticos, fracciones de direccionamiento y agentes de imagenología, tal como se usan en la presente memoria, incluyen sales aceptables, ésteres o sales de tales ésteres. Por ejemplo, los glucocorticoides incluyen sales farmacéuticamente aceptables y ésteres de los mismos, por lo tanto, cuando se describe un fármaco, por ejemplo, dexametasona, también se describen sales farmacéuticamente aceptables de la misma, tales como palmitato de dexametasona.

20 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparten efectos toxicológicos no deseados a la misma.

Las sales de adición de bases y las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Berge y col., "Pharmaceutical Salts", J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19) REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18a edición (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) Y GOODMAN Y GILMAN'S, THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS (10ª edición, (2001)).

25 El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones.

30 Además, los fármacos proteínicos actualmente disponibles y el fármaco de bajo peso molecular disponible oralmente también pueden beneficiarse de los principios ilustrados en la invención. Por ejemplo, la extravasación del polímero inyectado en las articulaciones con AR se retrasó durante 1 a 2 horas. Por lo tanto, para los fármacos de proteína o péptido, deben sobrevivir este período de tiempo contra la depuración hepática y renal. Los fármacos proteínicos o peptídicos pueden estabilizarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, la PEGilación de la proteína y/o la modificación de la estructura principal del polímero puede proporcionar un medio beneficioso para resolver este problema (3).

35 Utilizando técnicas modernas de imagenología de RM, se observó la acumulación específica de macromoléculas en articulaciones artríticas en el modelo de rata de artritis inducida por adyuvante. Hubo una excelente correlación entre la captación y retención del polímero marcado con agente de contraste de RM con características histopatológicas de la inflamación y daño de tejido local. La metodología utilizada en este estudio demostró que los agentes de imagenología macromolecular (sistemas de suministro poliméricos conjugados con agentes de imagenología de RM, CT, PET, escintigrafía gamma) son herramientas poderosas de imagenología y evaluación para enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide. El uso de los agentes de imagenología macromoleculares también demuestra la utilidad del sistema de suministro con el fin de direccionar un fármaco, que es una mejora beneficiosa sobre los tratamientos actuales, por ejemplo, para el tratamiento de artritis reumatoide. La invención proporciona la capacidad de aumentar el potencial terapéutico y la ventana de dosificación de los fármacos reduciendo sus efectos secundarios. Además, la invención puede tener una semivida más larga en la circulación sanguínea cuando se compara con fármacos de bajo peso molecular, lo que puede aumentar la biodisponibilidad del fármaco. Además, la invención puede usarse para volver hidrófobo un fármaco hidrófilo y, particularmente para fármacos a base de péptidos, reducir la inmunogenicidad.

45 Para demostrar los efectos terapéuticos superiores de la invención, se sintetizó un copolímero de HPMA que contiene una fracción de direccionamiento con un fármaco antiartrítico. La hidracina se usó como la fracción de direccionamiento, ya que se puede unir a las fracciones cargadas negativamente en el cartilago. El fármaco antiartrítico, dexametasona, se unió a la cadena principal del polimérico (P-Dex) a través de un enlace hidrazona sensible al pH como se ilustra en la Figura 6. El polímero con la hidracina y la dexametasona unidos se inyectó luego en ratas con AIA (4/grupo) al día 13 después de la inducción de la artritis. Se administró una dosis única de 10 mg (P-Dex)/kg. Como control, se dividió la misma dosis de fosfato sódico de dexametasona de bajo peso molecular (Dex) en 4 dosis iguales y se administró una dosis cada día a otro grupo de ratas con AIA (4/grupo) a partir del día 13-16 después de la inducción de artritis. Como se muestra en la Figura 7, ambos grupos de animales mostraron una disminución dramática de la hinchazón de la articulación del tobillo después de las inyecciones el día 13. Sin embargo, con el cese de las inyecciones diarias del Dex de control, la inflamación empeoró rápidamente mientras que la inflamación en el grupo P-Dex tuvo una supresión prolongada. Estas ventajas significativas del tratamiento con P-Dex se pueden atribuir al direccionamiento específico y a la retención mejorada (debido a la fracción de direccionamiento al cartilago) del sistema de suministro polimérico a las

articulaciones artríticas de los animales.

5 Para reforzar las estadísticas de los efectos terapéuticos superiores observados del sistema de suministro, se realizó un estudio con grupos de animales más grandes (7/grupo). Uno de los impactos significativos de la inflamación de la artritis reumatoide es el daño al hueso en las articulaciones, que es evidente en la Figura 8 de los animales sin tratamiento (solución salina). Los glucocorticoides, tales como la dexametasona (Dex), pueden retardar la erosión ósea reduciendo la inflamación de las articulaciones, como es evidente en la Figura 8 de animales con tratamiento con Dex. Sin embargo, tal mejora puede ser fuertemente reforzada si Dex se conjuga con un copolímero de HPMA. La inhibición de la inflamación se prolonga (Figura 7) y el hueso está bien conservado en el grupo de animales tratados con P-Dex con una DMO similar al grupo sano. Un factor más dinámico a considerar en el metabolismo óseo es el grado de erosión ósea. La superficie erosionada del hueso se correlaciona directamente con el reclutamiento y la actividad de los osteoclastos, que son las células responsables de la resorción ósea y el desarrollo de daño óseo. En la Figura 9, se resumen los datos de la superficie de erosión ósea para todos los grupos de tratamiento. De nuevo, el grupo con P-Dex mostró un menor porcentaje de superficie de erosión comparado con el grupo con Dex. El análisis histológico de las articulaciones artríticas con diferentes tratamientos también confirmó la superioridad del tratamiento con P-Dex (Fig. 10).
 10 La cadena principal polimérica soluble en agua de la invención es un copolímero de HPMA. La invención puede incluir, opcionalmente, uno o más fracciones de direccionamiento, que pueden usarse para dirigir el sistema de suministro a un tejido específico, tal como hueso, cartílago, etc. Ejemplos ilustrativos de fracciones de direccionamiento incluyen, pero no se limitan a bisfosfonatos, grupos amonio cuaternario, péptidos (por ejemplo, oligo-Asp u oligo-Glu), ácido aminosalicílico y/o anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos (por ejemplo, Fab, anticuerpos humanizados y/o scFv). Una fracción de direccionamiento puede enlazarse a la cadena principal polimérica a través de enlaces covalentes o físicos (enlaces). Opcionalmente, los espaciadores entre una fracción de direccionamiento y la cadena principal polimérica pueden ser escindida tras un estímulo que incluye, pero no se limita a, cambios en el pH, presencia de una actividad enzimática específica (por ejemplo, catepsina K, MMP, etc.), cambios en niveles de oxígeno, etc. Los espaciadores entre el agente terapéutico y la cadena principal polimérica pueden escindirse mediante un estímulo que incluye cambios en el pH. Opcionalmente, se puede unir una etiqueta (o etiquetas) de bioensayo a la cadena principal polimérica. Puede ser cualquier etiqueta conocida en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, un radioisótopo, biotina, oro, etc. Su porcentaje en moles promedio por cadena de polímero puede variar de 0% hasta aproximadamente 50%.

El marcador de bioensayo y/o la fracción de direccionamiento puede enlazarse a la cadena principal polimérica soluble en agua por medio de un espaciador. Los espaciadores son conocidos en la técnica y la persona con conocimientos ordinarios en la técnica puede seleccionar un espaciador basado en longitud, reactividad, flexibilidad y similares. Por ejemplo, un espaciador puede ser un alquilo o alquino que tiene de uno a 50, preferiblemente de uno a 15 carbonos. El espaciador puede ser una secuencia peptídica (por ejemplo, seleccionada de todos los aminoácidos naturales) que tiene de uno a 20, preferiblemente de uno a 10 residuos. En aún otro ejemplo, un espaciador puede contener un enlace hidrazona que es escindible bajo un pH ácido. Estos espaciadores pueden escindirse tras un estímulo que incluye, pero no se limita a, cambios en el pH, presencia de una actividad enzimática específica (por ejemplo, catepsina K, MMP, etc.), cambios en los niveles de oxígeno, etc.

Opcionalmente, el entrecruzamiento biodegradable mostrado en la Figura 5 puede entrecruzarse, hasta cierto punto, la cadena principal polimérica lineal. El sistema de suministro resultante conserva todavía su solubilidad en agua. El enlace en sí es preferiblemente escindible en condiciones fisiológicas.

40 Como apreciará un experto en la técnica, cada clase (por ejemplo, agente terapéutico, fracción de direccionamiento, marcador de bioensayos, separador y/o agente de imagenología) puede comprender cualquier número de compuestos o composiciones diferentes. Por ejemplo, el agente terapéutico puede consistir en una mezcla de uno o más FAINES y uno o más glucocorticoides, tales como una combinación de dexametasona e hidrocortisona. Por lo tanto, la invención proporciona la ventaja de que se puede incorporar cualquier combinación de diferentes agentes terapéuticos, fracciones de direccionamiento, marcadores de bioensayos, espaciadores y/o agentes de imagenología sobre la cadena principal polimérica soluble en agua. Como resultado, se puede crear un sistema de suministro de fármacos o de imagenología con dos o más agentes terapéuticos diferentes y/o dos o más fracciones de direccionamiento diferentes y/o dos o más marcadores de bioensayos diferentes, y/o dos o más espaciadores diferentes (uno o más de los cuales puede ser escindible, en donde el estímulo puede ser diferente para diferentes espaciadores) y/o dos o más agentes de imagenología. Por ejemplo, se pueden combinar uno o más agentes de imagenología con uno o más agentes terapéuticos, para producir una combinación de fármaco/agente de imagenología que, por ejemplo, se puede usar para tratar y/o monitorear al sujeto. Un ejemplo de realización de tal fármaco/agente de imagenología es un método para determinar los efectos de un fármaco o combinación de fármacos particular. Por ejemplo, el fármaco/agente de imagenología puede contener un fármaco candidato en el que el agente de imagenología permite una supervisión mejorada de los efectos de fármacos candidatos. En otra realización a modo de ejemplo, el fármaco/agente de imagenología puede usarse también para tratar un sujeto y para monitorear la respuesta de los sujetos al tratamiento.

Una cantidad eficaz de un fármaco es bien conocida en la técnica y cambia debido a la edad, el peso, la gravedad del estado del sujeto, el compuesto particular en uso, la concentración de la preparación y el modo de administración. La determinación de una cantidad eficaz se deja preferiblemente a la prudencia de un médico tratante, pero puede determinarse usando métodos bien conocidos en la técnica (37, 38). Las composiciones de la invención se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, la preparación de una composición farmacéutica es conocida en la técnica (37, 38).

Las composiciones se pueden administrar por cualquier medio deseable y apropiado. Para el suministro *in vivo* (es decir, a un sujeto que tiene artritis u otras enfermedades inflamatorias), se prefiere que el sistema de suministro sea biocompatible y preferiblemente biodegradable y no inmunogénico. Además, es deseable suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto en un vehículo fisiológicamente aceptable. La inyección en un individuo puede ser de forma subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular o, por ejemplo, directamente en un área localizada. Alternativamente, el suministro *in vivo* puede lograrse mediante el uso de un jarabe, un elixir, un líquido, un comprimido, una píldora, una cápsula de liberación en el tiempo, un aerosol, un parche transdérmico, una inyección, un goteo, un ungüento, etc.

Abreviaturas

10 AIA, artritis inducida por adyuvante; AIBN, 2,2'-azobisisobutironitrilo; APMA, clorhidrato de N-(3-aminopropil) metacrilamida; DMO, densidad mineral ósea; COX-2, ciclooxigenasa-2; TC, tomografía computarizada; Dex, fosfato sódico de dexametasona; FARME, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; DIPEA, diisopropiletilamina; DOTA, 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra(ácido acético); éster DOTA-NHS, mono(N-hidroxisuccinimidil éster)del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris(ácido acético)-10-acético; DTPA-Gd³⁺, complejo de gadolinio con ácido dietilentriamina pentaacético; DXA, absorciometría dual de rayos X; EB, azul de Evans; PRM, permeabilidad y retención mejorada; ¹⁸FDF-F, fluorodesoxiglucosa; FITC, isotiocianato de fluoresceína; FPLC, cromatografía líquida rápida de proteínas; HPMA, N-(2-hidroxipropil)metacrilamida; ICP-OES, espectroscopia de emisión óptica de plasma inductivamente acoplado; IL-1Ra, antagonista del receptor de interleuquina1; LA, N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)propanodiamina; MA-FITC, N-metacriloilaminopropil fluoresceína tiourea; MA-GG-NHNH₂, N-metacriloilglicilglicilhidrazina; Mn, peso molecular promedio en número; MPA, ácido mercaptopropiónico; IRM imagenología de resonancia magnética; Pm, peso molecular promedio ponderado; FAINE, tratamiento sintomático con fármacos antiinflamatorios no esteroideos; OA, osteoartritis; OMNISCAN o gadodiamida es la formulación inyectable del complejo de gadolinio de bismetilamida del ácido dietilentriamina pentaacético; P-Dex, conjugado de dexametasona con copolímero de HPMA, MA-GG-NHNH₂ y MA-FITC a través de unión de hidrazona (Figura 6); PET, tomografía de emisión positrónica; PHPMA, poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida]; poli(HPMA-co-APMA-co-MA-FITC), copolímero de HPMA, APMA y MA-FITC; P-DOTA, producto de conjugación de poli(HPMA-co-APMA-co-MA-FITC) y éster DOTA-NHS; P-DOTA-Gd³⁺, complejo purificado de P-DOTA y Gd³⁺; AR, artritis reumatoide; TA, temperatura ambiente; SEC, cromatografía de exclusión por tamaño; scFv, fragmento variable de cadena sencilla; ATM, síndrome de articulación temporomandibular; FNT, factor de necrosis tumoral.

30 Referencias

1. G.S. Firestein. Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. En S. Ruddy, E. D. Harris Jr. y C. B. Sledge (ed.) Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Ed. W.B. Saunders Company, St. Louis, 1997, página 921.
2. F. C. McDuffie. Morbidity impact of rheumatoid arthritis in society. Am. J. Med. 78: 1-5 (1985).
- 35 3. J. S. Smolen y G. Steiner. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. Nature Review Drug Discovery 2: 473-488 (2003).
4. W. J. Wallis, P. A. Simkin y W. B. Nelp. Protein traffic in human synovial effusion. Arthritis and Rheumatism 30: 57-63 (1987).
5. J. R. Levick. Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins. Arthritis and Rheumatism 24: 1550-1560 (1981).
- 40 6. M. Albuquerque y J. P. de Lima. Articular lymphoscintigraphy in human knees using radiolabeled dextran. Lymphology 23: 215-218 (1990).
7. L. S. Wilkinson y J. C. W. Edwards. Demonstration of lymphatics in human synovial tissue. Rheumatol. Int. 11: 151-155 (1991).
8. E. L. Matteson. Current treatment strategies for rheumatoid arthritis. Mayo Clin. Proc. 75: 69-74 (2000).
- 45 9. E. Santana-Sahagun y M. H. Weisman. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. En S. Ruddy, E. D. Harris Jr. y C. B. Sledge (ed.) Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Ed. W.B. Saunders Company, St. Louis, 1997, páginas 799-822.
10. C. M. Stein y T. Pincus. Glucocorticoids. En S. Ruddy, E. D. Harris Jr. y C. B. Sledge (ed.) Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Ed. W.B. Saunders Company, St. Louis, 1997, páginas 823-840.
- 50 11. J. Kopecek, P. Kopecková, T. Minko y Z. R. Lu. HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50: 61-81 (2000).
12. L. W. Seymour. Passive tumor targeting of soluble macromoleculaeas and drug conjugates. Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 135-187 (1992).
13. J. M. Metselaar, M. H. Wauben, J. P. Wagenaar-Hilbers, O. C. Boerman y G. Storm. Complete remission of

- experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. *Arthritis Rheum.* 48: 2059-2066 (2003).
- 5 14. M. N. J. Paley, I. D. Wilkinson, E. van Beek y P. D. Griffiths. Magnetic resonance imaging: basic principles. En R. G. Grainger, D. Allison, A. Adam y A. K. Dixon (ed.) *Grainger & Allison's Diagnostic Radiology: A Textbook of Medical Imaging*, 4th Ed. Churchill Livingstone, Inc. London, 2001, páginas 101-136.
15. J. Kopecek y H. Bazilová. Poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]. I. Radical polymerization and copolymerization. *Eur. Polym. J.* 9: 7-14 (1973).
16. V. Omelyanenko, P. Kopecková, C. Gentry y J. Kopecek. Targetable HPMA copolymer-adriamycin conjugates. Recognition, internalization, and subcellular fate. *J. Controlled Release* 53: 25-37 (1998).
- 10 17. T. H. Cronin, H. Faubl, W. W. Hoffman y J. J. Korst. Xylene-diamines as antiviral agents. *Patente estadounidense* No. 4.034.040, 1977.
18. S. Moore y W. H. Stein. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211: 907-913 (1954).
- 15 19. Z. R. Lu, X. Wang, D. L. Parker, K. C. Goodrich, H. R. Buswell. Poly(1-glutamic acid) Gd(III)-DOTA conjugate with a degradable spacer for magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem.* 14: 715-719 (2003).
20. A. M. Bendele. Animal models of rheumatoid arthritis. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 1: 377-385 (2001).
21. D. Wang, S. C. Miller, M. Sima, P. Kopecková, y J. Kopecek. Synthesis and evaluation of watersoluble polymeric bone-targeted drug delivery systems. *Bioconjug. Chem.* 14: 853-859 (2003).
- 20 22. I. Kushner y J. A. Somerville. Permeability of human synovial membrane to plasma proteins. Relationship to molecular size and inflammation. *Arthritis and Rheumatism* 14: 560-570 (1971).
23. T. P. Jacobs, O. Kempinski, D. McKinley, A. J. Dutka, J. M. Hallenbeck, G. Feuerstein. Blood flow and vascular permeability during motor dysfunction in a rabbit model of spinal cord ischemia. *Stroke* 23: 367-373 (1992).
24. Y. Matsumura, H. Maeda. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46: 6387-6392 (1986).
- 25 25. M. A. Brown y R. C. Semelka. *Principles of Magnetic Resonance Imaging*. En M. A. Brown y R. C. Semelka (ed.) *MRI: Basic Principles and Applications*, 3rd Ed. Wiley-Liss, New York, 2003, páginas 27-42.
26. D. Claveau, M. Sirinyan, J. Guay, R. Gordon, C. C. Chan, Y. Bureau, D. Riendeau y J. A. Mancini. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 production in the rat adjuvant-induced arthritis model. *J. Immunol.* 170: 4738-4744 (2003).
- 30 27. M. I. V. Jayson y A. St. J. Dixon. Intra-articular pressure in the rheumatoid arthritis of knee. I. Pressure changes during passive joint distension. *Ann. Rheum. Dis.* 29: 261-265 (1970).
28. Y. Okada. Proteinases and Matrix Degradation. En S. Ruddy, E. D. Harris Jr. y C. B. Sledge (ed.) *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 6th Ed. W.B. Saunders Company, St. Louis, 1997, páginas 55-72.
- 35 29. P. S. Treuhaft y D. J. McCarty. Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases. *Arthritis and Rheumatism* 14: 475- 484 (1971).
30. I. Giraud, M. Rapp, J. C. Maurizis y J. C. Madelmont. Application to a cartilage targeting strategy: synthesis and in vivo biodistribution of 14 C-labeled quaternary ammonium-glucosamine conjugates. *Bioconjug. Chem.* 11: 212-218 (2000).
- 40 31. M. Rapp, Giraud I., Maurizis J.C., Galmier M.J., Madelmont J.C. Synthesis and in vivo biodisposition of [14C]-quaternary ammonium-melphalan conjugate, a potential cartilage-targeted alkylating drug. *Bioconjug Chem.* 14(2): 500-6 (2003).
32. A. Wunder, Muller-Ladner U., Stelzer E.H., Funk J., Neumann E., Stehle G., Pap T., Sinn H., Gay S., Fiehn C. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 170(9): 4793-801 (2003).
- 45 33. S. L. Timofeevski, Panarin E.F., Vinogradov O.L., Nezhentsev M.V. Anti-inflammatory and antishock water-soluble polyesters of glucocorticoids with low level systemic toxicity. *Pharm Res.* 13(3): 476-80 (1996).
34. H. Kitamura, Kato A., Esaki T. AG-041R, a novel indoline-2-one derivative, induces systemic cartilage hyperplasia in rats. *Eur J. Pharmacol.* 418(3): 225-30 (2001).

35. F. Demsar, Van Dijke C.F., Kirk B.A., Kapila S., Peterfy C.G., Roberts T.P., Shames D.M., Tomazic S., Mann J., Brasch R.C. Mapping abnormal sinovial vascular permeability in temporomandibular joint arthritis in the rabbit using MRI. *Br. J. Rheumatol.* 35(Suppl 3): 23-25 (1996).

5 36. P. B. Jacobson, Morgan S.J., Wilcox D.M., Nguyen P., Ratajczak C.A., Carlson R.P., Harris R.R., Nuss M. A new spin on an old model: in vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat. *Arthritis Rheum.* 42(10): 2060-73 (1999).

37. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed, A. Gilman, J. Hardman y L. Limbird, eds., McGraw-Hill Press (2001).

38. *Remington's Pharmaceutical Science's*, 18th ed. Easton: Mack Publishing Co. (1990).

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que comprende:
 un copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) soluble en agua y una cantidad eficaz de un agente terapéutico antiinflamatorio unido a dicho copolímero de HPMA soluble en agua, en donde el copolímero de HPMA soluble en agua está unido al agente terapéutico antiinflamatorio a través de un espaciador que comprende un enlace hidrazona.
2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una fracción de direccionamiento unida al copolímero de HPMA soluble en agua.
3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la enfermedad inflamatoria comprende artritis reumatoide.
4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un marcador de bioensayo enlazado al copolímero de HPMA soluble en agua.
5. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente terapéutico antiinflamatorio es un glucocorticoide.
6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la fracción de direccionamiento dirige la composición al hueso o cartílago.
7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 6, en la que la fracción de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en bifosfonatos, grupos de amonio cuaternario, péptidos, oligo-Asp, oligo-Glu, ácido aminosalicílico, anticuerpos y fragmentos o derivados en esto.
8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2, o 6-7, en la que la unión entre la fracción de direccionamiento y el polímero soluble en agua es escindible.
9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2, o 6-7, en la que la unión entre la fracción de direccionamiento y el polímero soluble en agua es no escindible.
10. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos, FAINE, FARME, glucocorticoides, metotrexato, sulfasalazina, cloroquina, oro, sal de oro, cobre, sal de cobre, penicilamina, D-penicilamina, ciclosporina, y mezclas de los mismos.
11. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en un disolvente acuoso o diluyentes para uso en el suministro de una composición acuosa a un sujeto que se piensa que tiene artritis reumatoide; y
 permitiendo la acumulación y direccionamiento de la composición farmacéutica en una articulación artrítica, mejorando así el tratamiento de la artritis.
12. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además reducir un efecto secundario del agente terapéutico en tejidos distinto de la articulación artrítica.
13. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en FAINE, FARME, inhibidor de ciclooxigenasa-2, un glucocorticoide, un bloqueador de factor de necrosis tumoral y un antagonista de receptor de interleuquina 1.
14. Una composición para imaginar y evaluar una enfermedad inflamatoria que comprende:
 un copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) soluble en agua y una cantidad eficaz de un agente de imagenología médica unido a dicho copolímero de HPMA soluble en agua, y en donde dicho copolímero de HPMA soluble en agua comprende además un agente terapéutico antiinflamatorio unido a dicho copolímero de HPMA soluble en agua, en donde el copolímero de HPMA soluble en agua está unido al agente terapéutico antiinflamatorio a través de un espaciador que comprende un enlace hidrazona.
15. La composición de la reivindicación 14, en la que el agente de imagenología médica se selecciona del grupo que consiste en al menos uno de un agente de IRM, PET, CT y escintigrafía gamma.
16. La composición de la reivindicación 14, que comprende además una fracción de direccionamiento unida al copolímero de HPMA soluble en agua.
17. La composición de la reivindicación 14, en la que la enfermedad inflamatoria comprende artritis.
18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14-17, que comprende además un marcador de bioensayo enlazado al copolímero de HPMA soluble en agua.

19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14-18, que comprende además un espaciador entre el agente formador de imágenes y el copolímero de HPMA soluble en agua, en la que el espaciador es escindible.
20. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14-18, que comprende además un espaciador entre el agente de imagenología y el copolímero de HPMA soluble en agua, en donde el espaciador no es escindible.
- 5 21. La composición de la reivindicación 14, en la que la fracción de direccionamiento dirige la composición a un tejido específico.
22. La composición de la reivindicación 21, en la que la fracción de direccionamiento dirige la composición al hueso o cartílago.
- 10 23. La composición de la reivindicación 21, en la que la fracción de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en bisfosfonatos, grupos de amonio cuaternario, péptidos, oligo-Asp, oligo-Glu, ácido aminosalicílico, anticuerpos y fragmentos o derivados de los mismos.
24. La composición de la reivindicación 14, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos, FAINE, glucocorticoides, metotrexato, sulfasalazina, cloroquina, oro, sal de oro, cobre, sal de cobre, penicilamina, D-penicilamina, ciclosporina, y sus mezclas.
- 15 25. Un método para formar la imagen de una enfermedad inflamatoria, comprendiendo el método:
Formar la imagen de una enfermedad inflamatoria de un paciente o un modelo animal con un equipo de IRM, PET, CT o escintigrafía gamma antes de haberle administrado a dicho paciente o modelo animal la composición de la reivindicación 14 y formar la imagen después de haberle administrado a dicho paciente o modelo animal la composición de la reivindicación 14.
- 20 26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende además realizar un ensayo de biodistribución.
27. El método de acuerdo con la reivindicación 25 o 26, que comprende además dirigir el copolímero de HPMA soluble en agua a un tejido específico.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el direccionamiento del compuesto se dirige al hueso o al cartílago.
- 25 29. El método de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en el que el direccionamiento del compuesto a un tejido específico comprende utilizar una fracción de direccionamiento seleccionado del grupo que consiste en bifosfonatos, grupos de amonio cuaternario, péptidos, oligo-Asp, oligo-Glu, ácido aminosalicílico, anticuerpos y fragmentos o derivados de los mismos.
- 30 30. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-29, que comprende además escindir un enlace entre la fracción de direccionamiento y el copolímero de HPMA soluble en agua.
31. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la formación de imágenes de una enfermedad inflamatoria de un paciente o modelo animal mejora con el compuesto que comprende imagenología de una articulación artrítica.
32. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en el que el agente de imagenología médico se selecciona del grupo que consiste en al menos un agente de IRM, PET, CT, escintigrafía gamma y combinaciones de los mismos.
- 35 33. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente terapéutico comprende una pluralidad de agentes terapéuticos distintos.
34. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 2, 6, o 7, en la que la fracción de direccionamiento comprende una pluralidad de distintas fracciones de direccionamiento.
- 40 35. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 34, en la que la pluralidad de distintas fracciones de direccionamiento se dirige a una pluralidad de tejidos.
36. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el marcador de bioensayo comprende una pluralidad de distintos marcadores de bioensayo.
37. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el espaciador comprende una pluralidad de espaciadores químicamente distintos.
- 45 38. La composición de la reivindicación 14, en la que el agente de imagenología comprende una pluralidad de agentes de imagenología distintos.
39. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en el que el agente de imagenología comprende al menos dos agentes de imagenología, en donde cada uno de los dos agentes de imagenología se utiliza en una técnica de imagenología diferente.

40. Una composición que comprende un copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida soluble en agua unido a una fracción de direccionamiento y a un glucocorticoide a través de un enlace de hidrazona sensible al pH.
41. La composición de la reivindicación 40, en la que el glucocorticoide es dexametasona.
42. La composición de la reivindicación 40, en la que la fracción de direccionamiento es hidracina.
- 5 43. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la fracción de direccionamiento es hidracina.

FIG. 1

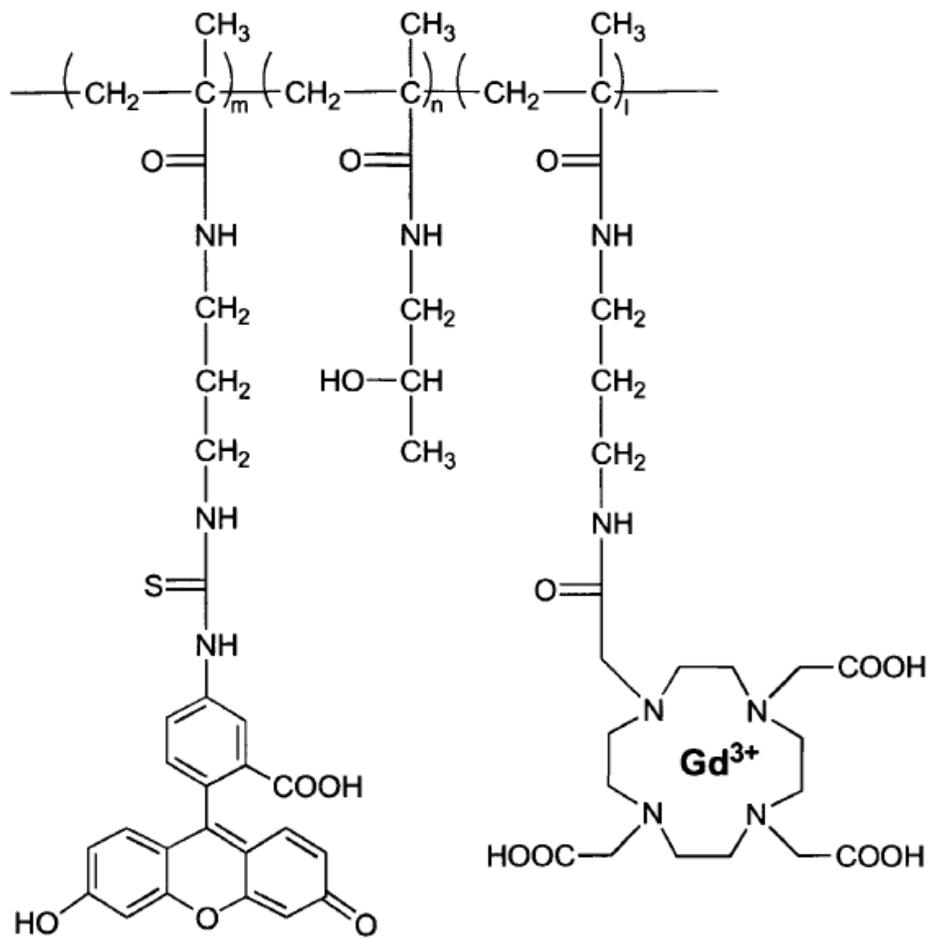


FIG. 2

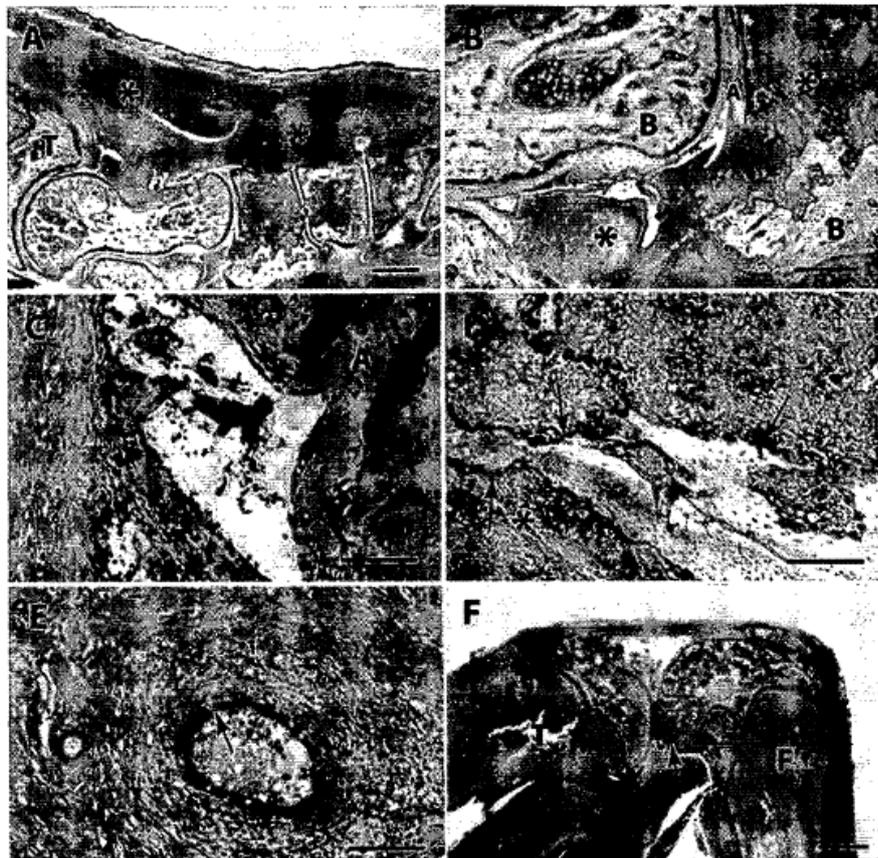


FIG. 3

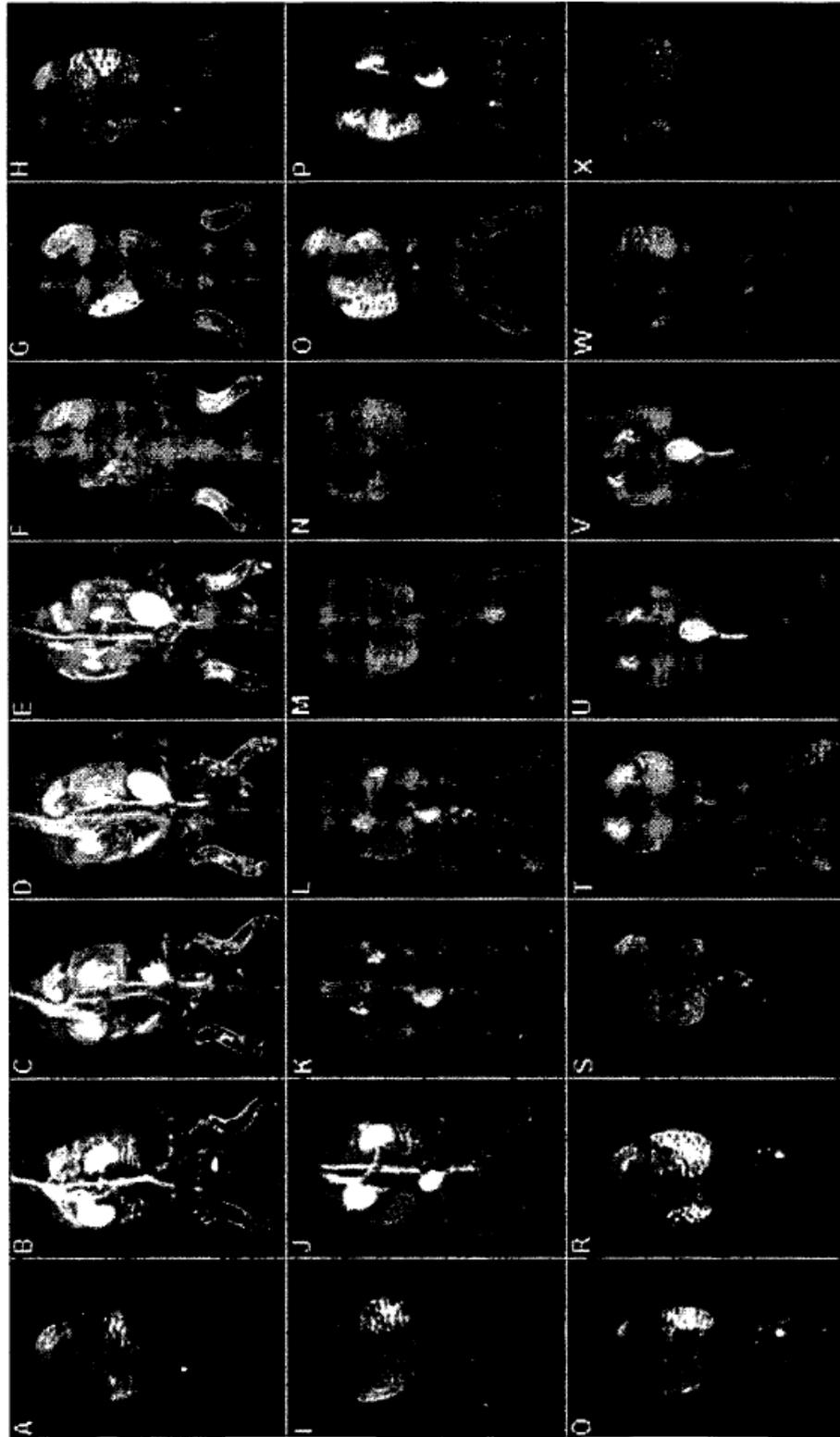


FIG. 4

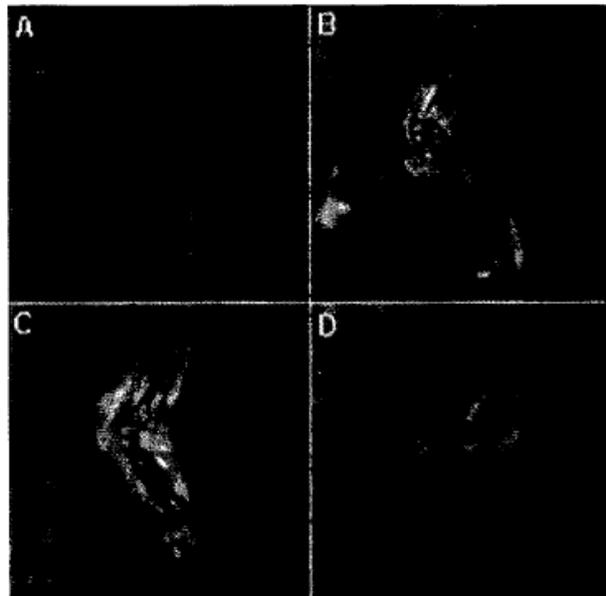
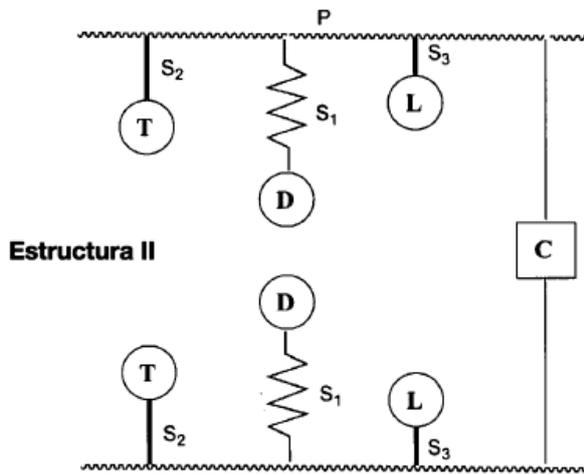
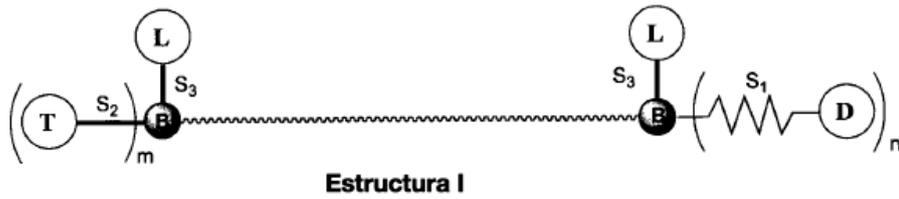


FIG. 5



T Fracciones de direccionamiento unidas covalentemente al polímero terminal o cadena principal a través del espaciador S_2 ———

D Fármacos antiinflamatorios o agentes de imagenología no invasivos o mezcla de ambos, unidos al polímero a través del espaciador S_1 ———

L Marcador de bioensayo opcional unido covalentemente a la cadena principal polimérica a través del espaciador no degradable S_3 ———

B Estructura de ramificación

————— **C** ————— Entrecruzamiento biodegradable opcional en el sistema de suministro

~~~~~ Cadena principal polimérica inerte del sistema de suministro, P

FIG. 6

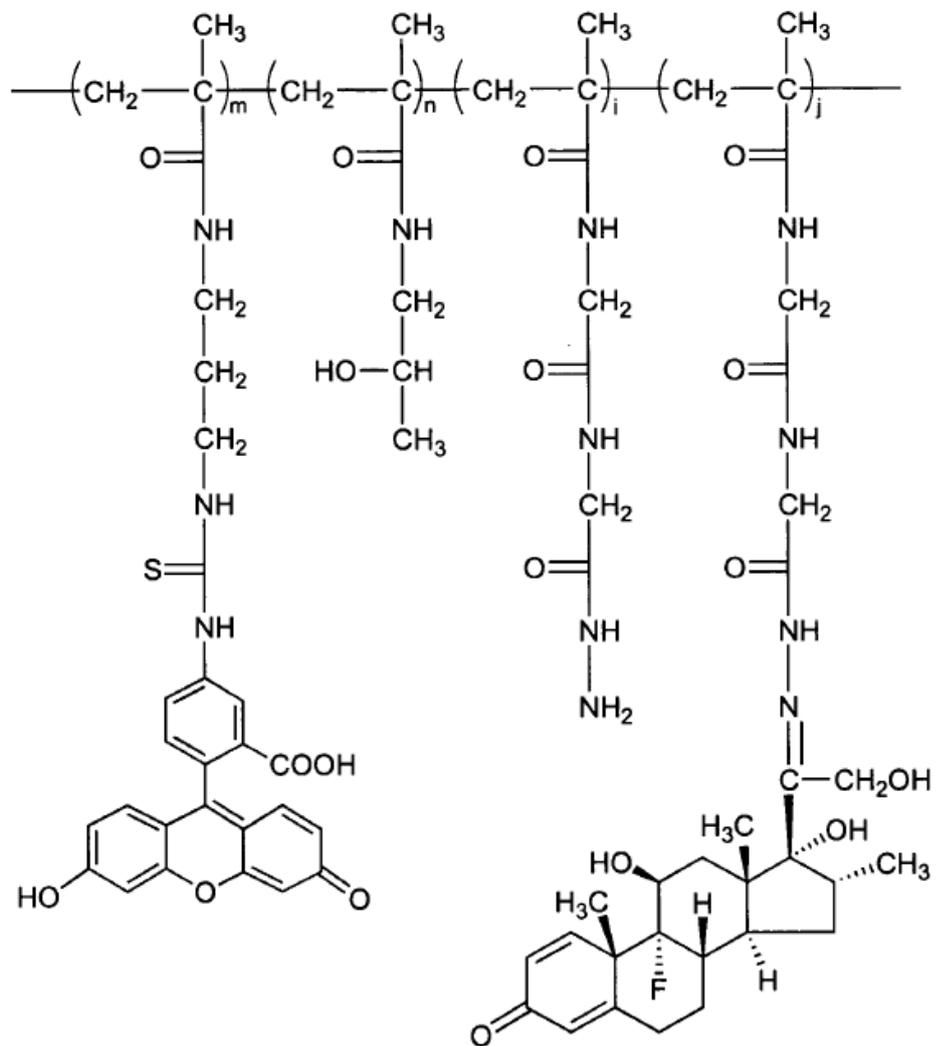


FIG. 7

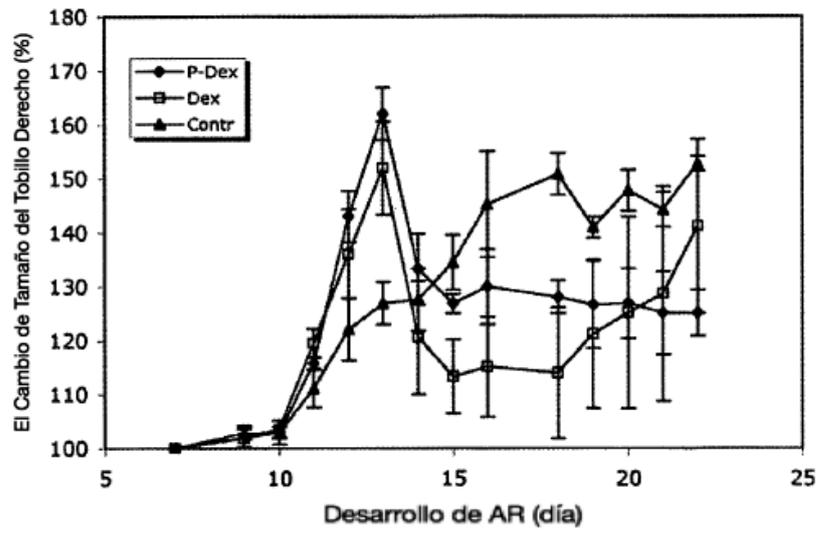


FIG. 8

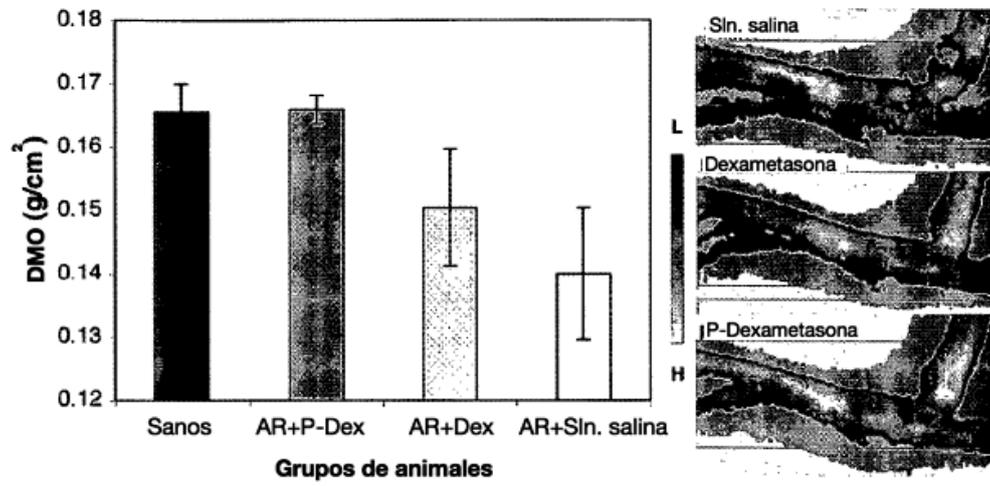


FIG. 9

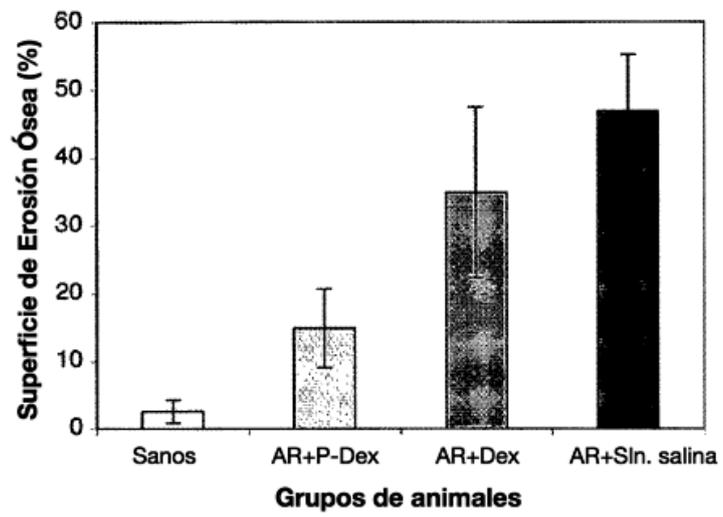


FIG. 10

